

山口 仁孝 論文内容の要旨

主 論 文

Biological and biochemical characterization of mice expressing prion protein devoid of the octapeptide repeat region after infection with prions

プリオンタンパク質オクタペプチドリピート領域欠損マウスのプリオン感染における生物学的および生物化学的特徴

山口仁孝、宮田博規、内山圭司、大津山彰、犬伏祥子、森剛志、村松直美、片峰 茂、坂口末廣

PLoS One 2012 ; 7(8) : e43540

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：西田 教行 教授)

緒 言

プリオン病は、プリオンの感染により起こる神経変性疾患である。プリオンが感染すると、神経細胞に発現する正常プリオンタンパク質(PrP^C)が、部分的にプロテナーゼK(PK)抵抗性を獲得した異常プリオンタンパク質(PrP^{Sc})へ構造変換する。しかし、この構造変換のメカニズムは不明である。

PrP^CのN末領域には、8個のアミノ酸配列が5回繰り返されたオクタペプチドリピート(OR)と呼ばれる特徴的な領域が存在する。この領域は銅イオンと結合することが知られている。しかしPrP^Cの機能における銅イオンの役割はいまだ不明である。我々は、以前、OR領域のみを欠損したPrP^{ΔOR}を発現するTg(PrP^{ΔOR})/Prnp^{0/0}マウスを作出した。本研究では、プリオン感染時のPrP構造変換におけるOR領域の役割を明らかにするため、Tg(PrP^{ΔOR})/Prnp^{0/0}マウスにプリオンを感染させ、潜伏期間、神経症状、病理学的変化等を野生型対照群と比較検討した。

対象と方法

Tg(PrP^{ΔOR})/Prnp^{0/0}マウスと野生型(C57BL/6)マウスの脳内にスクレイピー由来プリオン(RML株)を接種し、潜伏期を算出した。発症したマウスの脳と脊髄を採材し、免疫学的及び組織化学的解析を行った。臓器の感染価はバイオアッセイ法にて算出した。

またプリオン持続感染細胞(N2aC24L1-3)に、各種変異PrP発現ベクターをリポフェクション法にて導入した。2日後に細胞ライセートを作製し、ウェスタンブロッティング(WB)に供した。導入したPrPには3F4抗体エピトープを挿入し、内因性PrPと区別した。

結 果

野生型マウスは感染後165±4日に、Tg(PrP^{ΔOR})/Prnp^{0/0}マウスは147±9日にて発症した。野生型マウスの脳組織内PrP^{Sc}と比べ、Tg(PrP^{ΔOR})/Prnp^{0/0}マウス脳内のPrP^{Sc}

蓄積量は少なく、一方脊髄内ではやや多く検出された。免疫組織染色では **Tg(PrP Δ OR)/Prnp^{0/0}**マウスのアストログリオシスは野生型マウスと比べて脳内では弱く、脊髄内ではやや強く観察された。感染価も野生型マウスと比べて、**Tg(PrP Δ OR)/Prnp^{0/0}**マウスの脳内では低く、脊髄ではやや高く検出された。これらの結果から、**OR**領域の有無がプリオン感染部位に影響することが分かった。

OR領域を含むアミノ酸 **32-88**を欠損した **PrP Δ 32-88**発現ベクターを用いて、プリオン感染細胞での構造変換を検討した。**N**末領域には、3個のリジンと2個のプロリンを含む塩基性領域が存在する。**N**末領域の塩基性領域の役割を解析するために、**PrP Δ 32-88**の塩基性領域のアミノ酸に変異を導入し、感染細胞に導入した。リジン残基、特に24番目と27番目のリジン残基に変異を有するプリオン蛋白は感染細胞内で異常化せず、24番目と27番目のリジン残基が構造変換に重要であることがわかった。

考 察

今回我々は、中枢神経系におけるプリオン感染および増殖が、宿主の正常 **PrP**の**N**末端 **OR**領域の有無によって大きく変化することを明らかにした。とくに脳においては、**PrP^C**の構造変換の効率が **OR**の有無によって異なることがわかった。また、**OR**領域のさらに**N**末側の塩基性領域のリジン残基が **PK**抵抗性への変換に重要であることを明らかにした。

OR領域は銅イオンと結合することから、この銅イオンと **PrP**の結合が構造変換の効率に重要な役割を担っている可能性が示唆された。また、脳組織においては、**OR**領域と結合する特異的因子があり、構造変換に影響を及ぼしたとも考えられる。**OR**領域のさらに**N**末側に存在するリジン残基については、構造変換を促進すると言われているグリコサミノグリカンの結合に関与している可能性が考えられる。これらのさらなる疑問を解決するため、**OR**領域に銅イオンが結合した場合の正常 **PrP**の構造安定性（不安定性）の変化や**C**末側の高次構造に及ぼす影響、他の因子との結合性の変化などを分子レベルで解明する必要がある。