

Figure 5. Immunoreactions of the #2065 monoclonal antibody against GST-PrP peptide fusions (Western blot). Color was developed by peroxidase/ECL system.

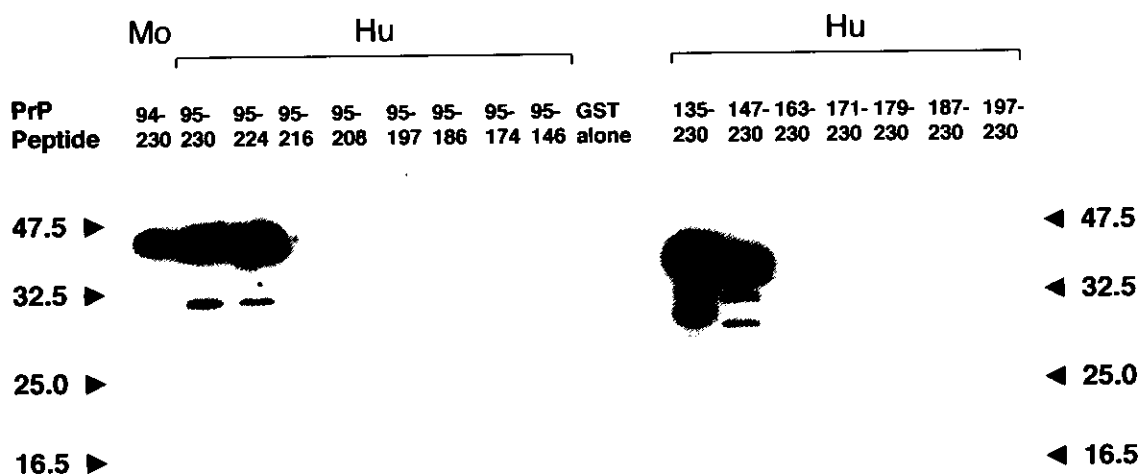


Figure 6. Immunoreactions of the #383 monoclonal antibody against GST-PrP peptide fusions (Western blot). Color was developed by peroxidase/ECL system.

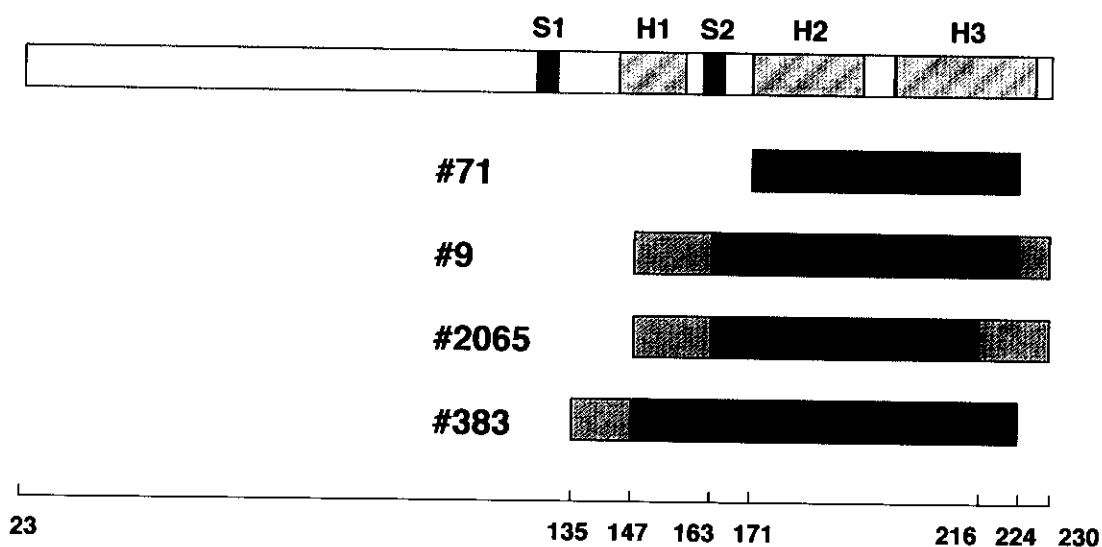
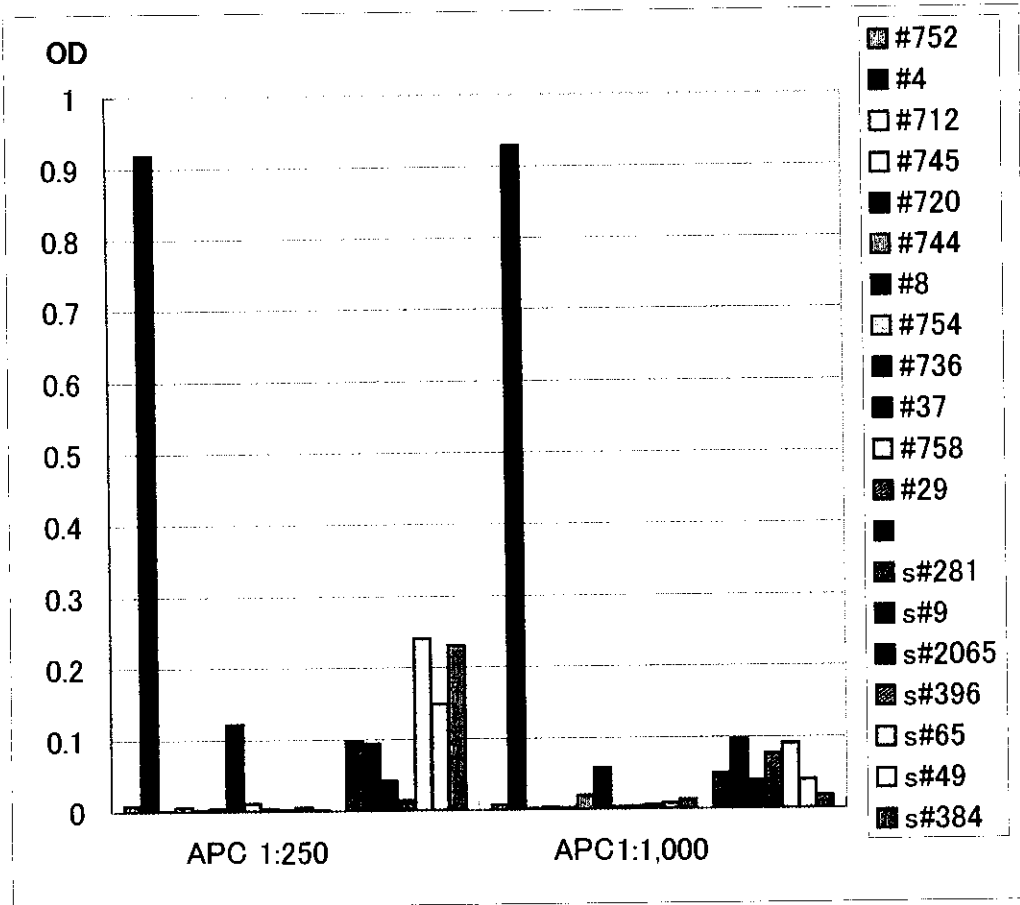


Figure 7. The locations of the epitope for anti-human PrP monoclonal antibodies. The uppermost figure: a scheme of human PrP structure. S1 and S2: short β strands. H1, H2 and H3: α -helices. Figures at the mid-positions: locations of the epitope for antibodies that are indicated on the left side of bars by number. Black bars indicate the essential parts of PrP peptide for the immunoreaction; Gray ones indicate segments of PrP which contribute to enhance the immunoreaction. Numbers at the bottom indicate the number of residues at the positions shown by short vertical lines on a horizontal line.

