

厚生労働省科学研究研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

コンフォメーション特異的抗体による簡便で高精度な BSE 診断法の開発研究

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 橋口 周平

平成 18 (2006) 年 3 月

## 目次

### I. 総括研究報告書

コンフォメーション特異的抗体による簡便で高精度な BSE 診断法の開発研究 鹿児島大学工学部生体工学科 橋口 周平 .....	1
--	---

### II. 分担研究報告書

1. コンフォメーション特異的抗体による簡便で高精度な BSE 診断法の開発研究 ～プリオンタンパク質のリフォールディングと物理化学的解析～ 鹿児島大学工学部生体工学科 伊東 祐二 .....	9
2. コンフォメーション特異的抗体による簡便で高精度な BSE 診断法の開発研究 ～コンフォメーション特異的抗体のスクリーニング法の確立～ 鹿児島大学工学部生体工学科 杉村 和久 .....	13

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	19
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	20
-----------------------	----

# 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

総括研究報告書

コンフォメーション特異的抗体による簡便で高精度な BSE 診断法の開発研究

主任研究者：橋口 周平（鹿児島大学工学部生体工学科助手）

研究要旨：プリオンのコンフォメーションを見分ける抗体を作製し、診断治療法の開発へ資することを目的として研究を行った。遺伝子組み換えヒトプリオン分子（aa23-231）からβシート型プリオン蛋白（human PrP (23-231): β-PrP; Scinence 283: 1935-37, 1999）を作製、CD スペクトル解析によりそのコンフォメーションを確認した。この β-PrP はプロテアーゼ抵抗性を示し、オリゴマーであることを明らかにした。作製したβシート型プリオン蛋白の感染性の有無は重要な問題であるが、この β-PrP 分子にヒト抗体ファージライブラリーを直接反応させ、β-PrP 特異的ヒト一本鎖抗体を単離した。この結果により、ファージライブラリー法を用いて、プリオン分子のコンフォメーションをスナップショットする特異的抗体を作製できることを明らかにした。分子の形を見分ける抗体の作製方法が確立できたので、次年度は、感染試料中の異常プリオンだけに反応する抗体の作製を試み、直接的な診断法への応用を試みる。

分担研究者：

杉村 和久 鹿児島大学工学部  
生体工学科教授

伊東 祐二 鹿児島大学工学部  
生体工学科助教授

A. 研究目的

プリオン病はタンパク質の立体構造の変化による変性タンパク質が引き起こす疾病とされ、多くの研究がそれを支持している。この疾病の診断や治療法の開発にゲノム科学が対応できないため、診断・治療法の開発にはプリオン分子の

コンフォメーションについての詳細な情報が必要である。しかしながら、特定の分子の微妙な形の違いを識別する抗体が利用できないがために、病態の解明、プリオン仮説の実験的裏付けが得られていない。プリオン蛋白に反応する抗体を作製する研究は数多く試みられているが、その全ての研究では、プリオン抗原をアジュバントとともに鉱物油で練り上げたものをマウスの腹腔に免疫するという常識的方法で作製された。プリオン病では「プリオン分子のコンフォメーション」が最も重要な解析ポイントであるにもかかわらず、この免疫操作は、リンパ球に認識される時点でのプリオン蛋白の立体構造をコントロールできない盲の研究になっている。本研究では、ヒト抗体を提示しているファージライブラリーを駆使し、*in vitro*で、物理化学的条件を変化させた状態でリフォールディングした様々なコンフォメーションを持つプリオン蛋白に直接反応させ、プリオン蛋白のコンフォメーションを識別できる抗体を作製する。単離されたコンフォメーション特異的抗体の中から、プリオンが感染した脳のホモジェネートを用い、異常プリオンを直接検出

できる抗体を選別し、直接検出による簡便で高感度な診断法開発を目的とする。

## B. 研究方法

### ヒト一本鎖抗体ファージライブラリー

：20名のヒト末梢血リンパ球より単離した mRNA から cDNA を合成し、VH, V<sub>K</sub>, V<sub>λ</sub> 遺伝子群に特異的なプライマーで抗体遺伝子を増幅後、リンカーで連結した V<sub>μ</sub>-V<sub>K</sub>, V<sub>μ</sub>-V<sub>λ</sub> (IgM 系) と V<sub>γ</sub>-V<sub>K</sub>, V<sub>γ</sub>-V<sub>λ</sub> (IgG 系) の scFv 遺伝子を pCANTAB 5E に組み込み、ヒト一本鎖抗体ファージライブラリーを構築した。

