

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18年度 総括研究報告書

主任研究者 橋口 周平

平成19（2007）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 ～繊維状プリオン蛋白の作製とその物理化学的解析～ 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 ～繊維状プリオン蛋白に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	14

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：異常プリオンを直接識別できる抗体を作製し、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）からプリオン蛋白フィブリル（J. Mol. Biol. 346: 645-659, 2005）を作製、チオフラビン蛍光解析、透過型電子顕微鏡および原子間力顕微鏡解析によりプリオン蛋白の繊維化を確認した。このプリオン蛋白フィブリルはプロテアーゼ抵抗性を示した。作製したプリオン蛋白フィブリルの感染性の有無は重要な問題であるが、ヒト抗体ファージライブラリーを用いた抗体スクリーニングを行い、プリオン蛋白フィブリルに特異的ヒト抗体ファージを単離した。これまでの結果により、ファージライブラリー法を用いて、プリオン蛋白のコンフォメーションに特異的抗体を作製できることを明らかにした。

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

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、

A. 研究目的

プリオン病はタンパク質の立体構造

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 κ , V λ 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 μ -V κ , V μ -V λ (IgM 系) と V γ -V κ , V γ -V λ (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：Baskakov IV ら (J. Mol. Biol. 346: 645-659, 2005) のプロトコールに準じて、大腸菌の発現系を用いて作製・精製した組み換えヒトプリオン蛋白(hPrP: aa23-231)を、1M GuHCl, 3M Urea, 10 mM Na-acetate, pH 3.7 の緩衝液を用いて 22 μ M に調製しプリオン蛋白オリゴマーを作製した。また、1M GuHCl, 3M Urea, 10 mM Na-acetate, pH 5.5 の緩衝液を用いて 22 μ M に調製後、37°C で攪拌 (600 rpm) することでプリオン蛋白の繊維化を行った。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、透過型電子顕微鏡および原子間力顕微鏡 (atomic force microscope: AFM) を用いて解析した。

パンニング:作製されたヒトプリオン蛋白フィブリル試料中へのプリオン蛋白単量体およびオリゴマーの混入を避けるため、遠心分離による精製を行ない、繊維化していないプリオン蛋白が混入していないことをウェスタンブロッティング法により確認した。精製されたプリオン蛋白フィブリルをヒト一本鎖抗体ファージライブラリーと反応させ、非特異的なファージを洗浄にて取り除いた後、プリオン蛋白フィブリルを回収し、結合したファージを pH2.2 の 0.1 M glycine-HCl で溶出、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。遠心チューブへの非特異的結合による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 α -PrP, β -PrP およびプリオン蛋白フィブリル (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は、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

大腸菌の発現系を用いて作製・精製した組み換えヒトプリオン蛋白 (hPrP: aa23-231) を、1 M GuHCl, 3 M Urea, 10 mM Na-acetate, pH 3.7 の緩衝液を用いて 22 μ M に調製した。CD スペクトル解析の結果、このプリオン蛋白は 215 nm において負のスペクトルが認められ、典型的な β シート型の構造にフォルディングされていることが確認され

た。原子間顕微鏡解析を行った結果、CD で β シート型吸収を示す β -PrP は、Jackson GS (Science 283: 1935-37, 1999) らの方法に準じて作製された β -PrP と同様に粒子状のオリゴマーの形成が認められた。これらの β 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、1 M GuHCl, 3 M Urea, 10 mM Na-acetate, pH 3.7 の緩衝液を用いて 22 μ M に調製されたプリオン蛋白を 37°C で攪拌 (600 rpm) することでプリオン蛋白の繊維化を試みた。プリオン蛋白の繊維化はチオフラビン蛍光解析 (ThT assay) を用いて解析した。その結果、攪拌後時間経過に伴ないチオフラビン蛍光が増強され、蛍光強度は 28 ~ 32 時間でプラトーに達した。これらの試料の透過型電子顕微鏡および AFM 解析によりプリオン蛋白の繊維化を認めた。一方、pH 3.7 の緩衝液を用いてフォールディングしたプリオン蛋白オリゴマーを用いて攪拌を行ってもプリオン蛋白の繊維化は認められなかった。作製されたプリオン蛋白フィブリルはプロテアーゼ抵抗性を示した。ウシ由来の組み換え全長プリオン蛋白についてもプリオン蛋白オリゴマーおよびプリ

