

160 381 21 2 A

厚生労働科学研究費補助金

食品安全確保研究事業

血液中でのプリオンタンパクの存在様式の
解析と血液製剤からのプリオン除去の研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 義昭

平成 16 (2004) 年 3 月

目次

I 総括研究報告書

- 血液中でのプリオンタンパクの存在様式の解析と P1-P4
血液製剤からの除去の研究

主任研究者 岡田 義昭

II 分担研究報告書

1. 血液製剤からのプリオン除去法、及び P5-P12

in vitor 感染系の開発と感染効率の評価

岡田 義昭

2. 組換えヒトSTI1タンパクの発現と P13-P18

ヒトプリオンタンパクとの結合に関する研究

水沢 左衛子

3. 実験動物を用いたプリオンタンパクの P19-P22
存在様式及び動態についての病理学的解析

永田 典代

- III 研究成果の刊行に関する一覧表 P23

- IV 研究成果の刊行物・別冊 P24-P43

厚生科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

総括研究報告書

血液中でのプリオンタンパクの存在様式の解析と血液製剤からの除去の研究

主任研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨 スクレイピ由来プリオン株に感染したマウス由来の脾細胞を解析したところ主に CD11b 陽性細胞に PrP^{Sc} を認め、組織学的にも B 細胞領域の濾胞中心にのみ陽性が認められた。また、in vivo や in vitro での感染実験によって得られた組織や細胞から検出されるウエスタンブロット法による PrP^{Sc} は、分子量や Proteinase K 耐性、バンドのパターンなどが異なることが明らかになった。これらのことから存在様式が異なる可能性が示唆された。また、最近 STI1(stress inducible protein 1)が PrP^c のリガンドであるという報告がなされ、分画製剤などから PrP^{Sc} を除去する方法として PrP^{Sc} と結合する生体分子の候補として STI1 と正常なプリオンタンパクとの結合を検討した。蛍光抗体法によって結合を示唆する結果が得られた。PrP^{Sc} に対しても結合性が保持されるか、今後の重要な課題と考えている。

分担研究者

水沢 左衛子 国立感染症研究所
血液・安全性研究部
主任研究官

永田 典代 国立感染症研究所
感染病理部
研究員

め、血液での検討が少ない。そこで、スクレイピ由来プリオン株を接種したマウスの脾細胞を用いて病理組織学的にどの部分に PrP^{Sc} 陽性の細胞が多く存在するのか、また、リンパ球をサブセット毎に分離・精製してどのサブセットに強いシグナルが検出されるのか検討した。また、昨年度に N2 細胞からクローニングした細胞株を用いて in vitro 感染系の確立も目指した。さらに、国内の BSE 感染牛の脳乳剤が入手（感染病理部より譲渡）できたことから in vitro での感染を試みた。一方、分画製剤などから PrP^{Sc} を除去する方法として PrP^{Sc} と結合する生体分子の検索は重要である。最近 STI1(stress inducible protein 1)が PrP^c のリガンドである、という報告がなされた。PrP^{Sc} が同様に STI1 と結合するかは現在の

A. 研究目的

英国において確認された variant CJD は、臨床上の特徴の他に末梢リンパ組織から PrP^{Sc} が容易に検出されることから輸血や血漿分画製剤を介して感染する危険性が警告された。そのため輸血や分画製剤の安全性を確保するために PrP^{Sc} の混入を防ぐ方策が取られ、問診の他に献血者の制限などが実際に実施されている。これまでプリオン病の研究が主に中枢組織で検討されたた

ところ不明であるが、有力な生体分子として結合の程度をさらに詳細に検討した。

B.研究方法

1.脾細胞での PrP^{sc} 陽性サブセットの解析

スクレイピ由来プリオン株を接種したマウス由来の脾細胞を Thy1、CD19、CD11b の各磁気ビーズを添加し、MACSMidi を用いて Thy1 陽性細胞、CD19 陽性細胞、CD11b 陽性細胞に各々分離した。変性剤存在下で 40 μ g/ml の PK にて 30 分処理し、ウエスタンブロットにて PrP^{sc} の検出を行った。

2.BSE 由来脳乳剤を用いた in vitro 感染

BSE に感染した国産牛由来の脳乳剤をヒトグリオマ-由来の細胞株 T98g に添加し、4 週後に感染の有無を検討した。

3.in vitro 感染系の開発と感染効率の評価

昨年得られた N2 細胞のクローンに PrP^{sc} を 10⁻² から 10⁻⁷ まで希釈した脳乳剤を添加し、30 日以上継代した細胞から PrP^{sc} の検出を行った。

4.STI1 の発現とプリオンタンパクとの結合の解析

PCR にてヒトの STI1 遺伝子を増幅し、pEF6/V5-His6-TOPO にクローニングし、COS7 細胞にて発現させ、精製した。一方、ヒトプリオンタンパクを発現させた COS7 細胞をスライドガラスに固定し、精製した STI1 タンパクを反応させ、FITC 標識した抗 V5 抗体をもって結合を解析した。また、逆に STI1 を発現させた COS7 に精製した PrP-HisTag を反応させ、FITC 標識

抗 His-Tag 抗体で結合性を解析した。

5.感染マウスの脾臓における PrP^{sc} 陽性細胞の解析

スクレイピ由来プリオン株を接種した 148 日目のマウスから脳と脾臓を摘出し、ホルマリン緩衝液にて固定後、ギ酸処理等によって PrP^{sc} を不活化した。121°C 20 分のオートクレーブ処理後ウサギ由来の抗プリオン抗体で検出した

C.研究結果

1. 脾細胞での PrP^{sc} 陽性サブセットの解析

CD11b 陽性細胞に分子量 27-30Kd 付近に強いシグナルが検出された。しかし、脳乳剤に認められるような 20Kd と 25Kd 付近のバンドは確認できなかった。

2. BSE 由来脳乳剤を用いた in vitro 感染

BSE 由来脳乳剤を添加した細胞は 80 μ g/ml の PK 処理でも 30Kd にバンドが検出された。しかし、脳乳剤に認められるような 20Kd と 25Kd 付近のバンドは確認できなかった。