図8 MAbsを用いたサンドイッチELISA法によるsPrPの検出



sPrP detection ELISA

Capture antibody: APC

sPrP: 20ng/well

Detector antibody : Mabs to sPrP

プリオン不活化剤の検討

班 員：品川 森一（帯広大・獣医公衆衛生）
研究協力者：堀内 基宏（帯広大・原虫究、獣医公衆衛生）
石黒 直隆（帯広大・獣医公衆衛生）
山本 真理（帯広大・獣医公衆衛生）

液状エチレンオキシド(LEO)が比較的温和にプリオンを不活化するが取り扱いが容易ではない。より安全な化合物としてグリシドール (GLD) が有望なことが判ったため、更に検討を加えた。5%GLDで室温2、5及び12時間処理により、潜伏期はそれぞれ30、110及び75日延長した。GLD処理によりPrP^{Sc}の低分子化し、このため抗原性の消失と感染性の低下が起きると推定された。PrPはGLDの濃度、反応時間、及び温度依存性に減少した。反応液のpHが調べた8までの範囲では高い方が有効であり、脳乳剤希釈に蒸留水を用いると効果が減弱し、食塩添加で回復が見られた。これら不活化に影響する因子の組み合わせにより、より完全な不活化条件を確立する必要がある。

Glycidol causes degradation of prion protein and reduction of prion infectivity

Morikazu SHINAGAWA¹⁾, Motohiro HORIUCHI¹⁾, Naotaka ISHIGURO^{1,2)}, and Mari Yamamoto¹⁾

¹⁾Laboratory of Veterinary Public Health, Department of Veterinary Medicine, and ²⁾Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro Univ. of Agriculture and Veterinary Medicine

ABSTRACT

We recently found that liquid ethylene oxide (LEO) was effective to inactivate prion. LEO is, however, difficult to handle for common use. Glycidol (GLD) was another promising chemical because of its ability to reduce reactivity to antiserum in Western blot. Here, GLD was examined of its inactivation ability against scrapie-mouse prion protein (PrP^{Sc}) under various conditions of chemical concentration, incubation time, and temperature. The bioassay of GLD treated scrapie mouse prion showed that treatment with 3 % GLD for 5 hr and 5 % GLD for 2, 5 hr or 12 hr at room temperature prolonged the mean incubation time by 44, 30, 110 and 73 days, respectively. From dose-incubation time standard curve, the decrease in infectivity titers were estimated as 10³ or more. GLD degraded PrP^{Sc} into low molecular fragments which might cause loss of antigenicity of PrP and inactivation of prion. It was also found that high pH, high temperature and some salt were desirable to enhance the effect of GLD. Although further study is necessary to determine the optimal condition, GLD may be a potential prion disinfectant.

〔はじめに〕

医療機器のプリオン汚染が臨床の現場で関心が持たれるようになった。プリオンは物理化学的抵抗性が高く、その不活化には131°C、数規定の苛性アルカリあるいはSDS 中での煮沸とか、通常の微生物の不活化法に比べ強力な処理が必要である。このような処理は医療機器を汚染したかもしれないプリオンを不活化するには不向きである。医療機器のプリオン汚染は有ったとしてもその感染価は低いと推定される。低濃度にプリオン汚染した医療機器のプリオン除染法を確立することは重要である。我々は液化エチレンオキシド (LEO) が有効であるが取扱が容易でないことから、より安全で取り扱いの容易な3種のエポキシ化合物を検討し、グリシドール (GLD)、β-プロピオラクトン (βPL)、プロピレンオキシド(PO)の内、GLD が有望なことが判った。更に、GLD不活化プリオンのバイオアッセイ及び不活化反応条件等を検討した。

〔材料と方法〕

マウス馴化スクレイピー帯広株¹⁾のプリオンを用いた。帯広株を脳内接種したマウスを発症し死期が近づいた段階で安楽死させ、脳を採取して保存した。脳の10%乳剤をPBSで作成し、プリオン原液として-30℃に保存した。組換えマウスPrP (rPrP)をHis-tagにコドン23~230を融合したものを発現する大腸菌から、封入体として分離し、キレートカラムで精製した後、pHを3.6まで下げながら透析し、ジスルヒド結合した可溶性分子をHPLCで分離した。脳乳剤にPBSあるいは希釈液と必要量のGDL (和光純薬)を加えて、1%脳乳剤として、各種温度・時間処理した。GLDの反応停止と除去のため8~10倍量のメタノールを加え、蛋白質を沈殿として回収した。高分子蛋白質の回収には、3塩化酢酸 (TCA)沈殿を行った。バイオアッセイには沈殿を基の量のPBSに浮遊し、20 μ lづつマウス脳内接種を行った。PrP^{Sc}の検出にはB103抗体²⁾を用いたWBを行った。ゲルの蛋白染色にはクーマシーブルー (CBB)染色及び銀染色を行った。蛋白量はProtein Assay Kit (Bio Rad)を用いた。マウス実験に際し、動物実験委員会で審査を受け、その指示に従って接種時はエーテル麻酔下で、殺処分時にエーテル麻酔下で安楽死させた。

〔成績〕

GLDを3及び5%で25度で2, 5及び12時間処理した試料を接種されたマウスの死亡までの期間を表1に示す。それぞれ、死亡までの期間が24日、44日、30日、110日及び80日間延長した。感染価は 10^3 以下に低下していた。

