

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 7 年 6 月 2 6 日現在

機関番号： 8 2 6 0 1

研究種目： 基盤研究(C) (一般)

研究期間： 2012 ~ 2014

課題番号： 2 4 5 9 0 1 7 2

研究課題名 (和文) G P I アンカー欠損スプライス変異型プリオン蛋白質の生理機能の解明に関する研究

研究課題名 (英文) Studies on cellular mechanisms of GPI-anchorless splice variant of the prion protein

研究代表者

菊池 裕 (Kikuchi, Yutaka)

国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部第一室・室長

研究者番号： 1 0 2 3 4 1 9 7

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要 (和文) : ヒト、ウシ及びヒツジ細胞株のmRNAを解析し、プリオン蛋白質 (PrP) のGPIアンカーシグナル配列が欠落したスプライス変異型プリオン蛋白質 (PrPSV) を同定した。PrP遺伝子欠損マウス細胞株HpL3-4にレトロウイルスベクターを用いてPrP又はPrPSV遺伝子を導入し、安定産生株を得た。ヒツジスクレイビーを添加して培養したヒツジPrP又はPrPSV産生細胞株でProteinase K (PK) 抵抗性PrPを確認したが、ベクターだけの導入では抵抗性を示さず、PK抵抗性PrPの増加が示唆された。樹立したPrP又はPrPSVの安定産生株は、感染やプリオン病発症機構の解明への寄与が期待される。

研究成果の概要 (英文) : An unusual alternative splicing occurring within the prion protein gene which resulted in the generation of mRNA lacking the GPI anchor signal sequence, GPI-anchorless PrP (PrPSV), was identified in the human, bovine and sheep cell lines. PrP or PrPSV cDNAs from sheep were cloned into the retroviral vector. To make sure that proper proteins are produced, HpL3-4 cells, murine PrP deficient cell line, were used. Stable expression of sheep PrP or PrPSV in the HpL3-4 cells were cultured with scrapie, and then the Proteinase K-resistant prion protein (PrPres) positive cells were detected. However, PrPres were detected in the mock-infected cells. The PrP- or PrPSV-expressing cell lines would be useful to investigate prion pathology.

研究分野： 環境・衛生系薬学

キーワード： プリオン 選択的スプライシング GPI アンカー

1. 研究開始当初の背景

正常プリオン蛋白質(PrP^C)は2本の糖鎖を有する分子量30,000-35,000の糖蛋白質で、glycosylphosphatidylinositol (GPI)でC末端が細胞膜のラフト(raft)に結合している GPI アンカー型蛋白質である。一般に GPI アンカー型蛋白質は細胞膜上での高い流動性を有し、他の情報伝達に関与する分子との会合や、抗体刺激による蛋白質のカベオラ(caveola)への集積等による機能の発現が報告されている。PrP^Cは様々な臓器で発現しており、特に中枢神経系での発現量が高いことが知られ、ニューロンでの発現が最も高く、次いでグリア細胞に多く見られる。

プリオン病は中枢神経系に異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})が蓄積する致死性の神経変性疾患で、PrP^{Sc}の脳内接種により伝播が可能ことから、伝達性海綿状脳症と称されている。PrP^{Sc}はPrP^Cと同じアミノ酸配列を有するが、その高次構造は異なり、蛋白質分解酵素(proteinase K, PK)処理に耐性を示す。

人のプリオン病には硬膜移植等によって発症した感染性クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、プリオン蛋白質遺伝子(PRNP)にコードされた253残基のアミノ酸に変異がある遺伝性CJD及びPRNPに変異のない孤発性CJDが知られ、約85-90%を孤発性CJDが占めている。一方、1996年に英国で確認された変異型CJDは、従来の孤発性CJDとは異なり、若年性の患者で発症した。PrP^{Sc}の生化学的研究及び英国で多発していた牛海綿状脳症(BSE)に関する疫学研究から、食肉を介してウシPrP^{Sc}が人へ伝達され、変異型CJDが発症したと考えられている。また、輸血によって変異型CJDを発症したと推定される症例も報告されており、血液を介したCJDの伝達が注目を集めている。

