

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05938

研究課題名(和文) 定型牛海綿状脳症の起源の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the origin of typical bovine spongiform encephalopathy

研究代表者

今村 守一 (Imamura, Morikazu)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：10391442

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)：本研究では、定型BSEの起源を明らかにすることを目的に異種動物間でのプリオン伝達を模した実験およびプリオンの自発生成を検討する実験を試験内増幅プリオン増幅法であるPMCA法を用いて行った。その結果、複数の動物プリオンを異種動物の正常プリオン蛋白質(PrPC)を基質として試験管内増幅させると、プリオン様産物が得られた。そのうちのいくつかをバイオアッセイしたところ、マウスへの感染性が認められた。さらに、組み換えウシPrPを基質としてプリオンシードを加えないで行ったPMCAにより、ウシ発現形質転換マウスに感染性を示す組み換えプリオンが得られた。今後、生成したプリオンの性質を詳細に解析する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

定型BSEの起源については未だ十分な科学的根拠が得られておらず未解明のままである。定型BSEプリオンがどのように出現したかを明らかにすることで、国内のBSE発生防止対策の改善ならびに見直しに資する重要な科学的知見が得られ、定型BSEの再流行を阻止する効果的な方策が可能となるさらに、定型BSEプリオンが生み出される機序を明らかにすることで、プリオンが自発発生する機構の解明につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, experiments to mimic prion transmission between heterologous animals and to examine spontaneous prion production were conducted using the PMCA method, an in vitro amplified prion amplification method, with the aim of clarifying the origin of the canonical BSE. As a result, in vitro amplification of multiple animal prions using heterologous normal prion protein (PrPC) as a substrate yielded prion-like products. Bioassays of some of these products showed that they were infectious to mice. Furthermore, PMCA using recombinant bovine PrP as a substrate without prion seed yielded recombinant prions that were infectious to bovine-expressing transgenic mice. Further detailed analysis of the properties of the generated prions is needed in the future.

研究分野：微生物学

キーワード：プリオン BSE

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

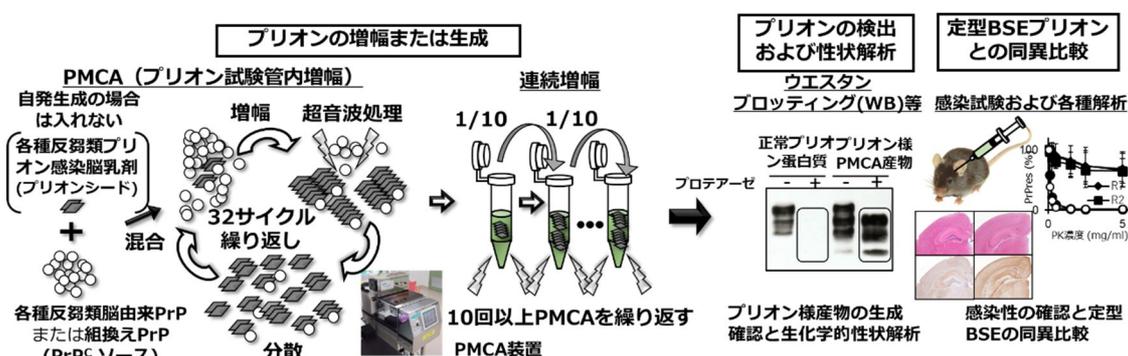
世界的に流行した従来型牛海綿状脳症(定型 BSE)は、飼料として肉骨粉等の給与を禁止することで、発生数は急速に減少し、現在では世界全体でほとんど発生していない。しかしながら、なぜ定型 BSE が突然出現したか、つまり定型 BSE の起源についてはまだ十分な科学的根拠が得られておらず、未解明のままである。BSE には定型 BSE の他に L 型、H 型という自然発症すると考えられている 2 種類の非定型 BSE が認められており、これら L 型および H 型非定型 BSE プリオンを接種した野生型マウスが定型 BSE 様の症状を示したことが報告されている。一方、自然発症すると考えられている羊・山羊のプリオン病である非定型スクレイピープリオンを牛プリオン蛋白質(PrP)発現マウスに接種すると、定型 BSE 様の症状を示す。このように、あるプリオンをその由来とは異なる動物種に感染させること(異種間伝達)で定型 BSE プリオンが生じる可能性が考えられている。また、人のプリオン病の約 80%は孤発性プリオン病が占めており、牛や羊、山羊でも孤発性プリオン病が認められていることから、最初の定型 BSE 発症牛は自然発症した可能性も否定できない。しかしながら、定型 BSE プリオンが自発生成することを示唆する具体的な知見はまだ得られていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は定型 BSE の起源を明らかにすることにある。そのために次の 2 点に着目し検討する。1 点目は、異種間伝達を模した PMCA により、あるプリオンが異種間伝達を経ることによって定型 BSE プリオンが出現した可能性を推定する。すなわち、他の反芻動物に由来する正常プリオン蛋白質(PrP^C)との組み合わせ、また、他の反芻類プリオンと牛 PrP^Cとの組み合わせで PMCA (異種間 PMCA) を行い、非定型 BSE プリオンが定型 BSE プリオン様に変化するか、または牛以外の反芻類プリオンが定型 BSE プリオン様に変化するかを明らかにする。2 点目は、組換え PrP を基質にした PMCA 法を用いて牛組換え PrP から定型 BSE プリオンが試験管内で自発生成するか否かを明らかにすることにより、定型 BSE プリオンが自然発症する可能性を検討する。