3. in vitro 感染系の開発と感染効率の評価

昨年得られた N2 細胞のクローンに 10⁻² から 10⁻⁷ まで希釈した脳乳剤を添加し、30 日以上継代した。40 μ g/ml での PK 処理では 21Kd から 27Kd 付近に非感染性細胞には認められないブロードなバンドを認められた。10⁻⁵ まで希釈した脳乳剤によっても PrP^{sc} が認められ

たクローンも存在したが高濃度でも感染が確認されないこともあり、希釈による連続性が確認できなかった。

4.STI1 の発現とプリオンタンパクとの結合の解析

ヒトプリオンタンパクを発現させた COS7 細胞をスライドガラスに固定し、精製した STI1 タンパクを反応させ、FITC 標識した抗 V5 抗体を用いて結合性を検討したところ、周囲の細胞に比較して強い蛍光を発する細胞が存在した。逆の組み合わせにおいても同様の細胞が観察された。

5.感染マウスの脾臓における PrP^{sc} 陽性細胞の解析

B 細胞領域の濾胞中心にのみ陽性細胞が検出された。陽性細胞のサブセットの解析を試みたがギ酸処理を行った組織切片では染色できなかった。

D. 考察

脾細胞を抗体が付いた磁気ビーズを用いて分離・精製することで、リンパ球の CD11b サブセットに PrP^{sc} が存在することが示された。さらに、病理組織学的にも B 細胞領域の濾胞中心にのみ陽性細胞が検出されたことから follicular dendritic cell(FDC)やマクロファージなどに PrP^{sc} が存在することが強く示された。

興味深いことに、我々はこれまで PrP^{sc} は 21Kd から 30Kd の間に糖鎖の違いで 3 本のバンドが存在すると考えていたが、ヒト細胞株 T98g では 30Kd、マウス脾

細胞では分子量 27-30Kd 付近のバンド、さらに N2 では良く見ると 21Kd と 27Kd 付近にブロードなバンドが確認できた。また、PK 耐性が細胞によって変化することがわかった。これらから、in vivo や in vitro では用いる組織や細胞によって PrP^{sc} の存在様式が異なる可能性が示唆された。また、非病原性の PK 耐性 PrP^c が存在することが報告されており、我々が検出した PrP^{sc} が本当に病原性又は伝達性があるのか注意深く解析する必要がある。

血液中や血球系に存在する PrP^{sc} は脳と存在様式が異なる可能性が今回の実験によって示唆され、血液や血球系の細胞では検出条件を詳細に検討する必要がある。

また、STI1 と正常なプリオンタンパクとが結合を示唆する結果が得られ、結合の条件の詳細な解析と PrP^{sc} に対しても結合性が保持されるか、今後の重要な課題と考えている。

E.結論

スクレイピ由来プリオン株に感染したマウス由来の脾細胞を解析したところ CD11b 陽性細胞に PrP^{sc} を認め、組織学的にも B 細胞領域の濾胞中心にのみ陽性が認められた。in vivo や in vitro での実験により組織や細胞によって PrP^{sc} の分子量や PK 耐性、バンドのパターンなどが異なることが明らかになった。これらのことから存在様式が異なる可能性が示唆

された。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、
他。血漿分画製剤の安全性；臨床マ
ニュアルアルブミン。191-196、2003
年。東京

2. 学会発表

岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子：
ヒト免疫グロブリン製剤におけるパ
ルボウイルス B19 の解析、第 51 回
日本ウイルス学会、2003 年

H. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金

分担研究報告書

血液製剤からのプリオン除去法、及び in vitro 感染系の開発と感染効率の評価

主任研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨 スクレイピ由来プリオン株を接種したマウスから脾細胞を Thy-1 (+)、CD19 (+)、CD11b (+) に分け、PrP^{sc} を検出したところ、CD11b (+) の細胞に強いシグナルが観察された。また、BSE 感染牛由来の脳乳剤をヒト細胞株 T98g に感染させたところ、プロテナーゼ k (以下 PK) 耐性の Pr が検出できた。興味深いことに、脾細胞とヒト細胞株 T98g から検出された PrP^{sc} は脳由来の PrP^{sc} のパターンと異なっていた。また、昨年クロニングしたマウス神経芽腫に PrP^{sc} を感染させたところ、脳乳剤と同じ濃度の PK 処理では PrP^{sc} が検出されなかったが、正常 Pr を完全に消化する濃度では検出された。この系を用いて脳乳剤の in vitro での感染価の測定を試みたが感染は確認できたものの定量性は困難であった。以上から、in vitro の細胞や in vivo での血球系の細胞では脳組織と PrP^{sc} の性状が異なる可能性とそれによって PK の耐性の程度が異なる可能性が示唆され、血液中に存在する PrP^{sc} の様式のさらなる解析が必要である。

A.研究目的

日本において牛海綿状脳症（以 BSE と略す）と診断された牛は 11 頭になった。さらに、これまで報告のなかった米国においても BSE が報告され世界に衝撃を与えた。発生頭数が少ないことから過剰な反応だと考えているヒトも一部にはいるようだが、地球規模でのヒトや物の流れを考えると我々の思いもよらない経路を通じて人間社会に侵入してくる可能性は否定できない。また、長期間の潜伏期があることから一度ヒトの発症例が報告された場合には既に多くのヒトが感染してしまっている可能性も

ある。この研究は血液を介したプリオン病の感染を未然に防止するために実施されている。これまでの研究は神経系の研究が主に行われており、血液に関するプリオン研究は少ない。除去実験にしても感染ハムスタ-脳乳剤の添加実験によって評価しているものが多い。我々は血液中や血球系細胞に存在するプリオンが脳と同じ性状で存在するのかどうかを主に解析し、感染防止に貢献したいと考えている。また、in vivo の研究は重要には違いないが、動物愛護の面や結果が出るまでに長期間を要すること、BSE の動物実験では P3 の施設が必要な事

