

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 李 得 燦

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ティングによりプリオン遺伝子を欠損したマウス ($Prnp^{0/0}$) が作製されている。これら $Prnp^{0/0}$ マウスは PrP 遺伝子との相同性が 25%である *doppel* 遺伝子 (*Prnd*) の発現レベルによって、発現していない ZN-1 型 (ZrchI, Edinburgh) と発現レベルが高いが ZN-2 型 (Ngsk, Rikn, Rcm0, ZrchII) に分かれている。この *Prnd* 遺伝子産物 (Dpl) が ZN-2 型マウスの ataxia による行動異常の原因と推論されている。最近、ZN-2 型 $Prnp^{0/0}$ マウスの hippocampus から樹立した PrP-欠損神経細胞株 (HpL3-4) を用いて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ている。そこで、HpL3-4 におけるアポトーシス細胞死について Dpl 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 Dpl 発現が関与するものであるかを検討した。Ataxia による行動異常をおこす Rikn $Prnp^{0/0}$ マウスの hippocampus から樹立した HpL3-4 細胞株に *Prnp/Prnd* chimeric mRNAs が検出された。この細胞におけるアポトーシス細胞死に Dpl 発現が関与するか否かについて解析を試みた。HpL3-4 と Dpl 過発現株 HpL3-4-Dpl を樹立して、無血清培地で培養した。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-Dpl とともに顕著な細胞の円形化が観察された。また、LDH assay により、細胞死を観察したところ、24 時間血清除去による細胞死は、HpL3-4 細胞株と比較して 120%に増加した。さらに、細胞死の強弱を、DNA Ladder により観察すると、HpL3-4-Dpl において、HpL3-4 に比較してより強度のアポトーシ

スが観察された。したがって、PrP-欠損神経細胞株における DpL の過発現は、無血清培地下でのアポトーシスをさらに促進することが観察された。

Dpl 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。しかしながら、その機能については未だ不明である。そこで、第二章では、Dpl 蛋白は PrP の N-末端部位が欠損されている構造を持っていることに着目し、Dpl と PrP の構造の差によるアポトーシス細胞死抑制機能について検討した。マウス PrP の N-末端側のアミノ酸 1 から 124 番まで (PrP (1-124)) を含む PrP/Dpl fusion 蛋白、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さらに検討するため、PrP のアミノ酸 1 から 95 番までのさらに短い欠損部位 (PrP (1-95)) を発現する 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が観察されなかった。このことから、無血清培地下でのアポトーシス細胞死抑制の機能に対して、PrP の N-末端部位を発現させた Dpl 蛋白は、PrP のように無血清培地下でのアポトーシス細胞死抑制の機能を有することが示唆された。PrP のアミノ酸 1 から 124 番までの N-末端部位が存在することがアポトーシス細胞死抑制に重要と考えられる。

さらに第三章では、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 N-末端の機能中心を同定した。正常型プリオン蛋白遺伝子の 5' 上流において、octarepeat region など、いくつかの領域を欠損させた欠損変異プリオン蛋白を発現する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を発現する神経細胞を作製した。作製した細胞株について無血清培地下で、DAPI 染

色や抽出 DNA 断片化解析を行なった。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及び、hydrophobic region 以後アミノ酸 124 から 146 番までを有する変異プリオン蛋白を発現させた神経細胞は、無血清培地下でアポトーシスが見られなかった。しかし、octapeptide-repeat domain や hydrophobic domain を欠損させた欠損変異プリオン蛋白発現神経細胞は、無血清培地下でアポトーシスが観察された。また、アポトーシス細胞では、核の凝縮及び DNA 断片化が観察された。以上の結果から、アポトーシス細胞死抑制に関する正常型プリオン蛋白の構造的な機能中心の領域は、PrP の N-末端部位に存在する octapeptide-repeat domain と hydrophobic region であることが明らかにされた。

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が明らかにされた。また、Dpl 遺伝子に PrP の N-末端側の遺伝子を付加させた。この PrP/Dpl fusion 蛋白遺伝子導入株によって、PrP のような抗アポトーシス機能が観察された。さらに、欠損変異プリオン蛋白発現神経細胞を用いた研究により、正常型プリオン蛋白のアポトーシス抑制の機能中心、PrP の N-末端部位に存在する octapeptide-repeat domain と hydrophobic region であることが明らかにされた。本研究の知見は、正常型プリオン蛋白の抗アポトーシス機能を考える上で重要な発見であると考えられる。

従って、審査員一同は、当論文内容が農学博士の資格を有するとの結論に達した。