

## 26. プリオン —プリオン研究の現状と将来の展望—

坂口 末廣

プリオン病の病原体は、正常脳組織に発現する正常型プリオン蛋白 (PrP<sup>C</sup>) が構造変換を起こし産生された異常型プリオン蛋白 (PrP<sup>Sc</sup>) から構成されているとするプリオン仮説が一般に広く受け入れられている。しかし、未だ PrP<sup>Sc</sup> そのものが感染性であるという直接的な証明はない。また、この構造変換は、プリオン病の病態形成の中心的役割をも担っていると考えられているが、その詳細な分子機構は未だ不明である。ここでは、プリオン病の病原体及び病態生理について、これまでの研究から明らかになったことを紹介しながら概説したい。

### はじめに

プリオン病 (または伝播性海綿状脳症) は、ヒトのみならず動物にも認められる中枢神経変性疾患である。羊のスクレーピー (scrapie) は、病因不明の動物プリオン病として、古くから知られている。また、ヒトでは、クロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease, CJD), ゲルストマン・ストロイスラー・シェインカー症候群 (Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome, GSS), 致死性家族性不眠症 (fatal familial insomnia, FFI), およびクールー (kuru) が知られている<sup>5)</sup>。ヒトプリオン病の10~15% (一部のCJD および GSS や FFI を含む) は優性遺伝性疾患であるが、大部分 (85~90%) は病因不明である<sup>5)</sup>。これまで、感染により発病したと確認されているプリオン病は、経口感染 (食人慣習) によるパプア・ニューギニアのフォア (Fore) 族のクールーのみであった<sup>5)</sup>。しかし最

近、スクレーピー汚染肉骨粉の摂取により感染したと考えられる牛海綿状脳症 (狂牛病, bovine spongiform encephalopathy, BSE) が、新たに世界的規模で出現し、大きな問題となっている<sup>15)</sup>。また、ヒトでは、CJD 汚染脳硬膜移植により感染した医原性 CJD や<sup>19)</sup>、牛海綿状脳症からの感染によると考えられる新型 CJD が多数報告されるようになった<sup>15)</sup>。このように、プリオン病は感染病としての性格を急速に強め、世界的規模でその感染は拡大している。

ここでは、まず、このような驚異的な拡大をもたらしたプリオン病の病原体について、現在最も受け入れられているプリオン仮説を紹介し、その仮説の検証がどこまで進んでいるのか概説したい。次に、プリオン蛋白欠損マウスの最新の知見から、次第に明らかとなりつつあるプリオン病の病態生理について考察したい。

### プリオン病の病原体について

#### 1. プリオン蛋白 (PrP)

プリオン蛋白 (PrP) は、宿主遺伝子にコードされた糖蛋白で、グリコシル・フォスファチジル・イノシトール (GPI) にて細胞膜にアンカーされている<sup>14)</sup>。PrP には、アミノ酸配列は同じであるが、高次構造を異にする二つの構造アイソフォームが存在する (表1)。正常脳組織に発現する蛋白分解酵素感受性の正常型プリオン蛋白 (cellular PrP, PrP<sup>C</sup>) と、プリオン病罹患組織にのみ特異的に検出される蛋白分解酵素抵抗性の異常型プリオン蛋白 (scrapie PrP, PrP<sup>Sc</sup>) である<sup>14)</sup>。PrP<sup>C</sup> は42%の $\alpha$ -ヘリックスと3%

長崎大学大学院医歯薬総合研究科感染分子病態学  
(〒852-8523 長崎市坂本1-12-4)

Prion

Suehiro Sakaguchi

Department of Molecular Microbiology and Immunology  
Nagasaki University Graduate School of Medical  
Sciences

Skakamoto 1-12-4, Nagasaki 852-8523

TEL: 095-849-7059

FAX: 095-849-7060

E-mail: suehiros-ngs@umin.ac.jp

表1 プリオン蛋白 (PrP) の構造アイソフォームの相違点

プリオン蛋白 (PrP)	蛋白分解酵素 (Proteinase K)	溶解性 (界面活性剤)	蛋白高次構造	
			αヘリックス	βシート
正常型 (PrP <sup>C</sup> )	感受性	可溶性	42%	3%
異常型 (PrP <sup>Sc</sup> )	抵抗性	不溶性	30%	43%

