

### 3. 我が国の BSE プリオンの生物学的性状の解析

分担研究者 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 横山 隆 動物衛生研究所・プリオン病研究センター  
研究協力者 林 浩子 動物衛生研究所・プリオン病研究センター

研究要旨 牛プリオン蛋白質 (PrP) 過発現マウス (米国より導入) は牛海綿状脳症 (BSE) プリオンの脳内接種後約 240 日で発症した。同マウスに/非定型、BSE/若齢型を脳内接種したが、現在まで異常は認められていない。マウス-ハムスターPrP のキメラマウスへの伝達試験により、PrP138-188 の領域が BSE のハムスターに対する種の壁に関与することが示された。また、BSE とスクレイピーの蛋白質分解酵素処理後の断片 (PrPcore) の N 末端を解析したところ、スクレイピーでは多様性が認められたが、BSE では一カ所に収束した。

#### A. 研究目的

単一といわれていた牛海綿状脳症状 (BSE) 株が複数に分かれる可能性がでてきた。マウスへの継代に基づく、我が国の BSE の性状および起源の解明が必要となっている。また、BSE プリオンはマウス、ヒツジ、サルへの伝達が認められているが、ハムスターへの伝達は示されていない。マウス/ハムスターキメラ PrP を発現するトランスジェニックマウスを用いて BSE プリオンの種の壁について検討する。

#### B. 研究方法

BSE 脳材料を野生型マウスに接種し、潜伏期、異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) のウエスタンブロット (WB)、PrP<sup>Sc</sup> のプロテイナーゼ K (PK) 抵抗性断片 (PrPcore) の N 末端のアミノ酸配列を分析した。

BSE 脳乳剤、野生型マウス初代および 2 代継代 BSE プリオンをマウス/ハムスターのキメラ PrP を発現するトランスジェニックマウスに接種し潜伏期の差異およびマウス脳内に蓄積する PrP<sup>Sc</sup> の性状について解析する。

#### C. 研究成果

1) ウシ PrP 過発現マウスの BSE プリオンに対する感受性の確認を 10%脳乳剤の脳内接種により行った。本マウスは文献の報告にほぼ一致し約 240 日の潜伏期で発症した。BSE/非定型、BSE/若齢型ならびに判定保留の症例を接種した牛 PrP 過発現マウスの経過観察を継続中で

ある。

- 2) PK 消化条件を変えた PrP<sup>Sc</sup> の N 末端は、スクレイピーでは多様であるが一カ所に収束するが BSE 由来の PrP<sup>Sc</sup> では多様性がなく、両者の構造が異なっていることを明らかとした。
- 3) BSE プリオンは野生型マウスとマウス PrP 過発現マウスではほぼ同じ潜伏期であったことから、異種 PrP のコピー数の増加だけでは種間バリアーを越えられないことが示唆された。

#### D. 考察

牛 PrP 過発現マウスの有用性が確認された。国内の複数の BSE 例 (和歌山症例、神奈川症例) について本マウスでの伝達性が確認された。茨城症例 ([非定型 BSE]) など継続中の実験については、引き続き観察が必要である。

BSE 接種マウス由来 PrP<sup>Sc</sup> の PK 切断部位はスクレイピー Obihiro 株接種マウスに比べて少なくとも 7 アミノ酸残基以上 C 末端側であることが示された。この PK 消化後の N 末端の差が WB における PrPcore の分子量の差を反映していることが明らかとなった。

MHM2PrP0/0 マウスはマウス継代 BSE プリオンに対し高い感受性を示した。BSE 由来の PrP<sup>Sc</sup> が MHM2 型 PrP<sup>C</sup> を効率よく変換する可能性が示唆された。野生型マウスとマウス PrP 過発現マウス (tga20 マウス) の潜伏期に差が認められなかったことから、異種 PrP のコピー数の増加のみで、種の壁は越えられないことが示された。

## E. 結 論

- 1) BSE プリオンの野生型マウスでの伝達を行い、マウス馴化した千葉株を作出した
- 2) スクレイピー帯広株感染マウス、スクレイピーSc237 株感染ハムスターおよび BSE/千葉株/感染マウス由来 PrP<sup>Sc</sup> の PK 消化後の N 末端を同定した
- 3) MHM2 型 (マウスとハムスターのキメラ) PrP を発現するマウスは野生型マウスに比べて BSE プリオンに対してより高い感受性を示すことが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

プリオン感染動物および材料の取り扱いには動物衛生研究所内の BSL3 レベル実験施設にて行い、汚染物は 135°C、30 分間のオートクレーブ処理により不活化した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hayashi H., Takata M., Iwamaru Y., Ushiki Y., Kimura K.M., Tagawa, Y., Shinagawa M., Yokoyama T, Effect of tissue deterioration on postmortem BSE diagnosis by immunobiochemical detection of an abnormal isoform of prion protein. *J.Vet.Med.Sci.* 66: 515-520, 2004.
- 2) Kim, C.L., Karino, A., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Sato, M., Horiuchi, M. Cell-surface retention of PrP<sup>C</sup> by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation. *J. Gen. Virol.* 85: 3473-3482, 2004.
- 3) Kim, C.L., Umetani, A., Matsui, T., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Horiuchi, M. Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies. *Virology* 320(1):40-51, (2004)
- 4) Prusiner, S.B., Williams, E., Laplanche, J.-L., Shinagawa, M. Scrapie, Chronic Wasting Disease, and Transmissible Mink Encephalopathy. In *Prion Biology and Diseases, Second Edition* (Prusiner, S.B. ed), pp. 545-594, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2004.
- 5) Hayashi, H. K., Yokoyama, T., Takata, M., Iwamaru, Y., Imamura, Y., Ushiki, Y.K., Shinagawa, M. The N-terminal cleavage site of

PrP<sup>Sc</sup> from BSE differs from that of PrP<sup>Sc</sup> from scrapie. *BBRC* 328: 1024-1027, 2005.

### 2. 学会発表

- 1) Iwamaru, Y., Okubo, Y., Ikeda, T., Hyashi, H., Imamura, M., Yokoyama, T., Shinagawa, M. PrP<sup>Sc</sup> distribution of a natural case of bovine spongiform encephalopathy. International symposium on Prion Diseases: Food and drug safety, Oct., 2004, Sendai
- 2) Hayashi, H., Takata, M., Iwamaru, Y., Ushiki, Y., Kimura, K. M., Tagawa, Y., Shinagawa, M., Yokoyama T. Effect of tissue deterioration on postmortem BSE diagnosis. Animal prion diseases & the Americas, Oct., 2004, Ames, Iowa, USA
- 3) Shimada, K., Iwamaru, Y., Imamura, M., Hayashi, H., Schmerr M. J., Shinagawa, M., Yokoyama, T. Establishment of rapid PrP<sup>Sc</sup> detection protocol in lymphoid tissue and application to scrapie surveillance of downer livestock in Japan. First International Conference of the European Network of Excellence NeuroPrion, May, 2004 Paris, France
- 4) Yokoyama, T., Kimura, K. M., Shinagawa, M. Bovine spongiform encephalopathy (BSE) in Japan. International symposium on Prion Diseases: Food and drug safety, 2004 Oct 31-Nov.2, 2004, Sendai, Japan
- 5) Shimada, K., Iwamaru, Y., Hayashi, H., Imamura, M., Takata, M., Ushiki, Y.K., Kimura, K.M., Tagawa, Y., Horiuchi, M., Shinagawa, M., Yokoyama, T. Surveillance of chronic wasting disease (CWD) in Japan. K. International symposium on Prion Diseases: Food and drug safety, 2004 Oct 31-Nov.2, 2004, Sendai, Japan
- 6) Yokoyama, T., Shimada, K., Tagawa, Y., Ushiki, Y., Hayashi, H., Shinagawa, M. Western blot assessment of prion inactivation by alkali treatment in the process of horticulture fertilizer production from meat meal. International Conference of the European Network of Excellence NeuroPrion, 2004 May, Paris

Incubation periods of BSE prion in mice

Passage history	mice	inoculum	diseased /inoculated	incubation period <sup>a</sup> (days)
1st	RIII	BSE/Chiba/1	5/5	409.0 ± 28.2
2nd	RIII	BSE/RIII	8/8	221.0 ± 4.7
2nd	CD-1	BSE/RIII	21/21	196.8 ± 8.4
3rd	CD-1	BSE/RIII/CD-1	22/22	173.6 ± 7.9
4th	CD-1	BSE/RIII/(CD-1) <sup>2</sup>	24/24	167.7 ± 5.7
5th	CD-1	BSE/RIII/(CD-1) <sup>3</sup>	11/11	158.6 ± 2.1
1st	CD-1	BSE/Kanagawa/5	5/5	450.7 ± 33.6
1st	tga20	BSE/ Kanagawa/5	6/7*	486.2 ± 61.4
1st	TgBoPrP	BSE/Wakayama/6	5/5	261.2 ± 12.2
1st	CD-1	BSE/Wakayama/6	10/10	415.3 ± 52.3
1st	TgBoPrP	BSE/Fukushima/8 <sup>b</sup>	0/5	>421*
1st	TgBoPrP	BSE/Hiroshima/9 <sup>c</sup>	0/6	>298*
1st	TgBoPrP	suspect/Kanagawa <sup>d</sup>	0/6	>298*
1st	CD-1	BSE/Kanagawa/10	0/10	>289*
1st	TgBoPrP	BSE/Kushiro/11	11/11	223.5 ± 13.5
1st	CD-1	BSE/Kushiro/11	0/10	>289*
1st	RIII	BSE/UK	5/5	467.2 ± 99.2
1st	TgBoPrP	BSE/UK	18/18	243.6 ± 23.1

<sup>a</sup>: mean ± standard deviation

<sup>b</sup>: atypical BSE case

<sup>c</sup>: young BSE case

<sup>d</sup>: suspended case (241-months old cattle)

\*: 2005/1/11

Incubation periods of mice inoculated BSE prion

	Obihiro	Sc237	BSE(1st)	BSE/RIII(2nd)	BSE/RIII/CD-1(3rd)
CD-1	150 ± 2.5 <sup>1)</sup>	>600	408.6 ± 28.2	196.8 ± 8.4	173.6 ± 7.9
MHM2	159.1 ± 7.4	420.5 ± 17.2	399.6 ± 56.7	123.8 ± 2.4	123.8 ± 2.4
MH2M	168.8 ± 7.9	102.3 ± 3.6	>560 <sup>2)</sup>	212.8 ± 16.4	185.0 ± 3.4
Tga20	78.3 ± 2.9	N.D. <sup>2)</sup>	456.5 ± 49.5	N.D. <sup>2)</sup>	123.6 ± 2.4
TgHaNSE	177.4 ± 7.1	47.2 ± 3.6	>560	N.D. <sup>2)</sup>	164.4 ± 6.8

1): incubation periods (days), mean ± SD

2): not done

Mice were intracerebrally inoculated 10% brain homogenates.