等から *in vitro* での感染系の確立を目指している。

B. 研究方法

1. 脾細胞での PrP^{Sc} 陽性サブセットの解析

スクレイピ由来プリオン株を接種したマウス由来の脾細胞（当研究所、感染病理部より供与）を抗 Fc 抗体で処理後 Thy1、CD19、CD11b の各磁気ビーズを添加し、MACSMidi にて Thy1 陽性細胞、CD19 陽性細胞、CD11b 陽性細胞を各々分離した。分離された細胞は変性剤存在下で 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の PK にて 30 分処理し、Dnase 処理後アルコールでタンパクを沈澱濃縮した。SDS-PAGE は 12%ゲルで電気泳動し、イモビロン膜（ミリポア社）に転写した。検出はマウス単クローン抗体の SAF32、SAF70、SAF84 等を用いた。

2. BSE 由来脳乳剤を用いた *in vitro* 感染

BSE に感染した国産牛由来の脳乳剤（当研究所、感染病理部より供与）をヒトグリオマ由来の細胞株 T98g に添加し、脳乳剤が持ち込まないようにして継代した。4 週後に非感染の T98g 細胞と感染させた細胞を集め、 2×10^6 づつ分注し PK の濃度を各 20、40、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ として PK 処理を行った。脾細胞と同様にウエスタンを実施し、3F4 抗体で検出をおこなった。

3. *in vitro* 感染系の開発と感染効率の評価

昨年得られた N2 細胞のクローンに PrP^{Sc} を 10^{-2} から 10^{-7} まで希釈した脳

乳剤を添加し、30 日以上継代した。 2×10^6 づつ分注し PK の濃度を各 20、40、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ として PK 処理を行った。脾細胞と同様にタンパクを沈澱させウエスタンを実施した。検出はマウス単クローン抗体の SAF32、SAF70、SAF84 等を用いた。

4. 血液製剤からのプリオン除去法

スクレイピ由来プリオン株を接種したマウスの脳乳剤（当研究所、感染病理部より供与）を 5000 X g にて 2°C、5 分間遠心し遠心前、cryoprecipitation、上清の 3 つに分画し、変性剤存在下で 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の PK にて 30 分処理後、脾細胞と同様に処理した。沈澱を 50 μl に溶解し、 $10^{-0.5}$ から 10^{-5} まで $10^{-0.5}$ づつの段階希釈を行い 10 μl をウエスタンに用いた。検出はマウス単クローン抗体の SAF70 と SAF84 を用いた。

C. 研究結果

1. 脾細胞での PrP^{Sc} 陽性サブセットの解析

CD11b 陽性細胞に分子量 27-30Kd 付近に強いシグナルが検出された。しかし、脳乳剤に認められるような 20Kd と 25Kd 付近のバンドは確認できなかった（図 1）。

2. BSE 由来脳乳剤を用いた *in vitro* 感染

非感染 T98g 細胞は 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の PK 処理によって Pr は検出されなくなったが、脳乳剤を添加した細胞は 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の PK 処理でも 30Kd にバンドが検出され

た。しかし、脳乳剤に認められるような 20Kd と 25Kd 付近のバンドは確認できなかった (図 2)。

3. in vitro 感染系の開発と感染効率の評価

昨年得られた N2 細胞のクローンに 10^{-2} から 10^{-7} まで希釈した脳乳剤を添加し、30 日以上継代した。非感染細胞及び脳乳剤を添加した細胞を各 20、40、 $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で PK 処理を行ったが、 $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ 処理では脳乳剤添加細胞においても 27Kd 付近にバンドは認められなかった。 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 処理では 21Kd から 27Kd 付近に非感染性細胞には認められないブロードなバンドを認められた (図 3)。 10^{-5} まで希釈した脳乳剤によっても PrP^{sc} が認められたクローンも存在したが高濃度でも感染が確認されないこともあり、連続性が確認できなかった。

4. 血液製剤からのプリオン除去について

脳乳剤を遠心前、cryoprecipitation、上清の 3 つに分画し、各々を段階希釈して陽性が得られる最大希釈倍率を解析すると遠心前は $10^{-2.5}$ 、cryoprecipitation は 10^{-3} 、上清は $10^{-1.5}$ であった。分子量の異なるバンドが 21Kd から 30Kd の間に 3 本認められた。

D. 考察

脾細胞を抗体が付いた磁気ビーズを用いて分離・精製することで、リンパ球の CD11b のサブセットに PrP^{sc} が存在することを示すことができた。保護剤を用い

て -80°C に凍結してあった細胞を解凍して分離した影響のためか、細胞数を測定する際に死細胞が認められた。そのため Thy-1 陽性細胞や CD19 陽性細胞にも弱いシグナルが認められた (図 1)。しかし、図 1 に示した CD11b の細胞数は他のサブセットの $1/2$ であり、CD11b 陽性細胞に PrP^{sc} 陽性細胞が多いことが示唆された。新鮮な脾細胞に分離して特定のサブセットに PrP^{sc} 陽性細胞が存在するのかが確認する必要がある。

我々はこれまで図 4 に示すように PrP^{sc} は 21Kd から 30Kd の間に糖鎖の違いで 3 本のバンドが存在するものだと考えていたが図 1 と図 2 に示したように 30Kd 付近のみに PrP^{sc} が認められた。特に、ヒト細胞株 T98g は明瞭なバンドであることから糖鎖が付いていない可能性もある。図 3 の N2 では良く見ると 21Kd と 27Kd 付近にブロードなバンドが確認できることから、in vivo や in vitro では用いる組織や細胞によって PrP^{sc} の存在様式が異なる可能性が示唆された。また、図 3 の N2 細胞のように PrP^{sc} の PK 耐性が存在様式の異なることによって変化する可能性がある。N2 では $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ の PK 処理では PrP^{sc} が検出されなかったからである。非病原性の PK 耐性 PrP^c が存在することが報告されており、我々が検出した PrP^{sc} が病原性又は伝達性があるのかが注意深く解析する必要がある。

