

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

異常型プリオン蛋白質汚染のインビトロ高感度検出法の開発

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山崎 壮

平成15年(2003年)4月

目次

I. 総括研究報告書	
異常型プリオン蛋白質汚染のインビトロ高感度検出法の開発 山崎 壮	1
II. 分担研究報告書	
1. 異常型プリオン蛋白質に高感受性培養細胞の開発に関する研究 山崎 壮	5
2. プリオン蛋白質の細胞内動態に関する研究 －免疫アッセイの標準品として用いる Proteinase K 処理 抵抗性プリオン蛋白質の調製－ 菊池 裕	8
3. 異常型プリオン蛋白質結合性分子プローブの開発に関する研究 －プリオン蛋白質結合性ペプチドリガンドの探索－ 堀内 基広	11
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	18

異常型プリオン蛋白質汚染のインビトロ高感度検出法の開発

主任研究者 山崎 壮 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 第二室長

研究要旨

プリオン病病原体であるプリオン（PrP^{Sc}）の検出法としては、バイオアッセイ法と免疫アッセイ法があるが、それぞれ一長一短がある。しかし、迅速性、簡便性、高感度の 3 条件がそろった PrP^{Sc} 検出法はなく、その開発が求められている。そこで、本研究では、インビトロ検出法の特徴である迅速性と簡便性を持ちながら現在の免疫アッセイ法よりも高感度な検出法をめざして、培養細胞を用いたバイオアッセイ法および PrP^{Sc} に特異的に反応する分子プローブを用いたインビトロ検出法の開発を行う。

本年度は、1) PrP^{Sc} に対して高感受性の培養細胞株を開発するために、ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を基にしてウシ正常プリオン蛋白質（BoPrP^C）を発現するトランスフェクタント細胞株を作製した。2) プリオン蛋白質（PrP）の免疫アッセイに用いる標準品の確保を目的とし、ヒト・グリオブラストーマ細胞株 T98G が産生する蛋白質分解酵素 proteinase K（PK）処理抵抗性プリオン蛋白質（PrP^{Res}）の性質を調べた。また、その産生量を増加させる目的で、各種培養条件の検討を行った。その結果、T98G 細胞サブライン T98G104 細胞は PrP^{Res} を効率的に産生し、免疫アッセイの標準品に適用可能なことが示唆された。3) PrP 分子に対するペプチドリガンドを探索するために、M13 ファージ膜蛋白質の N 末端に 12-mer のランダムペプチドを発現するライブラリー（Ph.D.12）とジスルフィド結合をとる 7-mer のランダムペプチドを発現するライブラリー（Ph.D.C7C）から、PrP 分子と結合するペプチドリガンドを探索した。12-mer のペプチド LPP1（ACFPWWESCLEH）は PrP^C または変性した PrP を認識し、7-mer の環状ペプチド CPP1（KPHPYTL）は PrP^{Sc} のコンフォメーションエピトープを認識している可能性が示唆された。

分担研究者

菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所 衛生
微生物部 主任研究官
堀内 基広 帯広畜産大学 原虫病研究セン
ター 助教授

A. 研究目的

現在、様々なウシ由来またはヒト由来の医薬品、化粧品、医療品、およびウシ由来の食品が利用されている。そのため、それらのプリオン汚染の迅速で高感度な検出法の確立が急務である。プリオン病病原体であるプリオン（異常型プリオン蛋白質、PrP^{Sc}）の検出法としては、バイオアッセイ法と免疫アッセイ法がある。バイオアッセイ法は高感度で信頼性のある方法であるが、迅速性と簡便性に欠ける。一方、免疫アッセイ法は迅速で簡便であるが検出感度が劣る。それぞれ異なった長所と短所があり、現在目的に応じて使い分けている。しかし、迅速性、簡便性、高感度の 3 条件がそろった PrP^{Sc} 検出法はなく、その開発が求められている。そこで、本研究では、インビトロ検出法の特徴である迅速性と簡便性を持ちながら現在の免疫アッセイ法よりも高感度な検出法をめざして、新たな原理による PrP^{Sc} 汚染のインビ

トロ検出法の開発を行う。そのために、培養細胞を用いたバイオアッセイ法および PrP^{Sc} に特異的に反応する分子プローブを用いたインビトロ検出法の開発を行う。バイオアッセイ法は、正常型プリオン蛋白質（PrP^C）を発現している培養細胞を用い、外来性のプリオン蛋白質（PrP）やプリオン蛋白質ペプチドの細胞表面への結合やそれらが誘起する細胞内での反応を解析することによって、感染初期に判定可能な PrP^{Sc} の検出法の開発を行う。また、これまで培養細胞での感染実験系がないヒトプリオン、ウシプリオンに適用できる高感受性の培養細胞株の開発もめざす。インビトロ検出法は、PrP^{Sc} に特異的に結合するモノクローナル抗体、蛋白質およびペプチド等のリガンドを分子プローブとして、PrP^{Sc} を無細胞系で簡便に検出する方法の開発を行う。

B. 研究方法

1. 異常型プリオン蛋白質に高感受性培養細胞の開発に関する研究

ウシ正常プリオン蛋白質（BoPrP^C）発現トランスフェクタントを作製するために、昨年度、ほ乳類動物発現用ベクターである pcDNA3.1 ベクターと pDEST12.2 ベクターにウシ PrP コー

ド領域 cDNA (BoPrP cDNA) を挿入して作製したプラスミドを、ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b に導入し、2 種類のトランスフェクタントを作製した。今年度は、それらを、96 穴プレートを用いた限界希釈法によるクローニングを行った。増殖したクローンについて、免疫ブロット法で BoPrP の発現を確認した。

2. プリオン蛋白質の細胞内動態に関する研究

PrP^{Sc} の高感度検出法の開発を目的とし、ヒト・グリオブラストーマ細胞株 T98G が産生する蛋白質分解酵素 proteinase K (PK) 処理抵抗性プリオン蛋白質 (PrP^{Res}) を調製し、その性質を調べた。また、その産生量を増加させる目的で、各種培養条件の検討を行った。

3. 異常型プリオン蛋白質結合性分子プローブの開発に関する研究

PrP 分子に対するペプチドリガンドを探索するために、M13 ファージ膜蛋白質の N 末端に 12-mer のランダムペプチドを発現するライブラリー (Ph.D.12) とジスルフィド結合をとる 7-mer のランダムペプチドを発現するライブラリー (Ph.D.C7C) から、PrP 分子と結合するペプチドリガンドを探索した。スクレイピー帯広株感染マウス脳から精製した PrP^{Sc} を抗原として選抜したファージからペプチドライブラリーをコードする領域の塩基配列を決定した。ペプチドと PrP の反応は、ペプチドを発現する M13 ファージを用いた ELISA により行なった。(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム解析に関する倫理指針を遵守して研究を行った。本研究計画で用いるヒト由来の試料に関する研究は、一般的な研究用試料等として分譲されている細胞、DNA 等の匿名化された試料又は遺伝情報を用いて行った。また、本研究の動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験倫理委員会および帯広畜産大学の動物委員会が定めた動物実験倫理規定に従って実施した。

C. 研究結果

1. 異常型プリオン蛋白質に高感受性培養細胞の開発に関する研究

ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を基にして、2 種類の発現ベクターを用いて、ウシ PrP^C を発現する 2 群のトランスフェクタント株を作製した。免疫ブロット法で約 35 kDa 付近に BoPrP のバンドの発現を確認した。次年度は、トランスフェクタントに対する外来性のプリオン蛋白質やプリオン蛋白質ペプチドの作用を解析する予定である。

2. プリオン蛋白質の細胞内動態に関する研究

マウス・抗ヒト PrP モノクローナル抗体 6H4 を用いた免疫ブロット法で、T98G 細胞を短期

間の継代後に播種して調製した全細胞溶解液 (WCL) は、PK 処理 (10 µg/ml、10 分間、37°C) で PrP に相当するバンドを示さなかった。一方、長期間の継代後に播種して調製した WCL では、PK 処理抵抗性の PrP^{Res} に相当する 31 kDa のバンドを示した。T98G 細胞が産生する PrP^{Res} は MV2 型に分類されたが、各種 PrP^{Res} の分類に広く用いられているヒト PrP の 109-112 残基を認識するマウス・モノクローナル抗体 3F4 には反応性を示さなかった。

