

[結果]

- (1)神経網の海綿状変化は、小さな円形ないし楕円形の空胞形成であり、大脳皮質では癒合して巨大化する例が多々みられた。
- (2)高度な病変部位では神経細胞はほとんど消失するが、残存する細胞は核が濃染し細胞体が膨れて丸くなり、一見虚血性変化に類似する場合がある。また、central chromatolysis、inflated neuron と呼ばれ、胞体が膨れ上がって核が辺縁に寄って魚眼状の変化を呈する神経細胞が皮質深部を中心に散見された。さらに Lewy 小体に類似した構造を胞体に有する神経細胞もみられた。
- (3)星形グリアの変性像もさまざまであった。肥胖性グリアを優位にみる病変が多いが、海綿状変化のないような小脳の皮質下白質では線維性グリオシスが先行する。星形グリアの反応は同一例においても部位によって観察される像は多彩であった。
- (4)大脳白質は病変の起きやすい部位であり、一概に二次性変化とは言えなかった。とくに初期から髄鞘が脱落する傾向にあり、軸索以上に変性に陥りやすい部位がみられた。急激な変性脱落を示すマクロファージの反応はよくみられる現象であった。
- (5)小脳ではプルキンエ細胞より顆粒細胞層の脱落が顕著であった。白質では皮質直下のグリオシスが顕著であり、深部の髄質ではむしろ淡明化が主体であった。
- (6)大脳基底核や視床はほとんどの例で障害され、その病変は海綿状か淡明化であった。
- (7)海馬は多くの例で保存され、急激に萎縮を迎える時期になってもその大きさや細胞の配列は保持される傾向にあった。
- (8)1 から 7 の基本的所見に加えて、抗プリオン蛋白染色による染色では plaque type と synaptic type に大別され、さらに perineuronal や perivacuolar などのパターンもみられた。

[考察]

プリオン病の診断の基本は、プリオン染色に陽性であること、proteinase K 処理後に異常型を検出することである。すなわち、免疫組織学的手法と Western blot 法による解析である。確診されたプリオン病の組織病理は多彩である。異常型プリオン蛋白の沈着は神経網に高度な変性をきたす契機となる。海綿状の小空胞が灰白質に出現し、この小空胞は粗大となり、やがて spongiform change が完成する。一方、星形グリアの反応は多彩であり、線維性グリオシスが高度に進展する部位もあれば、肥胖性グリアや貪食細胞が出現する急性期を反映する変化もみられる。

[結論]

プリオン病は分子生物学的な進歩を背景に大きく見方の変った疾患である。従来の臨床病理学的な分類を基礎にしなが、異常プリオン蛋白の特徴からその分類の再編集が行われ、実に合理的かつ整合的に理解されるようになった。CJD の病理は、血管性障害、炎症性変化、そして根本的な変性像がすべて包含される。このような病変の多彩性は、異常プリオン蛋白の沈着と神経網の障害機序についてさらに検討を加えることの必要性を物語っている。

[参考文献]

- 1) Hoshi K, Yoshino H, Urata J, Nakamura Y, Yanagawa H, Sato T: Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts in Japan. *Neurology*, 55: 718-721, 2000
- 2) Ironside JW: Pathology of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Virol Suppl* 16: 143-151, 2000
- 3) 厚生労働省特定疾患対策研究事業「クロイツフェルト・ヤコブ病診療マニュアル [改訂版]」, 2001
- 4) 柳下三郎: Creutzfeldt-Jakob 病と関連疾患. *病理と臨床* 12: 297-306, 1994

プリオンタンパク関連遺伝子導入マウスの作製と解析

班 員：三好 一郎（東北大学・大学院医・動物実験施設）
班 員：毛利 資郎（九州大学・大学院医・実験動物学）
研究協力者：岡村 匡史（東北大学・大学院医・動物実験施設）
研究協力者：北本 哲之（東北大学・大学院医・病態神経）

【研究要旨】

マウスプリオンタンパク(PrP)遺伝子のプロモータを用い、内在性 PrP と同様の組織および時期特異性を期待できるヒトグルコシルセラミド合成酵素(Ugcg)高発現トランスジェニックマウスを作製した。脳における転写レベルおよび酵素活性レベルで Ugcg の高発現が確認されたため、セラミドースフィンゴ糖脂質合成系の活性化が、PrP の局在する生体膜のラフトや detergent-resistant membranes (DRMs)の構造や機能の変化を導き、結果としてプリオンに対する感受性を修飾することが出来るか感染実験により検討中である。

Production and analysis of the transgenic mice carrying prion protein-related gene

Ichiro MIYOSHI, Tadashi OKAMURA, Tetsuyuki KITAMOTO*, Shirou MOHRI **

Institute for Animal Experimentation, *Department of Neurological Science, Tohoku University Graduate School of Medicine, **Laboratory of Biomedicine, Graduate School of Medical Science, Kyushu University

ABSTRACT

We established the transgenic mouse lines by introduction of the transgene, which was composed of mouse prion protein (PrP) promoter region and human glucosylceramide synthase (Ugcg) cDNA fragment. As mouse PrP promoter regulated the expression of the transgene, spatial- and temporal-specificity of the gene expression was expected to be similar to that of mouse PrP. The higher expression of the transgene was observed both at transcription and enzyme activity levels in brain. The activation of ceramide-glycosphingolipids biosynthesis pathway might modify the structure and function of raft and detergent-resistant membranes (DRMs) in which PrP localize. We examine by transmission experiment whether these modification of DRMs have influence on the susceptibility to infectious prion as a result.

【はじめに】

PrP は GPI アンカー型タンパク質で、細胞膜のラフトや DRMs に局在すると考えられている。また、プリオンに起因する PrP の構造変換やその伝播には、ラフトや DRMs の存在およびその構造が影響することが示唆されている¹⁾。ラフトや DRMs の主要構成成分は GPI アンカー型タンパク質およびコレステロール、スフィンゴ糖脂質、スフィンゴミエリンなどである。今回、Ugcg の高発現によりスフィンゴ糖脂質合成系を活性化し、さらにそのことがセラミドを介してスフィンゴミエリンの合成系にも影響するためにラフトや DRMs の構造や機能に変化を引き起こし、その結果としてプリオンに対する感受性を修飾できるかという点に着目した。従来、様々な改変 PrP 遺伝子導入トランスジェニックマウスを作製する目的で用いたマウス PrP 遺伝子プロモータは、脾臓の濾胞樹状細胞を除外すると内在性のものと同様な発現の組織特異性を示すことから、プリオン感受性モデルマウスの作

製に有効であった²⁾。そこで、このプロモータとヒト Ugcg cDNA から構築された導入遺伝子を持つトランスジェニックマウスを確立した。現在、このマウスを用いて感染実験が進行中である。

【材料と方法】

導入遺伝子の基本骨格は、129SV マウス由来プロモータの下流に I/Ln マウス由来の 5' UTR (exon1, および intron1, exon2, intron2 を含む)、そして 129SV マウス由来の ORF を含む exon3 と 3'末端領域から構成されている。これまで、PrP をコードする ORF にヒト/マウスなどのキメラ型 PrP 遺伝子を配置した導入遺伝子を構築しトランスジェニックマウスを樹立してきた。今回も同様の手法で、ORF にヒト正常 Ugcg cDNA 断片を持つ導入遺伝子を構築し (図 1)、常法に従ってトランスジェニックマウス (以下 PrUgcg) を作製した。系統の確立に際し、PCR, あるいはサザンブロットにより導入遺伝子を検出し C57BL/6 へのバッククロスを行った。また、導入遺伝子の発現は RT-PCR, およびノザンブロット, ウェスタンブロットにより検討した。

酵素活性測定では、まず、蛋白分解酵素阻害剤の存在下でホモジェナイズした組織から除核後、超遠心分離(100,000xg)によって得られた総膜画分を NBD hexanoic ceramide (C6-NBD-Cer)/lecithin liposome および UDP-Glc-2Na と 32°C で 2 時間反応させた。次に、反応液に chloroform/methanol (2:1) を加え攪拌・遠心後、有機溶媒層を回収し、濃縮後薄層クロマトグラフィーにより基質(C6-NBD-Cer)と生成物(C6-NBD-GlcCer)を分離した。最後に、Epi-Light UV FA1100 および Luminous Imager により生成物を定量解析した。