## 4. 末梢神経における異常型プリオンタンパク (PrP<sup>Sc</sup>) の検出 及び

### ELISA, WB, BioAssay による PrP<sup>Sc</sup> の検出感度の比較

分担研究者 山河 芳夫 国立感染症研究所細胞化学部

研究協力者 萩原 健一、納富 香子、中村 優子、大内 史子 (国立感染症研究所細胞化学部)  
佐多徹太郎 (国立感染症研究所感染病理部)  
松田潤一郎 (国立感染症研究所獣医科学部)  
富士レビオ株式会社、株式会社ニッピ

研究要旨 (1) ウシ海綿状脳症の全頭検査で発見された神奈川-2 例目の BSE 陽性ウシの異常型プリオンタンパク (PrP<sup>Sc</sup>) の生体内分布を精査した。その結果、大腿神経や腰神経などの末梢神経において極めて微量 (当該ウシ脊髄の 1/1000 以下) ではあるが、PrP<sup>Sc</sup> がウエスタンブロット法で検出された。(2) BSE 陽性と判定された 3 頭のウシ (和歌山、神奈川-1, 神奈川-2) から 10% 脳乳剤をそれぞれ作成し、全頭検査に採用されている ELISA 法、確認検査の WB 法及び本研究班の松田が作出したウシ・プリオンタンパクを発現するトランスジェニックマウス (boTg) を用いた BioAssay 法でそれぞれの検出感度を比較した。その結果、陽性判定に要する組織重量は ELISA 法で約 100 $\mu$ g, Wb 法で約 2  $\mu$ g, BioAssay 法で約 1.25 $\mu$ g (和歌山) であった。

#### A. 研究目的

ウシ海綿状脳症の病原因子である PrP<sup>Sc</sup> は主に中枢神経系に蓄積するが、末梢神経系である背根神経節や回腸のアウエルバッハ神経叢にも蓄積することを神奈川-1 例目の感染ウシの試料を用いて分析し、報告した (本研究班 14 年度報告)。前回の知見を確認することや、PrP<sup>Sc</sup> の蓄積部位に関する新たな知見を得ること等を目的として神奈川-2 例目陽性ウシ (95 ヶ月齢、ホルスタイン、雌) の神経節及び神経試料について精査した。

BSE 罹患ウシの臓器、特に PrP<sup>Sc</sup> が多量に含まれる脳、脊髄等は BSE 研究の貴重な材料 (resource) であるが、と畜場において他のウシの危険部位と一緒に廃棄されてしまう為に研究材料として回収するのは困難である。今回、研究班の標準 (参照) 試料として陽性と判定された牛の臓器等を活用する事など目的として、全廃棄を免れた 3 頭の陽性ウシの脳から 10% 脳乳剤を作成した。これらの乳剤を用いて、全頭検査で採用されている ELISA 法、確認検査の WB 法及び本研究班の松田が作出したウシ・プリオンタンパクを発現するトランスジェニックマウス (boTg) を用いた BioAssay

法で陽性判定に要する組織の重量を求めることによりそれぞれの方法の検出感度を比較した。

#### B. 研究方法

神経及び神経節試料の乳化及びリタングステン沈殿: 神経線維部分を多く含む部位の乳化は直径 2 mm のジルコニアビーズ (ニッカトー製) を用いて安井機械製のマルチビーズショッカーで 2,500 rpm, 10 分間の震盪で行ない、20% 乳剤 1 ml を作成した。250  $\mu$ l の乳剤をスクリーキャップ付きのチューブに移し、同容の Sarcosyl 溶液 (4%/PBS) を加え、超音波を照射により良く分散せしめ、不溶物を遠心 (2,000 rpm, 5 min) 除去した。上清に 4% リタングステン酸溶液 (JDF Wadworth et al., The LANCET 358:2001, pp.171-180) を最終濃度 0.3% になる様に加えて 37°C 30 分震盪し、生じた沈殿を遠心 (15,000 rpm 15 min) で集めて 100  $\mu$ l の TN-buffer と detergent buffer 及び 10  $\mu$ l の 2-ブタノールを加え、超音波で沈殿を分散して、検査要項に従って酵素処理 (collagenase、PK 及び DNase 1) を行った。酵素処理後に PrP<sup>Sc</sup> を 2-BuOH-MeOH で沈殿させ、50  $\mu$ l の SDS-サンプル

buffer に溶かして電気泳動/WB の試料とした。  
電気泳動/ウエスタンブロッティング：確認検査で用いられているプロトコールに準拠して行なった。

抗体：1次抗体（抗プリオン抗体）は帯広畜産大学で作成したモノクローン抗体 44B1（マウス）を 0.2-0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度で使用した。

標準 10%脳乳剤の調整：国立感染症研究所における確認検査で陽性が確認された3頭のホルスタイン牛の小脳（神奈川-1 例目）及び視床（和歌山例、神奈川-2 例目）約 10 g を用いて 10%脳乳剤（PBS）をそれぞれ作成した。乳化は安井機械のマルチビーズショッカー、ニッカト製の直径 1 mm のタングステンビーズ（1g/1g 組織重量）を用いて 2,500 rpm 回転、5 分の処理で行った。作成した乳剤は 1ml/tube に分注してマイナス 80°C で保存した。

脳乳剤を用いた市販 ELISA 系の比較：上記 10%標準液を原液として各々のキットに付属する試料作成用の緩衝液で段階希釈し、各社のプロトコールに従って測定を行った。キットは一次検査での使用が認可されているプラテリア（バイオラッド社）、フレライザ（富士レビオ社）及び開発中のニップル（ニップ社）の3種を比較した。

BoTg マウスを使用した感染価の測定：松田が作出したウシ・プリオンタンパクを発現する Tg39-hemi (bo<sup>+/+</sup>, Prnp<sup>+/+</sup>)へ脳乳剤（和歌山例）の段階希釈液（25 $\mu\text{l}$ /匹）を脳内に接種した。（一群、4-6 匹）なお、感染の有無は脳、脾臓を経時的に WB 法で検査して PrP<sup>SC</sup> の蓄積を調べることにより行った。

（倫理面への配慮）

マウスを用いた実験については、実験動物委員会の承認を得、適切に取り扱った。異常型プリオンの取り扱い及びマウスへの感染実験は国立感染症研究所におけるバイオセフティー安全管理規程を遵守して行った。

## C. 結果

### 1. PrP<sup>SC</sup> の末梢神経及び神経節での検出

図-1 (A)に示す様に大腿、腰などの神経線維で極微量の PrP<sup>SC</sup> が WB 法で検出された。同時に泳動、発色した脊髄試料及び陽性コントロールの発色度から考えて、これらの神経への PrP<sup>SC</sup> の蓄積の程度は中枢神経（脊髄）の 1/1,000~1/3,000 と考えられる。一方、背根神経節では図-1 (B)に示す様に、検査した全ての神経節で脊髄の 1/10 程度の PrP<sup>SC</sup> の蓄積があることが判った。しかし、神経

節における PrP<sup>SC</sup> の蓄積は免疫組織化学的に検出する事が出来た。図-2 に示す様に、神経節では PrP<sup>SC</sup> は神経節細胞とそれを取り巻く外套細胞の間に認められ、神経線維の部分には PrP<sup>SC</sup> を検出することは出来なかった。神経線維部で PrP<sup>SC</sup> の免疫染色で染まらないのはこの部位での蓄積が極めて少量であり、検出感度が Wb 法ほど検出感度の高くない免疫組織化学では検出する事が出来なかったと思われる。

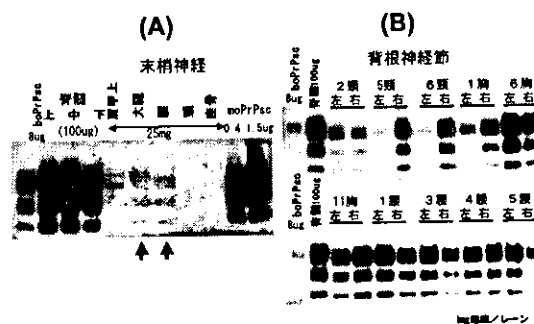


図-1 陽性ウシ（神奈川-2）の末梢神経(A)及び背根神経節(B)における PrP<sup>SC</sup> の蓄積

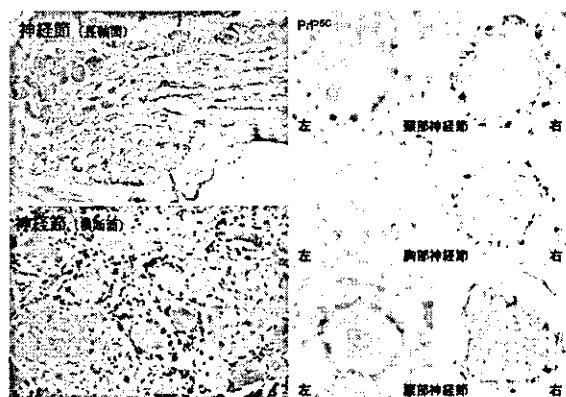


図-2 神奈川 2 例目の BSE 陽性牛の背根神経節における PrP<sup>SC</sup> の蓄積

## 2. PrP<sup>SC</sup> の検出感度の比較

### 2-1. ELISA 法での検出感度:

全頭検査での使用が認可されている検査キット 2 種及び開発中のキット 1 種の計 3 種の検査キットを用いて、作成した脳乳剤中の PrP<sup>SC</sup> の量を比較した（図-3）。いずれのキットを用いた場合においても、10%乳剤の 100 倍希釈液（100  $\mu\text{g}$  組織量/well）を用いた場合に OD 値が cut-off に近い値を示す事から、これらの検査キットはほぼ同等の検出感度を有する事が判った。

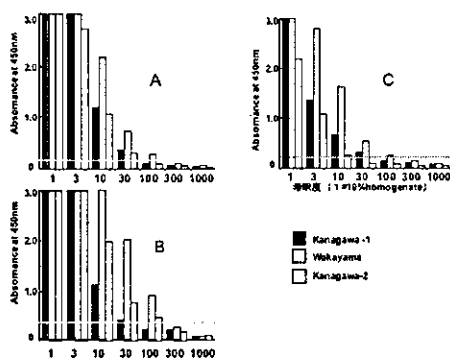


図-3 BSE 検査用エライザキットの PrP<sup>SC</sup> の検出感度の比較。

### 2-2. WB 法での検出感度:

図-4 に上記の脳乳剤から確認検査要項に準じて酵素処理して試料を作成し、段階希釈して WB 法で分析した例を示した。mAb44B-1 を一次抗体とし、ECL で検出した時に組織量 2 $\mu$ g に含まれる PrP<sup>SC</sup> を検出する事が出来た。図には示さないが、神奈川-2 の脳乳剤では PrP<sup>SC</sup> の検出に 4  $\mu$ g の組織量を必要とした。これらのことから、確認検査における WB 法の感度は一次検査で広く使われている ELISA 法の 50 倍程度の高感度で PrP<sup>SC</sup> を検出できることが判った。