GLD処理により抗体との反応性が低下する (Fig.1)理由として、PrP^{Sc}をGLDが修飾し、更にクロスリンクして凝集塊となって反応の場に入れないため、見掛け上反応性が減少すること及びPrP^{Sc}が分解される可能性がある。このため、糖鎖の無いrPrPを用いて、GLD処理によるPrP分子の変化を調べた。5%GLDで2~24時間処理すると時間と共に、僅かずつPrPの分子量が増加し、WBの反応性も低下した (Fig. 2A)。また、短時間 (2時間)処理したものを20%ゲルで短時間電気泳動した場合、低分子化した断片が検出された (Fig. 2B)。PrPの低分子化を確認するために、時間を変えてGLD処理した試料中のTAC沈殿可能な高分子蛋白質の量を調べたところ、時間とともに蛋白質量が減少し24時間で56%減少した (Fig. 2C)。即ち、抗体との反応性が低下はPrP分子が低分子の断片となるためであることが判った。GLD処理した人アルブミンもSDS-PAGEにより蛋白質のバンドが薄くなる (Fig. 2D)ことから、GLDは非特異的に蛋白質を断片化することが判った。

塩の影響を知るために、脳乳剤をPBSではなく蒸留水で希釈した。蒸留水による希釈でGDLの作用が抑制されたが食塩を150mMに加えたところ、この抑制が部分的に回復した (Fig. 3A)。pHの影響を調べるため、各種pHのSoerensen's phosphate buffer及び200mM Na-phosphate bufferで希釈した。Fig. 3Aに示すように、Na-phosphate bufferを用いた場合、再現性良くpHが高くなるに従い、GLDの効果が増した。しかし、Soerensen's phosphate bufferでは、pHが高場合は同様の結果であったが、凡そ7.5以下では再現性がなかった (成績を示さず)。

〔考察〕

GLDの効果が濃度、温度及び時間以外に塩、pHによって影響を受けることが判った。しかし、最適な条件を示すまでに至らなかった。GLD処理によるPrPと抗体との反応性の減少は、PrP分子の分解によることが判った。PrP分子が分解されれば感染価の低下も当然起こりうる。このことは、最適処理条件のスクリーニングにWBが使用できること示唆している。今回得られたバイオアッセイの成績はPBS希釈したものを25℃で処理した試料のものだけであり、その低下の程度は決して十分ではない。GLDがプリオン不活化剤として有効か否か判定するためには、より効果的な条件で処理された試料のバイオアッセイの成績が必要である。

〔参考文献〕

- 1) Takahashi, K., Shinagawa, M., Doi, S., Sasaki, S., Goto, H. and Sato, G. Purification of scrapie agent from infected animal brains and raising antibodies to the purified fraction. *Microbiol. Immunol.* 30: 123-131, 1986

2) Horiuchi, M., Yamazaki, N., Ikeda, T., Ishiguro, N., and Shinagawa, M. A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J. Gen. Virol.* 76: 2583-2587, 1995.

〔研究発表〕

1. 論文発表

1) Takahashi, M., Takahashi, R., Hasegawa, H., Horiuchi, M., Shinagawa, M., Yokoyama, T., Kimura, K., Haritani, M., Kurata, T. and Nagashima, K. Characterization of antibodies raised against bivariate-PrP-peptides. *J. Neurovirol.* 5: 300-307, 1999

2) Nakamura, S. Ono, F., Hamano, M., Odagiri, K., Kubo, M., Komatsuzaka, K., Terano, K., Shinagawa, M., Takahashi, K. and Yoshikawa, Y. Immunohistochemical detection of apolipoprotein E within prion-associated lesions in squirrel monkey brains. *Acta Neuropathol.* 100: 365-370, 2000

3) Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M. Glycidol Degrades Scrapie Mouse Prion Protein. *J. Vet. Med. Sci.* (submitted)

2. 学会発表

1) 島内育子、堀内基広、石黒直隆、品川森一 マウスと羊または牛キメラ PrP 遺伝子発現マウスのスクレイピーマウスモデルとしての有用性の研究 第 29 回日本獣医学会総会（つくば市）

2000 年 4 月

2) 堀内基広、石黒直隆、品川森一 異種 PrPC による PrPSc 産生の阻害 第 29 回日本獣医学会総会（つくば市）2000 年 4 月

3) 堀内基広、品川森一 PrP 合成ペプチドによる PrPC-PrPSc 相互作用の阻害 第 48 回日本ウイルス学会総会（津市）2000 年 10 月

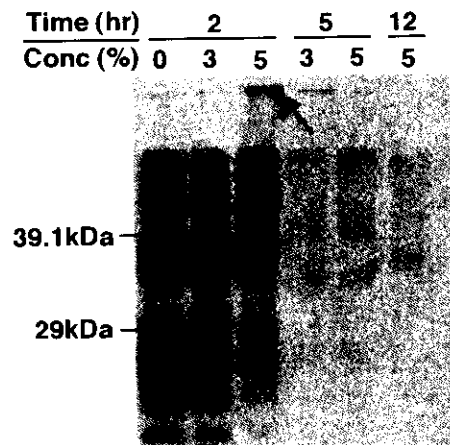


Fig. 1. The effect of GLD on PrPSc degradation under various conditions. The scrapie-brain homogenates were treated with 3 or 5 % GLD for 2, 5, and 12 hr. Arrow indicates the high molecular weight protein remained on top of the stacking gel. One hundred micrograms of brain equivalent was loaded in each lane and PrPSc was detected by Western blot analysis.