また、図 4 に示すように脳乳剤を使用

した場合、弱い遠心力でペレットに大部分の PrP^{sc} が落ちてしまい、血漿分画製剤の PrP^{sc} 除去のバリデーションに脳乳剤を使用するためには何らかの可溶性を高める工夫が必要だと考えられる。その一方で、血液中や血球系に存在する PrP^{sc} は脳と存在様式が異なる可能性が今回の実験によって示唆されたので血球系の細胞、又は脾細胞由来の PrP^{sc} を用いた解析が必要と思われた。

E. 結論

スクレイピ由来プリオン株に感染したマウス由来の脾細胞を解析したところ CD11b 陽性細胞に PrP^{sc} を認めた。さらに *in vitro* において BSE 由来の PrP^{sc} を感染させることで PK 耐性の PrP を検出した。興味深いことにこれらの PrP は脳由来の PrP^{sc} とはバンドのパターンが異なり、糖鎖の違いが示唆された。これらから血液中や血球系でのプリオンの存在様式が脳と異なる可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、他。血漿分画製剤の安全性；臨床マニユアルアルブミン。191-196、2003年。東京

2. 学会発表

岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子：ヒト免疫グロブリン製剤におけるパ

ルボウイルス B19 の解析、第 51 回
日本ウイルス学会、2003 年

H. 知的所有権の取得状況

なし

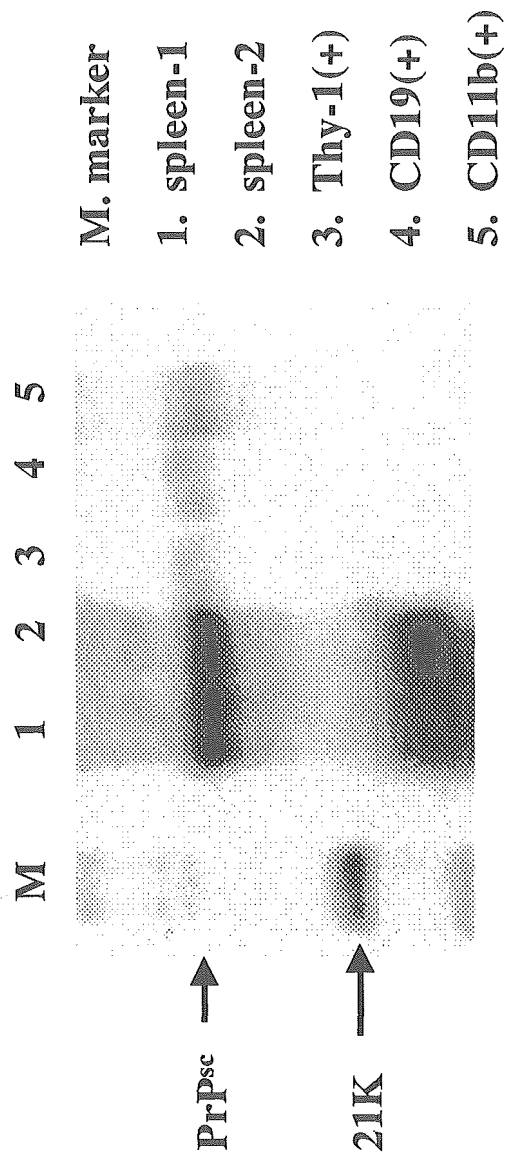