長期間培養した T98G 細胞 subline の 104 株は高濃度の PK 処理耐性 (250 µg/ml、60 分間、37°C) を示した。液体窒素中に保存している T98G104 細胞を解凍後、短期間培養した細胞も PrP^{Res} を産生した。また、T98G104 細胞を 44°C で 30 分間の熱ショック処理後、37°C に戻して培養を続けると PrP^{Res} の産生量が増加することを見いだした。以上の結果から、T98G104 細胞は PrP^{Res} を効率的に産生し、免疫アッセイの標準品に適用可能なことが示唆された。

3. 異常型プリオン蛋白質結合性分子プローブの開発に関する研究

Ph.D.12 から得られたペプチド ACFPWVES CLEH (LPP1) は精製 PrP^{Sc} 画分と反応したが、PrP^{Sc} を proteinase K (PK) で処理するとその反応は消失した。しかし、PK 処理した PrP^{Sc} をグアニジン塩酸塩で変性させると再び反応した。LPP1 の反応性はアミノ酸配列特異的であった。また、LPP1 は組み換え PrP (rMoPrP) とも反応したため、様々な欠失変異 rMoPrP を用いてエピトープ解析を行ったところ、このペプチドはマウス PrP コドン 155-214 内に存在するドメインに結合することが示された。Ph.D.C7C ライブラリーから得られた環状ペプチド KPHPYTL (CPP1) は精製 PrP^{Sc} 画分と反応し、その反応は PrP^{Sc} を PK で処理しても消失しなかった。しかし、PrP^{Sc} を 6M グアニジン塩酸塩で変性させることにより反応は消失した。また、CPP1 の反応性はアミノ酸配列とジスルフィド結合による構造に特異的であることが示された。以上の結果から、LPP1 は PrP^C または変性した PrP を認識し、CPP1 は PrP^{Sc} のコンフォメーションエピトープを認識している可能性が示唆された。

D. 考察

これまでのプリオン感染研究でも培養細胞は利用されてきたが、ごく限られた細胞株しかプリオン感染せず、多くの培養細胞株はプリオン感染に抵抗性であることが知られている。しかし、ブルシナーら (2000 年) が、特定のマウス継代プリオン株に対してのみではあるが、プリ

オン感染に高感受性の培養細胞サブクローンを樹立した。細胞内に PrP^{Sc} が蓄積することを確認することで PrP^{Sc} のインビトロバイオアッセイができる可能性を示した。そこで本研究では、これまで培養細胞での感染実験系がないウシプリオンに適用できる高感受性の培養細胞株の開発をめざすことにし、ウシ PrP^C を発現するウシトランスフェクタント細胞株を樹立した。次年度はこの細胞株の性質を解析する。

現在、国内の屠畜場ではウシ延髄の門を検体とし、BSEの全頭スクリーニングを行っている。測定にはELISAを用いているが、現在は試料前処理法のPK処理を判定する有益な標準品がない。これまでにT98G細胞がPK処理抵抗性PrP^{Pres}を産生することを見出していたので、今年度はT98G細胞がPrP^{Pres}を産生する条件の検討、特異性の解析を行った。

300症例の散発型CJDの解析から、PrP遺伝子コドン129の多型性 (M/V) による分類とPK処理後に糖鎖を切断したPrP^{Pres}の分子量 (21 kDa 及び19 kDa) によって6種類に分類されている。T98G細胞の産生するPrP^{Pres}はMV2型に分類した。しかし、PK処理後に糖鎖を切断したPrP^{Pres}の分子量が18 kDaを示し、CJDの解析に最もよく用いられる3F4抗体も認識せず、従来の2型とは異なっていた。T98G細胞が産生するPrP^{Pres}のPK切断部位は、2型の切断部位とされている97残基のSer近傍ではなく、3F4のエピトープである109残基の近傍と考えられるが、PK処理によってエピトープである109-112残基近傍の立体構造が変化して認識されない可能性もある。C末端を認識する抗体HPC2はPK未処理のPrPを認識しないが、N端が消化されたPrP^{Pres}に反応性を示した。先にHPC2は糖鎖を切断したPrP^Cを認識することを報告したが、本抗体はPK処理で残存したPrP^{Pres}だけに反応性を示したことから、試料をPK消化後に測定する各種のイムノアッセイ構築に有用と考えられる。

T98G細胞を長期間継代し、播種後に30日以上培養するとPrP^{Pres}を産生することを明らかにしていたが、長期間培養してG1期に誘導するだけではPrP^{Pres}は産生されず、10回以上の継代が必要であった。今回、PrP^{Pres}を安定して産生するT98G104株を確保したこと、44°Cの熱処理でPrP^{Pres}産生量が顕著に増加することを見いだしたことから、イムノアッセイの標準品として用いるPrP^{Pres}の安定供給も可能となった。

抗体に限らず、PrP を特異的に認識する分子、PrP^C と PrP^{Sc} を識別可能な分子は、PrP^C および PrP^{Sc} の生物・生化学性状の解析や、プリオン病新規診断法の開発に重要である。本研究で、PrP 特異的なペプチドリガンドとして、LPP1

および CPP1 の2種を同定した。LPP1 は GdnHCl により解離・変性した PrP^{Sc} や rPrP と反応することから、これまでに得られている多数の抗 PrP 抗体と同様に、PrP^C と PrP^{Sc} を識別することはできないと考えられる。一方、CPP1 は PrP^{Sc} を PK 処理しても反応するが、PrP^{Sc} を変性させることにより反応が低下する。また rPrP とは反応しないことから、PrP^{Sc} 凝集体上の構造エピトープを認識する可能性が示唆される。

FLAG エピトープを結合した LPP1-FLAG による PrP 分子の検出は可能であった。しかし同じ方法論で CPP1-FLAG と PrP^{Sc} の結合の直接検出には成功していない。CPP1-FLAG は CPP1 を発現するファージと PrP^{Sc} の反応を競合阻害することから、CPP1-FLAG は CPP1 と同様に PrP^{Sc} と結合すると考えられる。従って、CPP1-FLAG による PrP^{Sc} の直接検出ができない可能性として、立体障害により FLAG エピトープに抗 FLAG 抗体が結合できないことが挙げられる。今後、CPP1 により PrP^{Sc} を直接検出する試験系を検討する必要がある。また、LPP1 や CPP1 がプリオン病診断法に使用する分子プローブとなる可能性を調べるためには、これらの抗原選択性やアフィニティなどを解析する必要がある。

E. 結論

- 1) ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を基にして BoPrP^C を発現するトランスフェクタント細胞株を作製した。
- 2) T98G 細胞が産生する PrP^{Pres} の産生条件、特異性及び高産生株について研究を行った。また、得られた PrP^{Pres} は高濃度の PK 処理に耐性を示し、イムノアッセイの標準品として利用できる可能性を示した。
- 3) ペプチドファージライブラリーから PrP 分子と結合するペプチド性リガンドを探索した。アミノ酸配列特異的な反応性を示すペプチドと、PrP^{Sc} の高次構造を認識する可能性が示唆されたペプチドを同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kikuchi, Y., Takekida, K., 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) Kaori Takekida, Yutaka Kikuchi, Takeshi