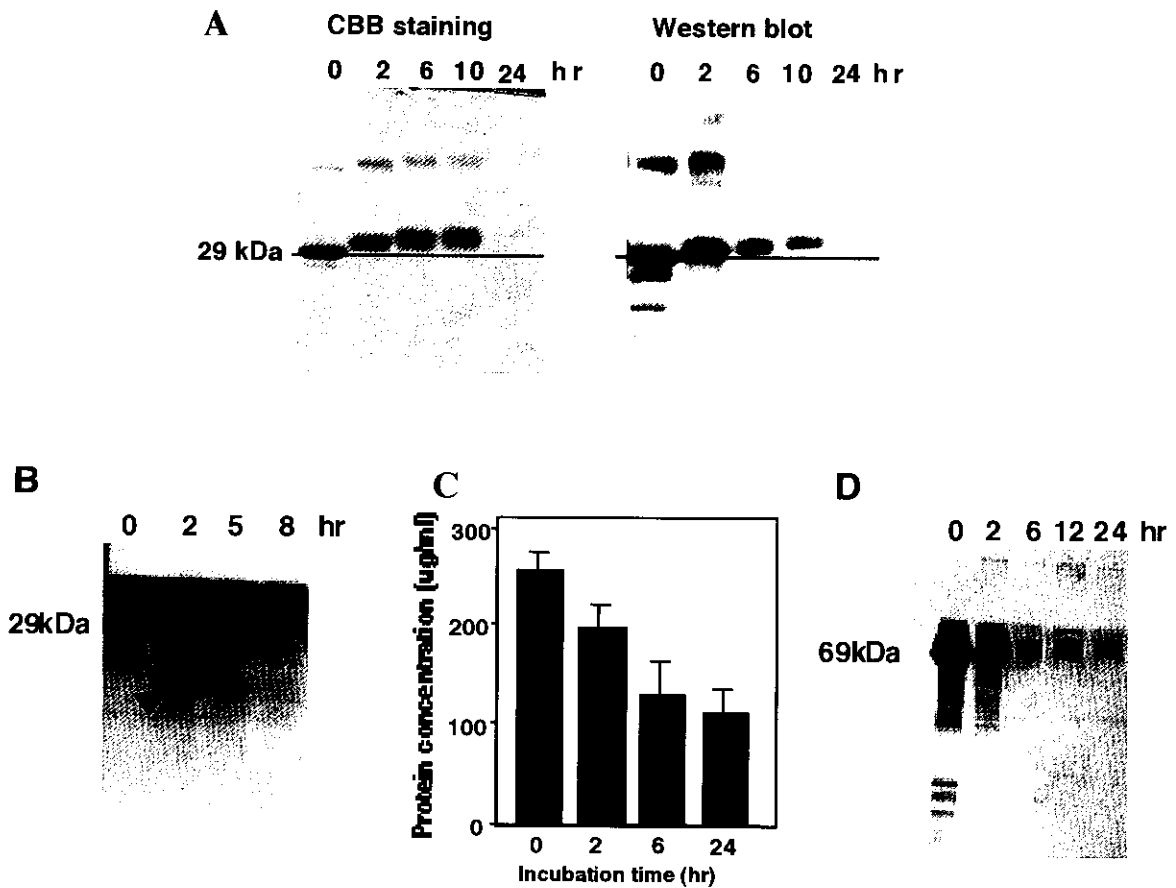


Fig. 2. Protein degradation by GLD treatment. (A) rMoPrP was treated with 5% GLD for 2, 6, 12, and 24 hr at r.t. The rMoPrP was detected by CBB staining (left, $2\mu\text{g}$ of rMoPrP was loaded in each lane) and by Western blot analysis (right, $0.1\mu\text{g}$ of rMoPrP was loaded in each lane). (B) rMoPrP was incubated with 5 % GLD for 2, 5, and 8 hr at r.t. and detected by SDS-PAGE with a 20 % acrylamide gel and the following silver staining. Five micrograms of rMoPrP was loaded in each lane. Arrow head indicates the degraded products. (C) Three hundred micrograms of rMoPrP was incubated with 5 % GLD at r.t. for 2, 6, and 24 hr. The reaction was stopped by TCA precipitation. The pellets were suspended in DDW for the protein assay. (D) Human serum albumin (0.5 mg/ml) was treated with 5 % GLD for 2, 6, 12, and 24 hr at r.t. Four micrograms of human serum albumin was loaded in each lane and detected by SDS-PAGE and silver staining. Molecular masses are indicated on the left.

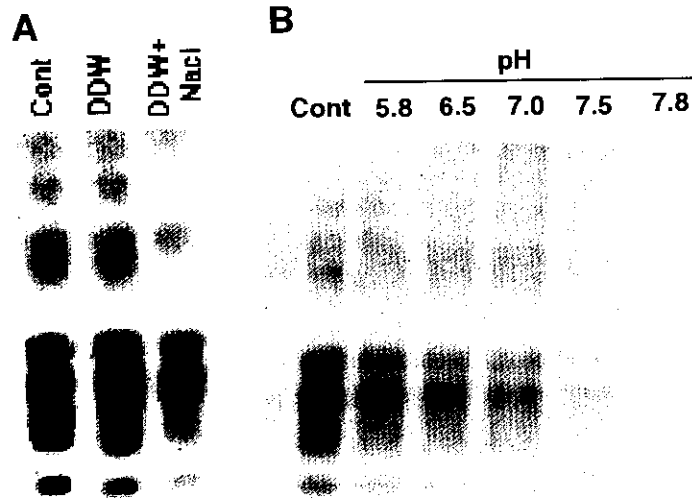


Fig. 3. Salt concentrations and pH influence the effect of GLD. (A) Scrapie-brain homogenates were treated with 5 % GLD at r.t. for 2 hr in the presence or absence of 150 mM NaCl. One hundred micrograms of brain equivalent was loaded in each lane and examined by WB. Cont: GLD-untreated control sample in PBS (pH 7.5). DDW: GLD-treated samples in distilled and deionized water (pH 7.3). (B) Scrapie-brain homogenates were suspended in Na-phosphate buffer and treated with 5%GLD at 55°C for 1hr at indicated pH. Eighty micrograms of brain equivalent was loaded in each lane. Cont: GLD-untreated scrapie-brain homogenates in PBS (pH7.5). Molecular masses are indicated in kDa on the left.

日本に存在する羊スクレイピー病原体の多様性

班 員：品川 森一（帯広畜産大学・獣医公衆衛生）
研究協力者：堀内 基広（帯広畜産大学・獣医公衆衛生、原虫病研究センター）
根本 卓弥（帯広畜産大学・獣医公衆衛生）
石黒 直隆（同上）
古岡 秀文（帯広畜産大学・家畜病理）
平井 結花（同上）
毛利 資朗（九州大学・大学院医・実験動物）

〔研究要旨〕

日本に存在する羊スクレイピー病原体の多様性を明らかにする目的で、日本で発生した羊スクレイピーの病原体の生物性状を調べた。1987年から1996年に日本で発生した羊スクレイピー野外例8例と、それらを羊に実験感染させた3例、計11例を使用した。ICRマウス($Prnp^{a/a}$)への伝達性では400日程度あるいは230日程度の潜伏期で伝達可能なもの、および伝達できないもの、の3種に分類された。ICRマウスに伝達できなかったものは、 $Prnp^{b/b}$ のPrP遺伝子型を有するI/LnJマウスへも伝達できなかった。マウスへ伝達可能であった羊スクレイピーはPrP^{Sc}のPK抵抗性の差により2つのグループに分類可能であり、この分類と伝達性による分類は一致した。最終的に、マウスへの伝達性とPrP^{Sc}のPK抵抗性から用いた病原体は3群に分類され、日本には複数の羊スクレイピー病原体が存在することが明らかとなった。また、羊スクレイピーの人PrPTgマウスへの伝達性を調べているが、現在まで伝達は確認されていない。日本では1970年代に羊の輸入によりスクレイピー病原体が侵入したと考えられている。その後25年の間に日本国内で多様性を獲得したのか、複数の病原体が侵入していたのかは不明である。しかしマウスへの伝達性を指標とした羊スクレイピー病原体の多様性は、英国における多様性と類似している。従って、日本に存在する羊スクレイピー病原体がBSEを起こしうる可能性は否定できない。

Biological and biochemical characterization of sheep scrapie agents prevalent in Japan.