### プリオンタンパクのリフォールディング

：Jackson GS (Science 283: 1935-37, 1999) らの方法に準じて、大腸菌の発現系から精製した recombinant human PrP (PrP: aa23-231) を、100 mM dithiothreitol (DTT) 存在下、6M GuHCl, 10 mM Na-acetate, Tris-acetate, pH 4.0 で変性後、酸性緩衝液 (10 mM Na-acetate, Tris-acetate, 1 mM DTT, pH 4.0) に対して透析することでリフォールディングを行った。得られたプリオン蛋白の構造を CD スペクトル、高圧蛍光、NMR、原子間力顕微鏡 (atomic force

microscope: AFM) を用いて解析した。

**パンニング**：リフォールディングしたヒトプリオン蛋白を 35mm Petri dish にコートしブロックした後、ヒト一本鎖抗体ファージライブラリーを反応させ、非特異的なファージを洗浄にて取り除いた後、結合したファージを pH2.2 の 0.1 M glycine-HCl で溶出、回収し増幅した。この操作を 2 回行い、ファージクローンを単離した。プレートへの非特異的に結合したファージの混入を減少させるため、最初のパンニングでは 2.5% skim milk、2 回目のパンニングは 0.5% gelatin をブロック溶液として用いた。

**ELISA**：マイクロタイタープレート (Nunc) に hPrP<sup>C</sup> (80 ng) をコートし、0.25% BSA でブロックした後、単離したファージクローンを反応させた。結合したファージの検出は、ビオチン化した抗 M13 抗体 (Amersham Pharmacia Biotech, CA)、AP 標識ストレプトアビジン (Vector Laboratories, CA) を順次反応させた後、基質溶液 (*p*-nitrophenylphosphate with 10% diethanolamine) を加え 405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定した。

(倫理面への配慮)

リコンビナントプリオン蛋白の取り扱い、感染機序、感染性プリオンの実態が明らかとなっていない現状を踏まえ、全ての実験を遺伝子組換えの P2 レベル実験室で行った。プリオン蛋白は「動物の伝達性海綿状脳症の実験指針について (案)」に基づいて取り扱いを行った。

### C. 研究結果

大腸菌の発現系から精製した recombinant human PrP (PrP: aa23-231) を、Jackson GS (Science 283: 1935-37, 1999) らの方法に準じて、100 mM dithiothreitol (DTT) 存在下、6M GuHCl, 10 mM Na-acetate, Tris-acetate, pH 4.0 で変性後、酸性緩衝液 (10 mM Na-acetate, Tris-acetate, 1 mM DTT, pH 4.0) に対して透析することでリフォールディングを行った。CD スペクトル解析の結果、215 nm において負のスペクトルが認められ、典型的な  $\beta$  シート型の構造にフォールディングされていることが確認された。さらに、作製した  $\beta$ -PrP の原子間顕微鏡解析を行った。その結果、CD で  $\beta$  シート

型吸収を示す  $\beta$ -PrP は、PrP (90-231) を用いて報告された Jackson GS らの結果と異なり、オリゴマーが形成されていることが明らかとなった。また、作製した  $\beta$  シート型プリオン蛋白はプロテアーゼ抵抗性を示した。さらに、0~1.5M GuHCl を加え、オリゴマーから繊維化の過程を ThT assay で 1 ヶ月間モニターしたが、ファイバーの形成は認められなかった。1 ヶ月間放置した  $\beta$  シート型プリオンの AFM 解析でもプリオンの繊維化は認められなかった。

このような物理化学的性質を持った、*in vitro* で  $\beta$  シート型構造に refolding したプリオン (human PrP (23-231):  $\beta$ -PrP) を用いて、抗体ファージライブラリーと直接反応させることで、プリオン蛋白の形の違いを見分ける抗体の作製を試み、 $\beta$ -PrP に特異的な抗体を 2 種類単離した。また、 $\alpha$ -helix 型の PrP ( $\alpha$ -PrP) を用いた探索から、 $\alpha$ -PrP に特異的な抗体を 4 種類単離した。4 種類の抗体はウシおよびヒト由来の  $\alpha$ -PrP と結合するが、1 つの抗体は、ウシに比べてヒト由来の  $\alpha$ -PrP に強い結合活性を示した。これらの抗体は、 $\alpha$ -PrP、アミロイド  $\beta$  ペプチド (A $\beta$ ) モノマー、A $\beta$  フ