Fig.1 PrP^{sc} detection in subsets of spleen cells

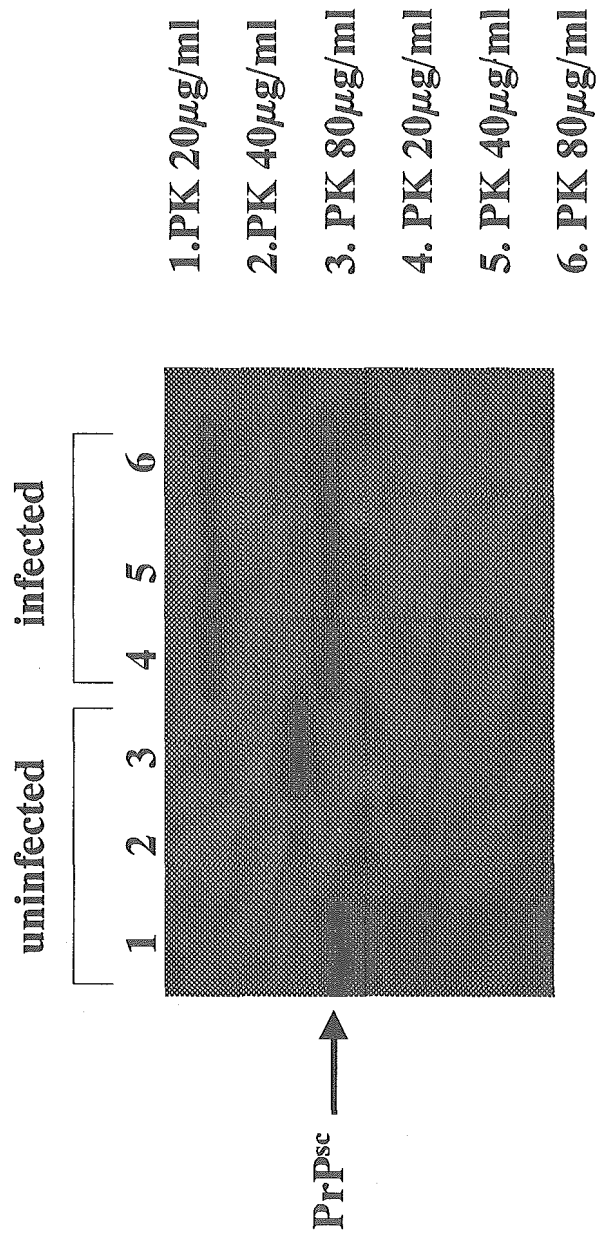


Fig.2 in vitro infection with BSE brain homogenate

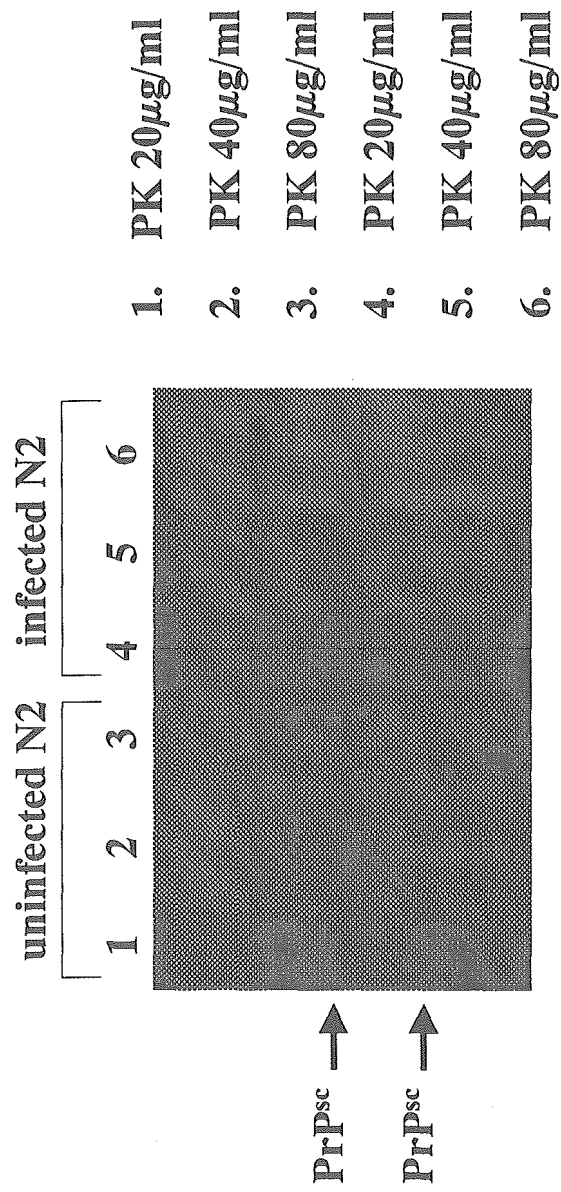


Fig.3 in vitro infection of N2 with PrP^{sc} brain homogenate

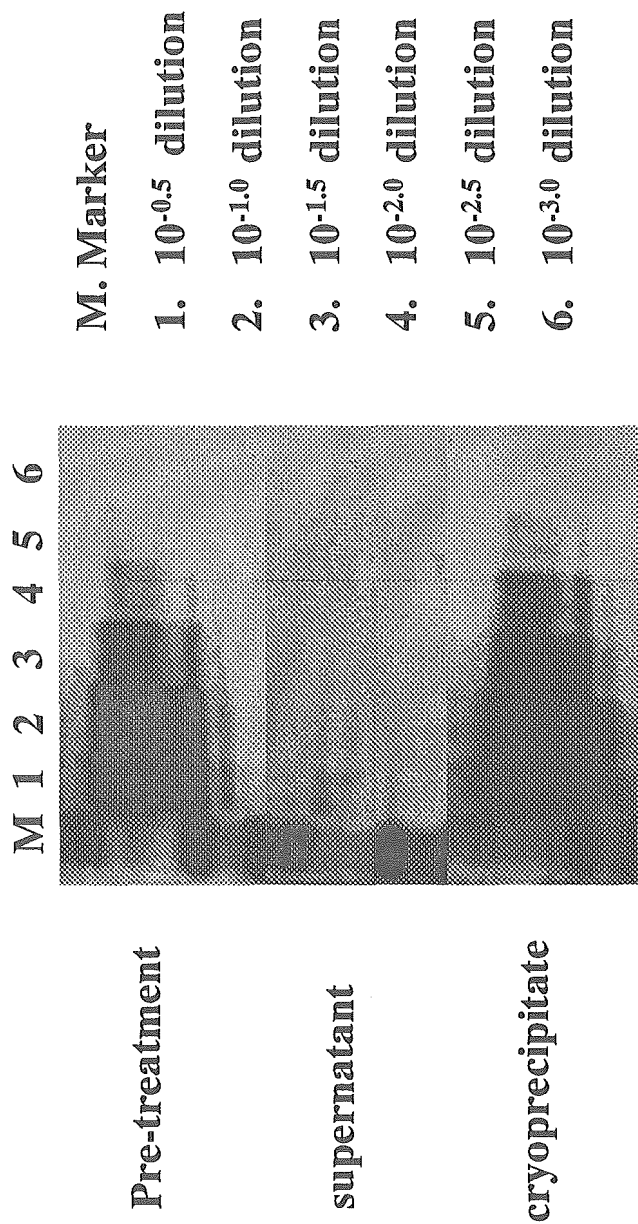


Fig.4 distribution of PrP^{sc} by low gravity centrifugation

厚生労働科学研究費補助金(食品安全確保研究事業)
分担研究報告書

組換えヒトSTI1タンパクの発現とヒトプリオンタンパクとの結合に関する研究

分担研究者 水沢左衛子 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官

伝達性海綿状脳症の病原体は異常プリオンタンパクであるが、正常プリオンタンパクに結合する生体分子が異常プリオンタンパクの伝播にどのように関与しているかは不明である。近年、マウスのSTI1がプリオンタンパクのリガンドであり、神経系細胞の細胞死を阻止することが報告された。異常プリオンタンパクの感染におけるヒトSTI1の関与を検討することを目的とし、本研究ではヒトとマウスの組み換えSTI1-V5-HisTagタンパク発現プラスミドを作製した。組み換えタンパクをニッケルアガロース磁気ビースで精製し、ヒトSTI1とヒトプリオンタンパクの結合の検討を行った。