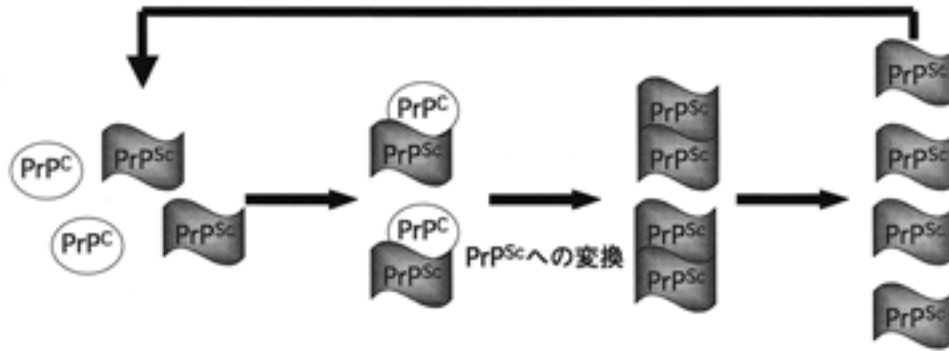


図1 プリオン仮説。  
異常型 PrP (PrP<sup>Sc</sup>) は正常型 PrP (PrP<sup>C</sup>) と結合し、PrP<sup>C</sup> を PrP<sup>Sc</sup> に変換させる。また、新しく産生された PrP<sup>Sc</sup> は、再び PrP<sup>C</sup> を PrP<sup>Sc</sup> に変換させる。このようにして、プリオンの増殖が起こる。

のβ-シートを含み、PrP<sup>Sc</sup> は30%のα-ヘリックスと43%のβ-シートを含む<sup>12)</sup>。PrP<sup>Sc</sup> の産生機構は明らかでないが、一旦翻訳された PrP<sup>C</sup> が何らかの修飾を受け、α-ヘリックスがβ-シートへ変換されることにより、PrP<sup>Sc</sup> が産生されると考えられている。

## 2. 病原体とプリオン仮説

プリオン病の病原体は、ウイルスや細菌などの通常病原微生物と非常に異なる生物学的特質を有する。例えば、病原体の感染性は、DNase や RNase および紫外線などの核酸を破壊する処理をしても減少せず、フェノールや尿素および塩酸グアニジンなどの蛋白変性剤にて減少する<sup>13)</sup>。1982年に Prusiner 博士は、「プリオン病の病原体は、核酸を含有せず、蛋白のみから構成されているプリオン (prion: *proteinaceous infectious particle*, 蛋白性感染性粒子) である」とするプリオン仮説を提唱した<sup>13)</sup>。この仮説によると、プリオンの実体は PrP<sup>Sc</sup> であり、外来から接種された PrP<sup>Sc</sup> は PrP<sup>C</sup> に作用し、機構は不明であるが、PrP<sup>C</sup> を PrP<sup>Sc</sup> へと変換させる (図1)<sup>14)</sup>。また、新しく産生された PrP<sup>Sc</sup> は、再び PrP<sup>C</sup> に作用し PrP<sup>Sc</sup> へと変換させる (図1)<sup>14)</sup>。このようにして、プリオンの複製が行われる。

現在、病原体に特有な核酸は未だ同定されておらず、この仮説が最も広く受け入れられている。病原体の複製の遺伝情報が核酸でなく蛋白にあるというこの仮説は大変魅力的であるが、その是非についてはまだ最終的な結論が出さ