プリオン蛋白質のORFにはスプライス変異が無く、単一のエクソンにコードされると考えられていた。先に、ヒト膠芽腫細胞株T98GはPRNPのエクソン2内に選択的スプライス変異を生じ、GPI アンカー欠損型プリオン蛋白質(GPI⁻PrPSV)を産生することを報告した[Kikuchi, Y. *et al.*, Hypoxia induces expression of a GPI-anchorless splice variant of the prion protein, *FEBS J.* **275**, 2965-2976 (2008)]。PrPSV mRNA のスプライスサイト(GT-AG)はPRNPのエクソン2内に位置し、その翻訳領域はPrPのN端側と新たなC末端からなる230アミノ酸残基をコードし、PrPと94%の相同性を示している。PrPとアミノ酸配列が異なるC末端を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いた研究で、T98G細胞が産生するGPI⁻PrPSVには糖鎖が無く、非イオン性界面活性剤に易溶性で、細胞質画分に確認された。

また、ウシ角膜培養細胞株BCE C/D-1b及びヒツジ脳由来培養細胞株OA1から調製したtotal RNAを解析し、ヒトと同様に、PrP遺伝子のエクソン3内に選択的スプライシン

グを確認した。ウシ及びヒツジのスプライス変異されたmRNAの翻訳領域はGPIアンカーシグナル配列を欠損し、それぞれ260残基及び252残基の蛋白質をコードしている。

哺乳類以外でも、ゼブラフィッシュの胚を用いた研究で、受精5.3時間後(5.3 hpf)にPrP-2のスプライス変異型mRNAが発現し、その構造はヒトと同様にGPIアンカードメインを欠落していることが報告され、発生への関与が注目を集めている[Aanes H. *et al.*, Zebrafish mRNA sequencing deciphers novelties in transcriptome dynamics during maternal to zygotic transition, *Genome Res.* **21**, 1328-1338 (2011); Syed M. *et al.*, Prion protein function and the disturbance of early embryonic development in zebrafish, *Prion* **5**, 88-92 (2011)]。

2. 研究の目的

プリオン病診断法の開発に資する研究として、PRNPの選択的スプライシングによって発現するGPI⁻PrPSVとプリオン病発症の関連を明らかにすることを目的とする。プリオン遺伝子ノックアウトマウス脳由来培養細胞株HpL3-4 (*prp*^{-/-})にレトロウイルスベクターでPrP又はPrPSV遺伝子を導入して持続的産生細胞株を樹立し、それらを比較してPrPSVの生理機能を解明する。また、持続的PrP又はPrPSV発現細胞株を用いてスクレイピー感染実験を行い、プリオン病発症に対するPrPSVの関与を探索する。

3. 研究の方法

(1) プリオン蛋白質産生細胞株の樹立

ヒト、ウシ及びヒツジ細胞株のゲノムからPCR法でPrP又はPrPSV cDNAを調製し、pBMN-Ires-EGFPに挿入してレトロウイルスベクターを構築した。リポフェクション法でPrP又はPrPSV遺伝子プラスミドDNAをパッケージング細胞Phoenix-ECOに導入し、それらの培養上清に産生されたウイルス粒子をHpL3-4細胞に感染させた。

(2) プリオン蛋白質産生の確認

調製した遺伝子導入細胞の総細胞抽出液(whole cell lysate, WCL)をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、セミドライ式ブロット法でPVDF膜に転写し、抗PrP抗体6H4又は抗アクチン抗体AC-15を用いたイムノブロット法を行った。

(3) 異常プリオン蛋白質検出系の検討

ヒツジのスクレイピーを感染させたマウスから樹立したObihiro株又はmockを脳内に接種したマウスから調製した脳乳液を用い、ヒツジPrP又はPrPSV産生細胞と共培養してPrP^{Sc}に対する感染の感受性を検討した。調製したWCLをPK処理後、イムノブロット法を行い、PrP^{Sc}の蛋白質分解酵素抵抗性を確認した。