A. 研究目的

異常プリオンタンパク(PrP^{Sc})が伝達性海綿状脳症の病原体であることは知られているが、正常プリオンタンパク(PrP^C)の生体での機能は明らかでなく、それを解明するためにPrP^Cに結合する生体分子の検索が続けられてきた。Stress inducible protein 1 (STI1) は co-chaperonin protein のひとつであるが、近年、マウスのSTI1がプリオンタンパクのリガンドであり、STI1とプリオンタンパクの結合が神経系細胞の細胞死を阻止することが報告された¹⁾²⁾。PrP^Cに結合する生体分子がPrP^{Sc}の伝播にかかわっているかどうかはもう一つの興味ある問題である。PrP^{Sc}感染におけるヒトSTI1の関与を検討することを目的とし、本研究ではヒトとマウスの組み換えSTI1-V5-HisTagタンパク発現プラスミドを作製し、ヒトSTI1とヒトPrP^Cの結合の解析を試みた。

B. 研究方法

ヒト及びマウスSTI1-V5-HisTagタンパク発現プラスミドの作製：ヒト glioblastoma 由来細胞株T98G (JCRB9041) 及びマウス neuroblastoma 由来細胞株N2a (ATCC: CCL-131) から調製したRNAを鋳型とし、RT-PCR反応 (Reverse transcriptase XL, Ex Taq polymerase, 宝酒造) によりタンパ

クをコードする領域を増幅した。RT-PCR反応に用いたプライマーはTable1に示した。増幅産物をアガロースゲル電気泳動で精製、pEF6/V5-His6-TOPOベクタープラスミド(Invitrogen)に挿入してヒトSTI1プラスミドpEFhSTI1/V5-His-13とマウスSTI1プラスミドpEFmSTI1/V5-His-B8を作製した。ベクター上のシークエンスプライマー結合部位から挿入DNAの5'と3'末端それぞれ約400の塩基の配列を決定し、目的のDNAが正しく挿入されていることを確認した。

組み換えタンパクの発現：組み換えSTI1タンパクの発現には上述のヒトSTI1プラスミドpEFhSTI1/V5-His-13とマウスSTI1プラスミドpEFmSTI1/V5-His-B8、プリオンタンパクの発現には当研究室で作製したEF-TOPO-hPr-7(human PrP67-230aa-V5-HisTag)とpME18-hPr(human PrP1-253aa)、発現コントロールにはpEF6/V5-His-TOPO/lacZをLipofectin Reagent (Invitrogen)を用いてCOS7細胞にトランスフェクションした。トランジェントに組換えタンパクを発現させた細胞を3日後にスクレーパーで集めて、蛍光免疫染色、ウェスタンブロット及び結合実験に使用した。

ウェスタンブロット：細胞または組み換えタンパクをSDS-PAGEサンプルバッファー中で100℃3分間加熱、SDS-12.5%ポリアクリルアミドゲル(パジェルNPU-12.5L、アトー社)を用いて100V、2時間の電気泳動(12.5%SDS

-PAGE)で分離後、polyvinylidene difluoride 膜 (Immobilon®, Millipore 社) に転写、ブロックエース (大日本製薬) で一晩ブロッキングを行った。V5-His-Tag 融合タンパクの検出には抗 V5 マウスモノクローナル抗体または抗 pentaHis 抗体を 1 次抗体、ビオチン標識抗マウス IgG ヒツジポリクローナル抗体を 2 次抗体とし、アビジン: ビオチン化 HR パーオキシダーゼ複合体を介したルミノール化学発光を ECL ミニカメラで検出した (Vectastain ABC キット、フナコシ及び ECL ウェスタンブロットング検出システム、アマシャム)。

HisTag タンパクの精製: トランスフェクションした細胞からの HisTag タンパクの精製には Ni-NAT Magnetic Agarose Beads (Qiagen) を用いた。

免疫蛍光染色: トランスフェクションした COS 7 細胞をスライドグラスにウェル当り約 5000 個スポットして風乾、5 分間冷アセトン処理した。FITC 標識抗 V5 マウスモノクローナル抗体 (Invitrogen) で染色して、蛍光顕微鏡下で V5-HisTag 融合タンパク発現細胞を観察した。

ヒト STI1 と PrP の結合実験:

(A) ヒト STI1 プラスミド pEFhSTI1/V5-His-13 でトランスフェクションした COS 7 細胞からヒト STI1-V5-HisTag タンパクを精製、 10^5 個細胞由来の精製物が $5 \mu\text{l}$ となるように PBS-1% BSA で希釈した。pME18-hPr (human PrP 1-253aa) でトランスフェクションした COS 7 細胞をスライドグラスの直径 6mm のウェル当り約 5000 個スポットして風乾、5 分間冷アセトン処理した。ウェルに精製したヒト STI1-V5-HisTag タンパク液 $5 \mu\text{l}$ を滴下し、 37°C 1 時間インキュベート、PBS で洗浄、FITC 標識抗 V5 マウスモノクローナル抗体 (Invitrogen) で染色して、蛍光顕微鏡下で観察した。

(B) pEFTOPO-hPr-7 でトランスフェクションした COS 7 細胞から精製した human PrP-V5-HisTag タンパクに FITC 標識抗 V5 マウスモノクローナル抗体を結合させ、十分に洗浄し、PBS-1% BSA で (A) と同様に希釈した。pEFhSTI1/V5-His-13 をトランスフェクションした COS 細胞をスライドグラスにウェル当り約 5000 個スポットして風乾、5 分間冷アセトン処理した。ウェルに上述の FITC 標識したヒト精製 PrP-V5-HisTag タン

パク液 $5 \mu\text{l}$ を滴下し、 37°C 1 時間インキュベート、PBS で洗浄、蛍光顕微鏡下で観察した。

C. 研究結果

ヒトとマウスの組み換え STI1-V5-HisTag タンパクの発現: ヒトとマウスの STI1 タンパクをコードする領域を pEF6/V5-His6-TOPO に挿入してヒト STI1 発現プラスミド pEFhSTI1/V5-His-13 とマウス STI1 発現プラスミド pEFmSTI1/V5-His-B8 を作製した。これらのプラスミドで COS 7 細胞をトランスフェクションし、アセトン処理した細胞を FITC 標識抗 V5 マウスモノクローナル抗体で免疫蛍光染色した結果、細胞質が強く染まった細胞が観察された (図 1)。さらに、ウェスタンブロット法で抗 V5 マウスモノクローナル抗体及び抗 pentaHis マウスモノクローナル抗体を用いて V5-His-Tag タンパクを検出した (図 2)。二つの抗体で検出されるバンドのパターンはよく一致し、一番分子量が大きい主なバンドの分子量は約 70kDa であった。これは分子量 66kDa の STI1 タンパクの C 末端に 45 アミノ酸残基が融合した組換え STI1 タンパクの分子量に相当する。また、これよりも低分子量のバンド 4 本がヒトとマウスのクローンで同じ位置に検出された。