れていない。

## 3. プリオン仮説の検証 (1)

プリオン仮説によると、PrP<sup>C</sup> が存在しないと、PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Sc</sup> へ変換が起きないため、PrP<sup>Sc</sup> の産生は行われず、プリオンの複製は起きない。もし PrP<sup>C</sup> 非存在下でも病原体の増殖が起これば、プリオン仮説は完全に否定されたことになる。そこで我々は、PrP 欠損マウス (以下、他の研究室で作成された系統と区別するために、N<sup>gsk</sup> PrP<sup>-/-</sup>マウスと略す) を作製し、感染実験を行い、プリオン仮説の真偽について検討した<sup>16)</sup>。その結果、PrP<sup>+/+</sup>マウスと N<sup>gsk</sup> PrP<sup>+/-</sup>マウスは、それぞれ接種後138±12日と259±27日に、全て発症し死亡した (図2)<sup>16)</sup>。また、それぞれのマウスの脳内では、病原体の増殖や PrP<sup>Sc</sup> の蓄積も観察された<sup>16)</sup>。しかし、N<sup>gsk</sup> PrP<sup>-/-</sup>マウスは、約500日間観察したが全く発症は認められず (図2)、脳内にも病原体の増殖や PrP<sup>Sc</sup> の蓄積は認められなかった<sup>16)</sup>。他の研究室からも、同様な結果が報告されている<sup>3)</sup>。つまり、これらの結果は、PrP<sup>C</sup> がプリオン病の病原体の増殖および病気進展に不可欠な分子であることを示し、プリオン仮説を強く支持した。

## 4. プリオン仮説の検証 (2)

プリオン仮説を最終的に証明するには、PrP<sup>Sc</sup> そのものが感染性であることを示す必要がある。今までの様な感染動物の組織からの PrP<sup>Sc</sup> の精製では、検出限界以下の PrP<sup>Sc</sup>

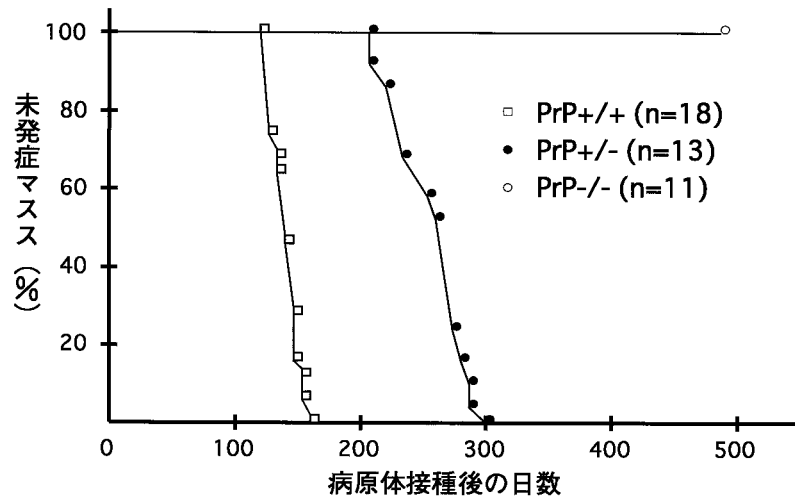


図2 Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスの感染実験。

PrP<sup>+/+</sup>マウスと Ngsk PrP<sup>+/-</sup>マウスは、それぞれ接種後138±12日と259±27日に、全て発症し死亡した。しかし、Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスは、約500日間観察したが全く発症は認められなかった。

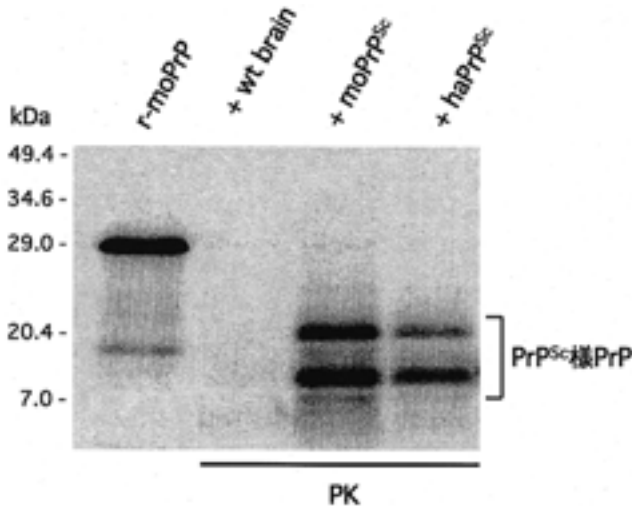


図3 レコンビナントマウス PrP<sup>Sc</sup> 様 PrP の産生。

<sup>35</sup>S-メチオニンにて標識したレコンビナントマウス (r-mo) PrP (レーン1) を、正常マウス脳乳剤 (wt brain)、精製マウス (mo) PrP<sup>Sc</sup>、及び精製ハムスター (ha) PrP<sup>Sc</sup> と反応させ、プロテナーゼ K (PK) にて消化後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供した。r-moPrP と wt brain との反応後、PK 処理すると、r-moPrP は完全に消化された (レーン2)。しかし、moPrP<sup>Sc</sup> や haPrP<sup>Sc</sup> と反応させた時は、PK で消化されない抵抗性の r-moPrP、つまり PrP<sup>Sc</sup> 様 PrP が産生された (レーン3と4)。