感染実験では、1%マウス脳乳剤 (福岡 1 株) 20 μ l を脳内接種した。

【倫理面への配慮】

全ての動物実験は、東北大学大学院医学系研究科および九州大学大学院医学研究院の動物実験指針に従って行われた。

【結果と考察】

数系統の PrUgcg マウスが確立されたが、いずれも外見上は正常で導入遺伝子発現の組織特異性も顕著な相違が見られないため、今回はその中から#1 および#3 を使用した。PrUgcg マウスは、交配することで胎生 6.5 日前後に死亡してしまう Ugcg ノックアウトマウスをレスキューする事を報告した³⁾。しかし、新生仔は小腸の腸絨毛の崩壊などの異常が主因で数日から一週間で衰弱死してしまう。これは、PrP 遺伝子のプロモータの制御で Ugcg が発現することで胎性致死は回避できたが、その後、このプロモータでは小腸のある細胞で Ugcg 遺伝子が発現しないことを示唆する。また、PrP 遺伝子のプロモータが広く一般臓器での遺伝子発現を促すことを裏付ける。しかしながら、図 2 に示すように、今回確立できた PrUgcg マウスの脳における転写レベルでの導入遺伝子の発現はコントロールに比較して顕著に強く、神経細胞での発現が強いという PrP 遺伝子のプロモータの特徴を反映していると考えられた。また、大脳および小脳の総膜画分中の Ugcg 酵素活性レベルは野生型の 1.4~2.0 倍程度上昇していたが (図 3)、転写レベルでの明らかな相違から期待されたほどではなかった。

スフィンゴ糖脂質は、細胞間相互作用の介在因子として、あるいは、細胞膜におけるシグナル伝達系の調整因子としての機能が示唆されている。その合成系の起点であるセラミドの修飾機構には、グルコシルセラミド合成系とスフィンゴミエリン合成系の 2 種類が存在する。また、その 2 種類の合成系はセラミドを介して相互に影響しあう。そのうち、特に前者において数百にも及ぶスフィンゴ糖脂質分子合成への最初の糖転移酵素が Ugcg である。Ugcg は、スフィンゴ糖脂質分子群の生合成の起点になる重要な酵素であると同時に、結果的にスフィンゴミエリン合成系にも影響を及ぼすことが予想される。スフィンゴ糖脂質やスフィンゴミエリンは神経組織に豊富でコレステロールや GPI アンカー型のタンパク質などと細胞膜のラフトや DRM の主要構成成分であることが知られている。これらのことから、Ugcg 活性の高発現によりラフトや DRM の構造や機能を修飾できる可能性、さらにその結果として、GPI アンカー型のタンパク質である PrP の構造変換や伝播の過程に影響を与

えプリオンに対する感受性を修飾できる可能性がある。

これまで、修飾した構造の PrP を発現させることでプリオン感受性モデルの開発を行い、成功例も得られた。これは、PrP に特異的な感受性の付与と考えられるが、今回の試みは PrP に特異的と言うより、むしろその局在する環境を変えることによる感受性（あるいは抵抗性）の付与と考えており、場合によっては特異的な方法と相加的に利用できる可能性を持つと期待している。

【結 論】

PrP が局在するラフトや DRM の構造および機能を変えることによりプリオンに対する感受性を修飾する目的で、PrP と同じ組織特異性を示す Ugcg 高発現トランスジェニックマウスを作製した。その感受性については現在検討中である。

【参考文献】

- 1) Simons K., Ehehalt R.: Cholesterol, lipids rafts, and disease. J Clin Invest. 110: 597-603, 2002
- 2) 毛利資郎, 北本哲之, 三好一郎, 石川有紀子, 大野彰子, 沼野純: ヒト PrP 遺伝子発現マウスのプリオン感受性試験(その3). 厚生省特定疾患「遅発性ウイルス感染」調査研究班, (班長 北本哲之) 平成 11 年度研究報告書: 88-93, 2000
- 3) 三好一郎, 北本哲之, 毛利資郎, 岡村匡史, 村本環, 平林義雄: プリオンタンパク遺伝子は胚発生初期にも発現する. 厚生省特定疾患「遅発性ウイルス感染」調査研究班, (班長 北本哲之) 平成 13 年度研究報告書: 130-133, 2002

【研究発表】

1. 論文発表
 - 1) Kitamoto T., Mohri S., Ironside J.M., Miyoshi I., Tanaka T., Kitamoto N., Itohara S., Kasai N., Katsuki M., Higuchi J., Muramoto T., Shin R.-W.: Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. Biochem Biophys Res Commun. 294: 280-286, 2002
 - 2) Gombojav A., Shimauchi I., Horiuchi M., Ishiguro N., Shinagawa M., Kitamoto T., Miyoshi I., Mohri S., Takata M.: Susceptibility of transgenic mice expressing chimeric sheep, bovine and human PrP genes to sheep scrapie. J Vet Med Sci. in press
2. 学会発表

図 1. 導入遺伝子の構造

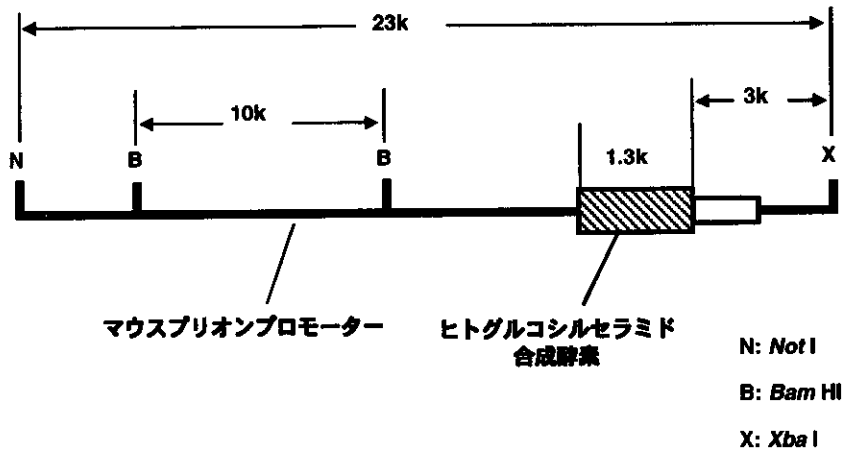


図 2. 脳における導入遺伝子のノザンプロット解析

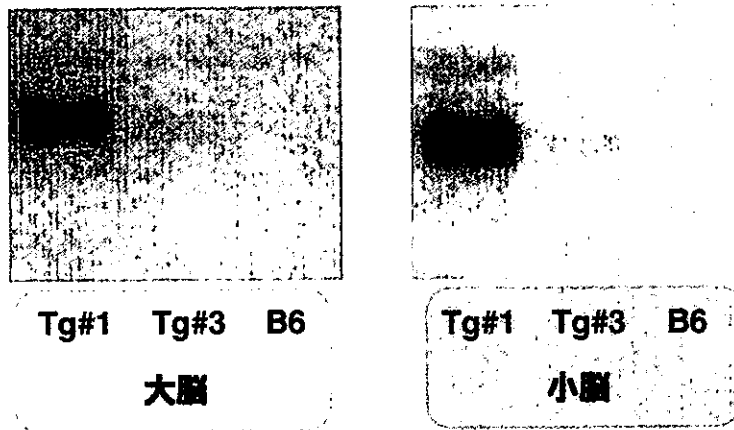
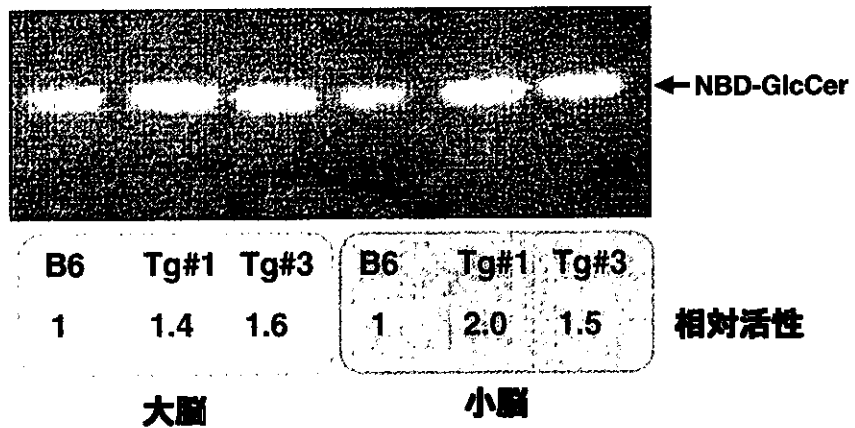