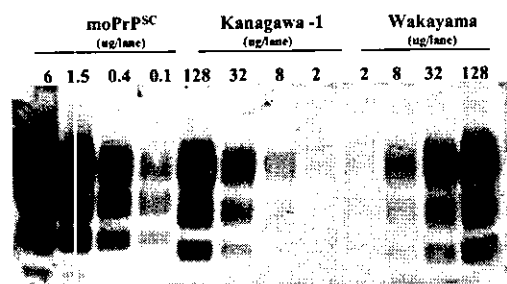


図-4 ウェスタンブロット法による PrP<sup>SC</sup> の検出感度。(ECL, 44B1 抗体)

### 2-3. Tg マウスを用いた BioAssay の検出感度:

本研究班の松田が作出したウシ・プリオンタンパクを発現するトランスジェニック・マウス (#39Tg-hemi) に和歌山例の脳乳剤を希釈し、その 25 $\mu$ l を脳内に接種して径時的に脳、脾臓における PrP<sup>SC</sup> を WB 法で検出した。実験は未だ継続中であるが、図-5 に接種後 244 日に安楽殺したマウスの脾臓に蓄積した PrP<sup>SC</sup> を WB 法で分析した結果を示した。5%脳乳剤を 1,000 倍希釈して接種したマウスの脾臓には PrP<sup>SC</sup> の蓄積が認められたが、10,000 倍希釈では蓄積を認める事は出来なかった。この結果から、#39Tg-hemi マウスに PrP<sup>SC</sup> を感染

させるのに必要な最低の組織量 (最低感染重量) は、現在の時点で 1.25  $\mu$ g であり、和歌山例の 10% 脳乳剤 1 ml には感染価として  $8 \times 10^4$  単位の病原体が含まれていると計算された。なお、図には示さないが、5%脳乳剤を接種したグループでは PrP<sup>SC</sup> の蓄積は脾臓で 106 日、脳では 312 日目に夫々認められているが、それ以上の希釈液では PrP<sup>SC</sup> の増殖が遅い為に PrP<sup>SC</sup> を脳から検出する事は出来なかった。現在、残りのマウスについて経過を観察中である。

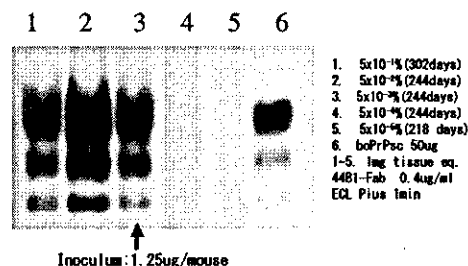


図-5 和歌山例の脳乳剤接種により Tg#39 (+/-) の脾臓に蓄積した PrP<sup>SC</sup>

### D/E. 考察及び結論

#### 末梢の PrP<sup>SC</sup> について

BSE では PrP<sup>SC</sup> は主として脳、脊髄等の中枢神経系に主として蓄積するが、末梢神経である回腸遠位部のアウエルバッハの神経叢に蓄積がある事を報告した (平成 14 年度)。今回、大腿、腰などの神経でごく微量ではあるが、PrP<sup>SC</sup> が WB 法で検出された。当該ウシの脊髄試料及び内部標準試料の発色度から考えて、これら末梢神経での PrP<sup>SC</sup> の蓄積の程度は中枢神経の 1/1,000~1/3,000 と考えられる。最近、BSE 陽性の死亡牛の末梢神経や副腎にも PrP<sup>SC</sup> の微弱な蓄積があることをプリオン病センターの横山等が報告している事や、ヒトのプリオン病であるクロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jacob disease: CJD) 患者の筋肉組織からも PrP<sup>SC</sup> が検出された事などを考え合わせると、PrP<sup>SC</sup> は今までに考えられていたより広範囲に分布している可能性があり、“危険部位”の概念に関して再評価が必要となるかも知れない。

#### 標準試料の作成と PrP<sup>SC</sup> の検出感度について

各種の検出方法で標準試料中の PrP<sup>SC</sup> を検出する為に必要とする最低組織重量を表-1 に示した。本研究班で作成した #39Tg マウスを使い、脾臓の

PrP<sup>Sc</sup> を WB 法で検出する方法が最も高感度であ

脳乳剤	ELISA	W.B.	Bio Assay
	BioRad, レビオ, ニッピ	mAb44B1を用い て確認検査に準拠	#39 Tg(hemi)を用い て評量で判定
和歌山		1-2ug/lane	1.25ug/mouse
神奈川-2	100ug/well	4-8ug/lane	N.D.
神奈川-1		2-4ug/lane	N.D.

表-1 PrP<sup>Sc</sup> の検出に要する最小の組織量

り、今回末梢神経で検出されている様な微量の PrP<sup>Sc</sup> の感染性を検証するのに有用であろう。一方、野外例の BSE では脾臓に感染性が検出されたと言う報告は無く、Tg マウスの脾臓に蓄積した PrP<sup>Sc</sup> の生理的な意味については今後検討されねばならない。

確認検査の WB 法は実用に用いられる方法としては第一世代 ELISA 法の 50 倍程度の感度を有し、一次検査の擬陽性サンプルの確認には十分な感度を有していることが確認された。また、今回用いた ELISA キットの間では、同様な原理 (HRP/MTB) で発色させている事からも予想された事ではあるが、PrP<sup>Sc</sup> の検出感度に大きな差は認められ無かった。

異常型プリオンタンパクの含量 (濃度) は作成した試料毎に違っており、異なる研究所で得られた成績、特に測定感度を相互に比較する為には性状が明らかで、安定な、参照品あるいは標準品が有ると便利である。今回作成した 10%脳乳剤は -80 度で 2 年保存後も ELISA, WB 法で PrP<sup>Sc</sup> の減少は認められていないので、参照 (標準) 品として今後の研究に活用する事が可能で有ると思われる。

## F. 健康危険情報

神奈川-2 例目の陽性ウシの PrP<sup>Sc</sup> の生体内分布を精査した結果、危険部位に指定されていない大腿、腰神経などの末梢神経にも微量 (中枢神経系の 1/1,000 以下) ではあるが PK 抵抗性の PrP<sup>Sc</sup> が WB 法で確認された。最近、BSE 陽性の死亡牛の末梢神経や副腎にも PrP<sup>Sc</sup> の微弱な蓄積があることをプリオン病センターの横山等が報告している事や、ヒトのプリオン病であるクロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jacob disease: CJD) 患者の筋肉組織からも PrP<sup>Sc</sup> が検出された事などを考え合わせると、PrP<sup>Sc</sup> は今までに考えられていたより広範囲に分布している可能性があり、“危険部位”の概念に関して再評価が必要となるかも知れない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kishida H, Sakasegawa Y, Watanabe K, Yamakawa Y, Nishijim M, Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K: Non-glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant-negative mutation inhibits PrP<sup>Sc</sup> replication in vitro. Amyloid: J Protein Folding Disord 11:14-20, 2004.
- 2) 萩原健一、山河芳夫: 非定型 BSE プリオン。「感染・炎症・免疫」, pp44-46, vol.34(3), 2004.

### 2. 学会発表

- 1) Yamakawa Y, Hagiwara K, Nohtomi K, Nakamura Y, Higuchi Y, Sato Y, Sata T and the expert committee for BSE diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Prion 2004: BSE inspection in Japan and finding of atypical PK-resistant Prion Protein(PrPres) in an apparently Jealth 23-month-old Holstein Steer. First International Conference of the European Net Work of Excellence NeuroPrion. May 24-25 Paris, France.
- 2) Yamamoto T, Hattori S, Ushiki Y, Yokoyama T, Tagawa Y, Tsukagoshi-Nagai H, Sata T, Yamakawa Y, Hall WW, Kinoshita N, Irie S: BSE screening kit with simplified preparation method for EIA sample. International symposium: Prion Diseases, Food and Drug Safety. Sendai, Japan, Oct.31-Nov.2, 2004.
- 3) 萩原健一、中村優子、日下芳友、納富香子、大内史子、西島正弘、山河芳夫: MHM2-正常プリオン蛋白質を発現する神経芽細胞 N2a を用いたプリオン蛋白質の構造変換の解析. 第 77 会日本生化学会大会 (横浜) 2004.10.
- 4) 岩浪直子、三川 潮、西道隆臣、山河芳夫、西島正弘、金子清俊: プリオン結合物質のスクリーニング及び抗プリオン活性. 第 77 会日本生化学会大会 (横浜) 2004. 10.
- 5) 土屋耕太郎、山河芳夫、佐多徹太郎、小野寺節、上田 進: 牛プリオンタンパク質に対する新規抗体の作製と性状の解析. 第 52 回日本ウイルス学会 (横浜) 2004.11.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 無し

## 5. ニワトリを用いた抗プリオン モノクローナル抗体の作成とその活用

分担研究者 松田 治男 (広島大学大学院生物圏科学研究科教授)

**研究要旨** ほ乳動物プリオンタンパクを認識するニワトリモノクローナル抗体の作出を行ってきた。抗原を免疫していないニワトリ脾臓細胞から作製したナイーブライブラリーから新たに得られた単鎖型遺伝子組換え抗体 *phAbF1* のウシ BSE サンプルに対する反応性を確認した。また、ニワトリ単鎖型遺伝子組換え抗体 *phAb4-12* の遺伝子に変異を導入し、*phAb4-12* と比較して反応性の高い変異導入抗体が得られた。さらに *phAb3-15* および *phAb4-12* の TAG 付加組換え二価抗体を CHO 細胞発現により調製し、ウシ BSE サンプルに対し著しく高い反応性を有することを確認した。今年度の結果から、既存の scFv 抗体の反応性の改良と、組換え二価抗体化による反応性の増強が可能であることが示された。今後、これらのニワトリ抗体を量産、実用化することにより高感度プリオン検出系に応用できると考えられる。

