

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670229

研究課題名(和文)プリオン病治療法開発のための新規結合蛋白質の機能解析

研究課題名(英文)The possibility of new prion binding protein in the therapeutic development for prion diseases.

研究代表者

山越 智 (Yamagoe, Satoshi)

国立感染症研究所・真菌部・主任研究官

研究者番号：00212283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン病は、異常型プリオン蛋白質が脳内に蓄積することによって起こると考えられる中枢神経疾患である。我々が同定した新規正常型プリオン結合タンパク質PBPが、正常型プリオンから異常型プリオンに転換される過程に影響を与える可能性を考えた。そこで、プリオン病発症マウスモデルを用いて、各種PBP遺伝子改変マウスにおける病気の進行を調べた。その結果、PBPの発現量に応じて延命することが分かった。PBPがプリオン病の進行を遅らせる働きを持つ可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Prion diseases are fatal transmissible neurodegenerative disorders and characterized by an accumulation of disease-associated forms of prion protein in the central nervous system. We identified a novel prion binding protein, designated PBP, physically associated with cellular prion protein. As the mechanism of infectivity involves a change in the normal cellular form into disease-associated forms, we speculated the possibility that PBP affected this conversion to influence the development of prion diseases. To test this, we have used the mouse model of prion diseases in PBP deficient mouse and PBP transgenic mouse. We found that the expression levels of PBP were correlated with the progression of the disease.

研究分野：分子生物学

キーワード：プリオン結合タンパク質 プリオン病 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

我々は、マウス正常プリオンの生理的機能の解析のために、マウス cDNA を用いた発現クローニングより生体内で相互作用をする新規タンパク質 PBP (prion binding protein) を同定した。PBP は血清タンパク質であり、正常プリオンタンパク質が GPI アンカータンパク質で細胞膜上に発現することから、PBP とプリオンタンパク質の相互作用により細胞にシグナルが伝わり、プリオンの生理作用に関わるものと考えられた。

2. 研究の目的

プリオン病は、異常型プリオン蛋白質の蓄積により起こると考えられる中枢神経疾患である。PBP が正常プリオンに相互作用することから生体内で正常型プリオンから異常型プリオン変化するとき何らかの影響を与える可能性を考えた。そこで本研究ではマウスモデルにおいて新規プリオン結合蛋白質 PBP のプリオン病に対する作用を、PBP 遺伝子改変マウスを使い解析することを目的とした。

3. 研究の方法

すでに作成されている PBP 遺伝子欠損マウスと PBP 遺伝子導入マウスを使用した。PBP 遺伝子欠損マウスは、遺伝子を完全に除いたマウスであり、PBP 遺伝子導入マウスは鶏の β -アクチンプロモーター制御下で発現するようにマウス PBP 遺伝子を導入し、全身性に PBP を発現するマウスである。それらに対しマウス馴化 BSE プリオン (BSE/JP6 Wakayama 株) を接種し、プリオン感染への感受性、ウエスタンブロット法による異常型プリオンタンパク質の検出、病変部位の分布、病理所見について解析した。マウス等の実験動物へのプリオン感染実験では、プリオンを 1) 脳内と 2) 腹腔 (あるいは 3) 経口) という相異なる接種法を並行して実施することが行われている。本研究では、最終的な病変組織である脳への直接接種、および末梢組織から中枢神経系に病原体が侵入する過程を考慮した腹腔からのプリオン接種を行なった。

(1) 脳内接種

BSE/JP6 Wakayama 株を感染させ、プリオン病を発症したマウスから調整した 0.5% 脳ホモジネート 25 μ l をイソフルランで麻酔をかけたマウスの脳内に接種した。陰性コントロールとして、健常マウスから調整した 0.5% 脳ホモジネートを用いた。

(2) 腹腔内接種

BSE/JP6 Wakayama 株を感染させ、プリオン病を発症したマウスから調整した 0.5% 脳ホモジネート 100 μ l をイソフルランで麻酔をかけたマウスの腹腔内に接種した。陰性コントロールとして、健常マウスから調整した 0.5% 脳ホモジネートを用いた。

(3) マウス系統

C57BL/6Jc1 の野生型、PBP 遺伝子欠損マウス、PBP 遺伝子導入マウスの 3 系統を使用した。長期飼育になるため 10-12 週令、各群 10-12 匹のメスのマウスを用いた。

(4) 生化学的解析

脳組織をビーズショッカーで破碎後、懸濁液に対して、コラゲナーゼ、DNaseI 処理、続いて protease K 処理を行った後にブタノールにてタンパク質を沈殿させた。サンプルバッファーに溶解後 SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にてタンパク質を分離後、抗プリオンタンパク質抗体を用いたウエスタンブロット法により異常プリオンタンパク質を検出した。