アイバーには結合しなかった。

これらの抗体を用いて、 $\alpha$  および  $\beta$ -form プリオンに対する結合特異性を ELISA で評価したところ、 $\beta$ -PrP から単離された抗体は、 $\beta$ -PrP 特異的結合するが  $\alpha$ -PrP に結合できず、逆に  $\alpha$ -PrP から単離された抗体は、 $\alpha$ -PrP に結合するが、 $\beta$ -PrP には反応しなかった。さらに、これらの抗体を用いて Western blotting 解析を行ったところ、SDS-PAGE 後のプリオン蛋白との反応性は認められないことから、単離した抗体は立体構造を認識する抗体であり、コンフォメーション特異的な抗体であると考えられた。以上の結果より、ヒト抗体ファージライブラリーと直接反応させるパンニング方法で、抗原のコンフォメーションをスナップショットした特異的な抗体を作製できることを明らかにした。

ファージライブラリー法を用いて、プリオン分子のコンフォメーションをスナップショットする特異的な抗体を作製する手法が確立できたので、現在、プリオンオリゴマー、プリオンファイバーや感染材料由来のプリオン蛋白を用いて、様々なコンフォーマーに特異的な抗体

パネルの作製を実施している。これらの抗体の中から、感染材料を用いて、異常プリオンだけを見分ける抗体を選別し、高感度な診断法開発を試みる。

#### D. 考察

$\beta$ シート型プリオンを用いて、プリオンのコンフォメーションを識別できる抗体の作製を達成した。しかしながら、プリオンファイバーに関しては、ファイバーの形成が確認できなかったため、現在のところプリオンファイバー特異的抗体は単離されていない。今回作製したコンフォメーション特異的抗体は、リコンビナントプリオン蛋白を用いて得られた抗体であり、感染試料中の異常プリオンを見分ける抗体であるのか解析する必要がある。今回作製された  $\beta$ -PrP 特異的抗体の感染試料との反応性については現在解析を進めている。

プリオン病においては、プリオンの感染性と構造、毒性と構造の相関といった分子基盤を明らかにすることが、診断法、治療法を開発する上で重要であり、分子がもつコンフォメーションを識別する抗体を作製することは、その構造と生物学的活性を調べる上で強力な武器とな

る。近年、*in vitro* で作製されたプリオンファイバーが感染性を有していたことが報告されたが、異常型プリオンタンパク質だけに結合する抗体の作製を確実なものにするために、リコンビナントプリオン蛋白を用いたアプローチだけでなく、感染試料を用いた抗体のスクリーニングについても実施する予定である。

#### E. 結論

抗体ファージブラリーを、*in vitro* で、物理化学的条件を変化させた状態でリフォールディングした様々なコンフォメーションを持つプリオン蛋白に直接反応させることで、コンフォメーション特異的抗体を作製する手法を確立した。作製したコンフォメーション特異的抗体をプローブとして、作製した  $\beta$ -PrP のコンフォメーション変化を経時的に調べたところ、 $\beta$ -PrP への結合活性が変化して増強した。この結果により、コンフォメーションをファージライブラリーでスナップショットして単離した特異的抗体をプローブとすることで、 $\beta$ -PrP 分子の構造変化を追跡できることを初めて明らかにした。作製されたコ



コンフォメーション特異的抗体から異常プリオンを直接識別できる抗体を達成し、さらにこの特異的結合を高度に増幅する手法が確立できれば、異常プリオンを直接検出できる検査法を確立できる。異常型プリオン特異的抗体を確実なものとするため、構造変化したプリオンの作製と抗体単離は継続して実施する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 学会発表

1. S. Hashiguchi, M. Yamamoto, S. Kitamoto, T. Nakashima, H. Yamanaka, D. Ishibashi, S. Sakaguchi, S. Katamine, Y. Ito, K. Sugimura  
Prion-conformation-specific human antibodies established from phage display library.  
Prions: Food and Drug Safety (Ed. T. Kitamoto), 191-192 (2005)
2. Shuhei Hashiguchi, Sho Kitamoto, Kotaro Sakamoto, Yuji Ito, Toshihiro Nakashima, Ken Sasaki, Jyoti U Gaikwad, Kazuyuki Akasaka, Suehiro Sakaguchi, Shigeru Katamine, Kazuhisa Sugimura.  
Human antibodies specific to beta-sheet-rich isoform of human prion protein.