### A. 研究目的

ほ乳動物プリオンタンパクとニワトリプリオンタンパクの相同性は約 40%と極めて低いことから、ニワトリはほ乳動物プリオンに特異的な抗体の作出に有効な免疫動物であると考えられた。事実、当研究室ではプリオン免疫ニワトリ脾臓細胞から、細胞融合法により抗プリオンモノクローナル抗体、ファージディスプレイ法により抗プリオン scFv 型抗体を作出してきた。これまでに得られたニワトリ抗プリオン抗体は、ほ乳動物プリオンタンパクを幅広く認識し、ウェスタンブロッティングにおいて非特異反応が極めて少ないという優れた特性を有していた。そこで本研究では、遺伝子工学的手法を用いた新規抗プリオン scFv 型抗体の作製、既存の抗プリオン scFv 型抗体の改良、さらに単鎖型抗体の二価抗体化を行うことでプリオン病診断に応用可能なニワトリ組換え抗体を作出することを目的として研究を行った。

### B. 研究方法

**【供試抗体】**当研究室で新たに作製した抗原非免疫ニワトリ脾細胞由来のナイーブファージディスプレイ scFv 抗体ライブラリーから新規抗プリオン scFv 型抗体 *phAbF1* を作出し、異常型プリオンの検出に用いた。ファージディスプレイ法によりプリオン免疫ニワトリ脾細胞由来ライブラリーから選抜した既存の scFv 型抗体 *phAb3-15* および *phAb4-12* をプリオン検出抗体として用いた。

両抗体はマウスプリオンタンパクのプロテアーゼ K(PK) 抵抗性領域を認識することを確認している。*phAb3-15* および *phAb4-12* 抗体 V 領域重鎖 ( $V_H$ ) 遺伝子と抗体 V 領域軽鎖 ( $V_L$ ) 遺伝子を増幅・精製し、各々の C 末に抗体 C 領域遺伝子 ( $C_H$ ,  $C_L$ ) を付加する様に設計した H 鎖発現ベクター、L 鎖発現ベクターに組み込んだ。なお H 鎖発現ベクターには抗体精製用に 6×His 配列を  $C_H$  の C 末に組み込んだ。両発現ベクターを CHO 細胞にトランスフェクションし二価抗体安定発現クローンを選抜した。培養上清からアフィニティークロマトグラフィーにより二価抗体を精製しプリオンの検出に使用した。

**【変異導入法】***phAb4-12* 抗体遺伝子断片を鋳型として、PCR 反応液に Mn を添加、基質添加濃度を不均一にした条件下で scFv 全長の PCR 増幅を行うことにより変異を誘導した。

**【供試サンプル】**BSE サンプルは国立感染症研究所佐多博士より分与された小脳ホモジネート (Kanagawa) を使用した。マウス異常型プリオンは動物衛生研究所横山博士より分与されたスクレイピー-(Obihiro 株) 感染マウスの脳ホモジネートを使用した。精製プリオンタンパクとしてリコンビナントマウスプリオン (MoPrP23-231) およびリコンビナントウシプリオン (BoPrP25-241) を用いた。

**【ウェスタンブロッティング】**ウェスタン用サンプルは、脳ホモジネートを PK (20μg/ml) で 37°C,



40 min 処理後、100,000g で 60 min 遠心して調製した。各種ニワトリ抗体を用いて 1 次抗体反応、HRPO-anti-chicken IgG (H+L) を用いて 2 次抗体反応を行った後、ECL plus を用いてシグナルを検出した。

### C. 研究結果

【新規 scFv 抗体 *phAbF1*】当研究室で抗原を免疫したニワトリから抗プリオン抗体を作出してきた経験上、ある一定の領域を認識する抗体が得られやすい傾向があった。そこで今回、新たなニワトリ抗体作製法として、プリオンタンパクを免疫していないニワトリからの抗体取得を試みた。その結果、MoPrP23-231、BoPrP25-241 および異常型ウシプリオンに特異的に反応する抗体：*phAbF1* が得られ、新たな手法での抗体取得が可能となったことが示された。今後、抗原認識部位の特定や反応性の改良を行っていく必要があるが、これまで得られなかったタイプのニワトリ抗体を作出できる可能性がある。

【変異導入抗体】*phAb4-12* の変異導入抗体を作製し、可溶性 scFv 抗体として精製した。各抗体濃度を合わせた条件で ELISA 法により MoPrP23-231、BoPrP25-241 に対する反応性を測定し比較した結果、*phAb4-12* より高い反応性を有する変異導入抗体が得られた。ウェスタンブロッティング法によりこれらの抗体の異常型ウシプリオンに対する反応性を検出した結果、*phAb4-12* と比較して高い反応性を有していた。これらの結果から、既存のニワトリ抗プリオン scFv 抗体の反応性改良が可能であることが明らかとなった。

【CHO 発現二価抗体】scFv 型抗体 *phAb3-15* および *phAb4-12* を二価抗体化して CHO 細胞に発現させた。培養上清中の抗体濃度は約 2 $\mu$ g/ml であった。アフィニティークロマトグラフィーにより二価抗体を精製し、各種濃度でウェスタンブロッティング法による異常型ウシプリオンの検出を行った結果、2 $\mu$ g/ml が至適条件であった。今回作製した二価抗体は scFv 抗体と比較して正常型プリオン、異常型プリオンに対し著しく高い反応性を示した。この結果から、既存、新規のニワトリ scFv 抗体を二価抗体化することで、より高感度のニワトリ抗体を作製することが可能であることが示された。

### D. 結論

新たな抗体作製技術として、ニワトリナイー

ブ scFv 抗体ライブラリーからの抗プリオン抗体の選抜、scFv 型抗体の遺伝子工学的手法による反応性改良、さらには二価抗体型の遺伝子組換えニワトリ抗プリオンモノクローナル抗体が作製可能となった。

### E. 健康危険情報

特に問題となる危険は無かった。

### F. 研究発表

- 1) Nakamura N, Shuyama A, Shimokawa M, Miyamoto K, Hojyo S, Horiuchi H, Furusawa S, Matsuda H: Establishment of a chicken monoclonal antibody panel against mammalian prion protein. J Vet Med Sci 66:807-814, 2004.
- 2) Kikuchi Y, Kakeya T, Sakai A, Takatori K, Nakamura N, Matsuda H, Yamazaki T, Tanamoto K, Sawada J: Propagation of a protease-resistant form of prion protein in long-term culture human glioblastoma cell line T98G. J Gen Virol 85:3449-3457, 2004.
- 3) Nishibori N, Shimamoto T, Horiuchi H, Furusawa S, Matsuda H: Expression vectors for chicken-human chimeric antibodies. Biologicals 32:213-218, 2004.

### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 6. 高親和性抗プリオンタンパク質抗体の作製とその利用

分担研究者 千葉 丈 東京理科大学基礎工学部  
研究協力者 佐多徹太郎 国立感染症研究所感染病理部  
山河 芳夫 国立感染症研究所細胞化学部  
堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究科

研究要旨 ウシのプリオンタンパク質 (BoPrP<sup>c</sup>) をコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを、プリオンタンパク質をノックアウトしたマウスに直接投与して遺伝子 (DNA) 免疫を行い、プリオンタンパク質に特異的なモノクローナル抗体 (2G11) を調製した。2G11 (IgG2b) は、マウス正常型プリオンタンパク質を発現する神経細胞を用いた FACS 解析で、細胞膜プリオンタンパク質との強い結合反応を示した。また、ウシ及びマウスのリコンビナントプリオンタンパク質を抗原とした ELISA 及びウェスタンブロッティング (WB) で、それぞれのプリオンタンパク質と反応し、ウシ、マウスの神経組織用いた WB では、それぞれのプリオンタンパク質を検出した。プリオン病罹患患者および動物の脳組織をプロテアーゼ処理し、WB で異常型プリオンタンパク質を検出したところ、sCJD (ヒト) と Scrapie (ヒツジ) では 2G11 との反応性が保たれたが、BSE (ウシ) では 2G11 との反応性が消失することが明らかになった。2G11 のエピトープは BoPrP<sup>c</sup> の N 末端に存在する octapeptide repeat の一部 (aa86-94 WGQPHGGG) であった。ウシのプリオンタンパク質の octapeptide repeat に存在する 1 回余分な repeat がプロテアーゼ感受性に大きな影響を及ぼしている可能性が、2G11 を用いることによって初めて明らかにできたものと思われる。sCJD、Scrapie、BSE の脳組織の染色では、これまで報告されているモノクローナル抗体の反応性とは異なり、2G11 によって神経細胞膜上のプリオンタンパク質のみが検出され、細胞質内のプリオンタンパク質は検出されなかった。細胞質内に検出されるプリオンタンパク質は、リソソームで N 末端が分解された異常型コアタンパク質であるとされているので、octapeptide repeat が神経細胞膜上の正常型プリオンタンパク質では保持されているが、細胞質内の異常型コアタンパク質では消失していることが 2G11 を用いることによって初めて証明できたものと思われる。2G11 は、これまで不明であったプリオンタンパク質構造変換の機構解明や異常型プリオンタンパク質の細胞内での蓄積などの研究に役立つと思われる。

### A. 研究目的

これまでプリオンタンパク質に対する様々な抗体が作製され、正常型および異常型プリオンタンパク質の検出に用いられている。本研究では、これまでに調製され、かつ一般に入手できる抗体よりも親和性が高い抗体を、我々の確立した遺伝子 (DNA) 免疫法を用いて調製することを目的とする。これまでに作製されたほとんどの抗体は、大腸菌で発現させて精製した組み換えプリオンタンパク質やプリオンタンパク質のアミノ酸配列の一部を合成したペプチドを抗原として調製されている。プリオンタンパク質の機能は依然不明であるが、プリオンタンパク質は糖鎖修飾されている細胞膜タンパク質であり、プリオンタンパ

ク質の立体構造の形成と維持には糖鎖修飾が必須であると考えられている。大腸菌を用いて調製したプリオンタンパク質を抗原として免疫した動物で産生されたこれまでの抗体レパートリーには、立体構造を認識する抗体はほとんど含まれていない可能性がある。また、合成ペプチドを抗原とした場合にも、立体構造を認識する抗体が得られる可能性は低い。プリオンタンパク質をコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを動物に投与して抗体応答を誘導する遺伝子 (DNA) 免疫では、生体内で発現し、糖鎖修飾されて正しい立体構造をとっているプリオンタンパク質を認識できる抗体が産生される可能性が高い。このような抗体レパートリーの中から、これまでの抗体の