オン蛋白フィブリルを作製した。

作製されたヒトプリオン蛋白フィブリルを用いて、抗体ファージの探索を行った。2 回目のパンニング後、114 クロオンを単離し、プリオン蛋白フィブリルへの結合活性を調べたところ、プリオン蛋白フィブリルに結合活性を示すが、 α -PrP、 β -PrP やコントロールとして用いた蛋白には結合しない抗体ファージが単離された。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、1 種類の抗体において scFv 抗体の発現が認められた。

昨年度は、組み換えヒトプリオン蛋白を、Jackson GS (Science 283: 1935-37, 1999) らの方法に準じて作製された β -PrP を用いて、2 種類の抗体 (β -PrP7、 β -PrP30) を単離したことを報告した。これらの抗体とプリオン蛋白フィブリルとの結合活性を評価したところ、 β -PrP にも結合するが、プリオン蛋白フィブリルとの強い結合活性が ELISA により認められた。

D. 考察

ヒト全長プリオン蛋白の *in vitro* で
の線維化を達成し、このプリオン蛋白フ
ィブリルを用いて、プリオン蛋白フィブ
リルだけに結合活性を有する抗体ファ
ージを単離した。一方、昨年度作製した
抗体(β -PrP7、 β -PrP30) は β シート型
プリオン蛋白に特異的と考えられてい
たが、今回作製したプリオン蛋白フィブ
リルとの結合を解析した結果、プリオン
蛋白オリゴマーだけでなくプリオン蛋
白フィブリルにも結合することから、プ
リオン蛋白オリゴマーとプリオン蛋白
フィブリルの立体構造には、共通した構
造があり、これらの抗体はその共通した
構造を特異的に認識していることが示
唆された。これらの抗体とプリオン蛋白
オリゴマーとの結合状態の構造解析を
行うことで、オリゴマーとフィブリルの
構造の関連を明らかにできると考えら
れる。

本研究では、プリオン病の診断、治療
に用いる抗体を作製することを目的と
して、プリオン蛋白の立体構造特異的抗
体の作製を行った。抗体の作製方法とし
ては、立体構造が明らかにされた試料に
抗体ファージライブラリーを反応させ

ることで、その標的分子の形に特異的な
抗体の作製を行った。作製したプリオン
蛋白コンフォーマーの感染性、細胞毒性
の有無、遺伝子組み換えプリオン蛋白を
用いて作製された抗体が、実際の感染材
料中の異常プリオンと特異的に結合で
きるか検討することは重要な検討課題
であり、*in vivo* での感染実験において、
作製したコンフォメーション特異的抗
体がどのような影響を及ぼすかを明ら
かにする必要がある。マウス由来のプリ
オン蛋白フィブリルとの交差反応が認
められれば、便法としてプリン持続感染
株などの培養細胞を用いたアッセイ方
法を用いて異常プリオンとの反応性を
解析できる。今後、これらの手法を用い
て作製された抗体の中から、感染材料を
用いて、異常プリオンだけを見分ける抗
体を選別する必要がある。

E. 結論

抗体ファージライブラリーを、*in vitro*
において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
白と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。これまで、全長プリオン蛋白の線維化の *in vitro* での再現は報告されていなかったが、最近 Baskakov IV (J. Mol. Biol. 346: 645-659, 2005)らはマウスプリオン蛋白を用いて、それが可能であることを報告した。このプロトコルに基づき、ヒトの全長プリオン分子の線維化に成功した。このプリオン蛋白フィブリルを用いて抗体スリーニング方法を検討し、プリオン蛋白フィブリルを直接プレートに吸着させた後、抗体ファージライブラリから結合クローンを選別する方法で、プリオン蛋白フィブリルだけに特異的抗体ファージを単離した。昨年度、Jackson GS (Science 283: 1935-37, 1999) らの方法に準じて作製された β -PrP に特異的抗体は、*in vitro* においてリフォールドされたプリオン蛋白のコンフォメーション変化を経時的に追跡できる、プリオン蛋白の β シート構造を識別できる特異的抗体プローブであるが、これらの抗体はプリオン蛋白フィブリルにも結合活性を有していた。これまでに正常プリオン蛋白、プリオン蛋白オリゴマーおよびプリオン蛋白フィブリルに特異的な抗体が単離されているが、感染材料に含まれる異常プリオンを識