図 3. 脳におけるグルコシルセラミド合成酵素活性



ScN2a 細胞における異常型プリオン蛋白検出に用いる C 末端エピトープタグの開発と species barrier 解析への応用

班 員：村本 環（東北大学・大学院医・病態神経）
研究協力者：北本 哲之（東北大学・大学院医・病態神経）
研究協力者：田中 智之（堺市衛生研究所）

〔研究要旨〕

プリオン感染マウス培養細胞に強制発現させたマウスプリオン蛋白の異常化を検出する上で有用な、C 末端エピトープタグの開発を試みた。その結果、Arg229 と Ser230 の間に挿入した FLAG タグ（FLAG229）の場合に、マウスプリオン蛋白の異常化の効率が最も高かった。FLAG229 タグを持つマウスプリオン蛋白（MoPrP FLAG229）は、PIPLC で細胞表面から培養液中へ遊離させることが可能であった。マウス・ヒト間の種の壁に関与する可能性のある 108 番および 111 番残基を MoPrP FLAG229 においてヒト型（Met108 および Met111）に置き換えると、Met111 は MoPrP FLAG229 の異常化を抑制したが、Met108 は抑制しなかった。FLAG229 タグはマウスプリオン蛋白に導入した変異が異常化に及ぼす影響を、従来用いられていた 3F4 タグを用いずにプリオン感染培養細胞で解析する上で有用であると思われる。

C-terminal epitope tags which allow to specifically detect the isoform conversion of murine prion protein introduced into ScN2a cells: exploitation and application to the analysis of species barrier

Tamaki MURAMOTO¹, Tetsuyuki KITAMOTO¹, and Tomoyuki TANAKA²

¹Department of Neurological Science, Tohoku University Graduate School of Medicine,
and ²Sakai-city Institute of Public Health

Abstract

We exploited epitope tags which allow, when introduced into the C-terminus of murine prion protein (MoPrP), to specifically detect the isoform conversion of the tagged molecule expressed in ScN2a cells. Among many tags examined, the FLAG tag, inserted between Arg229 and Ser230, allowed the isoform conversion of the tagged molecule with the highest efficiency. The FLAG-tagged MoPrP (MoPrP FLAG229) was released from cells into medium by PIPLC. Either Leu108 or Val111 in MoPrP FLAG229 was substituted with Met that could play a role in species barrier between mouse and human. The Met111 substitution inhibited the conversion of MoPrP FLAG229 while the Met108 did not. The FLAG229 tag may be a useful tool in studying, with cultured cells, the isoform conversion of MoPrP with the N-terminal mutations.

〔はじめに〕

プリオン感染マウス神経芽細胞腫株 ScN2a は、プリオン蛋白異常化メカニズムの解析に大きく貢献してきた。¹⁾ 特に「種の壁 species barrier」の解析においては大きな力を発揮し、マウス/ハムスター間の種の壁を克服するキメラプリオン蛋白分子の開発^{2, 3)}、およびそれを直接応用したマウス/ヒトキメラプリオン蛋白分子のデザインと同分子を発現するヒトプリオン高感受性トランスジェニックマウスの開発を可能にした。^{4, 5)} また、マウス/ヒト間の種の壁とプリオン蛋白 C 末端アミノ酸配列の関係の解析からは、プリオン増殖に関わる新たな因子(プロテイン X、あるいはファクターX)の存在を

示唆する重要なデータが生み出された。^{4, 6)} ScN2a システムを用いた種の壁の解析は、3F4 抗体での検出を可能にするエピトープタグ(Met108/Met111)付きのマウスプリオン蛋白が ScN2a 細胞内で異常化する能力に依存して行われてきた。²⁾ そのため、3F4 タグ部位およびその近傍に変異を導入し、その変異が異常化に及ぼす影響を評価することは、変異が 3F4 を用いた検出そのものに影響するため制限があった。3F4 タグ部位とその近傍は、プリオン蛋白の異常化において異常型特有の構造が生じることが推定されている部位であり、この部位への変異の導入とその異常化への影響を ScN2a システムを用いて解析できれば、本システムの有用性はさらに大きくなる。このようなことを可能にするために、我々は、プリオン蛋白 C 末端に導入し、プリオン蛋白異常化の解析に用いる新しいエピトープタグの開発を試みた。

〔材料と方法〕

1) 129/SvJ マウスプリオン蛋白遺伝子の open reading frame (ORF) の一部および全体を PCR でクローニングした。開始コドンの 5'側に BamHI site を、終止コドンの 3'側に XhoI を、また 3F4 エピトープタグ (Met108/Met111) をそれぞれ PCR プライマーのデザインを利用して創出した。3F4 タグ (Met108/Met111) を持つマウスプリオン蛋白 (Mo3F4) と持たない野性型プリオン蛋白 (MoPrP) の遺伝子に、site-directed mutagenesis 法で各種エピトープタグ (表) およびアミノ酸置換 (Met108 および Met111) を導入した。使用したタグおよびそのアミノ酸配列は以下の通りである: FLAG (DYKDDDDK)、HA (YPYDVPDYA)、Myc (EQKLISEED)、ヒト Parvo virus B19 VP2 蛋白タグ (SQPYHHWD)。VP2 蛋白タグに対する特異的モノクローナル抗体は福岡県赤十字血液センターの佐藤博行博士に御供与頂き、また抗体のエピトープマッピングは東北大学大学院医学系研究科病態神経学の辛龍雲博士に施行して頂いた。BamHI/XhoI ORF カセットを蛋白発現用プラスミドベクター pSPOX (カリフォルニア大学プルシナー博士より寄贈) に組み込んだ。

2) 各種発現用プラスミドを Qiagen で調製し、DNA 30-40 μ g を DOTAP (Roche) を用いてプリオン感染培養細胞 ScN2a およびプリオン非感染細胞 N2a (いずれもカリフォルニア大学プルシナー博士より寄贈) に導入した。48 時間培養後に細胞溶解用バッファー (10 mM Tris、pH 7.4、100 mM NaCl、1 mM EDTA、0.5% Triton X-100、0.5% sodium DOC) を用いて細胞を回収した。低速遠心で不溶性成分を除去したもの (細胞溶解液) を解析に用いた。

3) 細胞溶解液に Laemmli のウエスタンブロット用サンプルバッファーを加え、100 ° C 加熱したものを蛋白発現解析に用いた。細胞溶解液の一部に Sarkosyl を加え (最終濃度 2%)、これを proteinase K (20 μ g/ml) で処理した後、超遠心 (最大 604,000 g、25 ° C、1 時間) して沈渣を得た。沈渣を Laemmli のウエスタンブロット用サンプルバッファー中に再懸濁し 100 ° C 加熱したものを異常型プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) 分画として用いた。

4) ウエスタンブロット用サンプルの一部を N-glycosidase F (PNGase F) 処理し、プリオン蛋白の糖鎖を除去した。

5) 非プリオン感染細胞に MoPrP FLAG229 発現用プラスミドを導入し、48 時間後に培養液を protease inhibitor cocktail (Roche) を含むリン酸バッファーと交換した。バッファーに phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC、Roche) または等量の蒸留水を加え、3 時間室温でインキュベートしたのち、バッファーと細胞を別々に回収した。細胞の回収は上記 2、3 と同様に行った。バッファーは遠心およびフィルター濾過により細胞を除去したのち、メタノール・クロロホルムを用いて蛋白を沈殿させ回収し、Laemmli のウエスタンブロット用サンプルバッファーに懸濁して、100 ° C 加熱したものを培養液蛋白分画として用いた。

〔結果と考察〕

ScN2a 細胞に Mo3F4 分子を一過性発現すると、48 時間後に回収した細胞由来の PrP^{Sc} 分画中に、異常化した Mo3F4 を 3F4 抗体を用いたウエスタンブロットで容易に検出することが出来た (図 1)。