- Yamazaki, Motohiro Horiuchi, Tomoshi
 Takeya, Morikazu Shinagawa, Kosuke
 Takatori, Akio Tanimura, Ken-ichi
 Tanamoto, Jun-ichi Sawada. Quantitative
 Analysis of Prion Protein by
 Immunoblotting. *Journal of Health Science*
 48: 288-291 (2002)
- 3) 武木田薫、菊池裕、山崎壯、掛谷知志、高鳥
 浩介、棚元憲一、澤田純一、谷村顕雄：競合
 的 ELISA による食品試料中のプリオン蛋白
 質検出に関する検討、食品衛生学雑誌 43:
 173-177 (2002)
 - 4) Horiuchi, M., Nemoto, T., Ikeda, T.,
 Muramatsu, Y., Furuoka, H., Matsui, T.,
 Mohri, S. and Shinagawa, M. Biological
 and biochemical properties of sheep scrapie
 agents in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 40(9):
 3421-3426, (2002).
 - 5) Gombojav A., Ishiguro, N., Horiuchi, N.,
 Serjmayadag, D., Byambaa, B., and
 Shinagawa, M. Amino acid polymorphisms
 of PrP gene in Mongolian sheep. *J. Vet.
 Med. Sci.* 65(1): 75-81 (2003).
 - 6) 堀内基広 プリオンの検出技術 臨床検査
 46(12) 1545-1551. (2002)
 - 7) 堀内基広 プリオン蛋白質とプリオン病 栄
 養生理研究会報 46(1): 45-50. (2002)
2. 学会発表
- 1) 菊池裕、掛谷知志、高鳥浩介、中村尚登、松
 田治男、山崎壯、棚元憲一、澤田純一：ヒ
 ト・グリオーマ細胞の蛋白質分解酵素抵抗性
 プリオン蛋白質産生機構の解析 第 75 回日
 本生化学会大会、2002 年 10 月、京都
 - 2) 掛谷知志、菊池裕、高鳥浩介、山崎壯、棚元
 憲一、澤田純一：ヒト・グリオブラストーマ
 細胞株 T98G における熱ショックによるプリ
 オン蛋白質の発現 第 75 回日本生化学会大
 会、2002 年 10 月、京都
 - 3) Yamazaki, T., Kikuchi, Y.: Preparation of
 standard prion protein for immunoassay of
 abnormal isoform of prion protein.
 International Workshop on Current
 Knowledge of TSE, March 25, 2003, Tokyo
 - 4) 狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、
 古岡秀文、木村久美子：モノクローナル抗体
 6H10 の解析：PrP^{Sc} 特異的抗体の可能性 第
 133 回日本獣医学会学術集会（東京）2002 年
 4 月
 - 5) 毛利崇、堀内基広、石黒直隆、品川森一：免
 疫磁性ビーズを用いた PrP^{Sc} 検出法の開発
 第 133 回日本獣医学会学術集会（東京）2002
 年 4 月
 - 6) 金チャンラン、毛利崇、狩野綾子、堀内基広、
 石黒直隆、品川森一：抗 PrP モノクローナ
 ル抗体パネルの作製と抗体による PrP^{Sc} 産生
 阻害 第 133 回日本獣医学会学術集会（東
 京）2002 年 4 月
 - 7) 堀内基広、石黒直隆、品川森一、古岡秀文、
 北村延夫：経口？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
 - 8) 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
 - 9) 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
 レイビー株の分離 第 50 回日本ウイルス学
 会学術集会（札幌）2002 年 10 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
 なし

異常型プリオン蛋白質に高感受性培養細胞株の開発に関する研究

分担研究者 山崎 壮 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 第二室長

研究要旨

本研究では、外来性の異常型プリオン蛋白質に対する感染性、細胞表面への結合性、細胞内に誘起される反応などを指標にして、異常型プリオン蛋白質に対して高感受性の培養細胞株（トランスフェクタント）の開発を行うことをめざす。これまで培養細胞での感染実験系がないウシプリオンに適用できる培養細胞系の開発を目的に、昨年度は、ウシ培養細胞株としてウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を基にしてウシ正常プリオン蛋白質発現トランスフェクタントの作製を行った。今年度は、トランスフェクタントをクローニングして、細胞株を得た。来年度は、トランスフェクタント株に対する外来性のプリオン蛋白質やプリオン蛋白質ペプチドの作用を解析する予定である。

A. 研究目的

プリオン病病原体であるプリオン（異常型プリオン蛋白質、PrP^{Sc}）の検出法としては、バイオアッセイ法と免疫アッセイ法がある。バイオアッセイ法は高感度で信頼性のある方法であるが、迅速性と簡便性に欠ける。一方、免疫アッセイ法は迅速で簡便であるが検出感度が劣る。それぞれ異なった長所と短所があり、現在目的に応じて使い分けられている。しかし、迅速性、簡便性、高感度の 3 条件がそろった PrP^{Sc} 検出法はなく、その開発が求められている。そこで、本研究班では、PrP^{Sc} の迅速、簡便で高感度なインビトロ検出法の開発をめざす。その中で筆者らは、培養細胞を用いたバイオアッセイ法の開発をめざして、外来性の PrP^{Sc} に対する感染性、細胞表面への結合性、細胞内に誘導される反応などを指標にして、ウシ PrP^{Sc} に対して高感受性の培養細胞株（トランスフェクタント）の開発研究を分担する。

昨年度（初年度）は、基とするウシ培養細胞株を選択し、ウシ正常プリオン蛋白質（BoPrP^C）発現トランスフェクタントの作製を行った。今年度は、トランスフェクタントをクローニングして、細胞株を得た。

B. 研究方法

1. ウシ PrP^C 発現トランスフェクタントのクローニング

昨年度に、ウシ PrP コード領域 cDNA（BoPrP cDNA）をほ乳類動物発現用ベクターである pcDNA3.1 ベクターと pDEST12.2 ベクターに挿入して作製したプラスミドを、ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b（JCRB9129、ATCC CRL-2048 由来）に導入し、2 種類のトランスフェクタントを作製した。今年度は、それらを、96 穴プレートを用いた限界希釈法によるクローニングを行った。増殖したクローンに

ついて、免疫ブロット法で BoPrP^C の発現を確認した。

2. 免疫ブロット法

細胞をコンフルエントになるまで培養した後、SDS-PAGE sample buffer で細胞可溶化物（whole cell lysate, WCL）を調製した。陽性対照試料としては、ウシ大脳皮質ホモジネート由来 10,000 × g 沈殿画分（P2 画分）を用いた。試料を SDS-PAGE で分離後 PVDF 膜に転写し、抗 BoPrP モノクローナル抗体 BSPX54 を用いた免疫ブロッティングを行った。アルカリホスファターゼ標識 2 次抗体を用いた発色法で PrP を検出した。

C. 研究結果

1. ウシ PrP^C 発現トランスフェクタントのクローニング

昨年度の RT-PCR の結果から、ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b 細胞株では BoPrP mRNA が発現していると考えられたが、免疫ブロッティング法では BoPrP の発現を確認できなかった。一方、BoPrP cDNA をコードする発現プラスミドをウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b に導入して得られた 2 種類のトランスフェクタントでは、免疫ブロット法で約 35 kDa 付近に新たなバンドが出現し、BoPrP の発現を確認できた。BoPrP のバンドの見かけ上の分子量は、pcDNA3.1 ベクターを用いたトランスフェクタントと pDEST12.2 ベクターを用いたトランスフェクタントで差がなかったが、ウシ脳 P2 画分中の 2 本の糖鎖をもつ BoPrP のバンドの見かけ上の分子量とほぼ等しかった。次に、トランスフェクタントのクローニングを行った。増殖したクローンは BoPrP^C を発現していたが、培養プレートのウェルあたりの発現量には差があったので、発現量の多いクローンを選択した。

D. 考察

本研究では、新たな原理によるインビトロ検出法の開発の試みとして、培養細胞を用いたバイオアッセイ法の開発をめざす。これまでのプリオン感染研究でも培養細胞は利用されてきたが、ごく限られた細胞株しかプリオン感染せず、多くの培養細胞株はプリオン感染に抵抗性であることが知られている。しかし、プルシナーら(2000年)が、特定のマウス継代プリオン株に対してのみではあるが、プリオン感染に高感受性の培養細胞サブクローンを樹立した。細胞内にPrP^{Sc}が蓄積することを検出することでPrP^{Sc}のインビトロバイオアッセイができる可能性を示した。そこで本研究班では、PrP^{Sc}が細胞内に蓄積するのを検出する方法だけではなく、PrP^{Sc}が培養細胞に作用した際に誘起される細胞内反応や関与する分子を解析し、その生化学反応を捕らえてPrP^{Sc}を検出することを試みることにした。正常型プリオン蛋白質(PrP^C)を発現している培養細胞を用い、外来性のプリオン蛋白質やプリオン蛋白質ペプチドの細胞表面への結合やそれらが誘起する細胞内での反応を解析することによって、感染初期に判定可能なPrP^{Sc}の検出できるかもしれないと考える。これまで培養細胞での感染実験系がないウシプリオンに適用できる培養細胞系の開発をめざす。そのために、PrP^{Sc}に対して感受性の培養細胞株としてPrP^Cを高発現するトランスフェクタント細胞株を開発する研究を進めた。