別することができれば、プリオン蛋白の立体構造と感染性、細胞毒性との関連を明らかにできると考えられ、異常プリオンの直接的な診断法の確立と高精度化が見込まれる。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

学会発表

1. Shuhei Hashiguchi, Sho Kitamoto, Toshiya Kubota, Tomoyuki Imaizumi, Ken Sasaki, Jyoti U Gaikwad, Kazuyuki Akasaka, Noriyuki Nishida, Shigeru Katamine, Yuji Ito, Toshihiro Nakashima, Kazuhisa Sugimura. Direct cloning of phage library antibodies detecting various prion species under conformational conversion. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, p98 (2006)
2. Takayuki Hamasaki, Shunsuke Uchida, Shuhei Hashiguchi, Yuji Ito, Toshihiro Nakashima, Kazuhisa Sugimura. Phage library clones panned on ELISA plate coated with PAGE gels. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, p109 (2006)

3. 久保田俊也、橋口周平、今泉智之、黒川恵、中島敏博、西田教行、片峰茂、佐々木健、Jyoti U Gaikwad、赤坂一之、伊東祐二、杉村和久. 全長リコンビナントプリオン分子から作製された線維型及びオリゴマープリオン蛋白に対するヒト抗体ファージクローンの反応性について 2006年プリオン研究会抄録集、p18 (2006)

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
～繊維状プリオン蛋白の作製とその物理化学的解析～

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に、プリオン蛋白のリフォーリングを行った。昨年度は遺伝子組み換えヒトプリオン分子（aa23-231）を用いて、 β シート型プリオン蛋白（human PrP (23-231): β -PrP; *Science* 283: 1935-37, 1999）を作製し、その物理化学的解析を行ったが、今年度は Baskakov IV ら (*J. Mol. Biol.* 346: 645-659, 2005) のプロトコールに従い、プリオン蛋白フィブリルの作製を試みた。その結果、変性剤を含む酸性の緩衝液で希釈された酸化型プリオン蛋白は、37℃で攪拌することで、プリオン蛋白の繊維化が認められた。このプリオン蛋白フィブリル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

グ：大腸菌の発現系を用いて作製・精製した組み換えヒトプリオン蛋白(hPrP: aa23-231)を、Baskakov IVら (J. Mol. Biol. 346: 645-659, 2005) のプロトコールに準じて、1M GuHCl, 3 M Urea, 10 mM Na-acetate, pH 3.7の緩衝液を用いて22 μ Mに調製することで、プリオン蛋白のオリゴマー化を行った。また、1M GuHCl, 3 M Urea, 10 mM Na-acetate, pH 5.5の緩衝液を用いて22 μ Mに調製後、37°Cで攪拌(600 rpm)することでプリオン蛋白の繊維化を行った。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、透過型電子顕微鏡および原子間力顕微鏡(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

Baskakov IV ら (J. Mol. Biol. 346: 645-659, 2005) のプロトコールに準じて、組み換えヒト全長プリオン蛋白 (hPrP: aa23-231) を、1 M GuHCl, 3 M Urea, 10 mM Na-acetate, pH 3.7 の緩衝液を用いて 22 μ M に調製し、プリオン蛋白の二次構造を CD スペクトルを用いて解析した。その結果、215 nm において負のスペクトルが認められ、典型的な β 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 β -PrP の原子間顕微鏡解析を行った結果、CD で β シート型吸収を示す β -PrP は、昨年度、Jackson GS (Science 283: 1935-37, 1999) らの方法に準じて作製された β -PrP と同様に粒子になっていることが明らかとなった。作製された β シート型プリオン蛋白はプロテアーゼ抵抗性を示した。一方、1 M GuHCl, 3 M Urea, 10 mM Na-acetate, pH 3.7 の緩衝液を用いて 22 μ M に調製されたプリオン蛋白を 37°C で攪拌 (600 rpm) することでプリオン蛋白の繊維化を試み、チオフラビン蛍光解析 (ThT assay) を用いて繊維化の過程を解析した。その結果、攪拌後