4. 研究成果

(1) PBP 遺伝子改変マウスでのプリオンの発現

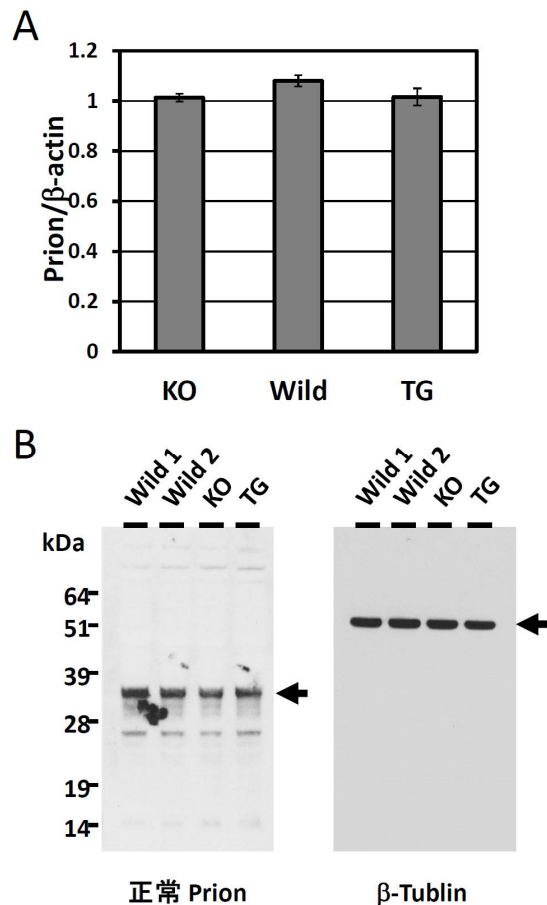


図 1. PBP 遺伝子改変マウスにおけるプリオンの発現 A: リアルタイム PCR によるプリオン mRNA の発現。 β -アクチンに対する比で示した。B: ウエスタンブロット法によるプリオンタンパク質の検出。コントロールとして β -チューブリンを用いた。

初めに、使用する PBP 遺伝子改変マウスにおけるプリオンタンパク質の発現について

調べた。図 1A のように、リアルタイム PCR による脳でのプリオン遺伝子の発現は、野生型、PBP 遺伝子欠損マウス、PBP 遺伝子導入マウスにおいて差がなかった。また、脾臓、肝臓でも差はないことも確認した。図 1B では、抗プリオンタンパク質抗体を用いたウエスタンブロット法によるプリオンタンパク質の発現を示した。遺伝子発現同様に、各マウス系統間で差はなかった。遺伝子欠損マウスにおいて正常プリオンタンパク質の発現量に差がないことから、各マウス系統間でプリオン病発症を比較する上で、正常プリオンタンパク質の発現量の差を考慮する必要がないことが分かった。

(2) PBP 遺伝子欠損マウスにおける脳内接種によるプリオン病の発症

病原体プリオンタンパク質を脳内に直接投与し、PBP 遺伝子欠損マウスの生存率を調べた。図 2 のように、野生型、遺伝子欠損、遺伝子導入マウスの生存率低下開始時期に差が見られたが、各マウス間において生存率に優位差はなかった。