認識するエピトープとは異なるエピトープを認識する抗体で、プリオンタンパク質の構造変換の機構解明などに有用なモノクローナル抗体を調製することを最終目的とする。

## B. 研究方法

PrP<sup>c</sup> ノックアウトマウスは共同研究者の国立感染症研究所松田潤一郎博士より供与された。ウシ（ホルスタイン）プリオンタンパク質 (BoPrP<sup>c</sup>) をコードする遺伝子は共同研究者の国立感染症研究所の高橋秀宗博士より供与された。BoPrP<sup>c</sup> 遺伝子を遺伝子免疫用ベクターに組み込み、我々の開発したプロトコールにより PrP<sup>c</sup> ノックアウトの筋肉に直接投与して遺伝子免疫を行い、ハイブリドーマの作製を行った。得られたモノクローナル抗体の中からアイソタイプが IgG2b であり、大腸菌を用いて調製されたウシ、マウスの組換えプリオンタンパク質を用いた ELISA および WB で強い反応性を示した 2G11 抗体を選択し、その認識する抗原についての解析を行った。正しい立体構造をとっている PrP<sup>c</sup> との反応性を調べるために、マウス神経細胞株を用いた FACS 解析を行った。さらに、PrP<sup>c</sup> との反応性はマウスとウシの正常脳組織を用いたウエスタンブロッティングで解析した。2G11 のエピトープは、北海道大学大学院獣医学研究科 堀内 基弘先生のご協力を頂き、octapeptide repeat 付近でトランケイトさせたリコンビナントウシプリオンタンパク質を抗原とした WB によって同定した。2G11 エピトープのプロテアーゼ感受性は、sCJD 罹患患者と Scrapie や BSE 罹患動物のの脳組織を常法によりプロテアーゼ処理し、ウエスタンブロッティングで検討した。変異型および正常型プリオンタンパク質の組織内・細胞内分布を検討する目的で、sCJD 罹患患者と Scrapie や BSE 罹患動物の脳組織標本を用いて免疫染色を行った。

### (倫理面への配慮)

マウスの取り扱いは動物保護に配慮し、東京理科大学実験動物委員会規定を遵守して行われた。

## C. 研究結果

BoPrP<sup>c</sup> をコードする遺伝子を組み込んだプラスミドで免疫された PrP<sup>c</sup> ノックアウトマウスの血清に、種を越えてプリオンタンパク質に反応する力価が非常に高い抗プリオンタンパク質抗体が証明された。このマウスの脾細胞を用いて調製

された 2G11 は、マウス神経細胞の細胞膜プリオンタンパク質と強く結合することが FACS 解析の結果明らかになり、コントロールの 6H4 モノクローナル抗体よりも高親和性の抗体産生クローンが誘導されていることが示唆された (図 1)。また、ウシ及びマウスのリコンビナントプリオンタンパク質を抗原とした ELISA 及び WB で、それぞれのプリオンタンパク質と反応し、ウシ、マウスの神経組織用いた WB では、それぞれのプリオンタンパク質を検出した (図 2)。プリオン病罹患患者および動物の脳組織をプロテアーゼ処理し、WB で異常型プリオンタンパク質を検出したところ、sCJD (ヒト) と Scrapie (ヒツジ) では 2G11 との反応性が保たれたが、BSE (ウシ) では 2G11 との反応性が消失することが明らかになった (図 3)。2G11 のエピトープは BoPrP<sup>c</sup> の N 末端に存在する octapeptide repeat の一部 (aa86-94 WGQPHGGG) であった (図 4)。sCJD、Scrapie、BSE の脳組織の染色では、これまで報告されているモノクローナル抗体の反応性とは異なり、2G11 によって神経細胞膜上のプリオンタンパク質のみが検出され、細胞質内のプリオンタンパク質は検出されなかった (図 5、図 6)。

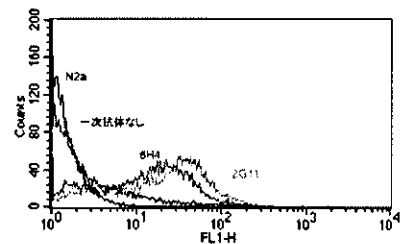


図1 2G11抗体のN2a細胞との反応性(FACS解析)  
N2a細胞(mouse neuroblastoma cell line)は正常型プリオンタンパク質を発現している。  
6H4抗体は哺乳類のプリオンタンパク質に反応するマウスIgG1抗体である。

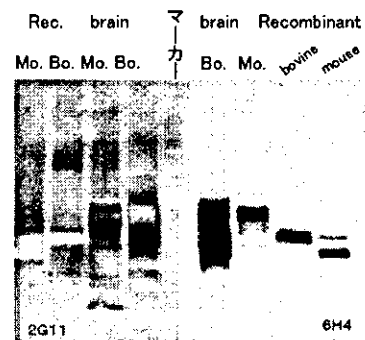


図2 リコンビナントプリオンタンパク質および脳組織由来正常型プリオンタンパク質を抗原としたウエスタンブロッティング  
6H4は0.4μg/mL、2G11は5μg/mLの濃度で反応させた。

## D. 考察

遺伝子免疫法を用いて PrP<sup>c</sup> に対する強い抗体応答を PrP<sup>c</sup> ノックアウトマウスに誘導することができ、興味深い特異性を示すモノクローナル抗体 2G11 が調製された。2G11 はマウス神経細胞の細胞表面プリオンタンパク質に強く結合することから、2G11 は正しい立体構造をとっている正常型プリオンタンパク質を認識できる抗体である。

2G11 のエピトープは octapeptide repeat に存在し、BSE のそれはプロテアーゼ感受性であり、sCJD や Scrapie のそれはプロテアーゼ耐性であったので、ウシのプリオンタンパク質の octapeptide repeat に存在する 1 回余分な repeat がプロテアーゼ感受性に大きな影響を及ぼしている可能性が、2G11 を用いることによって初めて明らかにできたものと思われる。また、sCJD、Scrapie、BSE の脳組織の染色では、これまで報告されているモノクローナル抗体の反応性とは異なり、2G11 によって神経細胞膜上のプリオンタンパク質のみが検出され、細胞質内のプリオンタンパク質は検出されないという興味深い知見が得られた。細胞質内に検出されるプリオンタンパク質は、リソソームで N 末端が分解された異常型コアタンパク質であるとされているので、octapeptide repeat が神経細胞膜上の正常型プリオンタンパク質では保持されているが、細胞質内の異常型コアタンパク質では消失していることが 2G11 を用いることによって初めて証明できたものと思われる。これらの結果から、2G11 は、これまで不明であったプリオンタンパク質構造変換の機構解明や異常型プリオンタンパク質の細胞内での蓄積などの研究に役立つと思われる。本研究は東京理科大学基礎工学研究科修士課程の高山三和の修士論文として発表された。

## E. 結論

プリオンタンパク質構造変換の機構解明や異常型プリオンタンパク質の細胞内での蓄積などの研究に役立つと思われるモノクローナル抗体 2G11 が調製された。

## F. 研究発表

1. 論文発表 なし。
2. 学会発表 なし。

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし。
2. 実用新案登録 なし。
3. その他 なし。

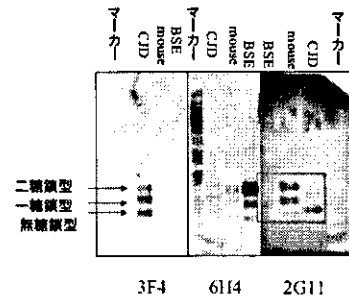


図3 プロテアーゼ処理によるBSEの2G11エピトープの消失  
マウスとヒト (CID) の2G11エピトープはプロテアーゼ処理に耐性であったが、BSEのそれは感受性であった。3F4: 抗ヒトプリオン抗体

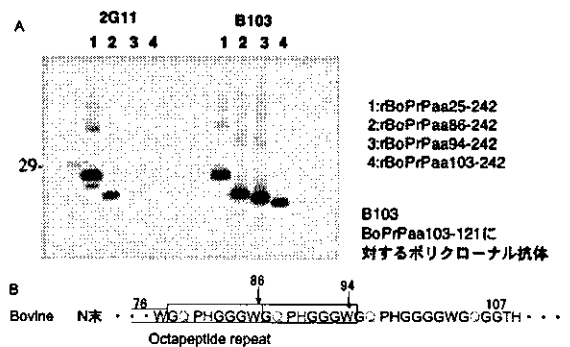


図4 2G11のエピトープマッピング  
Aはトランケートしたリコンビナントウシプリオンタンパク質に対するウェスタンブロット  
Bはウシプリオンタンパク質のaa86-94付近の配列

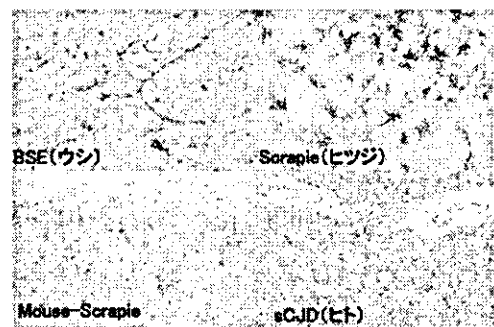


図5 2G11で免疫染色した、BSE、scrapie、mouseに帯広1株 (scrapie)、ヒトsCJDの標本 2G11は通常の免疫染色でウシ、ヒツジ、マウス、ヒトのプリオンと反応する。反応のパターンは基本的に神経線維(神経突起が網目状に存在するところ)に陽性で、ウシやスクレイビーでは顆粒状に、マウスやヒトではいわゆるシナプス型の顆粒状に陽性で、神経細胞質内には陰性。

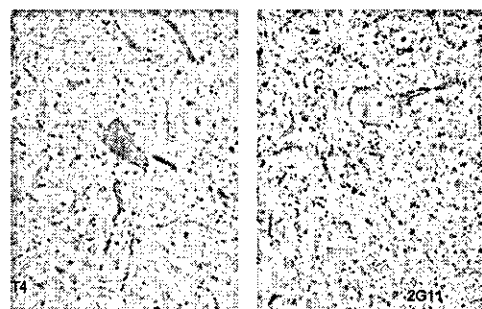


図6 BSE陽性牛検体をT4抗体(通常確認検査に使用しているウサギのポリクローナル抗体)と2G11モノクローナル抗体の免疫染色像  
通常は神経細胞の膜、細胞質内、そして神経突起に沿った陽性所見が得られる(左)が、2G11では、神経細胞の膜と神経突起に陽性所見があり、細胞質内は陰性となる(右)。

## 7. 蛍光相関分光法を利用した BSE 診断の 全自動化システムの構築

分担研究者 田村 守 北海道大学電子科学研究所 教授

研究要旨 蛍光相関分光法 (FCS) を用いた異常プリオンの全自動化検出システムの試作を完了した。本システムは ELESa と同程度の検出感度を有することを確認した。更に、現行の ELISA の～2 ケタ高い生前診断が可能な検出系として、蛍光相互相関法 (FCCS) の可能性を検討し、モデル蛋白質の抗原-抗体反応で～ピコモルオーダーの検出限界を得た。これによりプリオン検出への FCCS 応用の可能性が確認できた。