一方、各種エピトープタグ（表）を Mo3F4 分子の C 末端に導入した場合、殆どのタグで異常化能が失われたが、Arg229 と Ser230 の間、ないし Ser230 と Ser231 の間に挿入された FLAG タグ（FLAG229 および FLAG230）については、タグ付き分子の異常化能が保たれていた（表、図 1）。この二つのうちで、FLAG229 付き分子（Mo3F4 FLAG229）の方が相対的に異常化効率が高かったこと、および Ser230/Ser231/Ser232 が GPI アンカー付加シグナルとして重要である可能性を考慮し、FLAG229 を以後の研究に用いることにした。

FLAG229 付きマウス PrP 分子（MoPrP FLAG229）および Mo3F4 FLAG229 を ScN2a で発現させ、それを

抗 FLAG タグ抗体 M2 (Sigma) を用いたウエスタンブロットで検出しようと試みると、M2 抗体が種々の蛋白と交叉反応を起こし、検出の妨げとなった（図 2）。そこで、細胞溶解液のウエスタンブロットサンプルに PNGase F 処理を施しプリオン蛋白の糖鎖を除去した上でウエスタンブロットに用いると、MoPrP FLAG229 および Mo3F4 FLAG229 の両分子は約 28 kDa および 18 kDa の二種類のサイズの分子として検出された（図 2）。同じサンプルを 3F4 抗体と反応させると 28 kDa の Mo3F4 FLAG229 分子と強く反応し、18 kDa の分子とはほとんど反応しなかった（図 2）。このことから、28kDa の分子が Mo3F4 FLAG229 および MoPrP FLAG229 の全長型分子であり、18 kDa の分子は N 末端が切り出された C 末端断片であることが示唆された。MoPrP FLAG229 は、ScN2a 細胞および N2a 細胞に発現させた場合を比較しても、発現量や分子種のサイズに差は認められなかった（図 3）。N2a 細胞に発現させた MoPrP FLAG229 は 28 kDa、18kDa 両分子種とも

PIPLC 処理により細胞から培養液中へ遊離させることが可能で（図 3 A）、GPI アンカー型膜蛋白として細胞表面に存在していると考えられた。また、このデータによって 18 kDa 分子の C 末端構造が無傷であることが示された。ScN2a 細胞内で異常化した MoPrP FLAG229 を、糖鎖を除去しないまま M2 抗体を用いたウエスタンブロットで検出すると、約 20-30 kDa のサイズを持つ 3つの主要な分子種として検出された（図 3 B）。一方、N2a 細胞に発現させた場合には、対応する PrP^{Sc} 分画に同様の分子は検出されなかった（図 3 B）。以上のデータから、MoPrP FLAG229 分子の正常型・異常型は、野性型プリオン蛋白分子の正常型・異常型と同様の性状を有していると考えられた。

次に、我々は MoPrP FLAG229 を用いて、マウス/ヒト間（あるいはマウス/ハムスター間）の種の壁に関わる可能性がある 108 番アミノ酸（マウスで Leu、ヒト・ハムスターで Met）と 111 番アミノ酸（マウスで Val、ヒト・ハムスターで Met）がプリオン蛋白異常化に及ぼす影響を解析した。MoPrP FLAG229 の Leu108 と Val111 のいずれか又は両方をヒト・ハムスター型の Met で置換した分子を ScN2a 細胞で発現させ、その異常化能を調べたところ、Leu108 の Met への単独置換は異常化を抑制しなかったが、Val111 の Met への単独置換および 108 番・111 番両者の Met への置換は同程度に強く異常化を抑制した（図 4）。このことは、108 番・111 番のアミノ酸のうち、111 番は種の壁形成の原因となる可能性が高いが、108 番はその可能性が低いことを示唆している。

〔結 論〕

FLAG229 タグは、ScN2a 細胞に強制発現させる MoPrP 分子に導入することにより、その正常型・異常型両者の検出に有用であった。FLAG229 タグを用いることにより、マウス/ヒト間のプリオン蛋白 N 末端アミノ酸配列の違いが異常化に及ぼす影響を、3F4 タグを用いることなく ScN2a 細胞で解析することが可能となった。FLAG229 タグを用いることにより、プリオン蛋白異常化機構の解析における ScN2a 細胞システムの有用性はさらに高まると考えられる。

〔参考文献〕

- 1) Butler DA, Scott MRD, Bockman JM, Borchelt DR, Taraboulos A, Hsiao KK, Kingsbury DT, Prusiner SB: Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. J Virol 62: 1558-1564, 1988

- 2) Scott MR, Kohler R, Foster D, Prusiner SB: Chimeric prion protein expression in cultured cells and transgenic mice. *Protein Sci* 1: 986-997, 1992
- 3) Scott M, Groth D, Foster D, Torchia M, Yang SL, DeArmond SJ, Prusiner SB. Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell* 73: 979-988, 1993
- 4) Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB: Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83: 79-90, 1995
- 5) Kitamoto T, Mohri S, Ironside JW, Miyoshi I, Tanaka T, Kitamoto N, Itohara S, Kasai N, Katsuki M, Higuchi J, Muramoto T, Shin R-W: Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 280-286, 2002
- 6) Kaneko K, Zulianello L, Scott M, Cooper CM, Wallace AC, James TL, Cohen FE, Prusiner SB: Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10069-10074, 1997

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) 村本 環：プリオン病予防・治療法の開発。 *BIO Clinica* 17:373-377, 2002
- 2) 村本 環：プリオンの感染から中枢神経侵入まで。 *ファルマシア* 38:649-652, 2002
- 3) 村本 環：異常型プリオン蛋白：その検出法、タイピング、プリオン病診断への応用。 *医学のあゆみ* 203: 881-887, 2002

2. 学会発表

- 1) 村本 環：プリオン蛋白の構造と病原性。第 121 回日本医学会シンポジウム「プリオン病」、神奈川県足柄下郡箱根町 パレスホテル箱根、2002 年 8 月
- 2) 村本 環：欠損変異プリオン蛋白を用いたプリオン構造の解析。第 75 回日本生化学会大会シンポジウム「プリオン病」、京都、2002 年 10 月

表 各種C末端エピトープタグ付きMo3F4分子の発現および異常化効率

Construct name	221-----230*	Expression**	Conversion**
Mo3F4	SQAYYDGRRS	++++	++++
Mo3F4 FLAG230	SQAYYDGRRS#	++++	+
Mo3F4 FLAG229	SQAYYDGRR#S	++++	+~++
Mo3F4 FLAG227	SQAYYDG#RRS	++++	-
Mo3F4 FLAG225	SQAYY#DGRRS	++++	-
Mo3F4 FLAG223	SQA#YYDGRRS	++++	-
Mo3F4 FLAG221	S#QAYYDGRRS	++++	-
Mo3F4 FLAG229 Del228	SQAYYDGR-#S	++++	-
Mo3F4 FLAG229 Del227-228	SQAYYDG--#S	++++	-
Mo3F4 FLAG229 Del226-228	SQAYYD---#S	++++	-
Mo3F4 FLAG229 Del225-229	SQAYY----#S	++++	-
Mo3F4 FLAG229 Del224-229	SQAY-----#S	++++	-
Mo3F4 FLAG229 Del223-228	SQA-----#S	++++	-
Mo3F4 FLAG229 Del222-228	SQ-----#S	++++	-
Mo3F4 FLAG229 Del221-229	S-----#S	++++	-
Mo3F4 HA230	SQAYYDGRRS#	++++	-
Mo3F4 HA229	SQAYYDGRR#S	++++	-
Mo3F4 HA228	SQAYYDGR#RS	++++	-
Mo3F4 Myc230	SQAYYDGRRS#	++++	-
Mo3F4 Parvo230	SQAYYDGRRS#	+	-

* 各 construct の 221-230 番アミノ酸の配列（一文字表記）を示す。#はタグの挿入位置を表す。- は欠損しているアミノ酸を示す。

** 等量の construct DNA を用いて発現させた際の Mo3F4 の発現量（expression）および異常化量（conversion）に対する、各タグ付き分子のおおよその発現量および異常化量の比を表す（-, 0%; +, 25%; ++, 50%; +++, 75%; +++++, 100%）