Cambridge Healthtech Institute's 6th annual international conference: Recombinant antibody, April 2005, Boston

3. 橋口周平、北本祥、久保田俊也、今泉智之、中島敏博、坂口末廣、片峰茂、佐々木健, Jyoti U. Gaikwad, 赤坂一之、伊東祐二、杉村和久  
コンフォメーション特異的抗体によるプリオンの構造変異の追跡  
プリオン研究会、山形、天童市、2005
  4. 橋口周平、北本祥、久保田俊也、今泉智之、中島敏博、坂口末廣、片峰茂、佐々木健, Jyoti U. Gaikwad, 赤坂一之、伊東祐二、杉村和久  
プリオンのコンフォメーション変化を識別する抗体プローブの作製  
日本免疫学会総会・学術集会記録 **35**: p80 (2005)
  5. S. Kitamoto, S. Hashiguchi, Y. Ito, T. Nakashima, S. Sakaguchi, S. Katamine, K. Sasaki, J. U. Gaikwad, K. Akasaka, K. Sugimura  
Human antibodies specific to beta-sheet-rich isoform of human prion protein.  
生化学 **77**: p1043 (2005)
  6. T. Hamasaki, S. Uchida, S. Hashiguchi, Y. Ito, K. Sugimura  
Antibody-phage library clones panned on ELISA plate coated with PAGE gels.  
生化学 **77**: p1090 (2005)
- #### H. 知的所有権の出願・登録状況

# 分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

分担研究報告書

コンフォメーション特異的抗体による簡便で高精度な BSE 診断法の開発研究  
ープリオンタンパク質のリフォールディングと物理化学的解析ー

分担研究者：伊東 祐二（鹿児島大学工学部生体工学科助教授）

研究協力者：研究協力者：橋口周平、杉村和久（鹿児島大学工学部生体工学科）

赤坂一之 （近畿大学生物理工学部生物工学科）

片峰 茂 （長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）

研究要旨：本研究の目的であるプリオン病の直接的な診断法を開発のための鍵となる、プリオンのコンフォメーションを見分ける抗体を作製するためのプリオン蛋白のリフォールディングを行った。遺伝子組み換えヒトプリオン分子（aa23-231）を用いて、 $\beta$ シート型プリオン蛋白（human PrP (23-231):  $\beta$ -PrP; Scinence 283: 1935-37, 1999）を作製し、その物理化学的解析を行った。その結果、酸性、還元条件下でリフォールディングされたプリオン分子は、 $\beta$ シート型の構造をとっており、原子間力顕微鏡（atomic force microscope: AFM）を用いて解析した結果、繊維状ではなく、 $\beta$ -PrP が、ある程度の集合体を形成していることが明らかになった。この  $\beta$ -PrP はプロテアーゼ抵抗性を示した。

A. 研究目的

プリオン病はタンパク質の立体構造の変化による変性タンパク質が引き起こす疾病とされ、多くの研究がそれを支持している。この疾病の診断や治療法の開発にゲノム科学が対応できないため、診断・治療法の開発にはプリオン分子の

コンフォメーションについての詳細な情報が必要である。しかしながら、特定の分子の微妙な形の違いを識別する抗体が利用できないがために、病態の解明、プリオン仮説の実験的裏付けが得られていない。プリオン蛋白に反応する抗体を作製する研究は数多く試みられてい

るが、その全ての研究では、プリオン抗原をアジュバントとともに鉱物油で練り上げたものをマウスの腹腔に免疫するという常識的方法で作製された。プリオン病では「プリオン分子のコンフォメーション」が最も重要な解析ポイントであるにもかかわらず、この免疫操作は、リンパ球に認識される時点でのプリオン蛋白の立体構造をコントロールできない盲の研究になっている。本研究では、ヒト抗体を提示しているファージライブラリーを駆使し、*in vitro* で、物理化学的条件を変化させた状態でリフォールディングした様々なコンフォメーションを持つプリオン蛋白に直接反応させ、プリオン蛋白のコンフォメーションを識別できる抗体を作製する。単離されたコンフォメーション特異的抗体の中から、プリオンが感染した脳のホモジェネートを用い、異常プリオンを直接検出できる抗体を選別し、直接検出による簡便で高感度な診断法開発を目的とする。

## B. 研究方法

**プリオンタンパクのリフォールディング**：Jackson GS (Science 283: 1935-37, 1999) らの方法に準じて、大

腸菌の発現系から精製した recombinant human PrP (PrP: aa23-231) を、100 mM dithiothreitol (DTT) 存在下、6M GuHCl, 10 mM Na-acetate, Tris-acetate, pH 4.0 で変性後、酸性緩衝液 (10 mM Na-acetate, Tris-acetate, 1 mM DTT, pH 4.0) に対して透析することでリフォールディングを行った。得られたプリオン蛋白の構造を CD スペクトル、高圧蛍光、NMR、原子間力顕微鏡 (atomic force microscope: AFM) を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