今年度までに、ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を基にしてウシ PrP^C を発現するウシトランスフェクタント株の作製を行った。次年度は、トランスフェクタントに対する外来性のプリオン蛋白質やプリオン蛋白質ペプチドの作用を解析する予定である。

E. 結論

今年度までに、ウシ培養細胞株としてウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を基にしてウシ正常プリオン蛋白質発現トランスフェクタント株の作製を行った。来年度は、トランスフェクタント株に対する外来性のプリオン蛋白質やプリオン蛋白質ペプチドの作用を解析する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 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., Sawada, J.: G1-dependent prion protein expression in human glioblastoma cell line T98G. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 728-733 (2002)
2. Takekida, K., Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Horiuchi, M., Kakeya, T., Shinagawa, M., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J.: Quantitative analysis of prion protein by immunoblotting. *J. Health Sci.* 48, 288-291 (2002)
3. 武木田薫、菊池裕、山崎壯、掛谷知志、高鳥浩介、棚元憲一、澤田純一、谷村顕雄：競合的ELISAによる食品試料中のプリオンタンパク質検出に関する検討。食品衛生学雑誌 43, 173-177 (2002)

2. 学会発表

1. 菊池裕、掛谷知志、高鳥浩介、中村尚登、松田治男、山崎壯、棚元憲一、澤田純一：ヒト・グリオーマ細胞の蛋白質分解酵素抵抗性プリオン蛋白質産生機構の解析 第75回日本生化学会大会、2002年10月、京都
2. 掛谷知志、菊池裕、高鳥浩介、山崎壯、棚元憲一、澤田純一：ヒト・グリオブラストーマ細胞株T98Gにおける熱ショックによるプリオン蛋白質の発現 第75回日本生化学会大会、2002年10月、京都
3. Yamazaki, T., Kikuchi, Y.: Preparation of standard prion protein for immunoassay of abnormal isoform of prion protein. International Workshop on Current Knowledge of TSE, March 25, 2003, Tokyo

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 協力研究者

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 掛谷知志(リサーチ・レジデント)

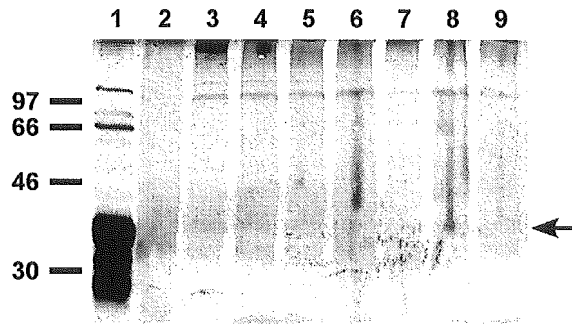


Fig. 1. Immunoblotting of PrP in BCE cells transfected with BoBrP/pcDNA3.1 plasmids. 1:bovine brain, 2:untransfected BCE cells, 3-9:transfected BCE cell clones

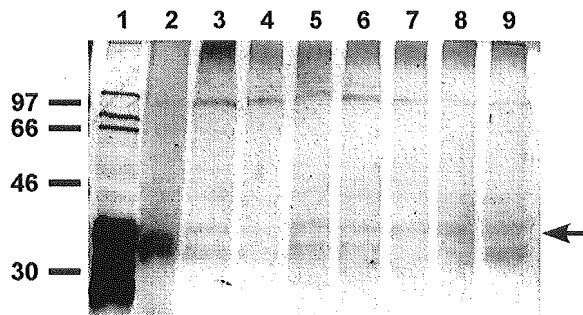


Fig. 2. Immunoblotting of PrP in BCE cells transfected with BoBrP/pDEST12.2 plasmids. 1:bovine brain, 2:untransfected BCE cells, 3-9:transfected BCE cell clones

異常型プリオン蛋白質汚染のインビトロ高感度検出法の開発
-イムノアッセイの標準品として用いるProteinase K処理抵抗性プリオン蛋白質の調製-

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 菊池裕

研究要旨

プリオン蛋白質(PrP)のイムノアッセイに用いる標準品の確保を目的とし、ヒト・グリオブラストーマ細胞株T98Gが産生する蛋白質分解酵素proteinase K (PK)処理抵抗性プリオン蛋白質(PrP^{res})の性質を調べた。また、その産生量を増加させる目的で、各種培養条件の検討を行った。

マウス・抗ヒトPrPモノクローナル抗体6H4を用いたイムノブロット法で、T98G細胞を短期間の継代後に播種して調製したWCLは、PK処理(10 µg/ml、10分間、37°C)でPrPに相当するバンドを示さなかった。一方、長期間の継代後に播種して調製したWCLでは、PK処理抵抗性のPrP^{res}に相当する31 kDaのバンドを示した。T98G細胞が産生するPrP^{res}はMV2型に分類されたが、各種PrP^{res}の分類に用いられているヒトPrPの109-112残基を認識するマウス・モノクローナル抗体3F4には反応性を示さなかった。

長期間培養したT98G細胞sublineの104株は高濃度のPK処理耐性を示し(250 µg/ml、60分間、37°C)た。液体窒素中に保存しているT98G104細胞を解凍後、短期間培養した細胞もPrP^{res}を産生した。また、T98G104細胞を44°Cで30分間の熱ショック処理後、37°Cに戻して培養を続けるとPrP^{res}の産生量が増加することを見いだした。以上の結果から、T98G104細胞はPrP^{res}を効率的に産生し、イムノアッセイの標準品に適用可能なことが示唆された。

A. 研究目的

食品、医薬品及び医療用具の安全性を確保するため、伝達性海綿状脳症の原因物質である異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の簡便・迅速な検出法の開発が望まれている。

本研究ではProteinase K (PK)処理を含めた試料前処理法に適用可能なイムノアッセイの標準品の確保を目的とし、次の項目について検討した。

1. 蛋白質分解酵素抵抗性プリオン蛋白質(PrP^{res})の調製と特異性の解析
2. PrP^{res}を安定して産生する細胞株の確保と培養条件の検討

B. 研究方法

1. イムノブロット法

ヒト・グリオブラストーマ細胞株T98Gを培養後、全細胞溶解液(whole cell lysate, WCL)を調製し、SDS-PAGEで分離後にPVDF膜へ転写した。各種の抗ヒトPrP抗体を用いたイムノブロッティングを行い、化学発光法でPrPを検出した。

2. 蛋白質分解酵素消化

T98G細胞のWCLを各種濃度のPKを用いて37°Cで消化し、イムノブロット法でPrPの蛋白質分解酵素抵抗性を調べた。

3. 培養条件の検討

T98G細胞及びT98G細胞sublineの104株を各種

の熱ショック条件下で培養後、正常条件下(37°C)で培養を継続後にPrP^{res}の産生量を調べた。

C. 研究結果

1. 蛋白質分解酵素抵抗性プリオン蛋白質の調製

イムノアッセイの標準品として用いるPrP^{res}の調製を目的とし、T98G細胞を用いてPrP^{res}の発現機構を調べた。細胞を13回の継代後に播種して39日後にWCLを調製し、10 µg/mlのPKで消化後(37°C、10分間)にイムノブロット法を行うと、6H4が認識するPK消化に抵抗性な31 kDaのバンドを示した(Fig. 1C)。T98G細胞のPrPコーディングクエンesisは、既報のPrP遺伝子(AY008282)の塩基配列と一致して変異はなかったが、コドン129がMet/Valの多型性を示した。また、PNGase Fで糖鎖を切断したPrP^{res}の分子量は18 kDaを示した。以上の結果から、T98G細胞が産生するPrP^{res}はMV2型と分類した。