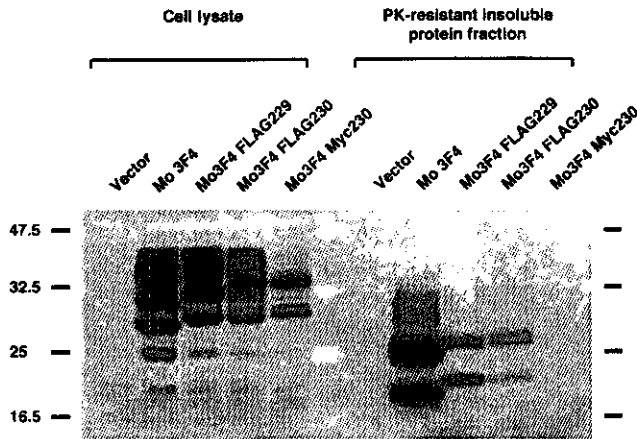


図1 Mo3F4 およびC末端エピトープタグ付き Mo3F4 の ScN2a 細胞における発現と異常化。

Mo3F4 および3種類 (FLAG229、FLAG230、Myc230、表1も参照) の異なるC末端エピトープタグ付き Mo3F4 またはベクターを ScN2a 細胞に発現させた。図の左側の5レーン は細胞溶解液を用いて各蛋白の発現を確認したもの (3F4 抗体を用いたウエスタンブロット)。右側5レーン は各蛋白を発現する細胞の溶解液由来の PrPSc 分画に含まれる異常化した蛋白を 3F4 抗体で検出したもの。Mo3F4、および FLAG タグを持つ Mo3F4 の異常化が確認された。

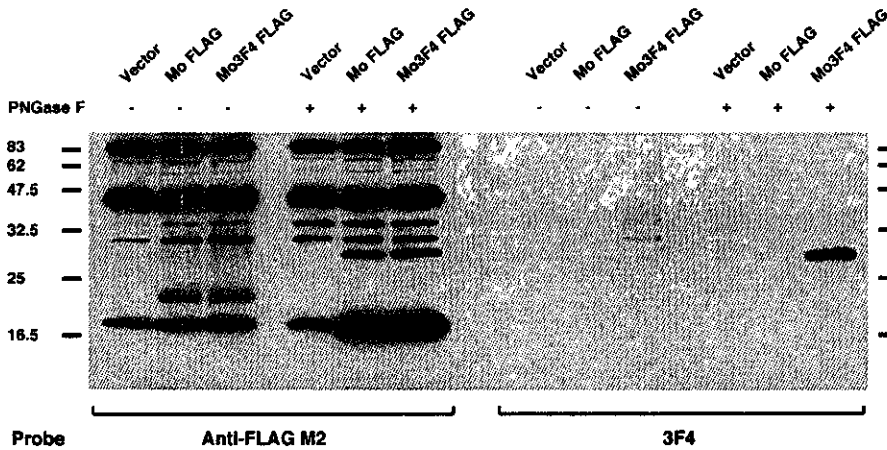


図2 FLAG229 タグ付きプリオン蛋白の発現と抗 FLAG 抗体による確認。

FLAG229 タグ付きマウスプリオン蛋白 (図中 Mo FLAG)、FLAG タグ・3F4 タグ両者を持つマウスプリオン蛋白 (図中 Mo3F4 FLAG) およびベクターを ScN2a 細胞に発現させた。図の左側半分は、細胞溶解液サンプルを抗 FLAG 抗体 M2 と反応させたウエスタンブロット。細胞溶解液サンプルに PNGase F 処理を施さなかった場合 (+) と施した場合 (-) の両者の結果を示す。全く同じサンプルを 3F4 抗体と反応させた場合のウエスタンブロットの結果を図の右側半分に示す。

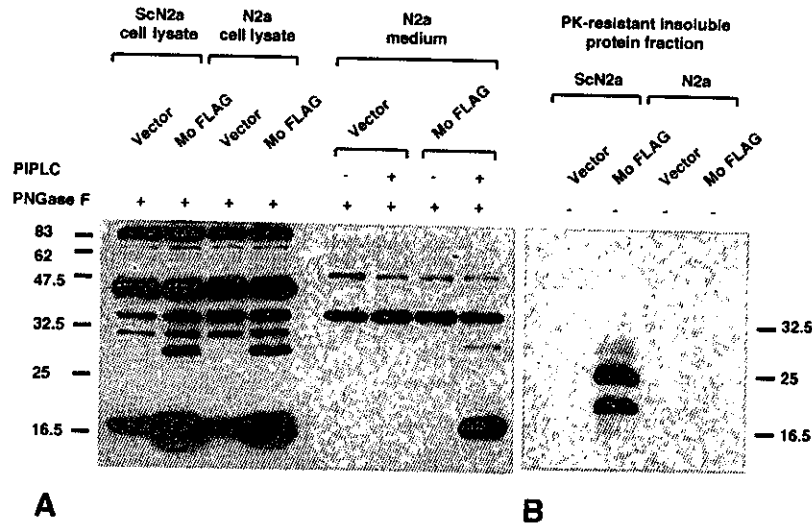


図3 FLAG229 タグ付きマウスプリオン蛋白は GPI アンカー化されており、感染細胞特異的に異常化する。FLAG229 タグ付きマウスプリオン蛋白 (図中 Mo FLAG) およびベクターを ScN2a 細胞および N2a 細胞で発現させた。A) 左側 4 レーンは細胞溶解液サンプルを用いて Mo FLAG229 の発現を M2 抗体で確認したもの。右側 4 レーンはベクターおよび Mo FLAG229 を発現している N2a 細胞に PIPLC 処理を施した場合 (+) と施さなかった場合 (-) の培養液蛋白分画中に含まれる FLAG タグ付き分子を M2 抗体で検出したもの。サンプルは全て PNGase F 処理してある。B) ベクターおよび Mo FLAG229 発現 ScN2a 細胞と、同じく N2a 細胞由来の PrPSc 分画 (PNGase F 未処理) 中の FLAG タグ付き分子を M2 抗体で検出したもの。

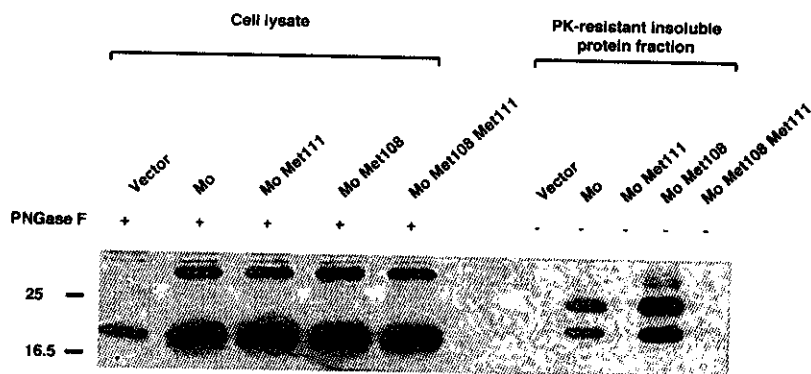


図4 FLAG229 タグ付きマウスプリオン蛋白にヒト型配列 (Met108、Met111) を導入した場合の異常化効率の変化。

FLAG229 タグ付きマウスプリオン蛋白 (図中 Mo)、およびそのアミノ酸配列の 111 番 Val および 108 番 Leu のいずれか、ないし両方をヒト型の Met で置換したもの (図中 Mo Met111、Mo Met108、Mo Met108 Met111)、およびベクターを ScN2a 細胞に発現させた。図左側の 5 レーンは細胞溶解液サンプル (PNGase F 処理済み) を用いて各タグ付き分子の発現を確認したもの。右側の 5 レーンは各分子発現細胞由来の PrPSc 分画 (PNGase F 未処理) 中の FLAG タグ付き分子を M2 抗体で検出したもの。

遺伝子工学的手法を用いたプリオンタンパク新規抗体作成の試み

班 員：松田治男（広島大学・大学院生物圏科学・免疫生物）
研究協力者：川嶋 剛（広島大学・大学院生物圏科学・免疫生物）
研究協力者：中村尚登（広島大学・大学院生物圏科学・免疫生物）
研究協力者：宮本和慶（広島大学・大学院生物圏科学・免疫生物）
研究協力者：丸山智裕（広島大学・大学院生物圏科学・免疫生物）

[研究要旨]

