

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金 芝 環

正常型プリオン蛋白遺伝子の生体での機能を調べる研究のため、世界で何種類ものプリオン蛋白遺伝子欠損マウス (*Prnp*^{-/-}) が作製された。これらはプリオン遺伝子の欠損部位によって1型と2型に分かれている。1型である Zrch I 型と Edinburg 型 *Prnp*^{-/-} マウスは正常に発達する一方、2型である Ngsk、Rcm0、Zrch II 型 *Prnp*^{-/-} マウスでは Doppel (Dpl) 遺伝子が脳に異所発現し、運動失調を起こすと知られている。Dpl 遺伝子は心臓や精巣で発現し、中枢神経系にはあまり存在していない。現在、Dplの機能についてはまで明らかになっていない。新たに作られた Rikn 型 *Prnp*^{-/-} マウスは *Prnp* ORF と intron 2 の一部が欠損され、加齢に伴う運動失調が現れた。本研究では、2型 Rikn *Prnp*^{-/-} マウスにおける Dpl と嗅覚の機能の関係および組織学的な解析を目的として研究を行った。

Prnp^{+/+} (C57BL/6J)、行動異常を起こす2型 Rikn *Prnp*^{-/-} 及び1型 Zrch I *Prnp*^{-/-} マウスを用いて Dpl の検出について検討した。2型 Rikn *Prnp*^{-/-} マウスの大脳、小脳、嗅球では、*Prnp* や *Prnd* 単独の mRNA は見られなく、3種類の *Prnp/Prnd* chimera mRNA が検出された。この産物は sequence 解析により、*Prnp* promoter から始まる *Prnp* exon 2、intergene exon、*Prnd* exon 2 などを含む chimera mRNA であることが分かった。さらに、週齢別の大脳、小脳、嗅球を用いて western blotting を行った結果から、Dpl の発現は脳の部位による差はなく、成熟した後、脳の Dpl 発現程度でも差はないことが明らかにされた。1型 Zrch I *Prnp*^{-/-} と2型 Rikn *Prnp*^{-/-} マウス 及び *Prnp*^{+/+} マウスの週齢に伴う嗅覚識別能力について検査を行うために様々な行動実験を行った。Simple olfactory test の結果、*Prnp*^{+/+} と1型 Zrch I *Prnp*^{-/-} マウスは週齢に対する変化が認められなかったが、2型 Rikn *Prnp*^{-/-} マウスでは加齢と共に嗅覚に対する反応が遅かった。Food localization test はマウスが food (チーズ) を探す時間を測定、分析した。この実験でも2型 Rikn *Prnp*^{-/-} マウスは反応時間が遅く、simple olfactory test と同一な結果が得られた。また、二つの刺激剤を連続的に与え、匂いの区別能力を検査するため、老齢のマウスで行った habituation /dishabituation test の結果、*Prnp*^{+/+} と1型 Zrch I *Prnp*^{-/-} マウスは刺激剤を導入する時すぐ反応を示したが、2型 Rikn *Prnp*^{-/-} マウスは、約2分たった時点で少し反応をみせ、認識能力が低下しているのが本研究で明らかとなった。老齢の2型 Rikn *Prnp*^{-/-} マウスにおける運動失調による誤差を排除するために行った odor recognition test の結果から、2型 Rikn *Prnp*^{-/-} マウスは加齢に伴う嗅覚機能の障害が起こると考えられた。

さらに、嗅覚機能の障害を現われる2型 Rikn *Prnp*^{-/-} マウスを用いて病理組織学的変化を解析した。老齢の2型 Rikn *Prnp*^{-/-} マウスで Hematoxylin -eosin 染色を行った結果、脳幹部と三叉神経根部で空胞変性が観察された。小脳は強度のプルキンエ細胞の脱落や樹状突起

の伸展が不良であるのが認められた。さらに、嗅球では僧帽細胞の脱落が観察された。抗-GFAP抗体を用いて免疫組織学的観察の結果、2型 R1kn *Prnp*^{0/0}マウスは嗅球の全般で陽性反応が観察し、特に外叢状層と顆粒細胞層で強度の glia 細胞の増殖が観察された。また、抗-ssDNA(single stranded DNA)抗体と様々な caspase 抗体を用いて染色行ったところ、嗅球の僧帽細胞で抗-ssDNA抗体、caspase-3抗体に対する反応性が検出された。これらの結果から、嗅球の僧帽細胞では caspase-3の活性化から誘導されるアポトーシス細胞死が起こると推測された。

本研究により、脳に異所発現する Dpl は小脳のプルキンエ細胞の変性による運動失調以外に、嗅球の僧帽細胞における細胞死にも関与しているのが明らかにされた。また、Dplによる嗅球の組織学的変性は嗅覚認識及び識別能力の低下に関与すると考えられる。従って、本研究の結果は、Dplの細胞毒性の研究につながり、PrP^CとDplの相互作用の解析に重要な役割を果たすと考えられる。

これらはプリオン病における研究の上で重要な知見を与えら。従って、審査委員一同は博士(獣医学)の資格を十分に有すると判断した。