

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06010

研究課題名(和文)プリオン蛋白質のアミノ末端側領域がプリオン病の固有な性質保持にかかわるか

研究課題名(英文) Non-structural region of prion protein amino-terminus involved in prion biological characteristics?

研究代表者

松浦 裕一 (Matsuura, Yuichi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・上級研究員

研究者番号：60398089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：性状の異なる3種類の牛海綿状脳症プリオンを用いて、プリオンの生物学的性状に関わる領域を明らかにすることを目的とし、アミノ末端側非構造領域を欠損させた蛋白質を発現する遺伝子改変マウスが一部のプリオンに感染しないが、他方のプリオンに感染することを明らかにした。しかし、当該領域がプリオンによる立体構造変換や生物学的性状保持に影響しないことが示され、プリオンの性状決定にはその生成過程も関わると推察される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、異常化したプリオン蛋白質の立体構造がプリオン性状の決定に関わると考えられている。しかし、本研究で示したプリオン生成過程によるプリオン性状の差異・保持への関与はプリオン病の学術的に新たな視点を提供する。また、未だに有効な治療法のないヒトのプリオン病の治療薬開発にも新たな視点を提供することが期待される。

研究成果の概要(英文)：There are three types of bovine spongiform encephalopathy prions with different biological characteristics. For the purpose of revealing regions related to the characteristics, these prions were subjected to experimental infection in transgenic mice expressing PrPC lacking the non-structural region of the amino terminus. These mice were infected with some prions, but not with others. However, it was shown that the lacking region did not affect the structural conversion and retention of biological properties by prions. Therefore, the conversion process can lead to the determination of prion characteristics.

研究分野：獣医微生物学

キーワード：プリオン 牛海綿状脳症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プリオン病は、生体内で発現する正常プリオン蛋白質 (PrP^C) の構造異性体である異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) が中枢神経系組織に蓄積して神経機構を破綻する病気である。蓄積した PrP^{Sc} は、核酸を介さない蛋白質感染粒子、プリオンの主要成分である。また、PrP^{Sc} は、蛋白質分解酵素で部分的にしか分解されず、Core 領域が残存する性状を示す。その性質は、プリオン病の診断のマーカーとなる加え、プリオンの識別マーカーともなっている。

動物プリオン病の一つ、牛海綿状脳症 (BSE) は 1986 年以降英国を中心に発生した従来型 (C-BSE) と 2001 年に報告された加齢に伴って自然発生する非定型 (Atypical) に大別される。さらに、ウエスタンプロット法による Core 領域の解析により、非定型 BSE は、Core 領域の分子量が C-BSE と比較して小さい Low-type (L-BSE) と大きい High-type (H-BSE) に分類可能である。それぞれの Core 領域は C-BSE ではアミノ酸配列 aa 103-264、L-BSE で aa 109-264、H-BSE では aa 94-264 である。

これまでに、ウシやウシ型プリオン蛋白質過剰発現マウス (TgBov) への感染実験で、C-BSE や L-BSE、H-BSE は固有の生物学的性状を示すことから、各々異なるプリオン株、すなわち異なる PrP^{Sc} の立体構造を持つと考えられる。しかしながら、BSE プリオンの感染性や BSE 株の病態の違いを規定する PrP^C のアミノ酸配列領域は未同定である。

2. 研究の目的

プリオンの感染に重要な PrP^C のうちアミノ末端側非構造領域は、2 価金属イオンと結合し、代謝や日内時計の調整への関与などの機能があることが示唆されている、本研究では、PrP^C のアミノ末端側非構造領域が PrP^{Sc} への構造変換と BSE プリオン株の生物学的性状保持に与える影響を調べることを目的とする。具体的には、(1) *in vivo* での PrP アミノ末端側領域の病態に与える影響、(2) 試験管内 (*in vitro*) での PrP アミノ末端側領域が PrP^{Sc} への構造変換に与える影響、(3) プリオンのアミノ末端側が性状保持に与える影響の 3 つの課題を実施する。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* での PrP アミノ末端側領域の病態に与える影響

下記の 3 種類の遺伝子改変マウスを用い、各々のマウスに対し C-BSE、L-BSE、H-BSE プリオンの感染実験を行った。

full マウス：ウシの全長 PrP(aa1-264) を 1 コピー発現)

31-94 マウス：H-BSE 由来 PrP^{Sc} では PK 消化されるアミノ末端領域を欠損

31-103 マウス：C-BSE 由来 PrP^{Sc} では PK 消化されるアミノ末端領域を欠損

C-BSE や L-BSE、H-BSE プリオン株を脳内投与した後、遺伝子改変マウスが神経症状を呈するまでの期間 (潜伏期間)、ウエスタンプロット法による Core 領域のバンドパターンを比較解析して、PrP のアミノ末端側領域を欠損させた遺伝子改変マウスに対する各 BSE 感染性を明らかにした。

(2) 試験管内 (*in vitro*) での PrP アミノ末端側領域が PrP^{Sc} への構造変換に与える影響

PrP のアミノ末端側領域欠損が PrP^{Sc} の生成に与える影響を明らかにするために、プリオンの感染性を保持したまま試験管内で PrP^{Sc} を増幅可能な protein misfolding cyclic amplification (PMCA) 法を用いて、C-BSE、L-BSE、H-BSE をそれぞれ full、31-94、31-103 の正常プリオン蛋白質と反応させた。PrP^{Sc} が生成されたか否かをウエスタンプロット法で調べ、検出限界希釈法により PrP^{Sc} の増幅効率を算出した。

