

研究成果の刊行に関する一覧

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版者名	出版地	出版年	ページ
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	T. Kitamoto	Prions: Food and Drug Safety	Springer	Japan	2005	191-192

T. Kitamoto (Ed.)

Prions

Food and Drug Safety

With 24 Figures

 Springer

Prion-conformation-specific human antibodies established from phage display library

Shuhei Hashiguchi¹, Mayumi Yamamoto¹, Syoh Kitamoto¹, Toshihiro Nakashima², Hitoki Yamanaka³, Daisuke Ishibashi³, Suehiro Sakaguchi^{3,4}, Shigeru Katamine⁴, Yuji Ito¹ and Kazuhisa Sugimura¹

¹Dept. Bioengin', Facult. Engin', Kagoshima University, 1-21-40 Korimoto, Kagoshima 890-0065 Japan ²The Chemo-Sero-Therapeutic Res. Inst. ³PRESTO JST ⁴Dept. Mol. Microbiol. Immunol., Nagasaki University <e-mail> shuh@be.kagoshima-u.ac.jp

Abstract

The pathogenesis of prion disease involves a structural change of prion protein (PrP). A series of antibodies recognizing a distinct conformational change of prion is useful for not only understanding the mechanism of molecular conversion but also for diagnostic and therapeutic reagents. Prions with various conformations can be prepared in vitro under varying physicochemical condition. Antibody-displaying phage library enables us to isolate such antibodies by simple biopanning procedure. This feature is superior to conventional animal-based approach. Recently, Prusiner et al. reported that the in vitro-refolded recombinant prion could be infectious in mouse model (Science 305: 673-676, 2004).

In this study, we used human prion protein (#90-231: In Pro, #23-231: kindly provided from Dr. S. Katamine, Nagasaki Univ.) and bovine prion protein (#102-241: In Pro, #23-231, Nagasaki Univ.) and prepared two kinds of refolded recombinant prions according to the Collinge's protocol (Science 283: 1935-1937, 1999). The α or β form was defined by circular dichroism (CD) spectropolarimetry. We successfully isolated five clones specific to α form and one clone specific to β form. In the case of α -specific clones, four clones showed the binding activity to human prion equal to bovine prion while one clone bound to human prion stronger than bovine prion. The β -specific clone showed no binding activity to monomeric nor fibril amyloid β peptide. We further search for α or β -specific clones and characterize the immunochemical features using ELISA and BIAcore.

Cambridge Healthtech Institute's
6th annual international
conference: Recombinant antibody

May 2005

Boston

(Title)

Human antibodies specific to beta-sheet-rich isoform of human prion protein.

(Authors)

Shuhei Hashiguchi¹, Sho Kitamoto¹, Kotaro Sakamoto¹, Yuji Ito¹, Toshihiro Nakashima², Ken Sasaki³, Jyoti U Gaikwad³, Kazuyuki Akasaka³, Suehiro Sakaguchi⁴, Shigeru Katamine⁴, Kazuhisa Sugimura¹

(e-mail: kazu@be.kagoshima-u.ac.jp <Kazuhisa Sugimura>)

(Affiliation)

1, Dept. Bioengin', Facult. Engin', Kagoshima Univ.

2, The Chemo-Sero-Therapeutic Res. Inst.

3, Deot. Biotechol. Sci, Kinki Univ.

4, Dept. Mol. Microbiol. Immunol., Nagasaki Univ.

The pathogenesis of prion disease involves a structural change of prion protein (PrP). A series of antibodies recognizing a distinct conformational change of prion is useful for not only understanding the mechanism of molecular conversion but also for diagnostic and therapeutic reagents. We have previously prepared two kinds of refolded recombinant prions (alpha-helical prion : α -PrP; beta-sheet-rich prion: β -PrP) according to the Collinge's protocol (Science 283: 1935-1937, 1999), and successfully isolated five single-chain Fv (scFv) antibodies specific to α -PrP and one scFv-phage specific to β -PrP (Antibody Engineering, San Diego, 2004). Recently, we have isolated an additional scFv-phage clone that binds to β -PrP but not to α -PrP, monomeric or fibril amyloid β peptide. In this study, soluble scFv antibodies derived from β -PrP-specific phage clones were expressed in the bacterial periplasm of HB2151 and purified scFv antibodies showed the fine specificity to β -PrP. We are under way constructing the Fab fragments by recloning the VH and VL fragments of these clones into the Fab expression vector.