以外の未知の病原微生物が混入している可能性を完全に否定することができなく、プリオン仮説の最終証明は不可能である。Kocisko らは、ある反応条件下で、PrP<sup>Sc</sup> と PrP<sup>C</sup> を試験管内で混入すると、PrP<sup>C</sup> が蛋白分解酵素抵抗性の PrP<sup>Sc</sup> 様 PrP に変換するという大変興味深い結果を報告した<sup>7)</sup>。もし、この PrP<sup>Sc</sup> 様 PrP が感染性であることを示せ

ば、プリオン仮説に最終結論を与えることができる。しかし、このシステムでは、はじめに混入する PrP<sup>Sc</sup> の量が多くて、新しく産生された PrP<sup>Sc</sup> 様 PrP の感染性を検討することが困難であるという問題点があった。

我々は、大腸菌から精製したレコンビナントマウス PrP<sup>Sc</sup> が、感染ハムスター脳から精製されたハムスター PrP<sup>Sc</sup> と混入しても、PrP<sup>Sc</sup> 様 PrP へ変換するという大変興味深い現象を見出した (図3) (坂口ら、未発表)。つまり、ハムスターで継代された病原体はマウスに感染性を示さないの、ハムスター PrP<sup>Sc</sup> 精製分画が未知の病原体を含んでいたとしても、マウスでは全く問題とならず、新しく産生されたレコンビナントマウス PrP<sup>Sc</sup> 様 PrP の感染性を、マウスに接種することによって検出することが可能となった。しかし、接種後285日経過しても、マウスはプリオン病を全く発症せず、レコンビナントマウス PrP<sup>Sc</sup> 様 PrP は感染性でないことが明らかとなった (坂口、未発表)。また、Hill らは、マウスとハムスターのキメラ PrP 遺伝子導入マウスは、ハムスターで継代された病原体を接種すると、マウスにもハムスターにも感染できる新しい性質を持つ病原体を産生することができることを利用し、キメラ PrP<sup>C</sup> とハムスター PrP<sup>Sc</sup> の反応から産生されたキメラ PrP<sup>Sc</sup> 様 PrP をマウスに接種した<sup>6)</sup>。しかし、接種後550日経過しても、マウスは発症せず、キメラ PrP<sup>Sc</sup> 様 PrP は感染性でないことが明らかとなった<sup>6)</sup>。つまり、これらの結果は PrP<sup>Sc</sup> 様 PrP は感染性でないことを示し、プリオン仮説への明らかな反証と考えることができるかもしれない。しかし、PrP<sup>Sc</sup> 様 PrP が感染性を獲得するには、蛋白分解酵素抵抗性以外の他の要因がさらに必要であるという反論も成立する。感染性蛋白“プリオン”という概念は非常に興味深い

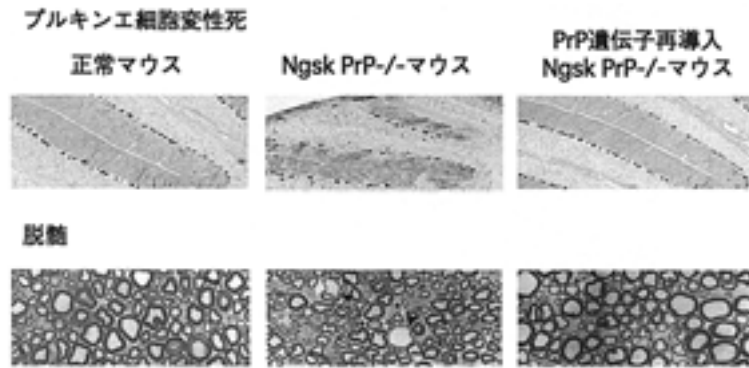


図4 Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスにおけるプルキンエ細胞変性死（上段）と座骨神経の脱髄（下段）。