次に、イムノブロット法で各種抗PrP抗体が認識するPrP^{res}のエピトープを調べた。PK処理したWCLはN末端(25-29残基)を認識するHUC2-13及び中間部位(109-112残基)を認識する3F4には反応性を示さなかった(Figs. 1A and 1B)。また、C末端(214-230残基)を認識するHPC2は、PK未処理のWCLには反応性を示さないが、PK処理後にPrP^{res}に相当する31 kDaのバンドを認識した(Fig. 1D)。

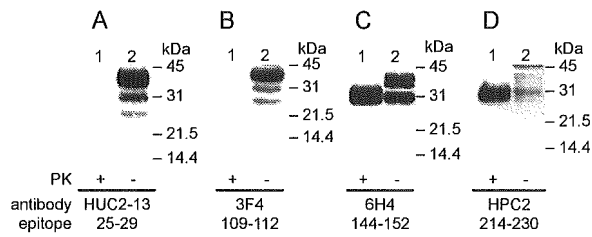


Fig. 1. Immunoblot analysis using anti-PrP antibodies for protease-resistant form of PrP in T98G cells. T98G cells were incubated with 10% FCS-RPMI 1640 for 39 days at passage 13 (P13D39) and whole cell lysates were prepared. Fifty μ g of the lysates were treated with PK (10 μ g/ml) at 37°C for 10 min (lane 1) or left undigested (lane 2). The lysates were boiled for 10 min and subjected to immunoblot with HUC2-13 (A), 3F4 (B), 6H4 (C) or HPC2 (D) antibodies. Epitope recognition sites located within PrP were shown as a residues number.

2. PrP^{res}を安定して産生する細胞株の確保と培養条件の検討

PrP^{res}を安定して産生する細胞の確保を目的とし、長期間の継代後にT98G細胞を培養を行い、PrP^{res}の産生を確認後に細胞を液体窒素中に保存し、解凍後にPrP^{res}の産生を調べた。T98G細胞sublineの104株を3回の継代後に36日間培養すると、250 μ g/mlのPK処理(60分間、37°C)に耐性を示した(Fig. 2A)。また、培養36日間後の細胞を新たに播種すると、4日後の細胞もPrP^{res}を産生した(Fig. 2B)。

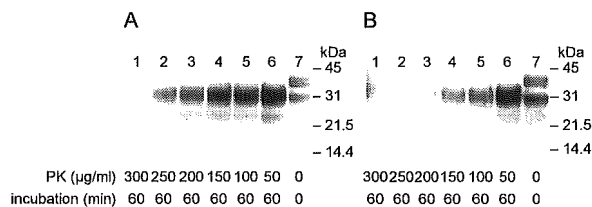


Fig. 2. Characterization of protease-resistant form of PrP in T98G104 cells. **A:** T98G104 cells were incubated with 10% FCS-RPMI 1640 for 36 days at passage 3 (P3D36) and whole cell lysates were prepared. **B:** Parallel cultures (P3D36) were trypsinized and replated at 5.0×10^5 cells per 9-cm dish (55 cm²) in 10 ml medium as a Day 0 (P4D0). After 4 days incubation (P4D4), whole cell lysates were prepared. Fifty μ g of the lysates were treated with PK at different concentrations (300 to 50 μ g/ml) at 37°C for 60 min (lanes 1-6) or left undigested (lane 7). The lysates were boiled for 10 min and subjected to immunoblot with 6H4 antibody.

次に、各種温度条件下でT98G細胞及びT98G104細胞を培養後にWCLを調製し、PrP^{res}の産生量の推移をイムノプロット法で調べた。37°Cで15日間培養した細胞に44°Cで30分間の熱処理を行うと、T98G細胞及びT98G104細胞のPrP^{res}産生量は未処理(Figs. 3A and 3B, lane 1)に比

較して減少した(Figs. 3A and 3B, lane 2)。細胞を37°Cに戻して培養を続けると、6時間後にT98G細胞のPrP^{res}産生量は未処理と同程度まで回復した(Fig. 3A, lane 5)。一方、T98G104細胞のPrP^{res}及びPrP^{res}は3時間後には未処理と同程度の産生量まで回復し、6時間後には顕著に高い産生量を示した(Figs. 3B and 3D)。

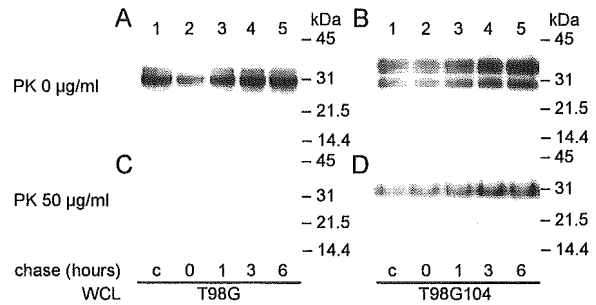


Fig. 3. Protease-resistant form of PrP production in T98G104 cells increased after heat-treatment. T98G (A and C) and T98G104 (B and D) cells were incubated with 10% FCS-RPMI 1640 for 15 days at 37°C and then treated at 44°C for 30 min. The cells were chased at 37°C and the whole cell lysates were prepared. Fifty μ g of the lysates were treated with PK (50 μ g/ml) at 37°C for 30 min (C and D) or left undigested (A and B). The lysates were boiled for 10 min and subjected to immunoblot with 6H4 antibody.

D. 考察

食品、医薬品及び医療用具等のPrP^{Sc}の汚染を防ぐために、高感度なPrP^{res}の検出法を確立する必要がある。現在、国内の屠畜場ではウシ延髄の門を検体とし、BSEの全頭スクリーニングを行っている。測定にはELISAを用いているが、現在は試料前処理法のPK処理を判定する有益な標準品がない。平成12年度にT98G細胞がPK処理抵抗性PrP^{res}を産生することを報告した。今年度はT98G細胞がPrP^{res}を産生する条件の検討、特異性の解析を行った。

T98G細胞を長期間継代し、播種後に30日以上培養するとPrP^{res}を産生した。平成12年度にT98GはG1期に正常プリオン蛋白質(PrP^C)の産生量が増大することを報告したが、長期間培養してG1期に誘導するだけではPrP^{res}は産生されず、10回以上の継代が必要であった。

300症例の散発型CJDの解析から、PrP^{res}遺伝子コドン129の多型性(M/V)による分類とPK処理後に糖鎖を切断したPrP^{res}の分子量(21 kDa及び19 kDa)によって6種類に分類されている。T98G細胞の産生するPrP^{res}はMV2型に分類した。しかし、PK処理後に糖鎖を切断したPrP^{res}の分子量が18 kDaを示し、CJDの解析に最もよく用いられる3F4抗体も認識せず、従来の2型とは異なってい

た。T98G細胞が産生するPr^{Pres}のPK切断部位は、2型の切断部位とされている97残基のSer近傍ではなく、3F4のエピトープである109残基の近傍と考えられるが、PK処理によってエピトープである109-112残基近傍の立体構造が変化して認識されない可能性もある。C末端を認識するHPC2はPK未処理のPrPを認識しないが、N端が消化されたPr^{Pres}に反応性を示した。先にHPC2は糖鎖を切断したPr^{PC}を認識することを報告したが²⁾、本抗体はPK処理で残存したPr^{Pres}だけに反応性を示したことから、試料をPK消化後に測定する各種のイムノアッセイ構築に有用と考えられる。

Pr^{Pres}を安定して産生するT98G104株を確保したこと、44°Cの熱処理でPr^{Pres}産生量が顕著に増加することを見いだしたことから、イムノアッセイの標準品として用いるPr^{Pres}の安定供給も可能となった。

E. 結論

平成14年度は、T98G細胞が産生するPr^{Pres}の産生条件、特異性及び高産生株について研究を行った。また、得られたPr^{Pres}は高濃度のPK処理に耐性を示し、イムノアッセイの標準品として利用できる可能性を示した。今後はT98G104細胞の培養条件の検討を進め、その産生様式や細胞内動態の研究を行う予定である。

F. 参考文献

- 1) Parchi, P., A. Giese, S. Capellari, P. Brown, W. Schulz-Schaeffer, O. Windl, I. Zerr, H. Budka, N. Kopp, P. Piccardo, S. Poser, A. Rojiani, N. Streichemberger, J. Julien, C. Vital, B. Ghetti, P. Gambetti, H. Kretzschmar. *Ann. Neurol.* **46**, 224-233 (1999)
- 2) Kikuchi, Y., Takekida, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 728-733 (2002)