### A. 研究目的

全自動化 BSE 検査システムの構築と、生前診断の可能性を求めて、蛍光相関分光法による新しい検査システムの完成を目指す。

### B. 研究方法

FCS 検出部として用いるため従来の装置の大幅な小型化によるコンパクト FCS 装置を完成させる。次に、本検出系と、サンプル及び試薬等の分注システムを統合し、全体をパソコンでコントロールし、サンプル採取から光学計測、判定までの全自動化を行う。

### C. 研究結果

1. コンパクト FCS 装置を完成させた。
2. 分注システムとコンパクト FCS を統合した全自動計測システムの試作が完了した。
3. プリオン抗体への蛍光ラベル及び rPrP による抗原検出を試み、ELISA と同等の検出感度を有することを確認した。
4. 現行の ELISA の～2 ケタ高いの超高感度化を目指し、新たに相互相関法 (FCCS) の導入を試みた。
5. モデル蛋白質を用いた場合、数ピコモルの検出感度に得られ、FCCS の全自動化システムの試作も開始した。

### D/E. 考察と結論

ELISA と同程度の全自動 BSE 検査システムの試作が終わり、フィールドの道が開けた。また、FCCS による超高感度検出の可能性を確認できた。今後、更に汎用のシステムを構築したい。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 坂田 啓司、藤井 文彦、金城 政孝、田村 守:  
「蛍光相関分光法 (FCS) を用いた抗原抗体反応解析および検体検出」, 月間バイオインダストリー, 21(4): 52-59 (2004)

#### 2. 学会発表

- 1) Back C, Saito K, Tamura M, Kinjo M: Analysis of the Microenvironment in the Cell Nucleus using "Molecular Ruler" Protein and Fluorescence Correlation. The 57th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Osaka, Japan (2004-05)
- 2) Foldes-Papp Z, Kinjo M, Saito K, Kii H, Takagi T, Tamura M, Costa JM, Birch-Hirschfeld E, Demel U, Thyberg P, Tilz GP: Genotyping by Two-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy: Target amplification. 7th International Carl Zeiss sponsored Workshop on Fluorescence Correlation Spectroscopy and Related Methods; October 5th to 6th 2004, Dresden / Germany
- 3) Takahashi Y, Sawada R, Ishibashi K, Mikuni S, Kinjo M: The analysis of cellular functions by multipoint Fluorescence Correlation

Spectroscopy. 7th International Carl Zeiss sponsored Workshop on Fluorescence. Correlation Spectroscopy and Related Methods. October 5th to 6th 2004, Dresden / Germany

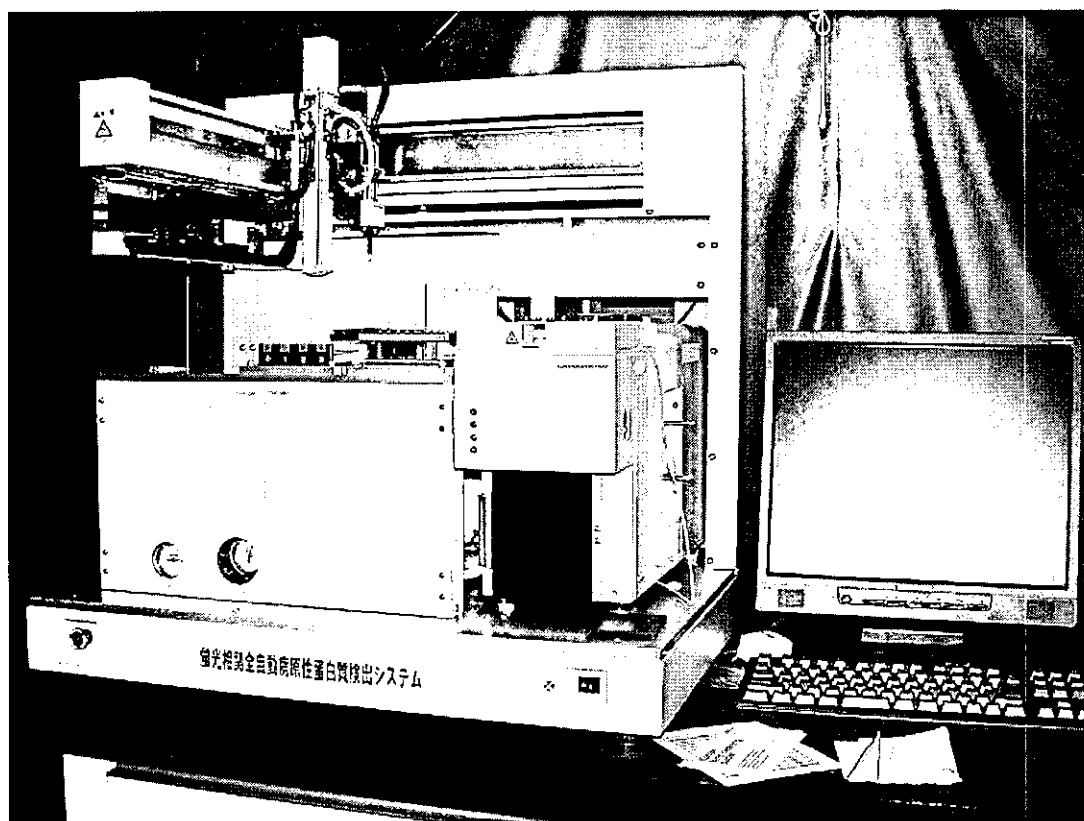
- 4) Sakata H, Fujii F, Tamura M, Kinjo M: Antigen-antibody reaction analysis with Fluorescence Correlation Spectroscopy 7th International Carl Zeiss sponsored Workshop on Fluorescence. Correlation Spectroscopy and Related Methods. October 5th to 6th 2004, Dresden / Germany
- 5) Pack C, Saito K, Tamura M, Kinjo M: Dynamics of tandem green fluorescent proteins at nucleus in living cell. 7th International Carl Zeiss sponsored Workshop on Fluorescence Correlation Spectroscopy and Related Methods; October 5th to 6th 2004, Dresden / Germany
- 6) Saito K, Wada I, Tamura M, Kinjo M: Fluorescent protein-based cross-correlation analysis in living cells. 7th International Carl Zeiss sponsored Workshop on Fluorescence

Correlation Spectroscopy and Related Methods; October 5th to 6th 2004, Dresden / Germany

- 7) Fujii F, Sakata H, Ueno M, Yanagiya T, Tamura M, Kinjo M: Detection of recombinant bovine prion protein by fluorescence correlation spectroscopy. International Symposium of Prion Diseases. Sendai, Japan, October 31 to November 2, 2004

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 特許取得

- 1) 2004年6月3日、蛍光相関分光法による抗原の迅速検出及び／又は測定法、発明者：金城政孝、堀内基広、藤井文彦、坂田啓司、田村 守、上野雅由、柳谷孝幸、出願人：独立行政法人科学技術振興機構、富士レピオ株式会社、アメリカ、特願2004-166440
- 2) 2004年9月22日、水溶性蛍光材料およびその製造方法、発明者：金城政孝、田村 守、藤井文彦、坂田啓司、神隆、出願人：独立行政法人科学技術振興機構、日本、特願2004-275675



蛍光相関全自動病原性蛋白質検出システム

## 8. プリオンの増殖に関与する補助因子の探索

分担研究者 堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究協力者 西村有起、石川謙介（東北大学大学院医学系研究科）

研究要旨 プリオンの複製増殖に関与する補助因子の同定を目指して、プリオン持続感染細胞を用いて RNA 干渉による遺伝子スクリーニングを行った。140 個の遺伝子の解析を終了し、候補となる 8 個の遺伝子を同定した。

### A. 研究目的

プリオンすなわち異常型プリオン蛋白の複製増殖の機構は未だ解明されておらず、そのためより有効な早期診断法や治療法の開発が遅れている。そこで、本年度はプリオンの複製増殖に関与する補助因子の同定をめざして、RNA 干渉による遺伝子発現抑制スクリーニング法を用いて候補因子の探索を行った。

### B. 研究方法

#### 1) siRNA 発現ベクターの作製

プリオン蛋白に結合する分子、細胞表面に発現する分子を標的にし、それぞれの遺伝子に特異的な配列 21 塩基を選択した。選択配列のセンス配列とアンチセンス配列の間にループ配列を挿入し、さらに 3' と 5' 末端側に制限酵素配列を付けた二本鎖オリゴ DNA を作製した。DNA を siRNA 発現用ベクターに組み込み、siRNA 発現コンストラクトを得た。

#### 2) プリオン持続感染細胞への遺伝子導入

異常型プリオン蛋白を持続的に発現しているマウス神経芽細胞種細胞 (ScN2a) を 10% で 6 穴ディッシュに植継ぎ、翌日に発現ベクター 0.4 µg/穴を細胞に導入した。導入後 6 時間後に培地中の血清濃度を 15% にし、導入から 3 日間培養した。

#### 3) 異常型プリオン蛋白の検出

培養後の細胞を溶解し、溶解液に PK 10 µg/ml を加えて 37°C で消化したものを SDS-PAGE 後に PVDF 膜に転写した。プリオン蛋白の検出は SAF83 抗体 (SPIbio) を用いた化学発光法 (CDP-star, アマシャムファルマシア) で行い、X 線フィルムに感光した。得られたイメージは NIH Image を用いて数値化し、ベクターのみを導入した細胞 (mock) での異常型プリオン蛋白の発現を 100%

とした相対比較を行った。

#### 4) 標的遺伝子の半定量的発現解析

細胞に 0.5 ml ISOGEN (ニッポンジーン) を加えて全 RNA を抽出し、SuperScript III (インビトロジェン) を用いて oligo d(T)<sub>20</sub> による cDNA の合成を行い、Ex Taq (タカラ) で標的遺伝子に対する PCR を行った。アガロース電気泳動後に NIH Image を用いて標的遺伝子の PCR 産物量を数値化し、比較した。内部標準として G3PDH、β-actin を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では倫理面に配慮する実験を含んでいない。

### C. 研究結果

マウスプリオン蛋白遺伝子の発現抑制効果が確かめられている 21 塩基配列 (GGGCCCTGGTGGCTACATGCT; Biochem Biophys Res Commun 2003, 305 (3):548-551) を用いた異常型プリオン蛋白の発現抑制をポジティブコントロール (PrPsi) とした。遺伝子導入 72 時間後の結果では、ベクターのみ (mock) ではプリオン蛋白が発現しているのに対し、PrPsi では総プリオン蛋白量では約 60%、異常型プリオン蛋白量では約 80% の発現抑制効果が認められた。この時のプリオン蛋白の mRNA 量は約 90% 抑制されていた。

