

## 論文内容の要旨

応用動物科学専攻

平成13年度博士課程進学

氏名 作道 章一

指導教官 小野寺 節

論文題目 Studies on the functions of cellular prion protein  
in copper homeostasis and antioxidative defense

(銅恒常性および抗酸化防御における正常型プリオン蛋白質機能に関する研究)

伝達性海綿状脳症はヒトにおける Creutzfeldt-Jakob 病、Gerstmann-Straussler-Scheinker 症候群、致死性家族性不眠症や動物におけるスクレイピー、牛海綿状脳症などの致死的な神経変性疾患である。これらの病気はその発症にプリオン蛋白質 (PrP) が深く関わっているためプリオン病とも呼ばれる。プリオン病の病原因子と考えられているのが異常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) であり、宿主に存在する正常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) の構造異性体である。アミノ酸一次構造上では違いがないが、①蛋白質分解酵素に対する抵抗性、②界面活性剤に対する溶解性および③蛋白質高次構造で両者は区別できる。プリオン病の発病機構は、次のように考えられている。外部から PrP<sup>Sc</sup> が接種されるか、もしくは原因不明の理由で PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Sc</sup> ができると、PrP<sup>Sc</sup> は PrP<sup>C</sup> に作用して次々と PrP<sup>Sc</sup> へと変換していく。PrP<sup>Sc</sup> は PrP<sup>C</sup> に比べ半減期が長く、分解されにくい性質を持っており、細胞内に蓄積する。感染時、PrP<sup>Sc</sup> の蓄積は神経細胞に特に見られる。PrP<sup>Sc</sup> は PrP<sup>C</sup> より変換されるので、結果的に細胞内で PrP<sup>Sc</sup> の蓄積と PrP<sup>C</sup> の枯渇が起き、これらが神経細胞死を誘導し、神経細胞の脱落を起こすものと考えられている。また、プリオン感染動物の脳内銅量は臨床症状が現れる前に低下していることが報告されており、脳内銅量の調節破綻もプリオン病の病態発現に重要な役割を果たしているものと推察される。成熟 PrP<sup>C</sup> は N 型糖鎖が 2 ケ所

付加され、glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) アンカーで細胞膜に繫留された状態で存在し、ウェスタンブロッティングでは33-35kDaのバンドとして検出される。PrP<sup>C</sup>が2価の銅イオンとN末端のP(Q/H)GGG(G/-)WGQの5回繰返し配列（オクタリピート領域）で結合することはさまざまな研究室から報告され、確認されているが、その機能については未知の部分が多い。

最近、PrP<sup>C</sup>の機能解析を目的として、PrP遺伝子（*Prnp*）ノックアウトマウス海馬由来不死化神経細胞株が樹立された。この*Prnp*欠損神経細胞株は無血清培地においてアポトーシスを起こし、*Prnp*の再導入によりアポトーシスが抑制されることが報告されている。PrP<sup>C</sup>のアポトーシス抑制機構を知ることは、PrP<sup>C</sup>の欠乏を原因の一つとするプリオン病の病態解明につながるという点で重要である。本研究ではPrP<sup>C</sup>のアポトーシス抑制機構の解明を目的とし、PrP<sup>C</sup>が銅恒常性維持および抗酸化防御機能を持つことにより、アポトーシスを抑制することを明らかにした。

第一章では、*Prnp* 欠損神経細胞の血清除去により誘導される細胞死が活性酸素の発生を原因とし、ミトコンドリアのアポトーシス誘導経路を経て細胞死が誘導される可能性を証明するために、活性酸素を消去する酵素である Cu/Zn Superoxide dismutase (SOD) 遺伝子 (*SOD-1*) およびミトコンドリアのアポトーシス誘導経路を抑制することで知られる *bcl-2*, *bcl-x<sub>L</sub>* 遺伝子の過剰発現によって無血清培地での *Prnp* 欠損神経細胞の細胞死を解析した。それは、様々な神経細胞株で血清除去が活性酸素発生を原因とし、ミトコンドリアのアポトーシス誘導経路を経てアポトーシスを起こすことが報告されているためである。①*bcl-2* 遺伝子、②*bcl-x<sub>L</sub>* 遺伝子、③*SOD-1* 遺伝子、④空ベクターを *Prnp* 欠損神経細胞に導入して得た細胞株を無血清培地において培養し、経時的に光学顕微鏡下での形態観察、核染色による核形態変化の観察、および Propidium iodide 染色後フローサイトメトリー解析を行った。その結果、血清除去 48 時間において、空ベクターを導入した細胞 (④) は顕著な細胞死を示し、血清除去 24 時間で核染色およびフローサイトメトリー解析においてアポトーシスの特徴を示した。一方、*bcl-2*, *bcl-x<sub>L</sub>*, *SOD-1* 遺伝子を導入した細胞 (①、②、③) は、それらを示さなかった。これらの結果から、*Prnp* 欠損神経細胞株の無血清培地での細胞死は *SOD-1* 遺伝子の過剰発現により抑制されたことから、細胞内活性酸素の発生が細胞死の原因の一つであり、*Bcl-2* や *Bcl-x<sub>L</sub>* が抑制できるミトコンドリアの関与するアポトーシス誘導経路を介している可能性が示唆された。