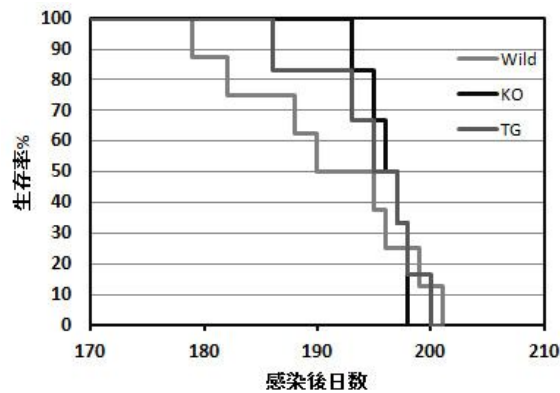


図 2. 脳内接種によるプリオン病発症における PBP 遺伝子欠損マウスの生存率の比較

(3) PBP 遺伝子欠損マウスにおける腹腔内接種によるプリオン病の発症

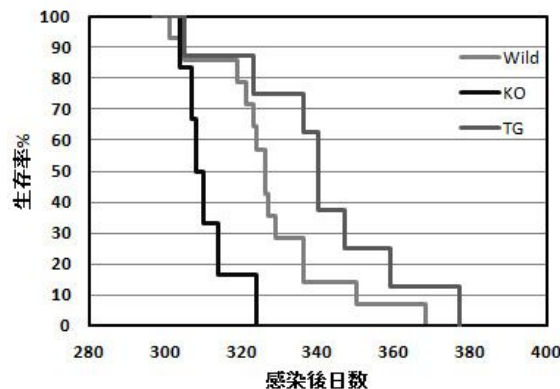


図 3. 腹腔内接種によるプリオン病発症における PBP 遺伝子欠損マウスの生存率の比較

さらに、病原体プリオンタンパク質を腹腔内に直接投与し、PBP 遺伝子欠損マウスの生存率を調べた。図 3 のように、野生型、遺伝子欠損、遺伝子導入マウスの生存率低下開始時期に差は見られなかったが、それ以降の生存率に差が見られ、PBP 遺伝子欠損マウス、野生型マウス、PBP 遺伝子導入マウスの順で延命することが分かった。50%生存率の比較では、遺伝子欠損マウスでは、310 日、野生型は、325 日、遺伝子導入マウスでは、344 日となり、PBP の発現と正の相関関係があった。

(4) PBP 遺伝子欠損マウスにおける腹腔内接種による異常型プリオンタンパク質の蓄積

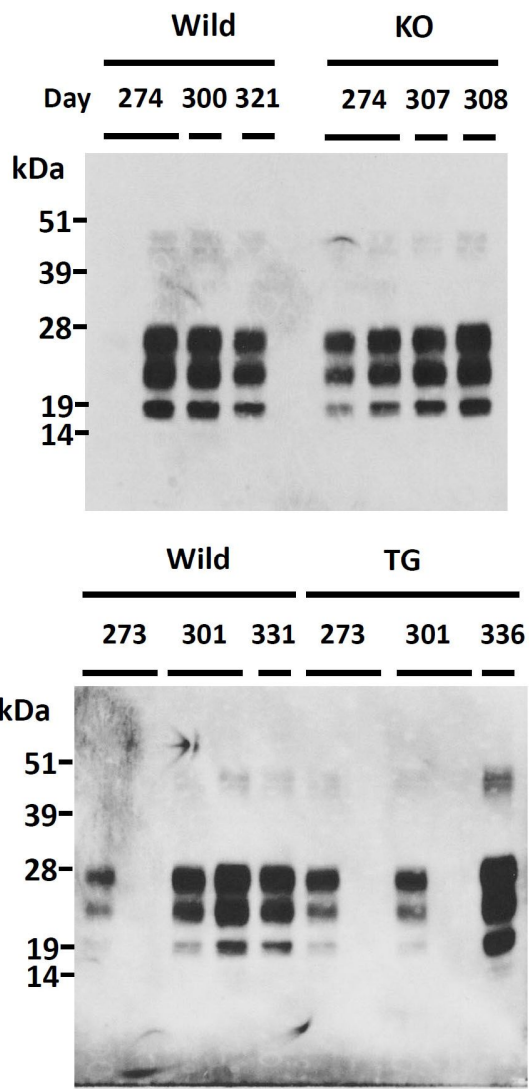


図 4. 腹腔内接種によるプリオン病発症における PBP 遺伝子欠損マウスでの異常型プリオンタンパク質の蓄積

腹腔内接種によるプリオン病発症における異常プリオンタンパク質の蓄積について調べた。各マウス脳からタンパク質を抽出して、タンパク質分解酵素抵抗性の異常プリオンタンパク質をウエスタンブロット法で検

出した。図4のように、生存率が低下し始める1か月前、接種後270日付近で、すでに異常型プリオンの蓄積が確認され、検体数が少ないという問題はあるが、異常型プリオンタンパク質の蓄積は、遺伝子欠損マウス、野生型、遺伝子導入マウスの順で進行する傾向が観察され、生存率と相関することが分かった。

(6) PBP 遺伝子改変マウスにおける腹腔内接種感染初期の脾臓での病原体プリオンの蓄積

以上の結果から PBP タンパク質が、病原体プリオンの腹腔から中枢神経系への侵入を抑えている可能性が考えられた。脾臓が中枢神経への侵入に関わる可能性が指摘されていることから、腹腔内接種感染初期における脾臓での病原体プリオンの蓄積について検討した。腹腔接種後、50日、70日、90日、110日の各マウスから脾臓を摘出し、病原体プリオンの蓄積を調べた。野生型マウスでは、50日ですでに4匹中3匹で病原体プリオンタンパク質の蓄積が見られ、70日で一度抑えられた後に、90日で再び検出され始め、110日ではすべてのマウスで病原体プリオンタンパク質の蓄積が見られた。PBP 遺伝子欠損マウスも程度の差はあるがほぼ同様のパターンを示した。PBP 遺伝子導入マウスでは、蓄積が遅れる傾向であったが差は顕著ではなかった。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山越 智 (YAMAGOE Satoshi)

国立感染症研究所・真菌部・主任研究官

研究者番号：00212283