Morikazu SHINAGAWA¹⁾, Motohiro HORIUCHI^{1,2)}, Takuya NEMOTO¹⁾, Naotaka ISHIGURO¹⁾,
Hidefumi FURUOKA³⁾, Yuka HIRAI³⁾, Shirou MOHRI⁴⁾

¹⁾Department of Veterinary Public Health, ²⁾National Institute for Protozoan Diseases, and

³⁾Veterinary Pathology, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

⁴⁾Laboratory of Biomedicine, Graduate School of Medical Science, Kyushu University

ABSTRACT

Because of a failure in finding agent-specific nucleic acid as a genome, scrapie agents cannot be classified by genotyping or antigenic typing that is commonly used for the classification of many viruses. However, the scrapie agents can be distinguished to some extent by biological properties such as transmissibility to experimental animals and distribution of

neuropathological lesions, and by biochemical properties such as molecular mass and relative protease-resistance of disease-specific isoform of prion protein (PrP^{Sc}). In order to characterize the scrapie agents which are prevalent in Japan, in this study we analyzed the transmissibility of sheep scrapie to mice and relative PK-resistance of PrP^{Sc}. The results indicate that the scrapie agents prevalent in Japan can be divided at least into three groups based on biological and biochemical properties. First group includes agents which caused disease in mice with incubation period of ~400 days and possessed relatively high PK-resistant PrP^{Sc}. Second group includes agents which caused disease in mice with incubation period of less than 300 days and possessed relatively low PK-resistant PrP^{Sc}. Third group includes agents which are difficult to transmit to mice but possessed relatively high PK-resistant PrP^{Sc}. Sheep scrapie has sporadically occurred since 1982 and actually, only ~60 cases were officially reported so far in Japan. However, the diversity of scrapie agents in the field raises the concern if scrapie agent similar to the parental agent of BSE will exist or emerge in Japan.

〔はじめに〕

羊スクレイピー病原体（プリオン）が直接人間に伝播したという証拠はない。しかし疫学調査やプリオンの諸性状に関する研究結果は、羊プリオンが肉骨粉を介して牛へ伝播し、そこで産生された牛プリオンが新型クロイツフェルトヤコブ病(vCJD)の原因となったことを強く示唆している(1-3)。現在まで日本ではBSEの発生はないが、羊スクレイピーは散発している。しかし日本に存在する羊プリオンの性状解析は進んでいない。PCRや血清反応等、通常の病原体に応用される技術がプリオンの性状解析に応用できないことが障壁となっている。

〔目的〕

羊スクレイピーは1970年代に羊の輸入に伴い侵入したと考えられている。以降我が国で羊スクレイピーが散発しているが、我が国に存在する羊プリオンの詳しい性状解析は行なわれていない。BSEおよびvCJDの発生原因とその経過から、羊プリオンに関する調査も公衆衛生上重要な課題である。そこで、1)日本に存在する羊プリオンの多様性の有無を明らかにすること、および、2)それらによるBSE発生の潜在的危険性を推測すること、を目的として、羊プリオンを生物学的および生化学的性状により分類することを試みた。

〔材料と方法〕

スクレイピー野外例8例、および野外例を羊に実験接種した感染実験例3例、および陰性対象として、PrP^{Sc}陰性の健康例1例を使用した。野外例のうちSporadicに分類したものは全て北海道内各地で散発したものであり、Y2とY5は同時期に同一牧場で発生した例であるが血縁関係はない。それ以外の例も互いに地理的関連および血縁関係がない症例である。Endemicに分類した例は、某牧場で同時期に発生した症例で2匹の母羊（出産後スクレイピーを発症して死亡）から生まれた羊である。羊のPrPアミノ酸型および臨床症状は表1に記した。羊脳の10%乳剤20ulをICRマウス(Prnp^{a/a})およびI/InJマウス(Prnp^{b/b})に脳内接種した。接種に使用した羊脳乳剤中のPrP^{Sc}およびスクレイピーを発症したマウス脳内に産生されたPrP^{Sc}のPK抵抗性をウエスタンブロット法により調べた。一部のマウスは病理組織学的検索も行なった。

(倫理面への配慮)

動物実験は本学「動物実験委員会」の指針に従って実施した。

〔結果〕

ICRマウスへの伝達性から、400日前後の潜伏期を経て伝達可能なもの(KH2, KU, SB, Y2, Y5, G1)、230日前後という短い潜伏期を経て伝達可能なもの(A1, B3)、および伝達不可能もしくは伝達が難しいもの(S1, S2, S3)、の3群に分類された(表2、3)。S3はPrP^{Sc}遺伝子型の異なるI/LnJマウスへも伝達しなかった。羊脳内に存在するPrP^{Sc}の生化学的性状をPK抵抗性を指標に検討したところ、40ug/ml、2時間のPK処理に抵抗性のPrP^{Sc}(代表例S2, KH2)と、同処理に感受性のPK弱抵抗性PrP^{Sc}(代表例A1)の2種類に大別された(図1、表3)。マウスへ伝達可能であった羊プリオンの潜伏期による分類と、PrP^{Sc}のPK抵抗性による分類は一致した(表3)。しかしマウスへ伝達しなかったGroup3と400日程度の潜伏期で伝達したGroup1はPrP^{Sc}のPK抵抗性では区別出来なかった。Group1とGroup2では羊PrP^{Sc}のPK抵抗性に違いがあるが、同様のPK抵抗性の違いがこれらの羊プリオンを接種したマウス脳内で産生されたマウスPrP^{Sc}でも認められた(図2、表3)。Group1の代表例としてSB, G1、Group2の代表例としてB3について、マウス脳内の病理組織学検索を行なったが、病変の分布に関しては顕著な差は認められなかった。しかしSBおよびG1の例では多数のアミロイドプラークが存在したの対し、B3の例ではアミロイドプラークは存在しない、という差が観察された(結果は示さず)。

〔考察〕

Group3に分類された例は、発生状況から同じ羊プリオンに感染していたと考えられる。3例とも羊スクレイピー野外例の平均潜伏期間(30-36月齢)よりも早期(21-27月齢)に斃死しており、また、他の例では認められない過敏という行動異常が発症初期に認められた(表1)。羊がプリオンの"株"に特異的な臨床症状を呈するか否かは不明であるが、他の症例とは明らかに異なる点で興味深い。Group2に分類された例は、一例のスクレイピー野外例から作製した同一羊脳乳剤を接種されている。この野外例の1%脳乳剤をICRマウスに接種すると潜伏期が280日程度で伝達することから(4)、羊で継代後もこの羊プリオンの性状は変化しなかったと考えられる。羊プリオンのマウスへの伝達性やPrP^{Sc}の生化学的性状が、"株"ではなく、PrP^{Sc}のアミノ酸型に影響される可能性が考えられる。しかし例数は少ないものの、羊PrPのアミノ酸型とマウスへの伝達性に関連は認められなかった。また、Group1に分類されたSB, Y2, Y5、Group2に分類されたA1はいずれもPrPアミノ酸型がMARQ/MARQであるが、Group1とGroup2でPrP^{Sc}のPK抵抗性が明らかに異なる。従ってPrPアミノ酸型以外の要因によりこれら諸性状が規定されていると考えられる。