第二章では以上の知見をもとに、PrP<sup>C</sup>が活性酸素の消去に関わっている可能性について検討するため、PrP 非発現・再発現 *Prnp* 欠損神経細胞の SOD 活性および活性酸素量の測定を行った。SOD 活性の測定は WST-キサンチンオキシダーゼ系を用いた吸光度法により行なった。その結果、*Prnp* の再導入により Cu/Zn SOD の産生量に変化は見られなかったが、SOD 活性の有意な上昇が見られた。さらに、血清除去下での活性酸素の発生量を活性酸素特

異的蛍光プローブ Dihydroethidium(DH)を用いたフローサイトメトリー解析により調べた。その結果、*Prnp* 欠損神経細胞で見られる活性酸素の発生が *Prnp* 遺伝子再導入株では抑制されていることが示された。PrP<sup>C</sup>は銅に特異的に結合することが知られている。そして、Cu/Zn SODは銅により活性が制御を受けることが知られている。そこで、PrP<sup>C</sup>が細胞内銅量の調節を行う可能性について検討するため、PrP 非発現・再発現 *Prnp* 欠損神経細胞株の血清除去系を用いて、PrP<sup>C</sup>発現が細胞内銅量に与える影響を調べた。銅の定量は硝酸分解サンプルをゼーマンバックグラウンド補正原子吸光分光光度計を用いて測定をおこなった。また、銅量は乾燥重量当たりの銅量(Cu  $\mu$ g/g dry weight)で比較を行った。活性酸素の発生が観察される血清除去6時間において、PrP 非発現 *Prnp* 欠損神経細胞株の細胞内銅量低下が観察されたが、PrP 再発現 *Prnp* 欠損神経細胞株は細胞内銅量の有意な低下はなく、PrP<sup>C</sup>発現により血清除去により誘導される細胞内銅量低下が抑制されることが示唆された。以上の結果から、PrP<sup>C</sup>は細胞内 SOD 活性を上昇させることにより活性酸素を消去し、血清除去による細胞死を抑制していることが示唆された。また、PrP<sup>C</sup>は細胞内銅濃度の維持に役割を果たしており、これが SOD 活性の制御に関わる可能性が考えられた。

第三章では、PrP<sup>C</sup>が SOD 活性を制御する機構について調べた。まず、PrP<sup>C</sup>のさまざまな領域を欠損させた PrP<sup>C</sup>発現細胞の SOD 活性を測定することで、PrP<sup>C</sup>による SOD 活性の制御に重要な領域を調べた。その結果、疎水性領域欠損 PrP<sup>C</sup>発現細胞(HpL3-4- $\Delta$ #2)は空ベクター導入細胞(HpL3-4-EM)と同等の SOD 活性を示したが、オクタリピート領域欠損 PrP<sup>C</sup>発現細胞(HpL3-4- $\Delta$ #1)は HpL3-4-EM よりも有意に低い SOD 活性を示した。一方、野生型 PrP<sup>C</sup>や PrP( $\Delta$ 124-146)を発現した細胞(それぞれ、HpL3-4-PrP および HpL3-4- $\Delta$ #3)は、HpL3-4-EM よりも有意に高い SOD 活性を示した。これらのことから、PrP<sup>C</sup>による SOD 活性の制御はオクタリピート領域だけでなく、疎水性領域も重要であることが示唆された。そこで、さらに PrP<sup>C</sup>の疎水性領域に結合することが知られている Stress-inducible protein 1(STI1)と PrP<sup>C</sup>依存的 SOD 活性化の関連について調べるため、STI1-PrP<sup>C</sup>結合を阻害することが知られている STI1 pep. 1 および p10 ペプチドが SOD 活性に与える影響を調べた。その結果、STI1 pep. 1 および p10 ペプチドいずれも HpL3-4-PrP 細胞において SOD 活性を阻害したが、HpL3-4-EM 細胞には影響がなかった。以上の結果から、PrP<sup>C</sup>依存的 SOD 活性化には STI1 が PrP<sup>C</sup>の疎水性領域に結合することと PrP<sup>C</sup>のオクタリピート領域が存在することの両方が重要であることが示唆された。

本研究では、①細胞内活性酸素の発生が *Prnp*欠損神経細胞株の血清除去による細胞死に重要であること、②PrP<sup>C</sup>が SOD 活性を上昇させることで活性酸素を消去し、細胞死を抑制すること、③PrP<sup>C</sup>の発現が血清除去による細胞内銅量低下を抑制すること、④PrP<sup>C</sup>依存的 SOD 活性化には STI1 の結合およびオクタリピートの存在が重要であることを明らかにした。これらの結果は、PrP<sup>C</sup>が銅恒常性を維持することで抗酸化防御に関わっていることを示唆し

ている。プリオン感染時の脳は、PrP<sup>Sc</sup>の蓄積により酸化ストレスが発生していることが知られている。この状況下で、同時にPrP<sup>C</sup>の枯渇が起きているので細胞内および脳内銅量の調節に破綻をきたすことで酸化ストレスを消去することができず、脳の神経細胞が細胞死に至るというメカニズムが考えられるが、今後の研究が必要である。本研究で得られたPrP<sup>C</sup>の機能に関する知見は、PrP<sup>C</sup>の欠乏が原因の一つであるプリオン病の病態解明や治療につながるという点で重要であると考えられる。