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

1. Kikuchi, Y., Takekida, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 728-733 (2002)
2. Takekida, K., Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Horiuchi, M., Kakeya, T., Shinagawa, M., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K.,

Sawada, J., *J. Health Sci.* **48**, 288-291 (2002)

3. 武木田薫、菊池裕、山崎壮、掛谷知志、高鳥浩介、棚元憲一、澤田純一、谷村顕雄、*食品衛生学雑誌* **43**、173-177 (2002)

2. 学会発表

1. 菊池裕、掛谷知志、高鳥浩介、中村尚登、松田治男、山崎壮、棚元憲一、澤田純一：ヒト・グリオーマ細胞の蛋白質分解酵素抵抗性プリオン蛋白質産生機構の解析 第75回日本生化学会大会、2002年10月、京都
2. 掛谷知志、菊池裕、高鳥浩介、山崎壮、棚元憲一、澤田純一：ヒト・グリオブラストーマ細胞株T98Gにおける熱ショックによるプリオン蛋白質の発現 第75回日本生化学会大会、2002年10月、京都
3. Yamazaki, T., Kikuchi, Y.: Preparation of standard prion protein for immunoassay of abnormal isoform of prion protein. International Workshop on Current Knowledge of TSE, March 25, 2003, Tokyo

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

J. 協力研究者

社団法人日本食品衛生協会非常勤職員 掛谷知志(国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部リサーチ・レジデント)

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

プリオン蛋白質結合性ペプチドリガンドの探索

分担研究者 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 助教授

研究要旨

PrP 分子に対するペプチドリガンドを探索するために、M13 ファージ膜蛋白質の N 末端に 12-mer のランダムペプチドを発現するライブラリー (Ph.D.12) とジスルフィド結合をとる 7-mer のランダムペプチドを発現するライブラリー (Ph.D.C7C) から、PrP 分子と結合するペプチドリガンドを探索した。Ph.D.12 から得られたペプチド ACFPWWESCLEH(LPP1) は精製 PrP^{Sc} 画分と反応したが、PrP^{Sc} を proteinase K (PK) で処理するとその反応は消失した。しかし、PK 処理した PrP^{Sc} をグアニジン塩酸塩で変性させると再び反応した。LPP1 の反応性はアミノ酸配列特異的であった。また、LPP1 は組み換え PrP(rMoPrP) とも反応したため、様々な欠失変異 rMoPrP を用いてエピトープ解析を行ったところ、このペプチドはマウス PrP コドン 155-214 内に存在するドメインに結合することが示された。Ph.D.C7C ライブラリーから得られた環状ペプチド KPHPYTL(CPP1) は精製 PrP^{Sc} 画分と反応し、その反応は PrP^{Sc} を PK で処理しても消失しなかった。しかし、PrP^{Sc} を 6M グアニジン塩酸塩で変性させることにより反応は消失した。また、CPP1 の反応性はアミノ酸配列とジスルフィド結合による構造に特異的であることが示された。以上の結果から、LPP1 は PrP^C または変性した PrP を認識し、CPP1 は PrP^{Sc} のコンフォメーションナルエピトープを認識している可能性が示唆された。

A. 研究目的

異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})がプリオン病の病原体“プリオン”の主要構成要素と考えられている。PrP^{Sc} は宿主遺伝子にコードされる正常型プリオン蛋白質(PrP^C)の構造異性体である。両 PrP は生化学的に区別可能であるが、構造など依然不明な点が多くこのされている。PrP^C と PrP^{Sc} を識別可能な分子プローブは、PrP^C と PrP^{Sc} の生物・生化学性状の相違を調べる上で重要な道具となる。また、PrP^{Sc} と PrP^C を識別可能な分子プローブが応用可能ならば、現在行われているプリオン病の免疫生化学的診断法に代わる、新たな技術

に基づいた診断法の開発が可能となる。1997 年に Korth らは、PrP^{Sc} と反応するが PrP^C とは反応しないモノクローナル抗体 15B3 を報告している。しかし、その後 15B3 を用いた研究の進展は報告されていない。現在まで、抗体や他の生体分子を含め、実用可能な PrP^{Sc} 特異的分子プローブはない。

ペプチドファージライブラリーは、ファージの構造蛋白上にランダムな短鎖ペプチドを発現するペプチドライブラリーである。レセプターに対するリガンドの同定、蛋白質と相互作用するポリペプチドの同定、抗体エピトープの解析などに有用な方法である。

本研究では PrP^C および PrP^{Sc} と結合するペプチドリガンドの探索・同定を目的として、PrP^{Sc} を抗原として、ペプチドファージライブラリーのスクリーニングを行なった。

B. 研究方法

ファージライブラリーとして、ランダムな 12mer(Ph.D.-12)、あるいはジスルフィド結合により環状構造をとる 7mer(Ph.D.-C7C)のペプチドをコート蛋白に発現する M13 ファージペプチドライブラリーを使用した。

スクレイピー帯広株感染マウス脳から分別遠心法により PrP^{Sc} を精製した。精製マウス PrP^{Sc} を 60mm プラスチックシャーレに吸着させ、 1×10^{12} pfu 相当のファージと反応させた。吸着したファージは Glycine-HCl(pH 2.2)にて溶出した。溶出したファージは増幅後に PrP^{Sc} を抗原として再びパニングに用いた。5 回のパニングにより選抜したファージのプラークから PCR によりペプチドライブラリーをコードする領域を増幅し、塩基配列を決定した。

ペプチドと PrP の反応は、ペプチドを発現する M13 ファージを用いた ELISA により行なった。精製 PrP^{Sc} あるいは組換え PrP(rPrP) を 96 ウェルプレートに吸着後、N102 ブロッキング剤(日本油脂)でブロッキングした。 1×10^9 pfu のファージを加え一時間反応後、PBST にてウェルを洗浄した。ファージの検出には HRP 標識抗 M13 抗体(Amersham Pharmacia)を用いた。また、一部の実験では精製 PrP^{Sc} をウェルに吸着後に、Proteinase K 処理、およびグアニジン塩酸塩処理を行なった。

(倫理面への配慮)

動物実験は帯広畜産大学動物実験委員会にて承認された実験指針に従って行なった。感染性を含む試料は帯広畜産大学 BSL2, 3 実験施設にて行なった。

C. 研究結果

それぞれのライブラリーから、パニングにより得られたペプチド配列とその出現頻度を表 1 に示した。その後のスクリーニングの結果から、Ph.D.12 から得られた配列のうち、ACFPWWESCLEH(LPP1)が PrP と反応する

可能性が示されたことから、以下の実験には LPP1 を使用した。また、Ph.D.C7C から得られた配列のうち、出現頻度が高かった KPHPYTL および KPHPYSL も、PrP と反応することがスクリーニングの結果から示唆された。両者の相違は 6 番目のアミノ酸のみで、その違いも Thr/Ser と同種のアミノ酸であることから、以降の実験では KPHPYTL(CPP1)を代表として用いた。

図 1 に LPP1 および CPP1 と PrP^{Sc} との反応性を示した。陽性対象として用いたモノクローナル抗体(mAb)31C6 は、PK 未処理の PrP^{Sc} と反応するが、処理に用いた PK 濃度の上昇とともに反応は消失した(図 1, A と C)。しかし、PK 処理した PrP^{Sc} をグアニジン塩酸塩(GdnHCl)で変性・解離させると、mAb31C6 は再び PrP と反応した(図 1, B と D)。LPP1 は PK 未処理の PrP^{Sc} と僅かに反応し、その反応性は PrP^{Sc} を PK 処理することで消失した。しかし、PK 処理 PrP^{Sc} を GdnHCl で変性させることにより、変性 PrP^{Sc} と反応するようになり、3M 以上の GdnHCl 処理でその反応はプラトーに達した(図 1, A と B)。一方、CPP1 は PK 処理後の PrP^{Sc} と明らかに反応したが、PrP^{Sc} を GdnHCl で解離・変性させることにより、その反応は濃度依存的に低下した(図 1, C と D)。これらの結果は、LPP1 は変性した PrP 分子に反応すること、CPP1 は未変性 PrP^{Sc} に存在する構造エピソードと反応することを示唆している。そこで、以降の実験では LPP1 の反応性を調べる場合には rPrP を使用した。