上段：正常マウスの小脳には、抗 spot35抗体で染色された数多くのプルキンエ細胞が認められるが、Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスでは著しく減少し、変性脱落している。PrP 遺伝子再導入 Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスでは、プルキンエ細胞は正常に回復している。下段：正常マウスでは正常に形成された厚い神経髄鞘が多数認められるが、Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスでは神経髄鞘が薄くなり、中には空砲状に変性している神経髄鞘も認められる（矢印）。PrP 遺伝子再導入 Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスでは、神経髄鞘は正常に回復している。

ものであるが、プリオン仮説の真偽についてはさらなる追求が必要である。

## プリオン病の病態生理

### 1. プリオン病の分子病態

ヒトプリオン病は、進行性の痴呆や小脳失調および不眠などの症状を呈する<sup>5)</sup>。病理学的には、神経細胞の変性死や活性化グリア細胞の増殖（グリオシス）等が認められる<sup>5)</sup>。プリオン病罹患脳内における PrP<sup>Sc</sup>の蓄積は、これらの神経学的異常が出現するより前から検出でき、次第にその量は増加し、末期には最大となる<sup>8)</sup>。また、PrP<sup>-/-</sup>マウスは、病原体接種後にも、PrP<sup>Sc</sup>の蓄積を起こさないし、プリオン病にもならない<sup>3)</sup>。つまり、これらの結果は、PrP<sup>C</sup>から PrP<sup>Sc</sup>への構成的な変換がプリオン病の病態の中心的役割を担っていることを強く示唆している。しかし、その詳細な分子機構は明らかでない。PrP<sup>C</sup>が PrP<sup>Sc</sup>に変換することによって産生される PrP<sup>Sc</sup>自体が、神経細胞毒性物質として作用し、神経障害を引き起こすとする gain-of-function説がある。また一方で、変換により生じる PrP<sup>C</sup>の減少が、PrP<sup>C</sup>の機能障害をもたらし、それによってプリオン病の病態が形成されるとする loss-of-function説もある。

### 2. PrP<sup>-/-</sup>マウスによるプリオン病の病態解析

先に紹介した Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスは、病原体を接種しなくても、老齢になると、プルキンエ細胞の変性死や<sup>17)</sup>、脊髄および末梢神経に著明な脱髄を呈する（図4）<sup>11)</sup>。また、脳内ではグリア細胞が異常に活性化し、グリオシス

を呈する<sup>1)</sup>。我々は、これらの異常が Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスに PrP 遺伝子を再導入すると正常に回復することを再確認し（図4）<sup>1,11)</sup>、PrP<sup>C</sup>がプルキンエ細胞の長期生存維持、神経髄鞘の維持、およびグリア細胞の活性化の調節に関与していることを明らかにした。しかし奇妙なことに、他の研究室で作製された別の系統の PrP<sup>-/-</sup>マウス（以下 Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスと略す）では、脱髄は検出されるが<sup>11)</sup>、プルキンエ細胞の変性死やグリオシスはみられず<sup>2)</sup>、これらの違いがどうして生じるのか不明であった。

我々は、Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスのノックアウトされた PrP 遺伝子座では、スプライシング異常が起こり、下流に存在する PrP 類似蛋白 (PrPLP/Dpl) 遺伝子が過剰発現するようになっていたことを見出し報告した<sup>9)</sup>。続いて、Moore らは、Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスに PrPLP/Dpl 遺伝子を導入し、PrP<sup>C</sup>の非存在下に PrPLP/Dpl を過剰発現させると、プルキンエ細胞死が起こることを明らかにし<sup>10)</sup>、PrP<sup>C</sup>の loss-of-function だけでなく PrPLP/Dpl の過剰発現も、プルキンエ細胞死には必要であることを証明した。

Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスに見られたプルキンエ細胞変性死やグリオシスといった神経学的異常はプリオン病でも認められ、プリオン病のこのような病態においては、PrP<sup>C</sup>の loss-of-function のみだけでなく、PrP<sup>Sc</sup>の蓄積による gain-of-function も関与している可能性が示唆された。また一方で、Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスが、脱髄以外にも、記憶に関係する海馬領域の長期増強 (long term potentiation; LTP) の遅延や睡眠周期異常等の行動異常を呈することが報告されており<sup>4,18)</sup>、プリオン病の痴呆や不眠及び脱髄といった病態には、PrP<sup>C</sup>の loss-of-function のみが関与し