3. 研究の方法

本研究は以下のような方法手順で進めた。



1. 各種反芻類プリオンをシードにした異種動物間PMCAによるプリオン様産物の生成

各種反芻類プリオン感染脳乳剤をシードとして、ウシ PrP、ヒツジ PrP、シカ PrP、ヒト PrP を発現する遺伝子改変マウス (TgBo、TgOv、TgCe、TgHu マウス)の脳乳剤を基質として異種間 PMCA を行った。1 回目の PMCA 後、再度 PMCA を行うという工程を 10~12 回繰り返す、連続増幅を行

った。連続増幅後 PMCA 産物の生化学的性状解析、遺伝子改変(Tg)マウスを用いたバイオアッセイを行った。

2. ウシ組換えPrPを基質としたPMCAによる組換えプリオンの自発生成

シード非存在下でバキュロウイルス - 昆虫細胞発現系で産生した組換えウシ PrP を基質とした連続 PMCA を行い、ウシ組換えプリオンの自発生成を試みた。自発生成したプリオン様プロテアーゼ抵抗性 PrP(PrPres)について生化学的性状解析およびバイオアッセイを行った。

4. 研究成果

本課題では、定型BSEの起源を明らかにすることを目的に 1) プリオンの異種動物間伝達を模した、各種反芻類プリオンをシードとしたPMCAによるプリオン様産物の生成、2) ウシ組換えPrPを基質としたPMCAによる組換えプリオンの自発生成を試みた。本年度はPMCAにより生成した、各種プリオン様プロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白質(PrPres)の生化学的性状や感染性の有無等を調べた。L型・H型BSEおよび定型・非定型スクレイピー、シカ慢性消耗病(CWD)プリオンをシードとし、Tg0vおよびTgBo、TgCe、TgHuマウス脳乳剤を基質としてそれぞれPMCAを行った。その結果、H型BSEをシードとした場合、Tg0vおよびTgCe、TgHu脳乳剤を基質としたPMCAでPrPresの生成が認められ、定型スクレイピーでは、TgBo、TgCe脳乳剤を基質としたPMCAでPrPresの生成が観察された。CWDでは、TgBo、Tg0v、TgHu脳乳剤を基質としたPMCAでPrPresの生成が認められた。ついで、生成したPrPresについてTgマウスを用いたバイオアッセイを行ったところ、H型BSEシードTg0v PMCA産物、H型BSE TgHu PMCA産物に感染性があることが示された。次に、昆虫細胞発現系で産生した組み換えウシPrPを基質としたシード非存在下におけるPMCAにより、ウエスタンプロットティングによるバンドパターンが異なる複数のPrPresが自発生成した。そのうちのひとつのPrPresをTgBoマウスに接種した結果、プリオン病の症状を示し、脳内に異常型PrPの蓄積が認められた。これらの結果はBSEが孤発的に生成する可能性を示しており、定型BSEプリオンも自発生成する可能性を示唆していた。今後これらのPMCAにより生成したプリオンの株の性状を解析する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Imamura M, Tabeta N, Iwamaru Y, Takatsuki H, Mori T, Atarashi R	4. 巻 613
2. 論文標題 Spontaneous generation of distinct prion variants with recombinant prion protein from a baculovirus-insect cell expression system.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 67-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.04.137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hanae Takatsuki, Morikazu Imamura, Tsuyoshi Mori, Ryuichiro Atarashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Pentosan polysulfate induces low-level persistent prion infection keeping measurable seeding activity without PrP-res detection in Fukuoka-1 infected cell cultures.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 7923
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-12049-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morikazu Imamura, Naoko Tabeta, Yoshifumi Iwamaru, Hanae Takatsuki, Tsuyoshi Mori, Ryuichiro Atarashi	4. 巻 613
2. 論文標題 Spontaneous generation of distinct prion variants with recombinant prion protein from a baculovirus-insect cell expression system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 67-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.04.137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Morikazu Imamura, Hiroyuki Okada, Hanae Takatsuki, Tsuyoshi Mori, Ryuichiro Atarashi
2. 発表標題 Demonstration of multiple prion conformers in natural scrapie isolates by PMCA
3. 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium 2022
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Morikazu Imamura
2. 発表標題 Demonstration of multiple prion conformers in natural scrapie isolates by PMCA
3. 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Morikazu Imamura, Hiroyuki Okada, Kotaro Miyazawa, Yuichi Matsuura, Yoshifumi Iwamaru, Hanae Takatsuki, Tsuyoshi Mori, Ryuichiro Atarashi
2. 発表標題 H-BSE prions adapted to ovine PrP in vitro acquired C-BSE-like properties.
3. 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium 2022
4. 発表年 2022年

〔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
研究 分 担 者	岩丸 祥史 (Iwamaru Yoshifumi) (20355142)	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・グループ長 (82111)	

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
---------	---------