

学 位 論 文 題 名

Studies on cellular mechanism of prion propagation using abnormal isoform prion protein specific detection method

（異常型プリオンタンパク質特異的検出法を用いたプリオンの
細胞内増殖機構の解析）

学位論文内容の要旨

異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の産生はプリオンの増殖において鍵となる現象である。プリオンの細胞内増殖機構を解明するため、プリオン感受性細胞を用いた正常型プリオンタンパク質 (PrP^{C}) の生合成および PrP^{Sc} 産生機構の解析が行われてきた。しかし、プリオンの増殖に必要とされる細胞機構に関しては、未だ十分には理解されていない。プリオンの細胞内増殖機構を理解するためには、 PrP^{Sc} の細胞内動態を解明することが必要不可欠である。そこで本研究では、プリオンの増殖機構を細胞生物学的に解析するため、抗 PrP モノクローナル抗体132を用いた蛍光抗体法により PrP^{Sc} を特異的かつ再現性良く検出する方法を確立した。

第一章では、 PrP^{Sc} 特異的検出法を用いて、プリオン持続感染細胞に存在する PrP^{Sc} の細胞内局在を詳細に解析した。その結果、 PrP^{Sc} がearly endosomesやlate endosomes, lysosomesなどエンドサイトーシスにかかわる細胞内コンパートメントに広範に存在することが明らかになった。特に、 PrP^{Sc} の一部は、細胞の核近傍の領域に存在する endocytic recycling compartments (ERCs) に局在した。プリオン持続感染細胞を20 °Cで培養することで、このような核近傍に集

簇するPrP^{Sc}は細胞の辺縁領域に分散するが、この細胞を引き続き37 °Cで培養すると、30分ほどで分散したPrP^{Sc}が核近傍の領域に再集簇するという現象が見られた。これらの結果は、プリオン持続感染細胞に存在するPrP^{Sc}が、ERCsを経由して、核近傍の領域と細胞膜を含む細胞の辺縁領域の間で、endocytic-recycling pathwayを介して循環していることを示唆している。

第一章で、PrP^{Sc}は特定の細胞内膜画分に蓄積するというよりも、様々なendosomesの間をダイナミックに輸送されていることが示された。このような膜輸送に関連したPrP^{Sc}の細胞内動態がプリオンの持続的な増殖に重要な意味を持つと考えられる一方で、プリオンが細胞内に侵入してから持続感染が成立するまでに必要とされる細胞内現象に関しては依然として不明な点が多い。そこで第二章では、プリオンが感染を成立するまでの過程を解明するため、PrP^{Sc}接種後の早い段階で、接種材料由来のPrP^{Sc}と細胞で新規に産生されたPrP^{Sc}の細胞内動態をそれぞれ同時に解析した。PrP^{Sc}の接種後24時間ほどで、接種したPrP^{Sc}の大部分はlate endosomesやlysosomesに輸送されたが、新規に産生されたPrP^{Sc}はlysosomesではほとんど検出されず、細胞膜、early endosomesおよびlate endosomesに検出された。しかし、その後48時間で、early endosomesおよびERCsで、新規に産生されたPrP^{Sc}の顕著な増加がみられた。このようなPrP^{Sc}の新規産生は、endo-lysosomal pathwayを介した膜輸送だけでなくendocytic-recycling pathwayを介した膜輸送を阻害することでも抑制された。以上の結果から、接種したPrP^{Sc}あるいは新規に産生されたPrP^{Sc}がendo-lysosomal pathwayからendocytic-recycling pathwayに移行することが、持続感染成立につながるプリオンの細胞内増殖の開始に重要であると考えられた。

本論文では、PrP^{Sc}特異的検出法を用いた局在解析により、これまで明らかにされてこなかったPrP^{Sc}の細胞内動態に関する知見を得た。プリオン持続感染細胞に存在するPrP^{Sc}がendocytic-recycling pathwayを介してダイナミックに循環