〔結論〕

日本に存在する羊プリオンは、マウスへの伝達性およびPrP^{Sc}の生化学性状から少なくとも3群に分類可能であった(表3)。従って、日本では多様な羊プリオンが流行していることが明らかとなった。特にマウスへの伝達性の成績は英国における結果と極めて類似している(5)。従って、日本に存在する羊プリオンの中には、英国でBSEの原因となった"株"と同様の性質を持つ株が存在する可能性は否定できない。今後とも継続的なサーベイが必要と考えられる。

〔参考文献〕

- 1) Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A & Smith PG: A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*. 347: 921-925, 1996
- 2) Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCordle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H & Bostock: Transmissible to mice

- indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*. 383: 498-501, 1997
- 3) Collinge J, Sidle KCL, Meads J, Ironside J & Hill AF: Molecular analysis of prion strain variation and aetiology of new variant CJD. *Nature*. 383: 685-690, 1996
 - 4) Shinagawa M, Matsuda A, Sato G, Takeuchi M, Ichijo S & Ono T: Occurrence of ovine scrapie in Japan: clinical and histological findings in mice inoculated with brain homogenates of an affected sheep. *Jpn. J. Vet. Sci.* 46: 913-916, 1984
 - 5) Dickinson: Scrapie in sheep and goat. in *Slow virus diseases of animals and man* (Kimberlin RH ed.). pp209-241, 1976

〔研究発表〕

1. 発表論文

- 1) Nakamura S, Ono F, Hamano M, Odagiri K, Kubo M, Komatsuzaki K, Terao K, Shinagawa M, Takahashi K, Yoshikawa Y: Immunohistochemical detection of apolipoprotein E within prion-associated lesions in squirrel monkey brains. *Acta Neuropathol.* 100: 365-370, 2000

2. 学会発表

- 1) 島内育子、堀内基広、石黒直隆、品川森一：マウスと羊または牛キメラPrP遺伝子発現マウスのスクレイピーマウスモデルとしての有用性の研究、第129回日本獣医学会、2000
- 2) 堀内基広、石黒直隆、品川森一：異種PrP^CによるPrP^{Sc}の産生阻害、第129回日本獣医学会、2000
- 3) 堀内基広、品川 森一：PrP合成ペプチドによるPrP^C-PrP^{Sc}間相互作用の阻害、第48回日本ウイルス学会、2000

Figure 1. Relative PK-resistance of sheep PrPSc

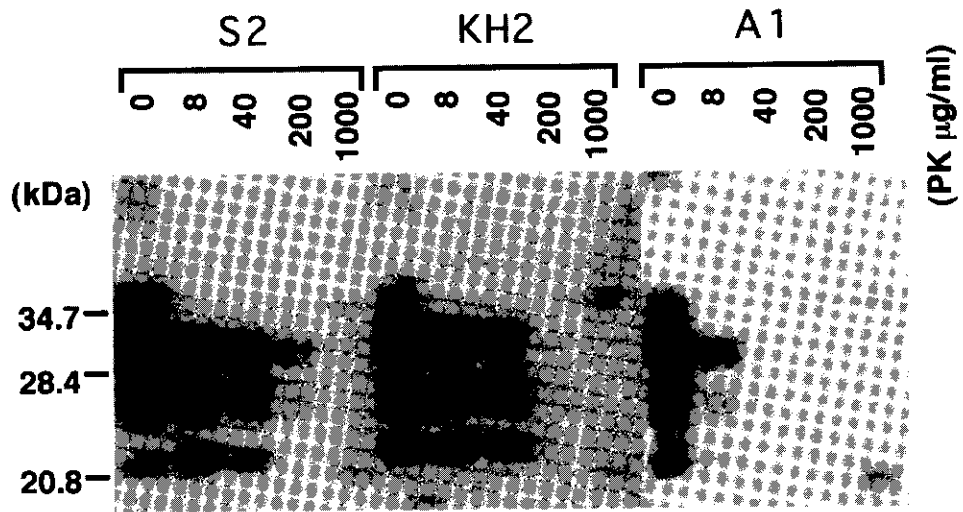


Figure 2. Relative PK-resistance of mouse PrPSc

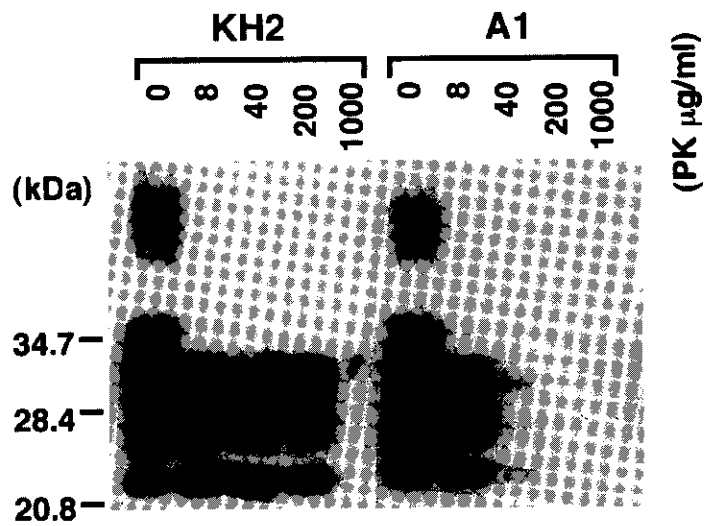


Table 1. Sheep used in this study.

Sheep	Breed ¹⁾ (age) ²⁾	PrP genotype ³⁾	Symptoms
Scrapie			
Sporadic			
KH2	S (48M)	MARQ/MARR	NA ⁴⁾
KU	S (52M)	MARQ/TARQ	ataxia, subtle loss of fleese
SB	S (34M)	MARQ/MARQ	ataxia, debility
Y2	S (35M)	MARQ/MARQ	ataxia, debility
Y5	S (41M)	MARQ/MARQ	ataxia, debility
Endemic			
S1	S x C (12M)	MARQ/MARH	ataxia, hypersensitivity
S2	S x C (21M)	MARQ/MARH	ataxia, hypersensitivity
S3	S x C (16M)	MARQ/MVRQ	ataxia, hypersensitivity
Experimental			
A1	S (27M)	MARQ/MARQ	ataxia
B3	S (21M)	MARQ/TARQ	ataxia
G1	S (26M)	MARQ/MARQ	ataxia, debility
Healthy			
S4	S x C (20M)	MARQ/MARQ	-

¹⁾ S, Suffolk; C, Corredael; S x C , F1 of Suffolk and Corredale.