LPP1 のアミノ酸配列特異性を検討するために、LPP1 および陰性対象として、逆配列を有する LPP1(R-LPP1)を用いて競合試験を行なった。その結果、LPP1 のみが LPP1 を発現するファージと rPrP の反応を阻害したことから(図 2, A)、LPP1 の反応はアミノ酸配列特異的であることが明らかとなった。CPP1 のアミノ酸配列および環状構造特異性を検討するために、CPP1、逆配列を有する CPP1(R-CPP1)、および N 末端の Cys を Ala に置換して環状構造を形成できない L-CPP1 を合成して競合試験を行なった。CPP1 のみが CPP1 を発現するファージと PrP^{Sc} の反応を阻害したことから(図 2, B)、CPP1 のアミノ

酸配列および環状構造特異性が明らかとなった

LPP1 は変性 PrP と反応することから、rPrP と反応することが予想され、実際に図 2 で rPrP と反応することが確認できたので、種々の組換え変異 PrP を用いて、LPP1 が認識するエピトープの同定を試みた(図 3)。LPP1 は aa155-214 を含む rPrP と明瞭に反応することから、LPP1 はこの領域内に存在するエピトープを認識することが明らかとなった。

今回同定したペプチドが PrP のリガンドとして、PrP を直接検出できるか否かを検討するために、LPP1 に FLAG エピトープタグを結合した合成ペプチド LPP1-FLAG を作製して、LPP1 の結合を HRP 標識抗 FLAG にて検出したところ、40nM 以上の濃度で LPP1-FLAG が PrP と反応することが確認された(結果は示さず)。

D. 考察

抗体に限らず、PrP を特異的に認識する分子、PrP^C と PrP^{Sc} を識別可能な分子は、PrP^C および PrP^{Sc} の生物・生化学性状の解析や、プリオン病新規診断法の開発に重要である。本研究で、PrP 特異的なペプチドリガンドとして、LPP1 および CPP1 の 2 種を同定した。LPP1 は GdnHCl により解離・変性した PrP^{Sc} や rPrP と反応することから、これまでに得られている多数の抗 PrP 抗体と同様に、PrP^C と PrP^{Sc} を識別することはできないと考えられる。一方、CPP1 は PrP^{Sc} を PK 処理しても反応するが、PrP^{Sc} を変性させることにより反応が低下する。また rPrP とは反応しないことから、PrP^{Sc} 凝集体上の構造エピトープを認識する可能性が示唆される。

FLAG エピトープを結合した LPP1-FLAG による PrP 分子の検出は可能であった。しかし同じ方法論で CPP1-FLAG と PrP^{Sc} の結合の直接検出には成功していない。CPP1-FLAG は CPP1 を発現するファージと PrP^{Sc} の反応を競合阻害することから、CPP1-FLAG は CPP1 と同様に PrP^{Sc} と結合すると考えられる。従って、CPP1-FLAG による PrP^{Sc} の直接検出ができない可能性として、立体障害により FLAG エピトープに抗 FLAG 抗体が結合できないことが挙げられる。今後、

CPP1 により PrP^{Sc} を直接検出する試験系を検討する必要がある。また、LPP1 や CPP1 がプリオン病診断法に使用する分子プローブとなる可能性を調べるためには、これらの抗原選択性やアフィニティなどを解析する必要がある。

E. 結論

12-mer のランダムペプチドを発現するライブラリー(Ph.D.12)とジスルフィド結合をとる 7-mer のランダムペプチドを発現するライブラリー(Ph.D.C7C)から、PrP 分子と結合するペプチド性リガンドの候補として ACFPWWESCLEH(LPP1)および PKHPYTL(CPP1)を同定した。LPP1 は変性 PrP と反応し、その反応性はアミノ酸配列特異的であった。また、LPP1 はマウス PrP コドン 155-214 内の領域を認識することが判明した。一方、CPP1 は PrP^{Sc} の高次構造を認識する可能性が示唆された。また、CPP1 の反応性はアミノ酸配列とジスルフィド結合による構造に特異的であった。本研究では PrP^{Sc} と PrP^C を識別可能な分子プローブの候補として CPP1 を同定したが、今後 CPP1 の反応性を詳細に調べる必要がある。また、ファージディスプレイが PrP^{Sc} 特異的プローブの同定に有用なツールとなることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

感染性を有するプリオンを使用した実験は、BSL2 および BSL3 実験施設内で行ない、汚染物は 800 度以上の焼却処理、あるいは、135°C30 分のオートクレーブ処理により不活化した。実験室内感染、外部への病原体の拡散などの事故は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Horiuchi, M., Nemoto, T., Ikeda, T., Muramatsu, Y., Furuoka, H., Matsui, T., Mohri, S. and Shinagawa, M. Biological and biochemical properties of sheep scrapie agents in Japan. J. Clin. Microbiol., 40(9): 3421-3426, (2002).

Gombojav A., Ishiguro, N., Horiuchi, N.,
Serjmayadag, D., Byambaa, B., and Shinagawa,
M. Amino acid polymorphisms of PrP gene
in Mongolian sheep. J. Vet. Med. Sci.
65(1): 75-81 (2003).

堀内基広(2002) プリオンの検出技術 臨床
検査 46(12) 1545-1551.

堀内基広(2002) プリオン蛋白質とプリオ
ン病 栄養生理研究会報 46(1): 45-50.

2. 学会発表

狩野 綾子、堀内 基広、石黒 直隆、品川
森一、古岡 秀文、木村 久美子：モノク
ローナル抗体 6H10 の解析：PrP^{Sc} 特異的抗
体の可能性 第 133 回日本獣医学会学術
集会（東京）2002 年 4 月

毛利 崇、堀内 基広、石黒 直隆、品川 森
一：免疫磁性ビーズを用いた PrP^{Sc} 検出法
の開発 第 133 回日本獣医学会学術集会
（東京）2002 年 4 月

金 チャンラン、毛利 崇、狩野 綾子、堀内
基広、石黒 直隆、品川 森一：抗 PrP モノ
クローナル抗体パネルの作製と抗体による
PrP^{Sc} 産生阻害 第 133 回日本獣医学会学術
集会（東京）2002 年 4 月

堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一、古岡
秀文、北村 延夫：経口ル?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

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

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
化スクレイピー株の分離 第 50 回日本ウ
イルス学会学術集会（札幌）2002 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

Table 1. Candidates for PrP binding peptides

Ph.D.-12		Ph.D.-C7C	
Sequence	Number	Sequence	Number
QAPHLNWWSTWL	13	KPHPYTL	11
ACFPWWESCLEH	4	KPHPYSL	11
SHGPLIAHMGRR	1	WLWPQHR	9
Total	18	Total	31