ファージ発現ニワトリ抗体 phAb3-15 (PrP90-110 にエピトープ存在) と phAb4-12 (PrP121-231 にエピトープ存在) の抗体遺伝子に error-prone PCR によって人為的に変異を導入し、新規抗体を選択することを試みた。連続して 2 回の error-prone PCR をおこなって得られた DNA 断片から変異導入ライブラリーを作成し、N2a/22L 細胞抽出物を抗原としたパニング選択をおこなった。phAb3-15 では抗原との反応性は上昇しなかった。phAb4-12 では、リコンビナント MoPrP23-231 に対する反応性が上昇した。このライブラリーからファージ抗体をモノクローン化してリコンビナント MoPrP23-231 に対する反応性を比較したところ、元の phAb4-12 ファージ発現抗体よりも抗原に対する反応性の高いファージ抗体を得る事が出来た。この結果から、error-prone PCR により既存のファージ抗体の抗原に対する反応性を上昇させることが可能である事が確認できた。

In vitro selection of high affinity anti-prion protein scFv from VH-VL random mutagenesis phage libraries

Haruo MATSUDA, Tsuyoshi KAWASHIMA, Naoto NAKAMURA, Kazuyoshi MIYAMOTO and Tomohiro MARUYAMA

Laboratory of Immunobiology, Department of Molecular and Applied Biosciences, Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University

Abstract

To increase the specificity of antibodies against the prion protein (PrP), we applied error-prone PCR to introduce random mutations into genes encoding single chain fragment of variable region (scFv). Two scFv constructs, phAb3-15 (recognizing between 90th and 110th amino acids of PrP), and phAb4-12 (recognizing between 25th and 29th amino acids of PrP) were selected as templates for error-prone PCR. We decided the concentration of the template was 0.01ng of DNA, and amplified scFv DNA fragments with error-prone PCR. We created randomized scFv libraries, and carried out panning selection against N2a/22L whole cell extract. After several rounds of panning, we obtained scFv fragments that recognized PrP. The specificity of those scFv were superior to original one's in ELISA.

[はじめに]

異常プリオンタンパク質の診断および研究を推進するためには、実績のあるニワトリ抗体 (1,2) のプリオンタンパク質への特異性の向上が望まれる。今年度はヒト PrP 免疫ニワトリ脾細胞から作成したファージ抗体を利用し、遺伝子工学的手法を用いて PrP 特異抗体の抗原に対する特異性を向上させるための実験をおこなった。

[目的]

異常プリオンタンパク質を検出、診断するイムノアッセイ法をよりの確なものにするためには、高感度で異常プリオンタンパク質を検出できるモノクローナル抗体を作成することが重要である。本研究では、ニワトリを免疫動物として作成したファージ抗体から、ヒトおよびマウス異常プリオンタンパク質を高感度で認識するファージ抗体 3-15 と 4-12 を選び、error-prone PCR を用いて人為的に塩基置換を導入し (3)、抗原認識能を向上させることを試みた。

[材料と方法]

1. 単鎖型抗体 (scFv) 遺伝子を有するプラスミド DNA の調整

ファージ抗体として発現させた 3-15 と 4-12 をサブレッサー株 XL1-Blue に感染させた。感染後、菌はアンピシリン含有 2xYT 寒天培地に塗布し 37°C で終夜培養した。得られたコロニーはアンピシリン含有 2xYT 培地で終夜培養し、遠心集菌の後、常法に従ってプラスミド DNA を抽出した。

2. error-prone PCR 反応

プラスミド DNA の 0.01ng を鋳型とし、scFv 遺伝子特異的プライマーを用いて error-prone PCR で scFv 遺伝子を増幅した。error-prone PCR を 1 度おこなった後、その産物の 0.01ng を鋳型として 1 回目と同じ条件で再度 error-prone PCR により scFv 遺伝子を増幅し、その産物により変異ライブラリーを構築した。

3. error-prone PCR 産物による変異ライブラリーの構築

2 回の error-prone PCR が終了した後、PCR 産物を精製し制限酵素 *Eag* I および *Bss*III で切断した。切断した DNA は、同じ制限酵素であらかじめ切断、精製したファージ発現ベクターにライゲーションし、サブレッサー株 XL1-Blue に形質転換したものを scFv 変異ライブラリーとした。

4. ファージ発現変異抗体ライブラリーの作成とパニング選択

形質転換した XL1-Blue は 2xYT 培地で培養した後、VCSM13 ヘルパーファージを感染させた。感染後、新たに終濃度 250 μ M IPTG を含むアンピシリン・カナマイシン含有 SuperBroth 培地で終夜培養し、遠心集菌後の培養上清をファージ発現変異抗体ライブラリーとした。作成したライブラリーに対して N2a/22L 細胞抽出物を抗原とし、パニング選択により PrP 特異的ファージ発現抗体を選抜した。

5. モノクローン化ファージ発現抗体 scFv 遺伝子の DNA 塩基配列決定

モノクローン化ファージ発現抗体は遺伝子特異的プライマーを用いて scFv を増幅し、常法に従って DNA 塩基配列を決定した。

6. ELISA

ファージ発現抗体の抗原との反応性は ELISA 法を用いて調べた。リコンビナント MoPrP23-231 もしくは N2a/22L 細胞抽出物をコートしたプレートにファージ発現抗体を加えて反応した後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス κ 鎖抗体を用いて検出した。

(倫理面への配慮)

今年度おこなった研究では動物実験はおこなっていない。また、遺伝子組換え実験には、広島大学の組換え DNA 申請において承認を得ている、人体には無害な菌株のみを用いた。

[結果]

1) phAb3-15 変異ライブラリーに対するパニング選択

phAb3-15 変異ライブラリーのサイズは 1.85×10^8 c.f.u./ μ g vector であった。パニング選択は N2a/22L 細胞抽出物を抗原として 4 回おこなったが、N2a/22L 細胞抽出物抗原、リコンビナント MoPrP23-231 抗原のいずれに対しても ELISA における反応性の上昇は見られなかった (図 1)。

2) phAb4-12 変異ライブラリーに対するパニング選択

phAb4-12 変異ライブラリーのサイズは 2.08×10^8 c.f.u./ μ g vector であった。パニング選択を N2a/22L

細胞抽出物を抗原として 3 回おこなった結果、ELISA において N2a/22L 細胞抽出物に対して反応は見られず、MoPrP23-231 への反応の上昇が見られた (図 1)。

2) phAb4-12 モノクローン化ファージ発現抗体の scFv DNA の塩基配列と抗原との反応

phAb4-12 変異ライブラリーから抗原との反応性の高い 21 クロンの DNA の塩基配列を決定したところ 5 種類の配列が得られた (図 2)。これらのクロンのファージ力価をそろえて再度 ELISA において MoPrP23-231 への反応性を調べた結果、いずれのクローンも元の phAb4-12 ファージ発現抗体よりも抗原との反応性は高かった (図 3)。

[考察]

今回得られた phAb4-12 変異ライブラリー由来の 5 種類の抗体はいずれもリコンビナント MoPrP23-231 を元の phAb4-12 ファージ発現抗体よりも高感度で検出した。パニング選択に用いた抗原は PrPsc を高発現している N2a/22L 細胞抽出物であり、本来 PrPsc に対して反応するファージ抗体が得られるはずである。ところが、リコンビナント MoPrP23-231 に対して高い反応性を示すクローンが得られた。今後、免疫沈降反応等の ELISA とは異なる手法で特異性の検討をおこなう必要があると考えている。また、4 回目のパニング選択から、競合的パニングに準じた方法で、PrPsc 特異抗体を得ることを目的として、リコンビナント MoPrP23-231 と結合する抗体を除いた後の変異ライブラリーに対して N2a/22L 細胞抽出物を抗原としたパニング選択をおこなっている。

一方、phAb3-15 変異ライブラリーに関しては、現在 N2a/22L 細胞抽出物を抗原として 6 回までパニング選択をおこなったところ、phAb4-12 変異ライブラリーと同じく、わずかにリコンビナント MoPrP23-231 に反応がみられた。現在パニング選択を継続している。phAb3-15 変異ライブラリーからも、今後 PrP 特異的抗体が得られることが期待される。

[参考文献]