していること、また、プリオンの接種後早期においては、endo-lysosomal pathway から endocytic-recycling pathway に PrP^{Sc} が移行することが、プリオンの持続感染成立につながる PrP^{Sc} の産生の開始に重要であることがわかった。PrP^{Sc} の細胞内輸送には多様な輸送経路が関係していることが予測されるが、PrP^{Sc} が endocytic-recycling pathway を介した膜輸送に付随して細胞内を循環することで、プリオンの持続的な増殖に有利な状況が生み出されると考えられる。神経細胞内での PrP^{Sc} の産生は、プリオン病で中枢神経系に認められる神経変性と密接に関係していると考えられている。しかし、プリオン病に罹患した動物の脳内で、プリオンの細胞内増殖がどのように神経変性を引き起こすのかは依然として理解されていない。プリオン感染に起因する神経変性機構を十分に理解するにはさらなる研究が求められるが、本論文からもたらされた知見は、プリオンの増殖による神経変性機構を解明する上で非常に有用である。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	堀 内 基 広
副 査	教 授	大 橋 和 彦
副 査	教 授	澤 洋 文
副 査	教 授	品 川 森 一

学 位 論 文 題 名

Studies on cellular mechanism of prion propagation using abnormal isoform prion protein specific detection method

(異常型プリオンタンパク質特異的検出法を用いたプリオンの
細胞内増殖機構の解析)

プリオン病の病原体「プリオン」の主要構成要素である異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の産生機構は、プリオンの増殖機構と同義と見做すことができる。プリオンの増殖はプリオン病における神経変性の原因となるが、プリオンの細胞内増殖機構は、未だ十分には理解されていない。そこで本研究では、細胞内に存在する PrP^{Sc} を特異的に検出する方法を確立し、プリオンの細胞内増殖機構を詳細に解析した。

第1章では、プリオン持続感染細胞における PrP^{Sc} の局在と輸送経路を解析した。プリオン持続感染細胞では、PrP^{Sc} が early endosomes、late endosomes、および lysosomes など膜輸送にかかわる細胞内コンパートメントに広範に存在することを明らかにした。なかでも、核近傍の領域に存在する endocytic recycling compartments (ERCs) での局在が特徴的であり、PrP^{Sc} が、ERCs を経由して、核近傍の領域と細胞膜を含む細胞の辺縁領域の間を循環していることを示す結果を得た。これらの結果は、PrP^{Sc} が細胞内膜輸送に付随して細胞内を移動することが、プリオンの持続的な増殖に重要であることを示している。

第2章では、プリオンが細胞内に侵入してから感染成立に至る過程を解析した。接種した PrP^{Sc} の大部分は late endosomes や lysosomes のような endo-lysosomal pathway の細胞内小器官に移行した。一方、新規に産生された PrP^{Sc} は接種後 24 時間で、細胞膜、early endosomes および late endosomes で検出され、その後、early endosomes および ERCs のような endocytic-recycling pathway の細胞内小器官で顕著な増加がみられた。PrP^{Sc} の新規産生は、endo-lysosomal pathway の輸送経路の阻害だけでなく、endocytic-recycling pathway の輸送経路を阻害することでも抑制された。以上の結果から、接種した PrP^{Sc} あるいは新規に産生された PrP^{Sc} が endo-lysosomal pathway から endocytic-recycling pathway に移行することが、プリオンの感染成立に重要であると考えられた。

本研究では、プリオン持続感染細胞に存在する PrP^{Sc} が endocytic-recycling pathway を介してダイナミックに細胞内を移動していること、また、細胞に侵入したプリオンが endo-lysosomal pathway から endocytic-recycling pathway に移行することが、プリオンの感染成立に重要であることを明らかにした。本論文の知見は、プリオンの細胞内増殖機構の解明、および、プリオンの増殖による神経変性機構を解明する上で非常に有用であり、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 山崎 剛士 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。