

学位論文題名

Studies on cellular factors affecting the formation of abnormal isoform of prion protein

(異常型プリオン蛋白質の生成に影響する細胞因子に関する研究)

学位論文内容の要旨

プリオン感染細胞は、プリオン増殖や異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})生成の細胞生物学的機構の解析に用いられてきた。プリオン感染細胞を用いた研究は、 PrP 生合成機構やプリオン増殖の細胞生物学的機構を明らかにするための、多くの知見を提供してきた。しかし、細胞内におけるプリオン増殖の詳細な機構は依然として不明な点が多い。本研究では、プリオンの増殖機構のさらなる理解を目的として、プリオン持続感染マウス神経芽細胞腫Neuro2a(N2a)を用い、プリオン増殖に関連する宿主因子および細胞内環境の同定を試みた。

第1章では、プリオン持続感染N2a細胞内における蛋白質分解酵素抵抗性 PrP (PrP-res)の量的変動の解析を行った。プリオン持続感染N2a細胞内の PrP-res 量は、継代後48時間で最初の量の50%程度にまで減少し、継代後72時間から96時間で元の量にまで回復した。正常型プリオン蛋白質(PrP^{C})の量も変動していたが、 PrP^{C} 量の変動は PrP-res 量の変動には影響しなかった。プリオン持続感染N2a細胞をプリオン非感受性細胞と共培養した場合、非感受性細胞を入れないものと比較して、 PrP-res 量は細胞密度依存的に最大2倍程度にまで増加した。これらのことから、細胞密度は PrP-res 量の変動に影響することが示唆された。この細胞密度依存的 PrP-res 量増加には、液性因子よりも細胞同士の接触が関連していた。細胞のコレステロールの量および局在は PrP-res 生成に影響することが知られているが、これらも細胞密度依存的に変化していた。以上の結果から、細胞密度によって変化する細胞内の微小環境が、 PrP-res 生成に影響を与えていることが示唆された。

第2章では、 PrP^{Sc} 生成における、エンドソーム小胞の酸性化およびエンドソーム系の小胞リサイクリング経路の関与について調べるために、エンドソームの酸性化に寄与することが知られている Clc-5 の遺伝子発現をsiRNAにより抑制した。 Clc-5 を標的としたsiRNAを導入したところ、プリオン感染N2a-5細胞の PrP-res 量は、陰性対照siRNAを導入したものに比べ

て、40%程度にまで減少した。この条件下ではPrP^Cの減少は見られなかった。予想に反し、Clc-5の発現抑制により、N2a細胞のエンドソーム又はライソソームと考えられる小胞の酸性化は亢進した。バフィロマイシンA1処理により小胞の酸性化亢進は抑制されたが、Clc-5の発現抑制によるPrP-res量の減少は抑制されなかった。従って、Clc-5の発現抑制によるPrP-res量の減少の主要因は小胞の酸性化の亢進ではないことが示唆された。一方、Clc-5の発現を抑制したN2a-5細胞では、陰性対照と比べてトランスフェリンの細胞内輸送が遅くなっていた。さらに、Clc-5の発現抑制は、細胞内コレステロールの分布およびリサイクリングエンドソームのマーカーであるrab11の局在を変化させた。これらの結果は、Clc-5の発現抑制により、エンドソーム-リサイクリング経路が障害されたことを示唆している。エンドソーム/ライソソーム小胞の酸性化亢進がPrP-res量の減少の主要因ではなかったことを考えると、Clc-5の発現抑制によるPrP-res量減少の原因は、エンドソーム-リサイクリング経路の障害であると考えられた。

本論文ではPrP^{Sc}生成に、(i) 細胞密度および細胞同士の接触によって調節される細胞内環境、および (ii) エンドソーム-リサイクリング経路、が関与していることを明らかにした。これらの発見は細胞内のプリオン増殖機構のごく一部を明らかにしたに過ぎないが、本論文で得られた結果はプリオンの増殖機構をより詳細に解き明かしていく上で有用であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 堀 内 基 広
副 査 教 授 稲 波 修
副 査 教 授 大 橋 和 彦
副 査 准教授 寺 尾 晶

学 位 論 文 題 名

Studies on cellular factors affecting the formation of abnormal isoform of prion protein

(異常型プリオン蛋白質の生成に影響する細胞因子に関する研究)

プリオン感染細胞は、プリオンの増殖機構や異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の生成機構を紐解くための、多くの知見を提供してきた。しかし、細胞内におけるプリオン増殖の詳細な機構は依然として不明な点が多い。本研究では、プリオンの増殖機構のさらなる理解を目的として、プリオン持続感染マウス神経芽細胞腫 Neuro2a(N2a)を用いて、プリオンの増殖に関連する宿主因子および細胞内環境の同定を試みた。

第1章では、プリオン持続感染N2a細胞における蛋白分解酵素抵抗性PrP(PrP-res)の量的変動について解析した。プリオン持続感染N2a細胞のPrP-res量は一定ではなく、継代後48時間で最初の量の50%程度に減少し、継代後72時間から96時間で元の量まで回復した。プリオン持続感染N2a細胞とプリオン非感受性細胞との共培養の結果から、細胞密度および細胞間の直接接触がPrP-res量の変動の一要因であることが示唆された。細胞のコレステロール量と局在は、PrP-resの生成に影響することが知られているが、これらが細胞密度依存的に変化することを見出した。従って、細胞密度依存的に変化する細胞内の微小環境が、PrP-resの生成に影響することが示唆された。

第2章では、 PrP^{Sc} の生成におけるエンドソームの酸性化の関与について検討するために、エンドソームの酸性化に関与する *Clc-5* の遺伝子発現を siRNA により抑制し、PrP-res 生成への影響を調べた。*Clc-5* の発現抑制により、プリオン持続感染 N2a 細胞の PrP-res 量は、陰性対照の 40%程度にまで減少した。予想に反し、*Clc-5* の発現抑制により、エンドソーム又はライソソームと考えられる小胞の酸性化は亢進したが、このことは PrP-res 量の減少の主要因ではなかった。一方、*Clc-5* の発現を抑制した N2a 細胞では、陰性対照と比べてトランスフェリンの細胞内輸送が遅く、細胞内コレステロールの分布およびリサイクリングエンドソームのマーカーである rab11 の局在が変化していた。これらの変化は、エンドソーム-リサイクリング経路の障害を示唆することから、エンドソーム-リサイクリング経路は PrP^{Sc} の生成に関与すると考えられた。

本研究では、PrP^{Sc}の生成に、(i) 細胞密度および細胞同士の接触によって調節される細胞内微少環境、および (ii) エンドソーム-リサイクリング経路、が関与していることを明らかにした。本論文で得られた結果は、プリオンの増殖機構をより詳細に解き明かしていく上で有用であり、研究成果は博士の学位を授与するに相応しいと考えられる。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者 中満 智史 氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規定第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。