- 1) Matsushita K., Horiuchi H., Furusawa S., Horiuchi M., Shinagawa M. and Matsuda H.: Chicken monoclonal antibodies against synthetic bovine prion protein peptide. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 777-779, 1998
- 2) Matsuda H., Mitsuda H. Nakamura N., Furusawa S. Mohri S. and Kitanito T.: A chicken monoclonal antibody with specificity for the N-terminal of human prion protein. *FEMS Immunol. And Med. Microbiol.* 23: 184-194, 1999
- 3) Daugherty P. S., Chen G., Iverson B. L. and Georgiou G.: Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 2029-2034, 2000

[研究発表]

1. 論文発表

- 1) Kikuchi Y., Kakeya T., Yamazaki T., Takekida K., Nakamura N., Matsuda H., Takatori K., Tanimura A., Tanamoto K. and Sawada J.: G₁-dependent prion protein expression in human glioblastoma cell line T98G. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 728-733, 2002

2. 学会発表

- 1) 川嶋剛、中村尚登、丸山智裕、堀内浩幸、古澤修一、松田治男 遺伝子工学的手法を用いたプリオンタンパク質新規有用抗体の作製 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜市) 2002 年 12 月

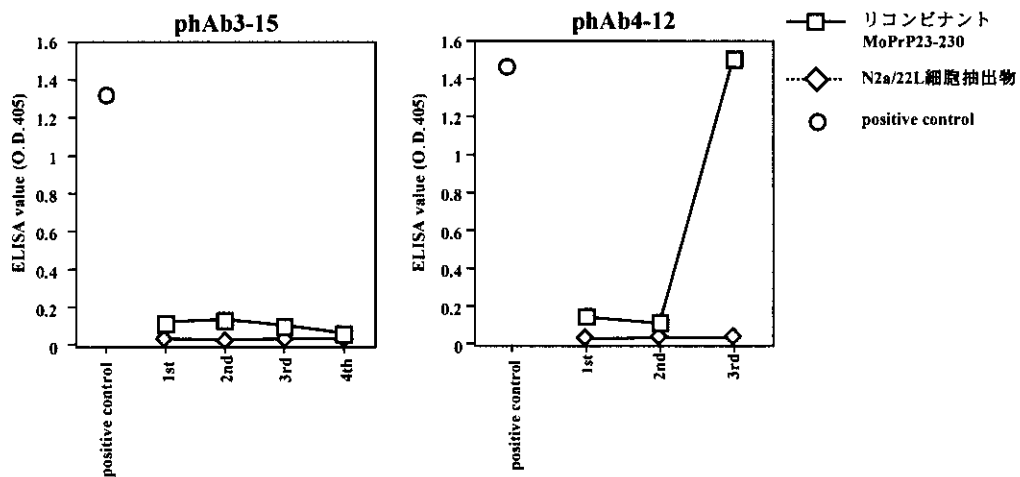


図1. phAb3-15変異ライブラリーのパニング選択

各パニング選択の後、リコンビナント MoPrP23-231、N2a/22L細胞抽出物に対する変異ライブラリーのELISAにおける反応性。□：リコンビナント MoPrP23-231、◇：N2a/22L細胞抽出物、○：positive control。

	(T54T)	S124P	N153D	E156G	R196S	S202P	V227A	V249D
4-12	(AC)↓	CG	AC	G A	AG	CA	G C	G C
1 A11	(AC)↓	-	-	-	-	-	-	G C
1 D04	-	-	-	-	-	-	G C	-
1 F09	-	-	-	-	AG	-	-	-
1 C09	-	-	AC	G A	-	CA	-	-
1 C06	-	CG	-	-	-	-	-	-

silent; 1 T→C; 3 A→G; 2 G→T

図2. 各クローンにおける変異部位のDNA塩基配列とそこから予想されるアミノ酸配列。

右端の文字数字はクローン番号を示す。4-12は positive control。袋文字はサイレント変異、もしくは transition を、影付きの太字は transversion を示す。

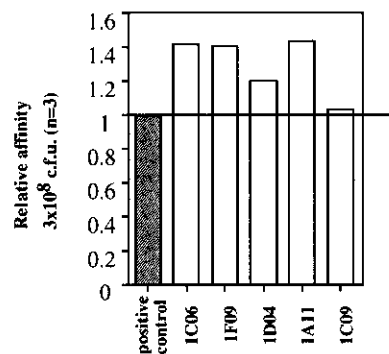


図3. phAb4-12変異scFvファージ抗体の抗原との反応性検討。

抗 PrP 抗体を用いた PrP^{Sc} 検出法の高度化

班 員：堀内 基広（帯広畜産大学・原虫病研究センター、獣医公衆衛生学）
研究協力者：工藤 聡子（帯広畜産大学・獣医公衆衛生）
研究協力者：品川 森一（動物衛生研究所・プリオン病研究センター）
研究協力者：梅谷 淳（富士レビオ(株)・帯広研究所）

【研究要旨】

現在食肉検査に導入されている BSE スクリーニング法よりも、感度・精度が高い PrP^{Sc} 検査法の開発は、より精度・感度の高いプリオン感染動物スクリーニングを実現する上で重要である。我々これまでに確立してきた PrP^{Sc} 検出用 captured-ELISA に更に改良を加え、抗原抗体反応の所要時間を短縮化した OFR-ELISA を開発した。今回、OFR-ELISA 検出系に高感度化が期待できる化学発光法および時間分解蛍光法(TRF)を導入して、さらなる高感度化が可能か否かについて検討した。西洋わさびペルオキシダーゼの発光基質として Supersignal pico および femto、アルカリフォスファターゼの発光基質として CDP/SP、CDP/EM、CSPD/SP および CSPD/EM を用いた。また、TRF にはヨーロッパウム標識抗体を用いて、発色基質 TMB を使用する OFR-ELISA との検出感度の比較を行った。非感染牛脳から調整した試料に組換え牛 PrP(rBoPrP)を添加した擬似試料を用いて rBoPrP の検出感度を調べた結果、TMB を使用する OFR-ELISA では 230pg/well、CSPD/EM で 30pg/well、Supersignal femto で 20pg/well、TRF で 10pg/well であった。以上の結果から抗原抗体複合物の検出系の変更により 10 倍以上の高感度化が達成できることが明らかとなった。

Improvement in sensitivity of PrP^{Sc} detection method using anti-PrP antibody

Motohiro HORIUCHI^{1,2}, Akiko KUDO¹, Morikazu SHINAGAWA³, and Atsushi UMETANI⁴

¹Institute for Protozoan diseases, ²Laboratory of Veterinary Public Health, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, ³Research Center for Prion Diseases, National Institute of Animal Health, ⁴Obihiro Research Laboratory, Fuji-Rebio Inc.

ABSTRACT

Development of more sensitive and reliable PrP^{Sc} detection system than that has been introduced to the inspection at the meat hygiene center, is important to achieve more sensitive and reliable screening of prion-infected livestock. We have recently improved our captured-ELISA system in terms of the reduction of time required for the immuno-reaction and established OFR-ELISA. In this study, we attempt to substitute a colorimetric substrate TMB in OFR-ELISA for light-emission substrates in order to improve the sensitivity. We used Supersignal pico and femto as substrates for peroxidase, and CDP/EM, CDP/SP, CSPD/EM, and CSPD/SP as substrates for alkaline phosphatase. We also attempted a time resolved fluorescence assay (TRF) by using Europium conjugated anti-PrP monoclonal antibody. A detection limit of each substrate was assessed by recombinant bovine PrP (rBoPrP) that was diluted with samples prepared from the medulla of normal cattle. The detection limits of the assay systems using TMB, CSPD/EM, Supersignal femto, and TRF are 230, 30, 20, and 10 pg/well, respectively. This result suggests that the replacement of colorimetric substrate to light-emission substrate can accomplish over 10-fold increase in the sensitivity of OFR-ELISA.

