

1. 課程・論文博士の別	課程博士
2. 申請者氏名	李得燦 (り とく ちゃん)
3. 学位の種類	博士 (農学)
4. 学位記番号	博農 第2653号
5. 学位授与年月日	平成15年9月30日
6. 論文題目	欠損変異プリオン蛋白を用いた正常型プリオン蛋白の抗アポトーシス機能に関する研究

#### 8. 論文内容の要旨

トにおける Creutzfeldt-Jakob disease や、ヒツジにおける scrapie およびウシにおける Bovine spongiform encephalopathy のプリオン病は異常型プリオン蛋白が体内に侵入あるいは生じることによって、宿主が本来持っている正常型プリオン蛋白 ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) が異常型プリオン蛋白 ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) へと変換し発症するというプリオン仮説が提唱されている。プリオン病に罹患した個体の脳組織では、多くの場合に神経細胞の空胞変性が見られることが報告されている。正常型プリオン蛋白遺伝子は哺乳類で高い相同性を持ち、様々な臓器で発現していることから、何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。現在、正常型プリオン蛋白質の機能を研究するため、世界の数カ所でジーンターゲットングによりプリオン遺伝子を欠損したマウス ( $\text{Prnp}^{0/0}$ ) が作製されている。これら  $\text{Prnp}^{0/0}$  マウスは  $\text{PrP}$  遺伝子との相同性が 25%である *doppel* 遺伝子 ( $\text{Prnd}$ ) の発現レベルによって ZN-1 型と ZN-2 型で分かれる。ZN-1 型と ZN-2 型により、欠損マウスの表現型が異なる。したがって、 $\text{PrP}^{\text{C}}$  の機能について様々な議論が見られる。最近、プリオン蛋白が神経細胞株のアポトーシスを抑制することが明らかになった。ところが、 $\text{Prnd}$  は正常型マウスの脳では発現レベルが低い、ZN-2 型  $\text{Prnp}^{0/0}$  マウスでは発現レベルが高い。この  $\text{Prnd}$  遺伝子産物 (Dp1) が ZN-2 型マウスの行動異

常の原因と推論されている。そこで、ZN-2 型 *Prnp*<sup>0/0</sup> マウスから樹立した PrP-欠損神経細胞株 (HpL3-4) におけるアポトーシス細胞死について Dp1 蛋白の関与および、アポトーシス細胞死抑制における正常型プリオン蛋白の構造的な機能中心の特定を目的として以下の研究を行った。

第一章では、PrP-欠損神経細胞株におけるアポトーシス細胞死に Dp1 発現が関与するものであるかを検討した。Dp1 は行動異常をおこす ZN-2 型 *Prnp*<sup>0/0</sup> マウスの脳においては過発現しているが、行動異常を示さない ZN-1 型 *Prnp*<sup>0/0</sup> マウスにおいては発現されていないことが明らかになった。行動異常をおこす R1KN 型 *Prnp*<sup>0/0</sup> マウスの hippocampal から樹立した PrP-欠損神経細胞株 (HpL3-4) におけるアポトーシス細胞死に Dp1 発現が関与するものであるかについて解析を試みた。マウス *doppel* 遺伝子全翻訳領域を含む発現ベクター (pMSCVpuro-Dp1-EGFP) を作製し、PrP-欠損神経細胞株にレトロウイルスベクターを用いて導入し、Dp1 過発現細胞株 (HpL3-4-Dp1) を作製した。HpL3-4 と Dp1 過発現株 HpL3-4-Dp1 を無血清培地下で培養した。光学顕微鏡下で観察したところ、培養後、24 時間以内に HpL3-4 と HpL3-4-Dp1 ともに顕著な細胞の円形化が観察された。また、LDH assay による細胞死を経時的に回収した細胞から観察したところ、24 時間血清除去による細胞死が HpL3-4 細胞株と比較して 120% であった。さらに、無血清培地下でおこる細胞のアポトーシスを経時的に回収した細胞から DNA Ladder を観察したところ HpL3-4-Dp1 の方が強く観察された。これらの結果から Dp1 の過発現は PrP-欠損神経細胞株において無血清培地下でのアポトーシスによる細胞死を促進する可能性が示唆された。