リコンビナントプリオン蛋白の取り扱い、感染機序、感染性プリオンの実態が明らかとなっていない現状を踏まえ、全ての実験を遺伝子組換えの P2 レベル実験室で行った。プリオン蛋白は「動物の伝達性海綿状脳症の実験指針について (案)」に基づいて取り扱いを行った。

## C. 研究結果

大腸菌の発現系から精製した recombinant human PrP (PrP: aa23-231) を、Jackson GS (Science 283: 1935-37, 1999) らの方法に準じて、

100 mM dithiothreitol (DTT) 存在下、6M GuHCl, 10 mM Na-acetate, Tris-acetate, pH 4.0 で変性後、酸性緩衝液(10 mM Na-acetate, Tris-acetate, 1 mM DTT, pH 4.0) に対して透析することでリフォールディングを行った。CD スペクトル解析の結果、215 nm において負のスペクトルが認められ、典型的な  $\beta$ シート型の構造にフォールディングされていることが確認された。さらに、作製した  $\beta$ -PrP の原子間顕微鏡解析を行った。その結果、CD で  $\beta$ シート型吸収を示す  $\beta$ -PrP は、PrP (90-231) を用いて報告された Jackson GS らの結果と異なり、オリゴマーが形成されていることが明らかとなった。また、作製した  $\beta$ シート型プリオン蛋白はプロテアーゼ抵抗性を示した。さらに、0~1.5M GuHCl を加え、オリゴマーから繊維化の過程を ThT assay で1ヶ月間モニターしたが、ファイバーの形成は認められなかった。1ヶ月間放置した  $\beta$ シート型プリオンのAFM解析でもプリオンの繊維化は認められなかった。

#### D. 考察

本研究で作製した  $\beta$ -PrP は、全長の

プリオン蛋白(23-231)を用いて作製されたが、PrP (90-231) を用いて報告された Jackson GS らの結果と異なり、オリゴマーが形成されていることが明らかとなった。pH8 で refolding した  $\alpha$ -PrP においても、 $\beta$ -PrP に比べ著しく数は少ないが、pH4.0 でフォールディングした  $\beta$ -PrP に認められたオリゴマー粒子が認められた、 $\alpha$ ヘリックス型と考えていた  $\alpha$ -PrP においてもプリオンオリゴマーが含まれていることを示唆している。

#### E. 結論

*in vitro* で、物理化学的条件を変化させた状態でリフォールディングし、 $\beta$ シート型にフォールドされたプリオンオリゴマーを作製した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

学会発表

1. S. Hashiguchi, M. Yamamoto, S. Kitamoto, T. Nakashima, H. Yamanaka, D. Ishibashi, S. Sakaguchi, S. Katamine, Y. Ito, K. Sugimura

- Prion-conformation-specific human antibodies established from phage display library.  
Prions: Food and Drug Safety (Ed. T. Kitamoto), 191-192 (2005)
2. Shuhei Hashiguchi, Sho Kitamoto, Kotaro Sakamoto, Yuji Ito, Toshihiro Nakashima, Ken Sasaki, Jyoti U Gaikwad, Kazuyuki Akasaka, Suehiro Sakaguchi, Shigeru Katamine, Kazuhisa Sugimura.  
Human antibodies specific to beta-sheet-rich isoform of human prion protein.  
Cambridge Healthtech Institute's 6th annual international conference: Recombinant antibody, April 2005, Boston
  3. 橋口周平、北本祥、久保田俊也、今泉智之、中島敏博、坂口末廣、片峰茂、佐々木健, Jyoti U. Gaikwad, 赤坂一之、伊東祐二、杉村和久  
コンフォメーション特異的抗体によるプリオンの構造変異の追跡  
プリオン研究会、山形、天童市、2005
  4. 橋口周平、北本祥、久保田俊也、今泉智之、中島敏博、坂口末廣、片峰茂、佐々木健, Jyoti U. Gaikwad, 赤坂一之、伊東祐二、杉村和久  
プリオンのコンフォメーション変化を識別する抗体プローブの作製  
日本免疫学会総会・学術集会記録 **35**: p80 (2005)
  5. S. Kitamoto, S. Hashiguchi, Y. Ito, T. Nakashima, S. Sakaguchi, S. Katamine, K. Sasaki, J. U. Gaikwad, K. Akasaka, K. Sugimura  
Human antibodies specific to beta-sheet-rich isoform of human prion protein.  
生化学 **77**: p1043 (2005)
  6. T. Hamasaki, S. Uchida, S. Hashiguchi, Y. Ito, K. Sugimura  
Antibody-phage library clones panned on ELISA plate coated with PAGE gels.  
生化学 **77**: p1090 (2005)
- H. 知的所有権の出願・登録状況