プリオン研究会

2005年8月

山形

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

橋口周平¹、北本祥¹、久保田俊也¹、今泉智之¹、中島敏博²、坂口末廣³、片峰茂³、
佐々木健⁴、Jyoti U. Gaikwad⁴、赤坂一之、伊東祐二¹、杉村和久¹

¹鹿児島大・工・生体工学、²化血研、³長崎大・医歯薬総合研究科・感染分子
病態学、⁴近畿大・生物工・分子生物工学

[目的]プリオン病は、プリオン蛋白のコンフォメーションの変化による変性タンパク質が引き起こす疾病とされるが、タンパク質の構造解析と生物学的解析の両者を同時に解析する手法が確立されていないため、「タンパク質のコンフォメーションとその感染機構の分子基盤」の詳細は明らかになっていない。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、構造と生物学的活性を調べる上で重要である。従来の抗体作製法では、分子の形をコントロールして抗体を得ることができないが、ファージディスプレイ法では、*in vitro*で作製したさまざまなconformerを用いて直接抗体を単離できるので、このバリアを乗り越えることができる。私どもは昨年プリオン病国際シンポジウムにおいて、遺伝子組み換えヒトプリオン分子 (aa23-231) からβシート型プリオンを作製 (β-PrP : Science 283: 1935-37, 1999)、原子間力顕微鏡、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後、ヒト抗体ファージライブラリーと直接反応させ、β-PrP特異的ヒト一本鎖抗体 (β-PrP7, β-PrP30) を単離したことを報告した。今回は、scFv抗体からFab抗体への抗体エンジニアリングを行い、抗体を用いて、作製したβ-PrPのコンフォメーション変化を経時的に調べたところ、β-PrPへの結合活性が変化していることから、コンフォメーション特異的抗体をプローブとすることで、蛋白分子の構造変化を追跡できることが示唆された。Fab抗体とプリオンの複合体の結晶化は比較的容易であり、X線結晶解析により抗体のエピトープの高次構造を決定できるので、その抗体をプローブとして感染性試料を用いた生物学的解析を行うことで、プリオンのコンフォメーションとその感染機構の分子基盤を解明できると考えられる。

第78回 日本生化学会

2005年10月

神戸

Human antibodies specific to beta-sheet-rich isoform of human prion protein .

Sho Kitamoto¹, Shuhei Hashiguchi¹, Yuji Ito¹, Toshihiro Nakashima², Ken Sasaki³, Jyoti U Gaikwad³, Kazuyuki Akasaka³, Suehiro Sakaguchi⁴, Shigeru Katamine⁴, Kazuhisa Sugimura¹

(e-mail: kazu@be.kagoshima-u.ac.jp <Kazuhisa Sugimura>)

1, Dept. Bioengin', Facult. Engin', Kagoshima Univ.

2, The Chemo-Sero-Therapeutic Res. Inst.

3, Deot. Biotechol. Sci, Kinki Univ.

4, Dept. Mol. Microbiol. Immunol., Nagasaki Univ.

The pathogenesis of prion disease involves a structural change of prion protein (PrP). A series of antibodies recognizing a distinct conformational change of prion is useful for not only understanding the mechanism of molecular conversion but also for diagnostic and therapeutic reagents. We have previously prepared two kinds of refolded recombinant human prions according to the Collinge's protocol (Science 283: 1935-1937, 1999). Alpha-helical conformation (α -PrP) of PrP23-231 was prepared under neutral pH condition whereas the beta-sheet-rich conformation (β -PrP) was prepared by refolding the PrP23-231 under reductive and pH4.0 condition that likely endosome-like condition. In this study, we successfully isolated five single-chain Fv (scFv) antibodies specific to α -PrP and two β -PrP specific scFv antibodies from human antibody displaying phage library (Antibody Engineering, San Diego, 2004). Two β -PrP specific antibodies were showed the fine specificity to β -PrP but not α -PrP under both neutral and acidic condition. In addition to immunochemical examinations including epitope and affinity analysis, we are going to test the immunohistological ability of these antibodies using brain with prion disease.

第35回 日本免疫学会

2005年12月

横浜

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
Direct cloning of phage library antibodies detecting various prion species under conformational conversion.

橋口周平、北本祥、久保田俊也、中島敏博、伊東祐二、杉村和久

鹿児島大・工・生体工 (Dept. Bioengin', Facult. Engin', Kagoshima-u., Japan)

化血研 (The Chemo-Sero-Therapeutic Res. Inst., Japan)

[目的]プリオン病は、プリオン蛋白のコンフォメーションの変化による変性タンパク質が引き起こす疾病とされる。しかしながら、「タンパク質のコンフォメーションとその感染機構の分子基盤」は、ほとんど不明である。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、構造と生物学的活性を調べる上で重要である。従来の抗体作製法では、分子の形をコントロールして抗体を得ることができないが、ファージディスプレイ法では、*in vitro* で作製したさまざまな conformer を用いて直接抗体を単離できるので、このバリアを乗り越えることができる。本研究では、上記の方法を用いて、プリオンのコンフォメーションを識別する抗体プローブの作製を試みた。

[方法及び結果]遺伝子組み換えヒトプリオン分子 (aa23-231) から β シート型プリオンを作製し (Science 283: 1935-37, 1999)、原子間力顕微鏡、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 シート型プリオン (β -PrP) 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 (b-PrP7, b-PrP30) を単離した。これらの抗体をプローブとして、作製した β -PrP のコンフォメーション変化を経時的に調べたところ、 β -PrP への結合活性が変化していることから、コンフォメーション特異的抗体をプローブとすることで、蛋白分子の構造変化をモニタできることが示唆された。

会員外研究者：坂口末廣，片峰茂 (長崎大・医歯薬総合研究科・感染分子病態学)，佐々木健，Jyoti U. Gaikwad，赤坂一之 (近畿大・生物工・分子生物工学)