ているのかもしれない。

### 終わりに

Prusiner博士がプリオン仮説を提唱してから約20年が過ぎようとしているが、残念ながら、プリオン病の病原体がプリオンと呼ばれる感染性蛋白であるのか、またそれはPrP<sup>Sc</sup>から構成されているのかといった根本的な問題にまだ解答を出すことができないでいる。そればかりか、PrP<sup>C</sup>の分子レベルにおける生理学的機能についても解明できないでいる。プリオン病が世界の人々に大きな不安を投げかけている現在、このような基本的な問題を早急に解決するばかりでなく、プリオン病の早期診断法や治療法および予防法といったより臨床的な研究成果も、プリオン研究に携わる我々には強く期待されているのではないだろうか。

### 文 献

- 1) Atarashi, R., Sakaguchi, S., Shigematsu, K., Arima, K., Okimura, N., Yamaguchi, N., Li, A., Kopacek, J., and Katamine, S. (2001) Abnormal activation of glial cells in the brains of prion protein-deficient mice ectopically expressing prion protein-like protein, PrPLP/Dpl. *Mol Med* **7**, 803-809
- 2) Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M., and Weissmann, C. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein [see comments]. *Nature* **356**, 577-582
- 3) Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**, 1339-1347
- 4) Collinge, J., Whittington M. A., Sidle, K. C. L., Smith C. J., Palmer, MS., Clark, A. R., and Jefferys, J. G. R. (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**, 295-297
- 5) DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1995) Etiology and pathogenesis of prion diseases. *Am J Pathol* **146**, 785-811
- 6) Hill, A. F., Antoniou, M., and Collinge, J. (1999) Protease-resistant prion protein produced *in vitro* lacks detectable infectivity. *J Gen Virol* **80**, 11-14
- 7) Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T., and Caughey, B. (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* **370**, 471-474
- 8) Kopacek, J., Sakaguchi, S., Shigematsu, K., Nishida, N., Atarashi, R., Nakaoka, R., Moriuchi, R., Niwa, M., and Katamine, S. (2000) Upregulation of the genes encoding lysosomal hydrolases, a perforin-like protein, and peroxidases in the brains of mice affected with an experimental prion disease. *J Virol* **74**, 411-417.
- 9) Li, A., Sakaguchi, S., Shigematsu, K., Atarashi, R., Roy, B.C., Nakaoka, R., Arima, K., Okimura, N., Kopacek, J., and Katamine, S. (2000) Physiological expression of the gene for PrP-like protein, PrPLP/Dpl, by brain endothelial cells and its ectopic expression in neurons of PrP-deficient mice ataxic due to Purkinje cell degeneration. *Am J Pathol* **157**, 1447-1452
- 10) Moore, R. C., Mastrangelo, P., Bouzamondo, E., Heinrich, C., Legname, G., Prusiner, S. B., Hood, L., Westaway, D., DeArmond, S. J., and Tremblay, P. (2001) Doppel-induced cerebellar degeneration in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15288-15293
- 11) Nishida, N., Tremblay, P., Sugimoto, T., Shigematsu, K., Shirabe, S., Petromilli, C., Erpel, S. P., Nakaoka, R., Atarashi, R., Houtani, T., Torchia, M., Sakaguchi, S., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Katamine, S. (1999) A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from Purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest.* **79**, 689-697
- 12) Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., et al. (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10962-10966
- 13) Prusiner, S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-144
- 14) Prusiner, S. B. (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**, 1515-1522
- 15) Prusiner, S. B. (1997) Prion diseases and the BSE crisis. *Science* **278**, 245-251
- 16) Sakaguchi, S., Katamine, S., Shigematsu, K., Nakatani, A., Moriuchi, R., Nishida, N., Kurokawa, K., Nakaoka, R., Sato, H., Jishage, K., et al. (1995) Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *J Virol* **69**, 7586-7592
- 17) Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T., and Noda, T. (1996) Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* **380**, 528-531
- 18) Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A., and Manson, J. C. (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**, 639-642
- 19) Yamada, S., Aiba, T., Endo, Y., Hara, M., Kitamoto, T., and Tateishi, J. (1994) Creutzfeldt-Jakob disease transmitted by a cadaveric dura mater graft. *Neurosurgery* **34**, 740-743 ; discussion 743-744