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

分担研究報告書

コンフォメーション特異的抗体による簡便で高精度な BSE 診断法の開発研究  
～コンフォメーション特異的抗体スクリーニング法の確立～

分担研究者：杉村 和久（鹿児島大学工学部生体工学科教授）

研究協力者：橋口周平、伊東祐二（鹿児島大学工学部生体工学科）

片峰 茂（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）

赤坂一之（近畿大学生物理工学部生物工学科）

研究要旨： リコンビナントプリオン蛋白（aa23-231）を用いて作製した $\beta$ シートリッチな構造のプリオン蛋白（ $\beta$ -PrP）を抗原として、抗体ファージライブラリーを用いて抗体の探索を行い、 $\alpha$ ヘリックスリッチな正常なプリオンタンパク質には結合しないが、 $\beta$ シート型のプリオンタンパク質にだけ特異的に結合する抗体を2種類単離し、ヒト抗体ファージライブラリーを用いて、コンフォメーション特異的抗体を作製することに成功した。

A. 研究目的

プリオン病はタンパク質の立体構造の変化による変性タンパク質が引き起こす疾病とされ、多くの研究がそれを支持している。この疾病の診断や治療法の開発にゲノム科学が対応できないため、診断・治療法の開発にはプリオン分子のコンフォメーションについての詳細な情報が必要である。しかしながら、特定の分子の微妙な形の違いを識別する抗

体が利用できないがために、病態の解明、プリオン仮説の実験的裏付けが得られていない。プリオン蛋白に反応する抗体を作製する研究は数多く試みられているが、その全ての研究では、プリオン抗原をアジュバントとともに鉱物油で練り上げたものをマウスの腹腔に免疫するという常識的方法で作製された。プリオン病では「プリオン分子のコンフォメーション」が最も重要な解析ポイントで

あるにもかかわらず、この免疫操作は、リンパ球に認識される時点でのプリオン蛋白の立体構造をコントロールできない旨の研究になっている。本研究では、ヒト抗体を提示しているファージライブラリーを駆使し、*in vitro*で、物理化学的条件を変化させた状態でリフォールディングした様々なコンフォメーションを持つプリオン蛋白に直接反応させ、プリオン蛋白のコンフォメーションを識別できる抗体を作製する。単離されたコンフォメーション特異的抗体の中から、プリオンが感染した脳ホモジネートを用い、異常プリオンを直接検出できる抗体を選別し、直接検出による簡便で高感度な診断法開発を目的とする。

## B. 研究方法

**ヒト一本鎖抗体ファージライブラリー**：20名のヒト末梢血リンパ球より単離した mRNA から cDNA を合成し、VH, V<sub>K</sub>, V<sub>λ</sub> 遺伝子群に特異的なプライマーで抗体遺伝子を増幅後、リンカーで連結した V<sub>μ</sub>-V<sub>K</sub>, V<sub>μ</sub>-V<sub>λ</sub> (IgM 系) と V<sub>γ</sub>-V<sub>K</sub>, V<sub>γ</sub>-V<sub>λ</sub> (IgG 系) の scFv 遺伝子を pCANTAB 5E に組み込み、ヒト一本鎖抗体ファージライブラリーを構築した。

**プリオンタンパクのリフォールディング**：Jackson GS (Science 283: 1935-37, 1999) らの方法に準じて、大腸菌の発現系から精製した recombinant human PrP (PrP: aa23-231) を、100 mM dithiothreitol (DTT) 存在下、6M GuHCl, 10 mM Na-acetate, Tris-acetate, pH 4.0 で変性後、酸性緩衝液 (10 mM Na-acetate, Tris-acetate, 1 mM DTT, pH 4.0) に対して透析することでリフォールディングを行った。得られたプリオン蛋白の構造を CD スペクトル、高圧蛍光、NMR、原子間力顕微鏡 (atomic force microscope: AFM) を用いて解析した。