異常型プリオン蛋白検出の迅速化を狙い、従来のウエスタンブロット法に代わり、ドットブロット法での検出系を検討した。ドットブロット法では培養容器も 96 穴プレートを用いるため、一度に多くの遺伝子がスクリーニング出来、操作も簡便であった。PrPsi を作用させた場合の異常型プリオン蛋白の発現抑制効果 (タンパク質レベルで

80%) の判別が十分に可能であった。

現在までに 140 遺伝子についてのスクリーニングが終了し、異常型プリオン蛋白の発現を抑制する 7 個の遺伝子と、異常型プリオン蛋白の発現を亢進する 1 個の遺伝子を確認した。このうち 2 個の遺伝子については mRNA の発現抑制についても検討した結果、これらの遺伝子の導入によるプリオン蛋白 mRNA 発現への影響は認められなかったが、標的遺伝子の mRNA 発現量はそれぞれ約 40%、約 20% の抑制が認められた。

#### D. 考 察

今回発見した異常型プリオン蛋白の発現量に影響を与える遺伝子産物は、いずれも神経細胞特異的に発現している分子ではなく、ほぼどの細胞にも共通して発現している分子であった。異常型プリオン蛋白の感染には感染因子となる異常型と正常型プリオン蛋白との接触が必要だと考えられており、異常型プリオン蛋白の複製増殖に関与する因子としては細胞接着や糖鎖関連因子などが候補である可能性がある。さらに異常型プリオン蛋白と接触することにより、細胞内へ何らかのシグナルが伝達される可能性も予想される。また、プリオン蛋白は細胞膜ラフトで異常型への変換反応が起きていると考えられており、ラフトの構成成分であるコレステロールに関連したのも候補と考えられる。今回同定した 8 個の遺伝子とこれらの候補分子との関連については、今後解析を進めていく予定である。また、これらの遺伝子産物が、診断マーカーや治療のターゲット分子となりえるかどうかについても検討を進めていく。

#### E. 結 論

プリオンの複製増殖に関与する補助因子を探索し、候補として 8 個の遺伝子を同定した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Todd NV, Morrow J, Doh-ura K, Dealler S, O'Hare S, Farling P, Duddy M, Rainov NG: Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect Dis*, 2005. (in press)
- 2) Sasaki K, Doh-Ura K, Wakisaka Y, Tomoda H, Iwaki T: Fatal familial insomnia with an unusual prion protein deposition pattern: an autopsy report with an experimental transmission study. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 31:80-7, 2005
- 3) Shiga Y, Miyazawa K, Sato S, Fukushima R, Shibuya S, Sato Y, Konno H, Doh-ura K, Mugikura S, Tamura H, Higano S, Takahashi S, Itoyama Y: Diffusion-weighted MRI abnormalities as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*. 63:443-9, 2004
- 4) Furukawa H, Doh-ura K, Sasaki K, Iwaki T: Accumulation of prion protein in muscle fibers of experimental chloroquine myopathy: in vivo model for deposition of prion protein in non-neuronal tissues. *Lab Invest* 84:828-35, 2004.
- 5) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, Race R, Iwaki T: Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* 78:4999-5006, 2004.
- 6) Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y, Murakami-Kubo I, Ando Y, Sawada T, Iwaki T: Amyloid imaging probes are useful for evaluation and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Gen Virol* 85:1785-90, 2004.
- 7) Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R, Shirabe S, Yamamoto K, Udono H, Ito T, Katamine S, Niwa M: A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine. Contamination with bacterial outer membrane proteins. *J Biol Chem* 279: 23661-23667, 2004.
- 8) Murakami-Kubo I, Doh-ura K, Ishikawa K, Kawatake S, Sasaki K, Kira J, Ohta S, Iwaki T: Quinoline derivatives are therapeutic candidates for transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol* 78:1281-1288, 2004.
- 9) Jin K, Shiga Y, Shibuya S, Chida K, Sato Y, Konno H, Doh-ura K, Kitamoto T, Itoyama Y: Clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation. *Neurology* 62:502-505, 2004.
- 10) Tsuji Y, Kanamori H, Murakami G, Yokode M, Mezaki T, Doh-ura K, Taniguchi K, Matsubayashi K, Fukuyama H, Kita T, Tanaka M: Heidenhain variant of Creutzfeldt-Jakob disease: diffusion-weighted MRI and PET characteristics. *J Neuroimaging* 14:63-66, 2004.



## 2. 学会発表

### 国際学会

- 1) Sasaki K, Doh-ura K, Iwaki T: New pretreatment method for immunohistochemistry for abnormal prion protein. International Symposium of Prion Diseases -food and drug safety-, Sendai, Oct.31-Nov.2, 2004.
- 2) Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R, Shirabe S, Yamamoto K, Udono H, Ito T, Katamine S, Niwa M: A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine: contamination with bacterial outer membrane proteins. International Symposium of Prion Diseases -food and drug safety-, Sendai, Oct.31-Nov.2, 2004.
- 3) Miyamoto T, Sadatomi R, Tanaka H, Higuchi R, Kawatake S, Doh-ura K: Can Forage Grasses inhibit Prion Replication? International Symposium of Prion Diseases -food and drug safety-, Sendai, Oct.31-Nov.2, 2004.
- 4) Ishikawa K, Kudo Y, Doh-ura K: Inhibition of abnormal PrP formation by amyloid-imaging probes in vitro. International Symposium of Prion Diseases -food and drug safety-, Sendai, Oct.31-Nov.2, 2004.
- 5) Tsuboi Y, Fujiki F, Yamauchi A, Doh-ura K, Kataoka Y, Yamada T: Treatment with Anti-malaria Agents, Quinacrine and Quinine, for Creutzfeldt-Jakob disease patients. International Symposium of Prion Diseases -food and drug safety-, Sendai, Oct.31-Nov.2, 2004.

### 国内学会

- 1) 堂浦克美: プリオン病: 遺伝子異常と臨床像・病理像及び治療薬開発の展望. 第45回日本神経学会総会 (東京) 2004.5.13.
- 2) 堂浦克美: 治療開発の現状と展望. 市民講座「ヤコブ病の対策の現状と克服へ向けての歩み」(仙台) 2004.10.31.
- 3) 堂浦克美: アミロイド結合化合物のプリオン病診断・治療への応用. 第2回東北アミロイド研究会 (仙台) 2004.12.17.
- 4) 堂浦克美: プリオン病治療法の開発. 第7回生命化学研究会シンポジウム (仙台) 2005.1.21.

## G. 知的所有権の出願・登録状況

- 1) 横田博, 堂浦克美: 体外診断キット及び体外診断方法. 特願 2004-216510、2004年7月23日
- 2) 竹中繁織, 野島高彦, 大塚圭一, 堂浦克美: 異常プリオンの電気化学的検出方法. 特願 2004-287562、2004年9月30日

## 9. プリオン蛋白の細胞内動態と食品試験への応用

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

研究協力者 手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部

研究要旨 プリオン病の発症機構の解明を目的とし、継代を重ねた後の長期間培養により蛋白質分解酵素処理抵抗性プリオン蛋白質 (PrPres) を産生するヒトグリオブラストーマ細胞株T98GのmRNA発現様式を解析した。様々な条件下で培養したT98G細胞からtotal RNAを調製し、プリオン蛋白質 (PrP) のC末端部位に相当する塩基配列を検出するRT-PCRを行った。短期間又は継代数が少ない培養条件下では、T98G細胞は通常のmRNAを発現していた。一方、継代を重ねた後に長期間培養するPrPresを産生する条件下では、通常のmRNAと共に、PrPのC末端とGPIアンカーシグナル配列を欠損したスプライス変異型PrPのmRNAを発現していた。塩基配列から推定されるアミノ酸配列は230残基の蛋白質で、その1-217残基はPrPと共通だった。次に、スプライス部位を横断したエクソン結合部位に特異的な配列を有するプライマー (exon-exon junction primer) を設計し、スプライス変異型PrPのmRNAを検出するRT-PCRを確立した。本法を用いて市販ヒト脳由来total RNAにスプライス変異型PrPのmRNAを検出したことから、新たなPrP発現機構の存在が示唆された。

### 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<sup>Sc</sup>) の解析が望まれている。

人のプリオン病には牛海綿状脳症から種の壁を越えて人に感染した変異型CJD、硬膜移植等によって発症した感染性CJD、プリオン蛋白質遺伝子 (PRNP) にコードされた253残基のアミノ酸に変異がある遺伝型CJD及びPRNPに変異のない散发型CJDが知られ、約85-90%を散发性CJDが占めている。

プリオン病の原因物質であるPrP<sup>Sc</sup>は正常プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) と同一のアミノ酸配列を有するが、その高次構造は異なり、蛋白質分解酵素処理に耐性を示すことが知られている。しかし、PrP<sup>C</sup>からPrP<sup>Sc</sup>への変換を含めて、プリオン病の発症機構は未だに不明である。

本研究ではPrP<sup>Sc</sup>の産生機構の解明を目的とし、継代を重ねた後の長期間の培養により蛋白質分解酵素処理抵抗性プリオン蛋白質 (PrP<sup>res</sup>) を産生するヒトグリオブラストーマ細胞株T98Gを対象とし、各種培養条件下でPRNPがコードするmRNA発現様式の変化を調べた。

### B. 研究方法

1) 細胞培養：ヒトグリオブラストーマ細胞株

T98GはT75組織培養用フラスコで培養し、1週間に1度の継代を行った。長期間の培養は9-cm組織培養用シャーレで行い、4日ごとに培地を交換した。  
2) RT-PCR：T98G細胞を培養後、DNase消化したtotal RNAを調製し、スーパースク립トII RNase H逆転写酵素 (インビトロジェン株式会社) を用いてファーストストランドcDNAを合成した。ヒト脳由来total RNAは日本ベクトン・ディッキンソン株式会社から購入し、同様にファーストストランドcDNAを合成した。PCRはPRNP (GenBank accession no. AL133396) のexon 2にコードされているプリオン蛋白質 (PrP) オープンリーディングフレーム (ORF) のmRNAを検出する各種プライマーと、KOD plus polymerase (東洋紡績株式会社) 又はEx taq polymerase (タカラバイオ株式会社) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規定」及び「国立医薬品食品衛生研究所病原体等安全管理規程」を遵守した。