4. 研究成果

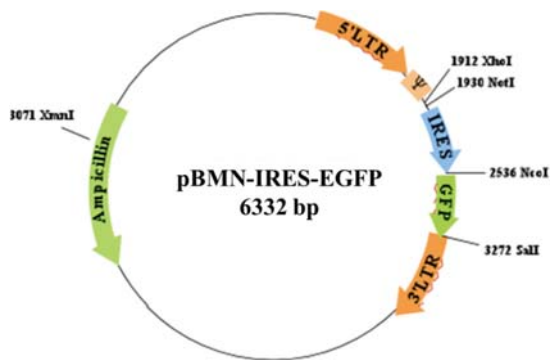


Fig. 1. レトロウイルスベクターpBMN-Ires-EGFPの模式図

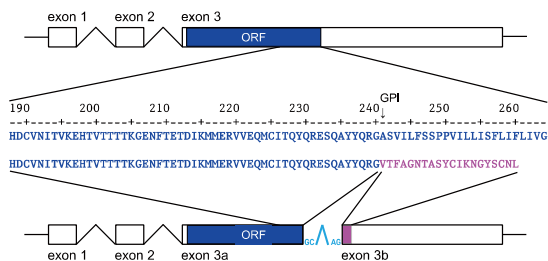


Fig. 2. ヒツジPrP遺伝子の構造及びGPIアンカー欠損部位のアミノ酸配列

ヒツジPrPの241番目のアミノ酸にGPIアンカーが結合する。アミノ酸配列242-264はGPIアンカーシグナルペプチドを示す。ヒツジエクソン3の選択的スプライシングにより生じたイントロンの両側をそれぞれ3a及び3bとし、新たに翻訳されるアミノ酸を赤字で示す。

(1) プリオン蛋白質産生細胞株の樹立

マウスPrP遺伝子欠損脳由来細胞株HpL3-4を用いてPrP又はPrPSVを産生する細胞株の樹立を行った。蛋白質を安定的に産生する細胞株を樹立するため、遺伝子の導入にはレトロウイルスベクターを用いた。ヒト、ウシ及びヒツジ培養細胞から調製したcDNAに制限酵素サイトを付加し、pBMN-Ires-EGFPベクターのマルチクローニングサイトに挿入した。レトロウイルスベクターの模式図をFig. 1に、ヒツジPrP及びPrPSVのアミノ酸配列の模式図をFig. 2に示した。

構築したレトロウイルスベクターはリポフェクション法でパッケージング細胞Phoenix-ECOに導入し、PrP又はPrPSV遺伝子を取り込んだウイルス粒子を含む培養上清を用いてHpL3-4細胞に形質導入を行った。共焦点顕微鏡でレトロウイルスベクターに由来するEGFPとDAPI染色した核の蛍光を観察して陽性細胞を選択し、ヒト、ウシ、ヒツジのPrP又はPrPSVを組換えたpBMN-Ires-EGFPの発現を確認した。Fig. 3にベクター、ヒツジPrP又はPrPSVを形質導入したHpL3-4細胞を共焦点顕微鏡で観察し、EGFPの蛍光を確認した写真を示した。

