

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中村 出

プリオン病の病原体は異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})と呼ばれ、正常型プリオン蛋白質(PrP^C)が変換して増幅されると考えられている。PrP^Cはその機能に関しては不明な点が多い。PrP^CはPrP^{Sc}の増殖のための鋳型となると考えられていることから、PrP^Cはプリオン病の発病には必要であり、さらにPrP^Cの発現量はプリオン病の潜伏期間に影響すると考えられている。本研究では、PrP^Cの性状を理解するために、細胞内のPrP^Cの局在及び遺伝子構造の解析を行った。PrP^Cは神経細胞に多く発現しており、また、プリオン病発症時に病態を呈するのは脳神経系であることから、プリオン病及びプリオン蛋白質の研究を行う上で、神経細胞は有用なものである。そこで第1章では、マウスから神経細胞株の樹立を行った。マウス胎児より海馬領域を初代培養・不死化し、細胞株を樹立した。樹立した細胞株(NB3-2)が神経細胞としての特徴を維持しているかを確認するために、MAP2の発現を解析した。また、ニューロフィラメント及びGFAPのmRNAの発現を解析した。その結果、細胞株NB3-2はMAP2、ニューロフィラメントが各陽性であり、GFAPは陰性であった。また、NB3-2は神経前駆細胞としての性質も有している細胞株であった。神経細胞株NB3-2は神経細胞としての特徴を多く維持している細胞株であり、プリオン蛋白質の研究に有用な細胞株であると期待される。第2章では、スクレイピー非感染細胞において核へのPrP^Cの局在を示すことを目的とし、神経細胞株を用いて蛍光抗体法にてPrP^Cの検出を行った。PrPは主に神経細胞の細胞膜に局在すると考えられてきたが、近年スクレイピー感染細胞においてPrP^{Sc}が細胞質中及び核内に局在することが示されている。抗PrPモノクローナル抗体 1D12を用いて蛍光抗体法により観察した。その結果、マウスPrP発現Npl2細胞株で核に、ウシPrP発現HpL3-4細胞株およびウシPrP発現Npl2細胞株で細胞膜近傍及び核に強い蛍光が観察されたが、マウスPrP発現HpL3-4細胞株では蛍光を示さなかった。本研究により、細胞種によって違いはあるもののPrP^Cがスクレイピー非感染細胞において核に局在することが示された。本研究は新たにPrP^Cの発現も核内に存在することを示すものである。第3章では、黒毛和種 of 材料を用いて、プロモーター活性を持つと予想される領域の塩基配列を明らかにすることを目的に研究を行った。スクレイピーはPrP遺伝子の多型により、病気の潜伏期間が影響されることが知られている。一方ウシに関しては、塩基置換とBSEの発症との間には大きな関係はないとされてきたが、近年ではウシPrP遺伝子のエキソン1領域近傍の多型も報告されており、ウシにおいてもプリオン病の発症にPrP遺伝子が影響する可能性が示唆されている。しかし、日本で飼育されている黒毛和種に関する知見は少ない。そこで、日本で飼育されている黒毛和種においてプロモーター領域に多型を持つ個体の頻度を調べるために、エキソン1近傍の領域をSSCPにより解析した結果、-213~+83及び+36~+323に多型が検出された。多型の頻度はそれぞれ-213~+83では45個体中5個体、+36~+323では45個体中6個体であった。次に、黒毛和種のPrP遺伝子においてSSCPにより+36~+323で見つかった多型がホルスタインで報告されている12bpの欠損/挿入変異と同じ塩基配列のものであるのかを確認するために塩基配列の解析を行った。その結果、イントロン1の領域(+301)にホルスタインのPrP遺伝

子で見られるものと同じ塩基配列の欠損/挿入変異が見出された。また、イントロン1の+1028~+2502 の領域の塩基配列の解析を行ったところ、この領域にはプロモーター活性に大きな影響を与えると予想される転写因子認識配列は存在しなかった。本研究により、日本で飼育されている黒毛和種及びホルスタインのPrP遺伝子プロモーター領域の塩基配列が明らかにされ、他の品種で確認されているイントロン1の欠損/挿入変異と同じ塩基配列をもつ欠損/挿入変異が確認された。本研究で示されたこれらの新たな知見は、いまだ未解明であるPrP^Cの機能解明に有用なものである。したがって審査委員一同は、本論文が博士(農学)の内容を有するものと判定した。