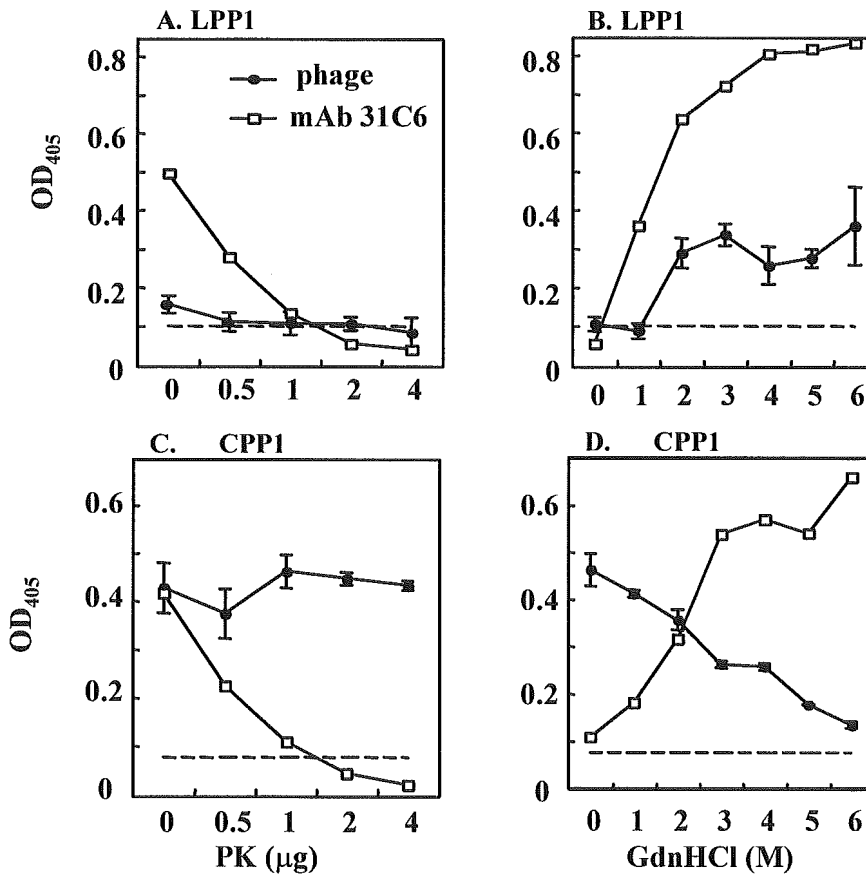


Fig. 1. Reactivity of phages to PrP^{Sc}. (A) and (C) Reactivity to PK-treated PrP^{Sc}. Wells were coated with 200 ng/well of purified PrP^{Sc} fraction, and treated with various amount of PK indicated in the figure. After terminating the PK-activity by Pefabloc, wells were blocked with 0.5% I-blockTM and then incubated with either phage (●) or mAb 31C6 (□). (B) and (D) Reactivity to GdnHCl-treated PrP^{Sc}. Wells coated with purified PrP^{Sc} fraction were first treated with 2 μg PK and then treated with GdnHCl at the indicated concentrations. Reactivities of phage (●) and mAb 31C6 (□) were plotted. The phages used were shown on the top of each graph. Dashed lines indicate cut off value.

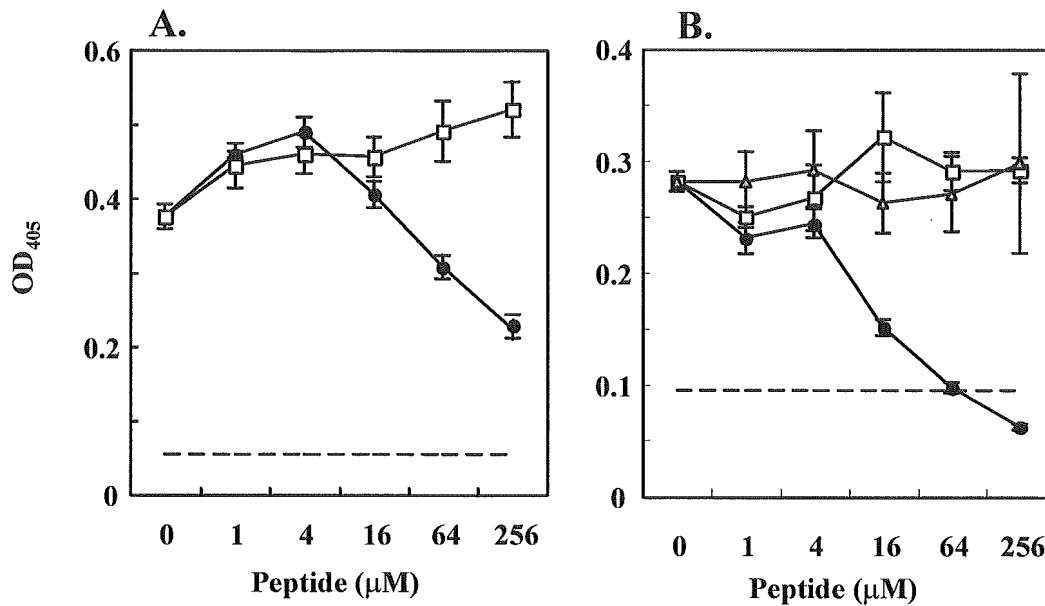


Fig. 2. Amino acid sequence-specific reactivity of phages. (A) Reactivity of phage expressing ACFPWESCLEH (LPP1) to rMoPrP 23-231 in the presence of LPP1 (●) or R-LPP1 (□). (B) Reactivity of phage expressing KPHPYTL (CPP1) to PK-treated PrP^{Sc} in the presence of CPP1 (●), R-CPP1 (□), or L-CPP1 (▲) were shown. Concentrations of peptides indicated at the bottom. Dashed lines indicate cut off value.

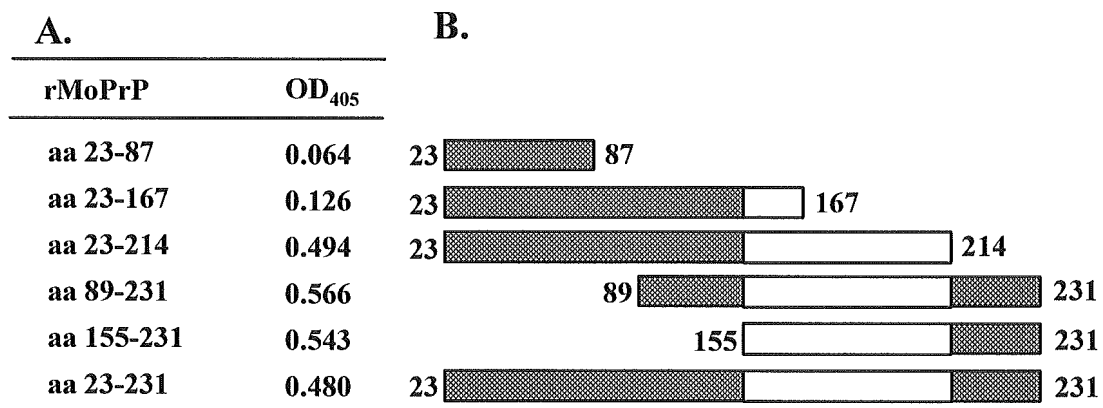


Fig. 3. Epitope analysis of LPP1 by using rMoPrPs. (A) Reactivities to various deletion mutants of rMoPrP in ELISA. Values of OD₄₀₅ were indicated. (B) Schematic representation of rMoPrP deletion mutants. Numbers indicate amino acid positions of N- and C-terminal end of each rMoPrP. Open boxes indicate the region where the epitope for LPP1 locate, while hatched boxes indicate the regions which appear not to be involved in the epitope.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kikuchi, Y., Kakeya, T., Yamazaki, T., Takekida, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K. and Sawada, J.	G ₁ -dependent prion protein expression in human glioblastoma cell line T98G.	Biol. Pharm. Bull.	25	728-733	2002
Kaori Takekida, Yutaka Kikuchi, Takeshi Yamazaki, Motohiro Horiuchi, Tomoshi Kakeya, Morikazu Shinagawa, Kosuke Takatori, Akio Tanimura, Ken-ichi Tanamoto, Jun-ichi Sawada.	Quantitative Analysis of Prion Protein by Immunoblotting	Journal of Health Science	48	288-291	2002
武木田薫、菊池裕、山崎壯、掛谷知志、高鳥浩介、棚元憲一、澤田純一、谷村顕雄	競合的ELISAによる食品試料中のプリオン蛋白質検出に関する検討	食品衛生学雑誌	43	173-177	2002
Horiuchi, M., Nemoto, T., Ikeda, T., Muramatsu, Y., Furuoka, H., Matsui, T., Mohri, S. and Shinagawa, M.	Biological and biochemical properties of sheep scrapie agents in Japan	J. Clin. Microbiol.	40	3421-3426	2002
Gombojav A., Ishiguro, N., Horiuchi, N., Serjmayadag, D., Byambaa, B., and Shinagawa, M.	Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep	J. Vet. Med. Sci.	65	75-81	2003
堀内基広	プリオンの検出技術	臨床検査	46	1545-1551	2002
堀内基広	プリオン蛋白質とプリオン病	栄養生理研究会報	46	45-50	2002

200201400

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
P17「研究成果の刊行物・別冊」をご参照ください