### C. 研究結果

1) スプライス変異型プリオン蛋白質mRNAの発現 PRNPがコードするmRNAの発現様式を調べる

ため、各種条件下で培養したT98G細胞から調製したtotal RNAを鋳型とし、KOD plus polymeraseを用いてRT-PCRを行った。

2回の継代後に39日間培養したT98G細胞(P2D39)から調製したtotal RNAでは、*PRNP* exon 2の434..961に相当する528 bpのバンドを検出した (Fig. 1a, lane 1)。一方、継代数を重ねた後に長期間培養したT98G細胞 (P13D40及びP19D35) から調製したtotal RNAでは、先のものより短い296 bpのバンドを示した (Fig. 1a, lanes 3 and 5)。継代数を重ねた後の短期間の培養では (P13D24)、528 bpのバンドを示した (Fig. 1b, lane 1)。296 bpのバンドをゲルから切り出してその塩基配列を解析したところ、PrPのC末端とGPIアンカーシグナル配列を含む232塩基対が528 bpの内部から欠落していた (Fig. 1, lower panel)。同時に調製したT98G細胞 (P13D40) のgenomic DNAを鋳型としたPCRでは528 bpのバンドを示し、296 bpと同じ塩基配列は存在しなかった (Fig. 1b, lane 5)。以上の結果から、継代数を重ねた後に長期間培養したT98G細胞では、*PRNP* exon 2のスプライス変異型RNAを発現することが示唆された。

## 2) エクソン結合部位に特異的なプライマー (exon-exon junction primer) を用いたスプライス変異型プリオン蛋白質mRNAの検出

スプライス変異型PrPのmRNAを検出することを目的とし、エクソン結合部位に特異的に結合するプライマー (exon-exon junction primer) を設計し、Ex-taq polymeraseを用いてRT-PCRを行った。

PrPのORFを含む*PRNP* exon2の1..1,433に結合するプライマーを用いたPCRでは、T98G細胞 (P18D24) から調製したファーストストランドDNA及びgenomic DNA中に1,433 bpのバンドを示し (Fig. 2a, lanes 1 and 4)、ゲルから切り出した1,433 bpのバンドの塩基配列は、*PRNP* exon 2と一致した。一方、スプライシングで欠落する部位 (232 bp) を挟み、その両端の配列を結合させたプライマーを用いたPCRは、ファーストストランドDNAに676及び555 bpのバンドを示したが (Fig. 2a, lanes 2 and 3)、genomic DNAではバンドが検出されなかった。また、切り出した676及び555 bpのバンドの塩基配列は、*PRNP* exon 2のそれぞれ908及び787 bpに相当する部位から232 bpの配列が欠落したものと一致した。以上の結果から、設計したexon-exon junction primerはエクソン結合部位と結合し、スプライス変異型PrPのmRNAを特異的に検出可能なことが示された。

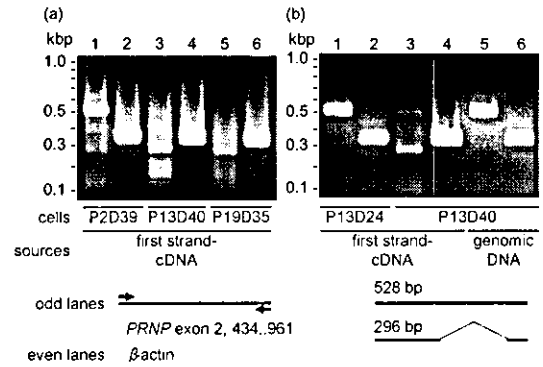


Fig 1. Expression of splice variant of PrP mRNA in T98G cells.

(a) T98G cells were incubated after repeated passages. First strand-cDNA from total RNA (5 µg) were prepared from T98G cells for 39 days after 2 passages (P2D39, lanes 1 and 2), for 40 days after 13 passages (P13D40, lanes 3 and 4), and for 35 days after 19 passages (P19D35, lanes 5 and 6). (b) T98G cells were incubated in long-term. First strand-cDNA from total RNA (5 µg) and genomic DNA (2.5 ng) were prepared from T98G cells for 13 days (P13D24, lanes 1 and 2) and for 40 days after 13 passages (P13D40, lanes 3 -6). The resulting DNA were amplified by PCR using human PrP primer set (odd lanes) and  $\beta$ -actin primer set (even lanes) with KOD Plus polymerase. PCR products were separated on a 2% agarose gel and visualized with ethidium bromide.

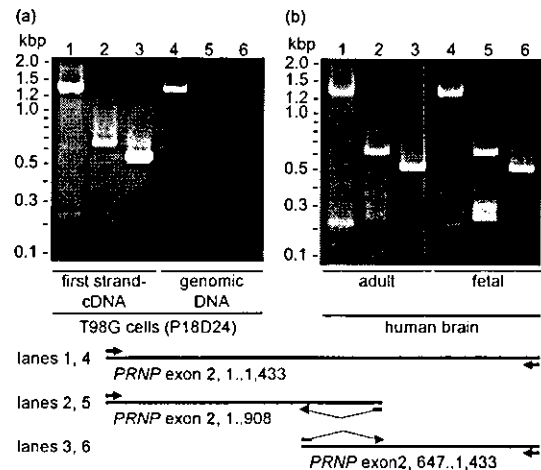


Fig. 2. Detection of splice variant of PrP mRNA using exon-exon junction primers.

(a) T98G cells were incubated for 24 days after 18 passages (P18D24). First strand-cDNA from total RNA (5 µg) and genomic DNA (2.5 ng) were prepared, followed by PCR using *PRNP* exon 2 primer set (1..22 and 1,433..1,411; lanes 1 and 4) and 24-nucleotide exon-exon junction primers (lanes 2-3, and 5-6) with Ex taq polymerase. (b) First strand-cDNA from adult human brain total RNA and human fetal brain total RNA (5 µg each; BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) were prepared, followed by PCR using the *PRNP* exon 2 primer set (lanes 1 and 4) and the exon-exon junction primers (lanes 2-3 and 5-6) with Ex taq polymerase.

次に、市販のヒト脳由来total RNAから調製したファーストストランドDNAを鋳型とし、exon-exon-junction primerを用いたRT-PCRを行った。成人及び胎児の脳から調製したファーストストランドDNAに1,433 bpのバンドと232 bpが欠落した676及び555 bpのバンドが検出され、T98G細胞と同

様にスプライス変異型PrP mRNAの存在が示唆された。

#### D. 考察

先に、ヒトグリオーマ細胞株T98GはPrP<sup>C</sup>を産生し (Kikuchi *et. al.*, 2002, *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 728-733)、継代を重ねた後に長期間培養するとPK処理抵抗性のPrP<sup>res</sup>を産生することを報告した (Kikuchi *et. al.*, 2004, *J. Gen. Virol.* **85**, 3449-3457)。本年度はPrP<sup>res</sup>を産生する条件下で、T98G細胞が発現するPRNPのmRNAの変化を調べた。約3か月間の継代後に1か月間以上培養したT98G細胞から調製したtotal RNAでは、PrPのC末端部位とGPIアンカーシグナル配列が欠落したスプライス変異型のmRNAを発現していたが、低い継代数又は短い培養期間後の細胞では検出されなかった。

本研究で確認したスプライス変異型PrPのORFは230アミノ酸をコードし、1-217残基まではPrPと同じ1次構造を有している (Fig. 3)。PrPと類似の蛋白質として1次構造上23%の相同性を持つDoppelが知られているが、スプライス変異型PrP mRNAのORFが翻訳されると相同性は約94%で、遙かに高い相同性を示している。その推定される分子量はPrPとほぼ同じ値を示し、SDS-PAGE等では分離が難しいことが予測される。現在、PrP及びスプライス変異型PrPのC末端部位をそれぞれ認識するモノクローナル抗体を作製し、mRNAから翻訳された蛋白質の確認を進めている。

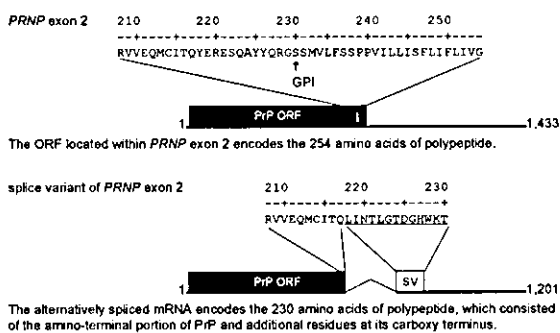


Fig. 3. Schematic representation of alternative splicing model of PRNP exon2 (1..1,433).

スプライス変異型PrP mRNAの発現量は、T98G細胞の培養条件によって変動した。しかし、本研究で設計したexon-exon junction primerを用い、市販のヒトの成人及び胎児脳由来total RNAを鋳型としたRT-PCRで、スプライス変異型PrPのmRNA発現を確認した。従って、exon-exon junction primerは、RT-PCRによるCJD患者脳由来試料等を

用いた発現の確認や、*in situ* PCRによる発現部位の特定などへの応用が期待できる。

今後は特異的にC末端を認識する抗体を用いた蛋白質発現量、細胞内動態及び生体内分布の確認、組換え蛋白質の調製して立体構造の確認等を行う予定である。

#### E. 結論

平成16年度は継代を重ねた後に長期間培養したT98G細胞が、PrPのC末端とGPIアンカーシグナル配列が欠落したスプライス変異型PrP mRNAの発現することを確認した。このmRNAは230残基のアミノ酸をコードするORFを含み、その1-217残基はPrPと共通だった。エクソン結合部位に特異的なexon-exon junction primerを設計し、スプライス変異型PrP mRNAを検出するRT-PCRを構築した。本方法を用い、市販のヒト脳由来total RNAでスプライス変異型PrP mRNAの発現を確認した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kikuchi Y, Kakeya T, Sakai A, Takatori K, Nakamura N, Matsuda H, Yamazaki T, Tanamoto K, Sawada J: Propagation of a protease-resistance form of prion protein in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G. *J Gen Virol* 85:3449-3457, 2004.

##### 2. 学会発表

- 1) 菊池 裕、掛谷知志、酒井綾子、松田治男、山崎 壮、棚元憲一、池田喜久子、山口直人、澤田純一、高鳥浩介：低酸素濃度下で培養したヒトグリオブラストーマT98G細胞株のスプライシング変異プリオン蛋白質遺伝子の発現。第77回日本生化学会大会 (横浜) 2004.10.13-16.
- 2) Kikuchi Y, Kakeya T, Sakai A, Matsuda H, Yamazaki T, Tanamoto K, Ikeda K, Yamaguchi N, Sawada J, Takatori K: Expression of a splice variant of prion protein during hypoxia in human glioblastoma cell line T98G. 「プリオン病国際シンポジウム」—食と医薬品の安全のために— (仙台) 2004.10.31-11.2.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 なし