(2) プリオン蛋白質産生の確認

構築した細胞を培養後にWCLを調製し、抗PrP抗体を用いたイムノブロット法でPrP又

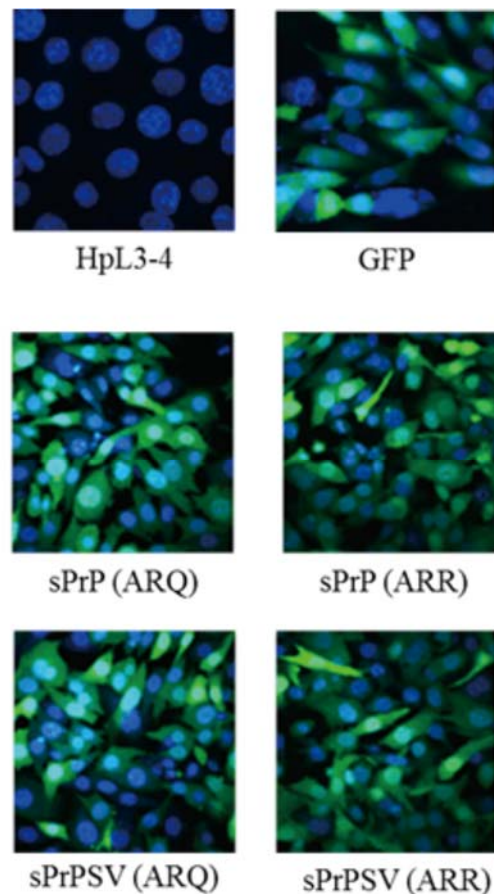


Fig. 3. ヒツジPrP遺伝子導入の確認

GFP遺伝子をもつレトロウイルスベクター(pBMN-Ires-EGFP)にsPrP (ARQ)、sPrP (ARR)、sPrPSV (ARQ)又はsPrPSV (ARR)の遺伝子を組み込み、マウスPrP遺伝子欠損脳由来細胞株HpL3-4へ導入し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。核はDAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole)で染色した。

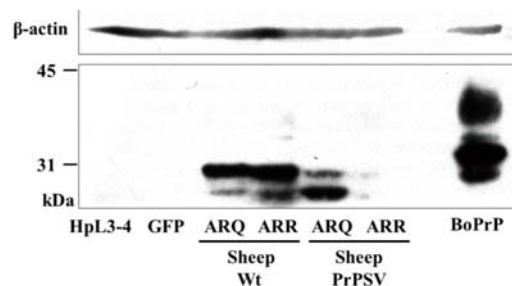


Fig. 4. ウェスタンブロット法によるWCL中のPrPの検出

親株のHpL3-4細胞、HpL3-4細胞にpBMN-Ires-EGFPベクターを導入したMock及びヒツジPrP (ARQ)及びPrP (ARR)並びにヒツジPrPSV (ARQ)及びPrPSV (ARR)、ウシPrPの遺伝子を導入したHpL3-4細胞からWCLを調製し、50 µg/laneで泳動後、抗PrP抗体6H4を用いたイムノブロット法で解析した。各レーンに添加した蛋白質量をβ-actinで確認した。

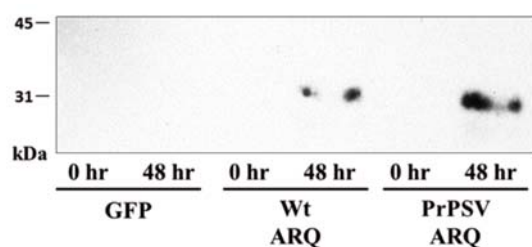


Fig. 5. PrP産生細胞を用いた異常プリオン蛋白質の感染実験

HpL3-4 GFP、HpL3-4 sPrP (ARQ)及びHpL3-4 sPrPSV (ARQ)細胞にスクレイピー感染マウス脳乳液を加えてPrP^{Sc}を感染させ、0時間及び48時間の培養後、調製したWCLをProteinase K処理し、蛋白質分解酵素抵抗性PrP^{Sc}バンドを検出した。

はPrPSVの産生を調べた。Fig. 4に、ヒト、ウシ、ヒツジPrP及びPrPSVを認識する抗PrP抗体6H4を用いたイムノブロット法の結果を示した。6H4抗体は親株のHpL3-4とベクターのみを形質導入した細胞のWCLは認識せず、ヒツジPrP (Sheep Wt)、PrPSV又はウシPrPを形質導入した細胞のWCLを認識した。