12 時間頃からチオフラビン蛍光が観察され、蛍光強度は 28~32 時間でプラトーに達した。これらの試料の透過型電子顕微鏡および AFM 解析によりプリオン蛋白の繊維化を認めた。一方、オリゴマーの形成が認められた pH 3.7 の緩衝液で調製された試料を攪拌し、オリゴマーからの繊維化の過程を ThT assay にて 1 ヶ月間解析したが、フィブリルの形成は認められなかった。作製されたプリオン蛋白フィブリルはプロテアーゼ抵抗性を示した。

ウシ由来の組み換え全長プリオン蛋白についてもプリオン蛋白オリゴマーおよびプリオン蛋白フィブリルを作製した。

D. 考察

プリオン病の診断、治療に用いる抗体を作製するための標的分子として用いる立体構造が明らかにされたプリオン蛋白を作製するために、遺伝子組み換えプリオン蛋白を用いてプリオン蛋白のフォールディングを行い、 β シート型にフォールドされたプリオン蛋白オリゴマーおよびプリオン蛋白フィブリルを作製した。これらのプリオン蛋白が実際

に感染性、細胞毒性を明らかにする必要がある。これまでにプリオン蛋白オリゴマーおよびプリオン蛋白フィブリルに特異的な抗体が単離されているが、これらの抗体と感染材料に含まれる異常プリオンを識別することができれば、プリオン蛋白の立体構造と感染性、細胞毒性との関連を明らかにできると考えられる。

E. 結論

これまで、全長プリオン蛋白の線維化の *in vitro* での再現は報告されていなかったが、最近 Baskakof IV (J. Mol. Biol. 346: 645-659, 2005)らは、マウスプリオン蛋白を用いて、それが可能であることを報告した。このプロトコルに基づき、ヒトおよびウシの全長プリオン蛋白分子の線維化に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Shuhei Hashiguchi, Sho Kitamoto, Toshiya Kubota, Tomoyuki Imaizumi, Ken Sasaki, Jyoti U Gaikwad, Kazuyuki Akasaka, Noriyuki Nishida, Shigeru Katamine, Yuji Ito, Toshihiro Nakashima, Kazuhisa Sugimura.
Direct cloning of phage library antibodies detecting various prion species under conformational conversion. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, p98 (2006)
2. Takayuki Hamasaki, Shunsuke Uchida, Shuhei Hashiguchi, Yuji Ito, Toshihiro Nakashima, Kazuhisa Sugimura.
Phage library clones panned on ELISA plate coated with PAGE gels. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, p109 (2006)
3. 久保田俊也、橋口周平、今泉智之、黒川恵、中島敏博、西田教行、片峰茂、佐々木健、Jyoti U Gaikwad、赤坂一之、伊東祐二、杉村和久。全長リコンビナントプリオン分子から作製された線維型及びオリゴマープリオン蛋白に対するヒト抗体ファージクローンの反応性について 2006年プリオン研究会抄録集、p18 (2006)

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
ー繊維状プリオン蛋白に特異的抗体のスクリーニング法の確立ー

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）を用いて作製されたプリオン蛋白
フィブリルを標的として、抗体ファージライブラリーを用いて特異的抗体の探索を行い、
 α ヘリックスリッチな正常なプリオンタンパク質および β シート型のプリオンタンパク質
には結合しないが、プリオン蛋白フィブリルだけに特異的に結合する抗体が単離され、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_K, V_λ 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_μ-V_K, V_μ-V_λ (IgM 系) と V_γ-V_K, V_γ-V_λ (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: Baskakov IV ら (J. Mol. Biol. 346: 645-659, 2005) のプロトコールに準じて、プリオン蛋白オリゴマーおよびプリオン蛋白フィブリルを調製した。大腸菌の発現系を用いて作製・精製した組み換えヒトプリオン蛋白(hPrP: aa23-231)を、1 M GuHCl, 3 M Urea, 10 mM Na-acetate, pH 5.5 の緩衝液を用いて 22 μM に調製後、37°C で攪拌 (600 rpm) することでプリオン蛋白の繊維化を行った。得られたプリオン蛋白フィブリルの構造を透過型電子顕微鏡および原子間力顕微鏡 (atomic force microscope: AFM) を用いて解析した。

パンニング: 作製されたヒトプリオン蛋白フィブリル試料中へのプリオン蛋白単量体およびオリゴマーの混入を避けるため、遠心分離による精製を行ない、繊維化していないプリオン蛋白が混入していないことをウェスタンブロッティング法により確認した。精製されたプリオン蛋白フィブリルをヒト一本鎖抗体ファージライブラリーと反応させ、非特異的なファージを洗浄にて取り除い