【はじめに】

我が国では、2001年10月18日から食用に供される牛のBSEスクリーニングが開始された。現在、**captured-ELISA**を用いるBio-Rad社の**PLATELIA BSE DETECTION KIT**により一次検査が行われている。本キットは1999年の欧州委員会によるBSE検査キットの評価では、エントリーした4キット中最高の感度を有することが報告されている(1, 2)。しかし、感度および操作性に優れたキットの開発は、BSEスクリーニングの高精度化および簡便化に必要な研究課題である。また、既存キットと同等の性能を有するキットであっても、1)競合による低価格化から検査の低コスト化が期待できること、2)今後世界市場でBSE検査キットの需要が増大すると予想されること、の観点から市場に供給していく意義は大きいと考えられる。我々は独自に開発してきた試料調製法を用いてELISAによるPrP^{Sc}の検出法の開発を行ってきた(3)。最近、操作性、感度および精度ともに**PLATELIA BSE DETECTION KIT**と同等もしくはそれ以上の**OFR-ELISA**を確立した。

【目的】

PrP^{Sc}検出法の高感度化は、BSE検査キットの高感度化にとどまらず、輸血用血液、血液製剤、医薬品原料などのプリオン汚染の摘発法の開発にとっても重要な課題である。これまでに、PrP^{Sc}検出法にも、化学発光法、時間分解蛍光測定法、蛍光相関測定法など高感度化が期待できる検出系の導入が試みられている(4, 5, 6, 7)。食用牛を対象としたBSE検査では、迅速性も重要な要素である。そこで本研究では食用牛のBSE検査を対象として開発した**OFR-ELISA**の検出系に、高感度化が期待できる発光・蛍光測定法を導入することで、操作性を損なうことなく高感度化が可能となるか否かを試みた。

【材料と方法】

正常牛の延髄から**OFR-ELISA**の試料調製法に従って試料を調製した。具体的には、**TN buffer** (50 mM Tris-HCl, pH 7.0)で20%乳剤を作製し、250 ulの20%乳剤に当量の**Detergent buffer**(4% Zwittergent 3-12, 1% Sarkosyl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.0)を加え、コラゲナーゼで37°C、30分処理した。続いて20 ug/mlの**Proteinase K**(PK)で37°C、30分消化した。PK阻害剤を加えた後、250 ulの2-ブタノールを加えて、15,000rpm、10分、20°Cで遠心した。沈殿を8M尿素で変性させ、そこに一定量の精製rBoPrPを添加した試料をELISAに用いた。

OFR-ELISAでは**capture**用抗体による抗原の捕捉と、標識抗PrP抗体によるPrPの検出を1段階で行なうので、HRP標識mAb72、AP標識mAb72、およびEu標識mAb72を作製した。抗体のEu標識はWallac社のEu labeling kitを用いた。

化学発光基質としてPierce社の**Supersignal pico**および**femto**(以上HRPの発光基質)、Tropix社の**CDP/EM**、**CDP/SA**、**CSPD/EM**、および**CSPD/SA**(以上APの発光基質)を使用した。発光およびTRFによるEuの蛍光はARVO-1420(Wallac社)を用いて測定した。

（倫理面への配慮）

牛の脳は特定部位として焼却処分されることとなっているが、今回用いた牛延髄は、北海道に特定部位使用申請書を提出して、研究目的での使用を許可されている。

【結果】

HRPの発光基質である**Supersignal pico**および**femto**間での比較では後者でより強いシグナルが得られ、APの発光基質の中では**CSPD/EM**で最も強いシグナルが得られたことから(図1)、以降の比較解析には**Supersignal femto**および**CSPD/EM**を使用した。**Supersignal femto**、**CSPD/EM**、およびEu標識抗体を用いるTRFのrBoPrP検出感度を、発色基質TMBを用いた**OFR-ELISA**と比較した(図2)。その結果、TMBを使用した場合は約230pg/well、**CSPD/EM**を使用した場合は約30pg/well、**Supersignal femto**を使用した場合は20pg/well、TRFを用いた場合は10pg/wellであった。**OFR-ELISA**の発色基質を発光

基質あるいは蛍光基質に置換することにより、数倍から十数倍感度が上昇することが判明した。

【考察】

BSE 感染牛の材料が希少であることから、今回は BSE 感染牛脳を使用した比較実験の実施には至っていない。しかし、検査対象となる牛延髄から作製した試料に rBoPrP を加えることで、BSE 感染牛脳から調製した検体に限りなく相同の疑似試料で比較解析を行なっている。従って、BSE 感染牛から試料を調製した場合でも、今回確認された感度の向上が得られる可能性が高い。英国の BSE 牛の延髄を用いて OFR-ELISA と PLATELIA BSE DETECTION KIT の感度比較を行なったところ、牛の個体により PrP^{Sc} の蓄積量に違いがあるため多少のばらつきはあるが、双方ともに 256 倍に希釈した試料から PrP^{Sc} の検出が可能であるという成績を得ている。我々が行なった試験における PLATELIA の感度は欧州委員会の報告と一致する。今回の結果では Eu 標識抗体を導入すると検出感度が 20 倍程度上昇することから、計算上は発光・蛍光法を導入することで 5120 倍希釈($10^{-3.7}$)まで検出可能となる。未変性(N)と変性試料(D)を TRF で測定して D/N 比を計測することで高感度化を図っている Conformation dependent immunoassay (CDI 法)では BSE 感染牛脳からの PrP^{Sc} 検出感度が $10^{-3.7}$ と報告されている(8)。文献上での比較では、CDI 法は最も感度の高い PrP^{Sc} 検出法の一つである。我々の結果は、Eu 標識抗体を用いる TRF の導入により OFR-ELISA の感度は CDI 法とほぼ同等まで上昇することを示しており、その実用化に向けた研究推進が今後の重要な課題となる。今後、TRF の反応条件を最適化した後に、BSE 感染牛脳を用いて比較試験を行なう予定である。

【結論】

HRP の発色基質 TMB を用いる OFR-ELISA の検出系に、時間分解蛍光測定法(TRF)を導入したところ、PrP の検出感度が 20 倍程度上昇することが確認できた。今後、反応条件の最適化を行い BSE 感染牛脳を用いた感度の比較解析が必要である。

【参考文献】

- 1) European Commission (1999) The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. <http://europa.eu.int/comm/index.html>
- 2) Deslys J.P., Comoy E., Hawkins S., Simon S., Schimmel H., Wells G., Grassi J., and Moynagh J.: Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature*. 409:476-478, 2001.
- 3) Grathwohl K.-W., Horiuchi M., Ishiguro N., and Shinagaw, M.: ELISA as a sensitive method for the detection of PrP^{Sc} in tissues of scrapie-affected mice. *J. Virol. Method.* 64: 205-216, 1997
- 4) Biffiger K., Zwald D., Kaufmann L., Briner A., Nayki I., Purro M., Bottcher S., Struckmeyer T., Schaller O., Meyer R., Fatzer R., Zurbriggen A., Stack M., Moser M., Oesch B., and Kubler E.: Validation of a luminescence immunoassay for the detection of PrP(Sc) in brain homogenate. *J. Virol. Methods.* 101: 79-84, 2002
- 5) Safar J., Wille H., Itri V., Groth D., Serban H., Torchia M., Cohen F. E., and Prusiner S. B.: Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat. Med.* 4:1157-1165, 1997
- 6) Barnard G., Helmick B., Madden S., Gilbourne C., and Patel R.: The measurement of prion protein in bovine brain tissue using differential extraction and DELFIA as a diagnostic test for BSE. *Luminescence.* 15: 357-362, 2000
- 7) Bieschke J., Giese A., Schulz-Schaeffer W., Zerr I., Poser S., Eigen M., and Kretzschmar H.: Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:5468-5473, 2000.
- 8) Safar J. G., Scott M., Monaghan J., Deering C., Didorenko S., Vergara J., Ball H., Legname G., Leclerc E., Solfrosi L., Serban H., Groth D., Burton D. R., Prusiner S. B., and Williamson R. A. Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice.

【研究発表】

1.論文発表

- 1) Horiuchi M., Nemoto T., Ishiguro N., Furuoka H., Mohri S. and Shinagawa M.: Biological and biochemical characterization of sheep scrapie in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 3421-3426, 2002
- 2) 堀内 基広 プリオンの検出技術 *臨床検査* 46: 1545-1551, 2002

2.学会発表

- 1) 堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一、古岡 秀文、北村 延夫：経口ルートによるプリオンの感染成立には消化管リンパ装置の存在が必要である 第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002 年 10 月
- 2) 工藤 聡子、堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一、横山 隆、梅谷 淳、松井 利生、柳谷 孝幸：免疫生化学的 BSE 診断技術の感度・操作性の改良 第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002 年 10 月
- 3) 田村 勇耕、堀内基広、古岡 秀文、石黒直隆、品川森一：尿崩症を誘発するマウス馴化スクレイパー株の分離 第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002 年 10 月