PrP 遺伝子 (*Prnp*) の 16 kb 下流に *doppel* 遺伝子 (*Prnd*) が位置する。*Prnd* の *Prnp* との相同性は 25% である。また、Dp1 はほとんどの哺乳動物において見られる事から何らかの役割を果たしていると考えられるが、その機能については未だ不明である。そこで、第二章では、Dp1 蛋白は PrP の N-末端側の octarepeat region, stop transfer region (STE), tandem repeat 部位が欠損されている構造を持っていることに着目し、アポトーシス細胞死抑制における Dp1 の機能

について検討した。マウス PrP の N-末端側のアミノ酸コドン Aa 1-124 (PrP (Aa 1-124)) を含む Dpl の ORF の発現ベクターを作製し、PrP-欠損細胞株に導入し、PrP (1-124) /Dpl fusion 蛋白を安定発現させた細胞株を作製した。この PrP (1-124) /Dpl fusion 蛋白発現細胞株は PrP 遺伝子導入細胞株同様、無血清培地下で生存した。経時的に回収した細胞を DAPI 染色や DNA 断片化により解析したところ、この細胞株はアポトーシスによる細胞死が強く抑制されていることが観察された。PrP-欠損細胞株における無血清培地下での細胞死抑制が PrP (1-124) /Dpl fusion 蛋白に起因するものであるかをより詳細に検討するため、PrP のアミノ酸コドン Aa 1-95 (PrP (1-95)) のさらに短い欠損部位を持っている PrP (1-95) /Dpl fusion 蛋白発現細胞株を作製した。無血清培地下で培養し、経時的に回収した細胞を DAPI 染色や DNA 断片化検出により解析したところ、アポトーシスによる細胞死は抑制されなかった。このことから、PrP-欠損細胞株のアポトーシス細胞死抑制において Dpl は N-末端側に octarepeat region, stop transfer region, tandem repeat 部位が欠損されている構造の PrP のような機能を持っていることが示唆された。

第三章では、アポトーシス細胞死抑制における正常型プリオン蛋白の構造的な機能中心の特定を検討した。正常型プリオン蛋白遺伝子の octarepeat region など N-末端側の重要構造部位いくつかの領域を欠損させた欠損変異プリオン蛋白発現ベクターを作製した。構築したベクターを PrP-欠損神経細胞株に導入し、欠損変異プリオン蛋白発現神経細胞を作製した。作製した細胞株すべてについて無血清培地下で 24 時間培養後の細胞死について DAPI 染色や抽出 DNA 断片化を解析した。PrP-欠損神経細胞株にプリオン蛋白全域を発現させた神経細胞と tandem repeat 部位以後 (Aa 124-146) を欠損させた欠損変異プリオン蛋白を発現させた神経細胞は無血清培地下で生存した。しかし、octapeptide-repeat domain (Aa 53-94) や STE と tandem repeat 部位 (Aa 95-132) を欠損させた欠損変異プリオン蛋白発現神経細胞は無血清培地下で細胞死が観察された。また、アポトーシス特異的な核の凝縮及び DNA 断片化が DAPI 染色や DNA ラダー検出法

で観察され、無血清培地下における細胞死はアポトーシスによることが認められた。さらに、アポトーシスによる細胞死率を調べたところ、発現ベクターのみ導入した細胞株と比較して octapeptide-repeat domain や STE と tandem repeat 部位を欠損させた細胞株はそれぞれ 160%、120%であった。以上の結果から、無血清培地下でのアポトーシス細胞死抑制における正常型プリオン蛋白の構造的な機能中心の領域が特定された。

本研究により、Dpl の発現は PrP-欠損神経細胞株において無血清培地下でのアポトーシスによる細胞死促進作用があることを Dpl 遺伝子の導入細胞株を用いて明らかにした。また、Dpl 遺伝子に PrP の N-末端側の遺伝子を組み込んだ PrP/Dpl fusion 蛋白遺伝子導入株によって、PrP-欠損細胞株のアポトーシス細胞死抑制における Dpl は PrP の N-末端側部位が組み込まれると PrP のような機能を持っていることが示唆された。さらに、欠損変異プリオン蛋白発現神経細胞を用い無血清培地下でのアポトーシス細胞死抑制における正常型プリオン蛋白の構造的な機能中心の領域を特定することに成功した。本研究の知見は、正常型プリオン蛋白の機能を考える上で重要な発見であると考えられる。