**パンニング**：リフォールディングしたヒトプリオン蛋白を 35mm Petri dish にコートしブロックした後、ヒト一本鎖抗体ファージライブラリーを反応させ、非特異的なファージを洗浄にて取り除いた後、結合したファージを pH2.2 の 0.1 M glycine-HCl で溶出、回収し増幅した。この操作を 2 回行い、ファージクローンを単離した。プレートへの非特異的に結合したファージの混入を減少させるため、最初のパンニングでは 2.5% skim milk、2 回目のパンニングは 0.5%



gelatin をブロック溶液として用いた。また、調整した $\beta$ シート型プリオン蛋白と抗体ファージディスプレイライブラリと反応後、プリオン蛋白の his-tag に特異的な抗体をコートしたプレートで、プリオン蛋白をトラップしプレートを洗浄後、結合したファージを溶出、回収し増幅するパンニングも実施した。

**ELISA**：マイクロタイタープレート (Nunc) にプリオン蛋白 (80 ng) をコートし、0.25% BSA でブロックした後、単離したファージクローンを反応させた。結合したファージの検出は、ビオチン化した抗 M13 抗体 (Amersham Pharmacia Biotech, CA)、AP 標識ストレプトアビジン (Vector Laboratories, CA) を順次反応させた後、基質溶液 (*p*-nitrophenylphosphate with 10% diethanolamine) を加え 405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定した。

(倫理面への配慮)

リコンビナントプリオン蛋白の取り扱い、感染機序、感染性プリオンの実態が明らかとなっていない現状を踏まえ、全ての実験を遺伝子組換えの P2 レベル実験室で行った。プリオン蛋白は

「動物の伝達性海綿状脳症の実験指針について (案)」に基づいて取り扱いを行った。

### C. 研究結果

$\alpha$ -helix 型の PrP ( $\alpha$ -PrP) を用いた探索から、 $\alpha$ -PrP に特異的な抗体を 4 種類単離した。4 種類の抗体はウシおよびヒト由来の  $\alpha$ -PrP と結合するが、1 つの抗体は、ウシに比べてヒト由来の  $\alpha$ -PrP に強く結合活性を示した。これらの抗体は、 $\alpha$ -PrP、アミロイド $\beta$ ペプチド (A $\beta$ ) モノマー、A $\beta$  ファイバーには結合しなかった。

大腸菌の発現系から精製した recombinant human PrP (PrP: aa23-231) を、Jackson GS (Science 283: 1935-37, 1999) らの方法に準じて、100 mM dithiothreitol (DTT) 存在下、6M GuHCl, 10 mM Na-acetate, Tris-acetate, pH 4.0 で変性後、酸性緩衝液 (10 mM Na-acetate, Tris-acetate, 1 mM DTT, pH 4.0) に対して透析することでリフォールディングし、構造解析された $\beta$ シート型の構造のプリオン蛋白 ( $\beta$ -PrP) を用いて、抗体ファージの探索を行った。2 回目のパンニング後、

36 クローンを単離し、 $\beta$ -PrP への結合活性を調べたところ、 $\beta$ -PrP に強い結合活性を示すが、 $\alpha$ -PrP やコントロールとして用いた蛋白 (Tim-3、BSA) には結合しない抗体ファージが単離された。36 クローン中 8 クローンが  $\beta$ -PrP に強い結合活性を示した。これらのファージクローンから scFv 分子のみを精製するために、抗体ファージを大腸菌 HB2151 に感染させ、scFv 抗体の発現精製を試みた。その結果、2 種類の抗体 ( $\beta$ -PrP7、 $\beta$ -PrP30) において scFv 抗体の発現が認められた。 $\alpha$ -PrP 特異的 scFv 抗体と、今回単離した scFv 抗体 ( $\beta$ -PrP7、 $\beta$ -PrP30) の  $\alpha$  および  $\beta$ -form プリオンに対する結合特異性を ELISA で評価した。その結果、 $\beta$ -PrP から単離された抗体は、 $\beta$ -PrP 特異的結合するが  $\alpha$ -PrP に結合できず、逆に  $\alpha$ -PrP から単離された抗体は、 $\alpha$ -PrP に結合するが、 $\beta$ -PrP には反応しなかった。さらに、これらの抗体を用いて Western blotting 解析を行ったところ、SDS-PAGE 後のプリオン蛋白との反応性は認められないことから、単離した抗体は立体構造を認識する抗体であり、コンフォメーション特異的抗体であると