ニッケル磁気アガロースビーズで V5-HisTag タンパクを吸着・溶出し、抗 V5 マウスモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット法で検出した結果、分子量が一番大きい主なバンドが効率よく回収され、分子量の小さいバンドの量は減少した (図 3)。以上の結果から、ヒト及びマウスの組み換え STI1-V5-HisTag タンパクは COS 7 細胞で発現していると考えられ、それはニッケル磁気アガロースビーズで精製可能であった。

ヒト STI1 と PrP の結合:

(A) pME18-hPr でトランスフェクションしてトランジェントにヒトプリオンタンパクを発現させた COS 7 細胞と精製したヒト STI1-V5-HisTag タンパクをインキュベート、FITC 標識抗 V5 マウスモノクローナル抗体で免疫染色した結果、周囲の細胞と比較して強い蛍光を発する細胞が観察された (図 4 A)。

(B) 逆にヒト STI1 プラスミド

pEFhSTI1/V5-His-13 でトランスフェクションしたCOS7細胞とFITC標識したhuman PrP-V5-HisTagタンパクをインキュベートした結果、同様に周囲の細胞と比較して強い蛍光を発する細胞が観察され(図4B)、ヒトSTI1とPrPが結合することが示唆された。

D. 考察

STI1はco-chaperonin proteinのひとつとして細胞質に局在するが、近年、MartinらはSTI1の約6%は細胞表面に分布し、プリオンタンパクと結合して神経系細胞の細胞死を阻止することを報告した。正常プリオンタンパクに結合する生体分子が異常プリオンタンパクの伝播にどのように関与しているかは明らかでない。本研究ではヒトとマウスの組み換えSTI1-HisTagタンパク発現プラスミドを作製し、COS7でトランジェントに発現させたヒトのSTI1とPrP^Cの結合を示唆する結果を得た。血球表面のSTI1の発現や、STI1とPrP^Sの結合の解析に必要な検出法の改良を行っている。

E. 結論

1. ヒトSTI1発現プラスミドpEFhSTI1-V5-His-13とマウスSTI1発現プラスミドpEFmSTI1-V5-His-B8を作製した。

2. 1で作製したプラスミドをCOS7細胞にトランスフェクションすると、組み換え

STI1-V5-HisTagタンパクに相当する分子量約70kDaのV5-HisTag融合タンパクが発現し、主に細胞質に存在していた。

3. 組み換えヒトSTI1とヒトPrPが*in vitro*で結合することが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

I. 文献

1) Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, de Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR, Martins VR. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. EMBO J. 2002; 21:3307-16.

2) Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. EMBO J. 2002; 21(13):3317-26.

Table 1. Primers designed for cloning human and mouse STI1 genes.

Target Gene		Sequence	Length	Position (GenBank Accession No)
Human STI1	Fw	5'-GCTATGGAGCAGGTCAATGAG	21b	60-80 (NM006819)
	Rv	5'-CCGAATTGCAATCAGACCCAC	21b	1691-1671 (NM006819)
Mouse STI1	Fw	5'-GCTATGGAGCAGGTGAATGAG	21b	53-73 (BC003794)
	Rv	5'-CCGAATTGCGATGAGACCCAC	21b	1684-1664 (BC003794)

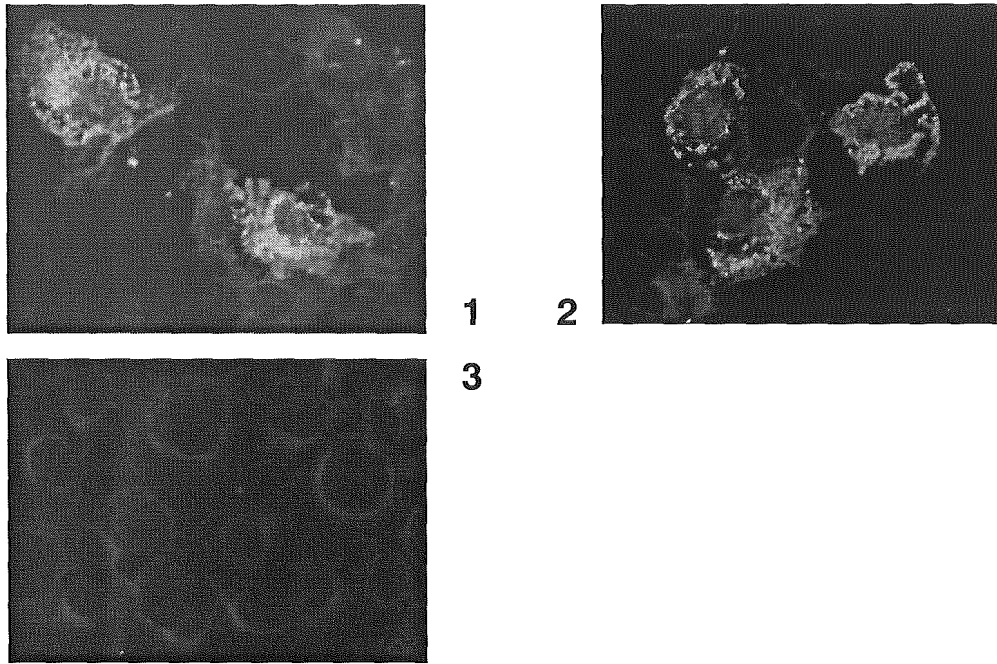


図1. ヒトとマウスの組み換えSTI1-V5-HisTagタンパクをトランジェントに発現しているCOS 7細胞の蛍光免疫染色像.