²⁾ Age of the scrapie sheep grouped as sporadic and endemic indicates the age at death (month-old), while that of experimental scrapie group indicates time to death after inoculation (month post inoculation).

³⁾ The nomenclature of PrP genotype was described elsewhere.

⁴⁾ No record of clinical symptoms was available.

Table 2. Transmissibility of sheep scrapie to mice.

Sheep	Mouse	Death (n/N) ¹⁾	PrP ^{Sc} -positive (n'/N') ²⁾	Time-to-death [Mean ± SD (day)]
Scrapie				
Sporadic				
KH2	ICR	6/6	5/5	417 ± 29
	I/LnJ	5/5	3/3	274, 275, 275, 275, 307 ⁴⁾
KU	ICR	7/7	7/7	394 ± 67
SB	ICR	9/9	6/7	231, 451 ± 39 ⁵⁾
Y2	ICR	5/5	4/4	418 ± 42
Y5	ICR	5/5	5/5	427 ± 15
Endemic				
S1	ICR	2/7	1/6	359, >462 ⁶⁾
S2	ICR	5/6	0/6	301, 400, 430, 478, 536, >620
S3	ICR	2/7	0/7	222, 413, >620
	I/LnJ	5/5	0/5	188, 200, 270, 363, 603 ⁷⁾
Experimental				
A1	ICR	6/6	6/6	229 ± 12
B3	ICR	7/7	7/7	236 ± 14
G1	ICR	9/9	8/9	190, 386 ± 20 ⁸⁾
Healthy				
S4	ICR	0/4	ND ³⁾	>620

¹⁾ n, number of animals died of any reason during the observation period; N, number of animals received brain homogenates.

²⁾ n', number of PrP^{Sc}-positive mouse; N', number of mice used for the examination of PrP^{Sc}.

³⁾ Not tested.

⁴⁾ All the mice died of wound by sever fighting without any symptoms of scrapie. Three mice which died at 275 dpi were found to be positive for PrP^{Sc}.

⁵⁾ One mouse which died at 231 dpi was negative for PrP^{Sc}. The average and SD of "time to death" were calculated from the remaining 8 mice.

⁶⁾ One mouse which died at 359 dpi did not show scrapie symptoms but were found to be positive for PrP^{Sc}.

⁷⁾ Four mice which died at 188, 200, 270, and 363 by fighting.

⁸⁾ One mouse which died at 190 dpi was negative for PrP^{Sc}. The average and SD of "time to death" were calculated from the remaining 8 mice.

Table 3. Classification of sheep scrapie by transmissibility and relative PK-resistance of PrP^{Sc}.

Sheep	PK-resistance ¹⁾ (Sheep PrP ^{Sc})	Transmissibility to ICR mice [Mean ± SD (day)]	PK-resistance ²⁾ (Mouse PrP ^{Sc})
Group 1			
KH2	H	Yes (417 ± 29)	H
KU	H	Yes (394 ± 67)	H
SB	H	Yes (451 ± 39)	ND ³⁾
Y2	H	Yes (418 ± 42)	ND
Y5	H	Yes (427 ± 15)	H
G1	H	Yes (386 ± 20)	ND
Group 2			
A1	L	Yes (229 ± 12)	L
B3	L	Yes (236 ± 14)	L
Group 3			
S1	H	No	NA ⁴⁾
S2	H	No	NA
S3	H	No	NA

¹⁾ H indicates PrP^{Sc} resistant to the treatment of 40 µg/ml PK for 1 hr, while L indicates PrP^{Sc} sensitive to the same treatment.

²⁾ H indicates PrP^{Sc} resistant to the treatment of 200 µg/ml PK for 1 hr, while L indicates PrP^{Sc} sensitive to the same treatment.

³⁾ Not tested.

⁴⁾ Not available.

正常プリオンタンパク質 (PrP^C) を分解するプロテアーゼの検索と、 プリオン病の病態解明に向けた基礎研究

班 員：金子 清俊 (国立精神・神経センター神経研究所・疾病研究第7部)
桜井 総子 (同・疾病研究第7部)
高井 恵理子 (同・疾病研究第7部)
鎌田 礼子 (同・疾病研究第7部)
吉田 幹晴 (同・遺伝子疾患治療研究部)

【研究要旨】

正常型プリオン (PrP^C) の代謝過程の全容解明並びにプリオン病治療・予防法開発への応用を目的として、我々はプリオンタンパク質 (PrP) を分解するプロテアーゼに着目した研究を進めている。

まず組換えプリオンタンパク質 (rec PrP) を基質とした *in vitro* PrP cleavage assay 系を確立し、次にこの系を用いて PrP^C 分解活性を検索した結果、マウス大脳皮質より抽出した lipid rafts 中に、複数の PrP 分解活性 (PrPase) が存在することを見出した。

これらの一つである α -PrPase は、生体内で PrP^C を分解する活性と相同である可能性が高く、また特徴的な PrP 分解活性の調節を受けていた。 α -PrPase およびその活性調節因子の研究は、PrP の本来の機能を明らかにする手がかりのみならず、プリオン病治療・予防法開発への応用も期待されると考えられる。

PrPases (Proteases processing prion protein) and its modulator in lipid rafts

Kiyotoshi KANEKO, Michiko ISHIKAWA-SAKURAI, Eriko WAKABAYASHI-TAKAI, Reiko KAMATA, and Mikiharu YOSHIDA*

Department of Cortical Function Disorders, *Cell Biology, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo 187-8502 Japan.

ABSTRACT

We identified proteolytic activity in detergent-extract of lipid rafts by utilizing *in vitro* prion protein (PrP) cleavage assay. One of these proteolysis directed by α -PrPase produced an 11-kDa amino-terminus fragment from recombinant PrP (rec PrP). The presumptive cleavage site is indistinguishable from that of PrP^C *in vivo*, which is also governed in lipid rafts. This cutting region of rec PrP by α -PrPase is buried inside of PrP molecule, therefore a molecular chaperon-like co-factor seems to be required to unfold this region before the cleavage. The mechanism of unfolding PrP might also give us a clue to investigate a conversion mechanism of PrP^C into PrP^{Sc}.