た後、プリオン蛋白フィブリルを回収し、結合したファージを pH2.2 の 0.1 M glycine-HCl で溶出、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。遠心チューブへの非特異的結合による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 α -PrP、 β -PrP およびプリオン蛋白フィブリル (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は、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

大腸菌の発現系を用いて作製・精製された組み換えヒトプリオン蛋白 (hPrP: aa23-231) を、1 M GuHCl, 3 M Urea, 10 mM Na-acetate, pH 5.5 の緩衝液を用いて 22 μ M に調製後、37°C で攪拌 (600 rpm) することで作製されたプリオン蛋白フィブリルを用いて、抗体ファージの探索を行った。2 回目のパンニング後、114 クローンを単離し、プリオン蛋白フィブリルへの結合活性を調べたところ、プリオン蛋白フィブリルに結合活性を示すが、 α -PrP、 β -PrP やコントロールとして用いた蛋白には結合しない抗体ファージが単離された。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、1 種類の抗体において scFv 抗体の発現が認められた。

現在、scFv 抗体の活性を調べている。一方、昨年度、大腸菌の発現系を用いて発現・精製された hPrP を、Jackson GS (Science 283: 1935-37, 1999) らの方法に準じて作製した β -PrP を用いて 2 種類の抗体 (β -PrP7、 β -PrP30) を単離したことを報告したが、これらの抗体とプリオン蛋白フィブリルとの結合活性を評価したところ、 β -PrP にも結合するが、プリオン蛋白フィブリルとの強い結合活性が ELISA により認められた。

D. 考察

ヒト全長プリオン蛋白の *in vitro* で線維化を達成し、このプリオン蛋白フィブリルを用いて、プリオン蛋白フィブリルだけに結合活性を有する抗体ファージを単離した。一方、Jackson GS (Science 283: 1935-37, 1999) らの方法に準じて作製した β シート型プリオン蛋白に特異的と考えられた抗体 (β -PrP7、 β -PrP30) は、今回作製したプリオン蛋白フィブリルにも結合活性を示すことから、プリオン蛋白オリゴマーとプリオン蛋白フィブリルの立体構造には、両者間で共通した構造があり、これらの抗体はその共通した構造に結合

していることが示唆された。これらの抗体とプリオン蛋白オリゴマーとの結合状態の構造解析を行うことで、オリゴマーとフィブリルの構造の関連を明らかにできると考えられる。感染試料との反応性については現在解析を進めている。

E. 結論

これまで、全長プリオン蛋白の線維化の *in vitro* での再現は報告されていなかったが、最近 Baskakof IV (J. Mol. Biol. 346: 645-659, 2005)らは、マウスプリオン蛋白を用いてそれが可能であることを報告した。このプリオン蛋白フィブリルを用いた抗体スリーニング方法を検討し、プリオン蛋白フィブリルを直接プレートに吸着させた後、抗体ファージライブラリから結合クローンを選別する方法で、プリオン蛋白フィブリルだけに特異的抗体ファージを単離した。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。

F. 健康危険情報

なし

ト抗体ファージクローンの反応性について 2006年プリオン研究会抄録集、
p18 (2006)

G. 研究発表

学会発表

1. Shuhei Hashiguchi, Sho Kitamoto, Toshiya Kubota, Tomoyuki Imaizumi, Ken Sasaki, Jyoti U Gaikwad, Kazuyuki Akasaka, Noriyuki Nishida, Shigeru Katamine, Yuji Ito, Toshihiro Nakashima, Kazuhisa Sugimura.
Direct cloning of phage library antibodies detecting various prion species under conformational conversion. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, p98 (2006)
2. Takayuki Hamasaki, Shunsuke Uchida, Shuhei Hashiguchi, Yuji Ito, Toshihiro Nakashima, Kazuhisa Sugimura.
Phage library clones panned on ELISA plate coated with PAGE gels. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, p109 (2006)
3. 久保田俊也、橋口周平、今泉智之、黒川恵、中島敏博、西田教行、片峰茂、佐々木健、Jyoti U Gaikwad、赤坂一之、伊東祐二、杉村和久。全長リコンビナントプリオン分子から作製された線維型及びオリゴマープリオン蛋白に対するヒ

H. 知的所有権の出願・登録状況