1. ヒトSTI1プラスミドpEFhSTI1/V5-His-13
2. マウスSTI1プラスミドpEFmSTI1/V5-His-B8
3. DNA陰性コントロール、

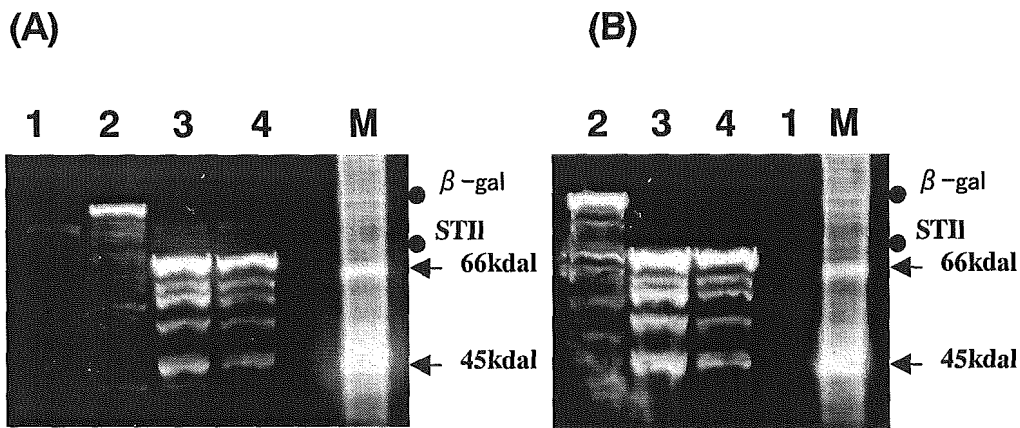


図2. COS 7細胞でトランジェントに発現しているヒトまたはマウスの組み換えSTI1-V5-HisTagタンパクのウェスタンブロッティング

(A) 抗penta Hisマウスモノクローナル抗体で検出 (B) 抗V5マウスモノクローナル抗体で検出。トランスフェクションに使用したプラスミドは (A) (B) とともに1. DNA陰性コントロール、2. pEF6/V5-His-TOPO/lacZ 発現コントロール、3. ヒトSTI1プラスミドpEFhSTI1/V5-His-13、4. マウスSTI1プラスミドpEFmSTI1/V5-His-B8. M. ビオチン標識分子量マーカー。

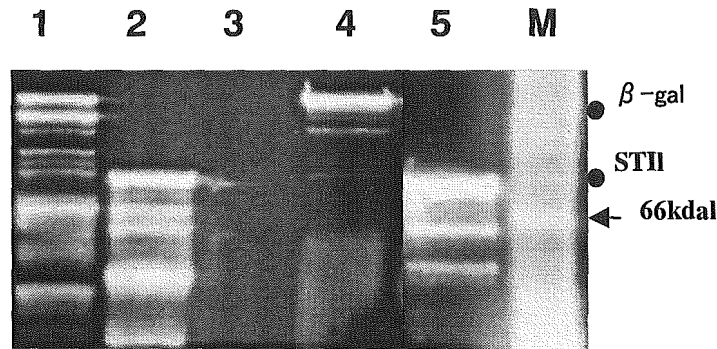


図3. ヒト組み換えSTI1-V5-HisTagタンパクのニッケル磁気アガロースビーズを用いた精製.

COS 7細胞でトランジェントに発現させた (1) lacZV5-HisTag タンパク、(2) ヒト組み換えSTI1-V5-HisTagタンパクおよび (3) DNA陰性コントロール. ニッケル磁気アガロースビーズで精製した (4) lacZV5-HisTag タンパクと (5) ヒト組み換えSTI1-V5-HisTagタンパク (M) ビオチン標識分子量マーカー.

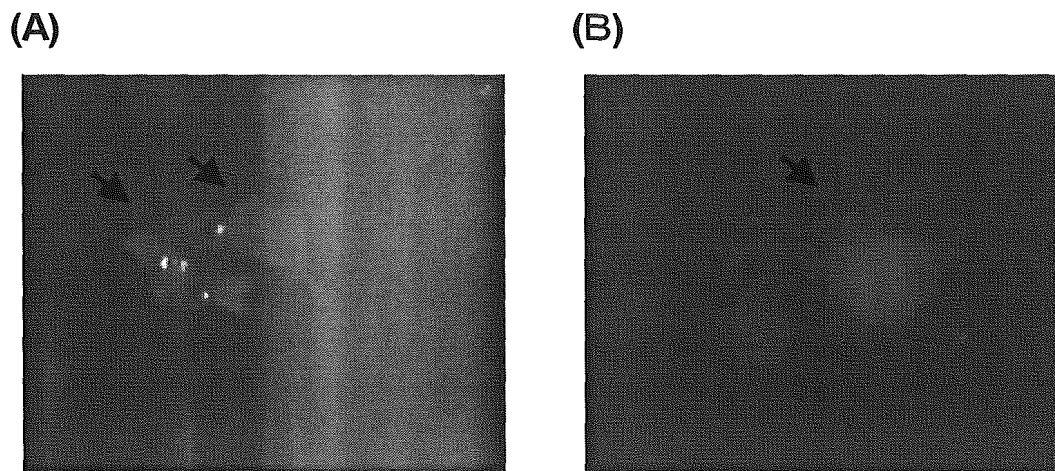


図4. ヒトSTI1とヒトPrPの結合

(A) pME18-hPrでトランスフェクションしたCOS 7細胞と精製ヒトSTI1-V5-HisTagタンパクをインキュベート、FITC標識抗V5マウスモノクローナル抗体で免疫染色した。(B) ヒトSTI1プラスミドpEFhSTI1/V5-His-13でトランスフェクションしたCOS 7細胞とFITC標識したヒトPrP-V5-HisTagタンパクをインキュベートした。矢印はFITC染色された細胞。