

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 薛 光愛

プリオン病は、正常プリオン蛋白質 (PrP^c) が異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) に構造変換し、異常プリオン蛋白質が脳内に蓄積することにより、神経細胞の機能不全および神経細胞死が引き起こされる致死的な神経変性疾患である。プリオン病には、ヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease)、ヒツジとヤギにおけるスクレイピー (scrapie)、ウシにおける牛海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathies: BSE) が含まれる。プリオン病の病原体 (プリオン) の増殖には正常型プリオン蛋白質の発現が必須である。ヒト、ヒツジではプリオン蛋白質遺伝子 (*PRNP*) の蛋白翻訳領域のアミノ酸多型がプリオン病に対する抵抗性と関連があると報告されている。一方で、ウシにおいて *PRNP* の蛋白翻訳領域のアミノ酸多型は存在するが、プリオン病と関連する多型は存在しないと報告されている。しかしながら、プリオン蛋白質の発現レベルと関係するプロモーター領域とプリオン病抵抗性について、近年プロモーター領域の上流に存在する 23 bp 挿入及び欠損が BSE の感受性と関連があると報告されている。現在まで、*PRNP* の蛋白翻訳領域のアミノ酸多型については研究が盛んに行われていたが、ウシプロモーター領域については十分な研究がなされていない。そこで、本研究では、ウシプリオン蛋白質遺伝子プロモーター領域の多型、プロモーター活性、および転写に関わる重要な領域を明らかとすることを目的として以下の研究を行った。

第一章 BSE の原因はスクレイピーに感染させたヒツジ、および BSE に感染したウシ由来の肉骨粉を経口摂取によるものであると一般的に考えられている。BSE の原因となる PrP^{Sc} はウシだけではなく、ヒトにも感染性を持っている。そのため、多くの国では食物連鎖から BSE 罹患牛を除去することを目的としており、一つの戦略として挙げられるのは BSE 抵抗性ウシの育種である。現在、日本で BSE 陽性牛が 35 頭発見されたが、その内黒毛和種が 3 頭である。肉用種が乳用牛に比べ、頭数が多いにもかかわらず、BSE 陽性牛が少ないことから、肉用種には BSE に対する抵抗性が存在するのではないかと考えられている。そこで本研究では、肉用種の 95% を占める黒毛和種の *PRNP* プロモーター領域の多型を明らかにすることを目的とした。そしてそのプロモーター領域の活性について研究を行った。黒毛和種 28 頭脂肪組織材料から DNA を抽出し、目的のプロモーター領域を増幅し、pT7-Blue T ベクターに導入、クローニングをし、塩基配列決定を行った。決定された塩基配列を GenBank のホルスタイン種配列 AJ298878 と比較した結果、7 箇所 (-184A→G, -141T→C, -85T→G, -47C→A, -6C→T, +17C→T, +43C→T) で一塩基遺伝子多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) が確認された。その中には、これまで報告されているホ

ルスタイン種塩基置換と一致したのが 2 箇所 -184/ 49246(A→G), -85/ 49345(T→G) [AJ298878]含まれていた。そして、新たに黒毛和種において 5 箇所の塩基置換を確認し、そのうち、2 箇所の Sp1 結合領域に塩基置換が存在した。これらの塩基置換がプロモーター活性に及ぼす影響を明らかにするために、ルシフェラーゼアッセイを行った。それぞれ 6 つのハプロタイプをルシフェラーゼレポーターベクターに組み込み、マウス神経繊維芽腫細胞 N2a に遺伝子導入して 48 時間培養後、プロモーター活性測定を行った。6 つのハプロタイプのうち、Sp1 結合領域で 6C→T 塩基置換を示したハプロタイプ及び 141T→C 塩基置換を示したハプロタイプはトランスフェクション 48 時間後の発現レベルがワイルドタイプのハプロタイプより有意に低下していた。以上の結果から、黒毛和種 *PRNP* プロモーターにはいくつかの多型が存在し、中にはプロモーター活性に影響を及ぼす塩基置換が存在することが明らかとなった。このような塩基置換は BSE 抵抗性牛の育種に役に立つと考えられた。

第 2 章 第 1 章ではウシ *PRNP* 5' 側領域に存在する Sp1 結合領域の 6C→T 多型によりウシ *PRNP* プロモーター活性が低下することを明らかにした。今回さらなる解析の結果、Sp1 結合領域の 47C→A 及び 12bp の挿入/欠失の多型は同調してウシ *PRNP* プロモーター活性に影響を与えることがレポーター遺伝子アッセイにより示された。47A と 23 bp 欠失/12bp 挿入 あるいは 23bp 挿入 /12bp 挿入を含むハプロタイプは他のハプロタイプ (23bp 欠失/12bp 挿入 or 23bp 挿入/12bp 欠失と 47C) 及び野生型のハプロタイプ (23 bp 欠失/12bp 欠失 と 47C) に比べて有意に低いプロモーター活性が観察された。さらに、ゲルシフトアッセイの結果、ウシ *PRNP* プロモーター領域の二つの多型が同調して Sp1 が *PRNP* プロモーター領域へ結合する活性に影響を与えることが明らかとなった。これらの結果により、2 箇所の Sp1 結合領域の多型は Sp1 の *PRNP* 領域へ結合及びプロモーター活性をコントロールしているものと考えられた。そして、ウシ *PRNP* プロモーター領域の single nucleotide polymorphisms (SNP) 等の変異は、BSE 発病に影響を及ぼす可能性が考えられる。

第 3 章 ウシ *PRNP* プロモーター領域の転写に関わる重要な領域の同定を目的とした。マウス及びウシプリオン蛋白質を発現するベクターをルシフェラーゼレポーターベクターと同時に Lipofectamine 法によって、N2a 細胞に遺伝子導入し、プリオン蛋白質過剰発現する場合のプロモーター領域の活性変化を測定した。その結果、プロモーター活性は導入したプリオン蛋白質量依存的に抑制されることが分かった。そして、プロモーター活性抑制効果は、マウスプリオン蛋白質のほうがウシプリオン蛋白質より、同じ量の発現ベクターを導入した場合強いことが確認された。以上の結果からプリオン蛋白質を過剰発現させた場合、*PRNP* プロモーター領域が抑制されることが明らかとなった。そこで、具体的にどの領域が過剰発現に反応するのかを明らかにするために、いくつかの挿入/欠失を示すプラスミドを用いて同様のプリオン蛋白質過剰発現実験を行った。その結果、23bp 欠失 12 bp 欠失を示した遺伝子断片のプロモーター活性が抑制された。以上のことより、上流の 23bp、下流の 12 bp を含む領域が転写に重要であることが示唆された。

したがって、審査委員一同は、本人が博士(農学)の資格を十分に有するとの結論に達した。