考えられた。以上の結果より、ヒト抗体ファージライブラリーと直接反応させるパンニング方法で、抗原のコンフォメーションをスナップショットした特異的抗体を作製できることを明らかにした。プローブコンフォメーション特異的抗体を単離されたので、今年度用いた  $\beta$ -PrP だけでなく、プリオンオリゴマー、プリオンファイバーや感染材料由来のプリオン蛋白を用いることで、様々なコンフォマーに特異的な抗体パネルの作製を行い、異常プリオン感染材料を用いて、異常プリオンだけを見分ける抗体を選別し、高精度な診断法開発を試みる。

#### D. 考察

$\beta$ シート型プリオンを用いて、プリオンのコンフォメーションを識別できる抗体の作製を達成した。しかしながら、プリオンファイバーに関しては、ファイバーの形成が確認できなかったため、現在のところプリオンファイバー特異的抗体は単離されていない。 $\beta$ -PrP 特異的抗体の感染試料との反応性については現在解析を進めている。また、得られた抗体の発現量が予想外に極めて低いため、大量発現系の構築を現在行っている。

pH8 で refolding した  $\alpha$ -PrP においても、 $\beta$ -PrP を用いて単離した特異的抗体と  $\alpha$ -PrP との反応性はこれまでも若干認められていた。これは、 $\beta$ -PrP に比べ著しく数は少ないが、 $\beta$ -PrP に認められたオリゴマー粒子が含まれていたことから、 $\alpha$ -PrP の中にも存在する粒子に結合した結果であると考えられ、 $\alpha$ ヘリックス型と考えていた  $\alpha$ -PrP においてもプリオンオリゴマーが形成されていることを示唆している。

#### E. 結論

抗体ファージライブラリーを、*in vitro* で、物理化学的条件を変化させた状態でリフォールディングした様々なコンフォメーションを持つプリオン蛋白に直接反応させることで、コンフォメーション特異的抗体を作製する手法を確立した。作製されたコンフォメーション特異的抗体から異常プリオンを直接識別できる抗体を達成し、さらにこの特異的結合を高度に増幅する手法が確立できれば、異常プリオンを直接検出できる検査法を確立できる。異常型プリオン特異的抗体を確実なものとするため、構造変化したプリオンの作製と抗体単離

は継続して実施する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 学会発表

1. S. Hashiguchi, M. Yamamoto, S. Kitamoto, T. Nakashima, H. Yamanaka, D. Ishibashi, S. Sakaguchi, S. Katamine, Y. Ito, K. Sugimura  
Prion-conformation-specific human antibodies established from phage display library.  
Prions: Food and Drug Safety (Ed. T. Kitamoto), 191-192 (2005)
2. Shuhei Hashiguchi, Sho Kitamoto, Kotaro Sakamoto, Yuji Ito, Toshihiro Nakashima, Ken Sasaki, Jyoti U Gaikwad, Kazuyuki Akasaka, Suehiro Sakaguchi, Shigeru Katamine, Kazuhisa Sugimura.  
Human antibodies specific to beta-sheet-rich isoform of human prion protein.  
Cambridge Healthtech Institute's 6th annual international conference: Recombinant antibody, April 2005, Boston
3. 橋口周平、北本祥、久保田俊也、今泉智之、中島敏博、坂口末廣、片峰茂、佐々木健、Jyoti U. Gaikwad、赤坂一之、伊東祐二、杉村和久  
コンフォメーション特異的抗体による

- プリオンの構造変異の追跡  
プリオン研究会、山形、天童市、2005
4. 橋口周平、北本祥、久保田俊也、今泉智之、中島敏博、坂口末廣、片峰茂、佐々木健, Jyoti U. Gaikwad, 赤坂一之、伊東祐二、杉村和久  
プリオンのコンフォメーション変化を識別する抗体プローブの作製  
日本免疫学会総会・学術集会記録 **35**: p80 (2005)
5. S. Kitamoto, S. Hashiguchi, Y. Ito, T. Nakashima, S. Sakaguchi, S. Katamine, K. Sasaki, J. U. Gaikwad, K. Akasaka, K. Sugimura  
Human antibodies specific to beta-sheet-rich isoform of human prion protein.  
生化学 **77**: p1043 (2005)
6. T. Hamasaki, S. Uchida, S. Hashiguchi, Y. Ito, K. Sugimura  
Antibody-phage library clones panned on ELISA plate coated with PAGE gels.  
生化学 **77**: p1090 (2005)
- H. 知的所有権の出願・登録状況