(3) プリオンのアミノ末端側が性状保持に与える影響

アミノ末端側領域欠損 (31-94、31-103) のプリオンがそれぞれ C-BSE や L-BSE、H-BSE の性質を保持するか否かを調べるために、1) で得られたマウスの脳乳剤をウシ型プリオン蛋白質遺伝子過剰発現マウス TgBov に接種する継代実験を実施して、アミノ末端側領域がプリオン株の生物学的性状を保持する領域か否かを調べた。

4. 研究成果

(1) *in vivo* での PrP アミノ末端側領域の病態に与える影響

C-BSE プリオンを接種した full マウスは、で発症したが、31-94 マウスや 31-103 マウスは接種後 850 日までに発症しなかった (図 1)。L-BSE プリオンや H-BSE プリオンを接種した 31-94 マウスや 31-103 マウスは full マウスと同期間もしくは長い期間の潜伏期間で BSE を発症した。マウスの脳に蓄積した PrP^{Sc} の Core 領域をウエスタンプロット法で解析すると、C-BSE、L-BSE や H-BSE の性質を識別することは可能であるが、明白な相違は認められなかった。特に、L-BSE もしくは H-BSE 接種 31-103 マウスの脳には、2 つの異なるサイズの Core 領域が検出され、より詳細な解析が必要であった。

以上の結果から、PrPCのアミノ末端側領域は、L-BSE プリオンや H-BSE プリオンでは感染に大きな影響を与える領域でなかったが、C-BSE プリオンの感染成立にとっては重要な領域であることが判明した。

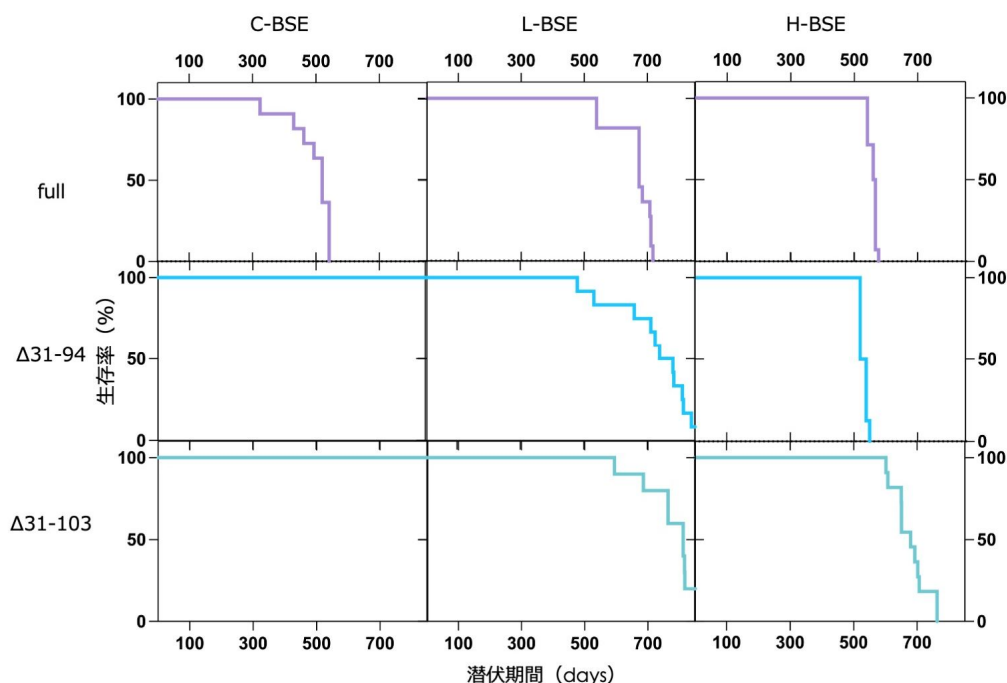


図1 BSE 接種マウスの生存期間曲線

(2) 試験管内(*in vitro*)での PrP アミノ末端側領域が PrP^{Sc} への構造変換に与える影響

full マウスから抽出した PrPC を PrP^{Sc} に構造変換させる効率は、C-BSE で 10.25 logPMCA₅₀、L-BSE で 10.0 logPMCA₅₀、H-BSE で 10.75 logPMCA₅₀ であった。31-94 マウスや 31-103 マウスでは、C-BSE や L-BSE では、full マウスと比べて 1/1000 倍程度に減少し、H-BSE では変化しなかった。これらの結果は、PrPC のアミノ末端側領域が H-BSE プリオンでは PrP^{Sc} 生成に影響を与えないが、C-BSE プリオンや L-BSE プリオンでは PrP^{Sc} 生成に関与する領域であることが示された。

(3) プリオンのアミノ末端側が性状保持に与える影響

1) で得られたそれぞれのマウスの脳を TgBov マウスに接種したところ、31-94 マウスに C-BSE プリオンが微量ながら生成されたことが示されたが、性質は C-BSE と類似していた。アミノ末端側領域を欠損した L-BSE プリオンや H-BSE プリオンはそれぞれ固有の性質を保持していた。このことから、プリオンの性質保持にアミノ末端側領域は関与しないと考えられた。

以上の結果から、プリオン病において PrPC のアミノ末端側領域はプリオンの性質保持には関与しないが、一部のプリオンでは感染成立に関与することが示された。不明な点が多いが、プリオンの株によって感染や異常化の機序が大きく異なることが考えられた。

また、マウスを用いた感染実験と PMCA 法による PrP^{Sc} 生成効率の算出結果に齟齬が認められ、PMCA 法が必ずしもプリオン感染を反映するものではないことが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------