〔はじめに〕

正常型プリオン (PrP^C) は、異常感染型プリオン (PrP^{Sc}) を鋳型としてタンパク質の高次構造変換を起こすことで PrP^{Sc} に変換すると考えられている。従来、PrP^C から PrP^{Sc} への構造変換は細胞膜表面の lipid rafts において起こり (4)、また PrP^C が lipid rafts においてタンパク質分解を受けることで、PrP^{Sc} への変換を免れることが示唆されてきた。これらの点から、我々は PrP^C のタンパク質分解に関わる分子を見出し、さらにこれを手がかりとして PrP^C から PrP^{Sc} への変換機構解明並びにプリオン病の治療・予防法開発を目的とした研究

を進めている。

我々は、まず人工的に合成した組換えプリオンタンパク質 (rec PrP) を基質とした *in vitro* PrP cleavage assay 系を確立した。この系を用いて PrP 分解活性を検索した結果、マウス大脳皮質より抽出した lipid rafts を構成している成分中に、複数の PrP 分解活性の存在を認めた。これらの PrP 分解活性を PrPase と名付け、現在それらの分解活性の詳細を検討している。

〔目的〕

PrP^C の代謝機構並びに PrP^{Sc} への変換機構を解明するために、生体内で PrP と相互作用する分子群を特定する。すなわち代謝に関与するプロテアーゼ及びその活性調節因子を同定することを目的とする。

〔材料と方法〕

FVB 系マウス (6 ないし 8 週令、オス) の大脳皮質を、1% Triton X-100 にて溶解後シヨ糖密度勾配遠心により分画し lipid rafts 標品を得た (1)。lipid rafts 標品は界面活性剤処理にて抽出画分を得、これに含まれるプロテアーゼ活性を検索した。組換えプリオンタンパク質 (rec PrP, Prionics, Switzerland) を人工基質とし試験管内でサンプルと反応させた後、抗プリオン抗体 (3F4、M-20) を用いたイムノプロットで分解産物を可視化する *in vitro* cleavage assay 系を確立した。

〔倫理面への配慮〕

マウスから脳を採取する際には、苦痛を与えないように最大限の配慮を行った。

〔結果〕

In vitro cleavage assay を用いて、マウス大脳皮質より分画した lipid rafts 標品中の PrP 分解活性を検討したところ、それぞれ異なった分解産物を産出する複数の分解活性を認めた (図-1a)。抗プリオン抗体 (3F4、M-20) を用いたイムノプロットで検出した分解産物の分子量から基質分子内の切断部位を推定したところ、4 カ所の切断部位があると考えられた (図-1b)。この分解活性をそれぞれ α -、 β -、 γ -、 δ -PrPase と名付けた。

〔考察〕

PrP の生理的・病的代謝過程を理解する上で、まず PrP の代謝過程の全容を明らかにすることは最も基本的な重要事項である。このことより我々は、まず PrP 代謝における最も基本的な分子の一つである PrP 分解酵素を同定することを試みている。のみならず、従来 PrP^C はタンパク質分解を受けると PrP^{Sc} への変換を免れることも知られていることより、PrP 分解酵素の研究はプリオン病の治療・予防法開発への応用も期待される。

現在までに *in vitro* PrP cleavage assay 系を確立し、それを用いてマウス大脳皮質由来の lipid rafts 中より、複数の PrPase 活性を検出し得た。その中の 1 つである α -PrPase による切断部位は、PrP 分解産物の分子量から PrP 分子内の 3F4 エピトープの C 末端側 20 から 30 アミノ酸残基の領域内にあると推定され、これは培養細胞を用いて検討された PrP^C の代謝過程において認められる PrP の限定分解 (2、3、4) とほぼ相同の分解活性であると推察された。すなわち今回我々が見出した α -PrPase は、生体内で実際に PrP^C を分解している分子と相同である可能性が高い。

α -PrPase による PrP 分解領域付近はほとんどが疎水性アミノ酸で構成されているため、生理的条件下でこの領域は PrP 分子内部に埋没した状態であると考えられている。このことから、PrP 分解酵素がこの領域にアクセスするには PrP の unfolding が起こっている可能性が高い。一般的な知見から類推した場合、この unfolding には何らかの分子シャペロン様の因子が関与していると考えられる。我々は、このアッセイ系に PrP の特定領域の合成ペプチドを過剰量共存させることにより、 α -PrPase 活性が増大することも見出している (未公表データ)。この結果は、生体内に合成ペプチドと相似の役割を持つ α -PrPase 活性調節因子が存在することを示唆している。

今後、これらの分子群を同定し更に詳細な検討を進めていく予定である。

〔結論〕

In vitro PrP cleavage assay 系を確立し、PrP^Cの分解に関わると考えられる α -PrPase およびその活性調節因子の存在を確認した。これらの分子群は、PrP^Cの代謝に関与する重要な分子群と考え、現在アミノ酸配列の同定を行っている。

〔参考文献〕

- 1) Lisanti M. P., Scherer P. E., Vidugiriene J., Tang Z., Hermanowski -Vosatka A., Tu Y.-H., Cook R. F. and M. Sargiacomo: Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source. Implications for human disease. *J. Cell Biol.* 126:111-126,
- 2) Harris D. A., Huber M. T., van Dijken P., Shyng S.-L., Chait, B.T. and R. Wang: Processing of a cellular prion protein. Identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry.* 32:1009-1016, 1993
- 3) Shyng S.-L., Huber M. T. and D. A. Harris: A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 268:15922-15928, 1993
- 4) Taraboulos A., Scott M., Semenov A., Avraham D, Laszlo L. and S. B. Prusiner: Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J. Cell Biol.* 129:121-132, 1995

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) Kaneko K, Ball HL, Wille H, Zhang H, Groth D, Torchia M, Tremblay P, Safar J, Prusiner SB, DeArmond SJ, Baldwin MA, Cohen FE: A Synthetic Peptide Initiates Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) Disease in Transgenic Mice. Running title: A peptide causes Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. *Journal of Molecular Biology.* 295:997-1007, 2000
- 2) Zulianello, Kaneko K, Scott M, Erpel S, Han D, Cohen F E, Prusiner S B: Dominant-negative inhibition of prion formation diminished by deletion mutagenesis of the prion protein. *Journal of Virology.* 74:4351-4360, 2000
- 3) Perrier V, Wallace A, Kaneko K, Safar J, Prusiner S B, Cohen F E: Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 97:6073-6078, 2000
- 4) Korth C, Kaneko K, Prusiner S B: Expression of unglycosylated mutant prion protein facilitates PrP^{Sc} formation in neuroblastoma infected with different prion strains. *Journal of General Virology.* 81:2555-2563, 2000
- 5) 金子清俊: 異常プリオンの形成と細胞障害. *神経内科.* 52:386-392, 2000
- 6) 金子清俊: Protein X-異常プリオン増殖に関与する新しいプレイヤー-. *脳の科学.* 22:743-749, 2000

2. 学会発表

- 1) Korth C., Kaneko K., Heye N., Scott M., and Prusiner S. B.: Transgenic mouse models for Creutzfeldt- Jakob disease. Annual Meeting of Society for Neuroscience. New Orleans, November 4-9, 2000.

〔知的所有権の取得状況〕

なし