(3) 異常プリオン蛋白質検出系の検討

樹立したPrP産生細胞を用い、PrP^{Sc}に対する感染感受性を検討した。PrP^{Sc}試料には、Obihiro株を脳内接種したマウスの脳乳液を用いた。樹立したPrP産生細胞をPrP^{Sc}試料と共培養し、調製したWCLをPK処理し、イムノブロット法で蛋白質分解酵素抵抗性を調べた。PrP産生細胞は、スクレイピーに対し高感受性を示すと考えられているヒツジのsPrP (ARQ)及びsPrPSV (ARQ)を用いた。その結果、mockではPrP^{Sc}感染後0時間及び48時間培養のいずれもバンドは認められなかった(Fig. 5、GFP)。一方HpL3-4 sPrP (ARQ)及びHpL3-4 sPrPSV (ARQ)細胞では、感染後0時間にバンドは認められなかったが、感染後48時間培養においてプロテアーゼ抵抗性PrP^{Sc}のバンドが認められた(Fig. 5、Wt ARQ、PrPSV ARQ)。これらの結果から、HpL3-4 sPrP (ARQ)及びHpL3-4 sPrPSV (ARQ)細胞でPrP^{Sc}の増加が示唆された。

(4) 考察

マウスPrP遺伝子欠損脳由来細胞株HpL3-4に各種PrP遺伝子を導入し、PrP高発現細胞株を樹立した(Table 1)。

PrP^{Sc}の感染には種の壁が存在し、本研究ではPrP^{Sc}試料としてヒツジスクレイピーを感染させたマウス脳から樹立した株(Obihiro株)

Table 1 樹立した各種PrP産生細胞株

種	Wild-type PrP ^C	スプライス変異型 PrPSV
ヒツジ	HpL3-4 sPrP (ARQ) HpL3-4 sPrP (ARR)	HpL3-4 sPrPSV (ARQ)
ウシ	HpL3-4 BoPrP	
ヒト	HpL3-4 hPrP (129M) HpL3-4 hPrP (129V)	HpL3-4 hPrPSV (129M) HpL3-4 hPrPSV (129V)

を用いることから、樹立したPrP産生細胞の中で、ヒツジWtのHpL3-4 sPrP (ARQ)及びヒツジスプライス変異型のHpL3-4 sPrPSV (ARQ)細胞に対する感染感受性について検討した。どちらのPrP産生細胞もスクレイピー感染マウス脳乳液を添加後、48時間培養することでプロテアーゼ抵抗性PrP^{Sc}のバンドの増加が認められ、PrP^{Sc}のPrP産生細胞への感染が示唆された(Fig. 5)。この実験において両細胞が産生するWt PrPC及びPrPSVが実際にPrP^{Sc}に構造変換しているか、また細胞を継代しても感染が維持されるかについて引き続き検討が必要である。現在、ヒツジPrPSVがPrP^{Sc}の構造変換への関与を調べることを目的として、抗ヒツジPrPSVモノクローナル抗体の作製を進めており、イムノブロット法等を通じて、ヒツジPrPSVの構造変換の解明への寄与が期待される。

近年PrPの多様性が発見され、PrP遺伝子にストップコドン挿入してGPIアンカー欠損PrPを発現したトランスジェニック(Tg)マウス(PrP/PrP Δ GPI)では、GSS様症状(脳細胞における空胞形成及びアミロイド沈着)の促進されることが報告されている[Stohr, J. *et al.*, Spontaneous generation of anchorless prions in transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 21223-21228 (2011)]。また、GPIアンカー欠損PrP発現Tgマウスは、ヒトとマウス間の種の壁を低くし、PrP発現マウスに比較して感染の成立が容易になることが報告された[Race, B. *et al.*, Increased Infectivity of Anchorless Mouse Scrapie Prions in Transgenic Mice Overexpressing Human Prion Protein, *J. Virol.* **89**, 6022-6032 (2015)]。本研究に用いたPrPSV遺伝子は、ストップコドン挿入した人為的なものではなく、実際に細胞内で選択的スプライス変異によって生じており、構築したPrPSV高産生細胞株を用いて同様の所見が得られるか、今後の研究計画の構築を進めている。

本研究で樹立したPrP又はPrPSVの高産生細胞株は、感染やプリオン病発症機構の解明に活用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件) ①Uchida, E., Furuta, B., Kikuchi, Y., Kubosaki, A., Yusa, S., Miyahara, M., Sasaki, Y., Kohara, A., Ohtani, A., Matsuyama, A., Okura, H., Yamaguchi, T., Collaborative Study on the PCR Detection Method of Mycoplasma Testing for Cell Substrates; The Revision for General Information of JP. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science* **45**, 442-451 (2014)

②Kikuchi, Y., Ohnishi, T., Furusawa, H., Kawai, T., Fukuda, Y., Yokoyama, H., Sugita-Konishi, Y., ELISA detection of *Kudoa septempunctata* in raw

Paralichthys olivaceus (olive flounder) using a chicken anti-*Kudoa* antiserum. *Biocontrol Science*, peer-reviewed journal, **18**, 193-197 (2013)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/bio/18/4/18_193/_pdf

- ③Ohnishi, T., Kikuchi, Y., Furusawa, H., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Kudoa septempunctata invasion increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer. *Foodborne Pathogens and Disease*, peer-reviewed journal, **10**, 137-142 (2013)
 DOI: 10.1089/fpd.2012.1294.
 - ④Yusa, S., Oliveira-Martins, J.B., Sugita-Konishi, Y., Kikuchi, Y., Cellular Prion Protein: From Physiology to Pathology. *Viruses*, peer-reviewed journal, **4**, 3109-3139 (2012)
 DOI: 10.3390/v4113109.
- 〔学会発表〕（計9件）
- ①菊池裕、遊佐精一、窪崎敦隆、寺嶋淳、豊田淑江、山口照英、低酸素条件下で発現するGPIアンカー欠損型プリオン蛋白質に関する転写因子BHLHE40の研究、第87回日本生化学会大会、2014年10月、京都市
 - ②内田恵理子、古田美玲、菊池裕、窪崎敦隆、遊佐精一、宮原美知子、佐々木裕子、小原有弘、大谷梓、松山晃文、大倉華雪、山口照英、日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験のPCR法改正のための共同研究、日本マイコプラズマ学会第41回学術集会、2014年5月、東京都文京区
 - ③窪崎敦隆、菊池裕、宮原美知子、遊佐精一、島崎愛加、石橋侑季、鈴木俊宏、小原有弘、大谷梓、佐々木裕子、松山晃文、大倉華雪、古田美玲、内田恵理子、山口照英、マイコプラズマ否定試験に利用可能な標準菌株および標準DNAの調製、日本薬学会第134年会、2014年3月、熊本市
 - ④内田恵理子、古田美玲、菊池裕、窪崎敦隆、遊佐精一、宮原美知子、佐々木裕子、小原有弘、大谷梓、松山晃文、大倉華雪、山口照英、日局参考情報「バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験」のPCR法の見直しに関する共同研究、日本薬学会第134年会、2014年3月、熊本市
 - ⑤Ohnishi, T., Kikuchi, Y., Yoshinari, T., Yamazaki, A., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y. Invasion of *Kudoa septempunctata* increases the

permeability of human intestinal epithelial monolayer. IAFP European Symposium, August 2013, Marseille

- ⑥菊池裕、大西貴弘、古沢博子、河合高生、福田穰、横山博、小西良子、ニワトリ抗血清を用いたELISAによるヒラメ体幹筋肉中*Kudoa septempunctata*の検出法、日本防菌防黴学会第40回年次大会、2013年9月、大阪府豊中市
- ⑦菊池裕、豊田淑江、遊佐精一、窪崎敦隆、山口照英、低酸素条件下で誘導されるスプライス変異GPIアンカー欠損型プリオン蛋白質の発現、第1回低酸素研究会、2013年7月、東京都新宿区
- ⑧菊池裕、遊佐精一、中島治、手島玲子、小西良子、山口照英、リン酸化セリンを含むプリオン蛋白質を認識する抗体に関する研究、第85回日本生化学会大会、2012年12月、福岡市
- ⑨玉川萌笑、遊佐精一、中島治、手島玲子、辻勉、小西良子、菊池裕、PrP遺伝子欠損細胞株HpL3-4に導入したヒツジプリオン蛋白質の解析、第85回日本生化学会大会、2012年12月、福岡市

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）
- 取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nihs.go.jp/index-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

菊池 裕 (KIKUCHI, Yutaka)
 国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部・室長
 研究者番号：10234197

(2)研究協力者

玉川 萌笑 (TAMAGAWA, Moemi)