

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～平成18年度 総合研究報告書

主任研究者 橋口 周平

平成19（2007）年 3月

研究組織

主任研究者

橋口周平 (鹿児島大学工学部生体工学科・助手)

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)

目次

I. 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	
総合研究報告書 (平成 17 年～平成 18 年度) 1
主任研究者：橋口周平 (鹿児島大学工学部生体工学科)	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 11
III. 研究成果の刊行物・別刷 13

I. 総合研究報告

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）

総合研究報告書

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：本研究では、異常プリオンに特異的抗体による直接同定、検出、定量する方法を確立する目的で、感染性、病原性と関連したプリオンの構造に特異的な抗体の作製を試みた。平成 17 年度は、20 名のヒト末梢血リンパ球より調製したヒト一本鎖抗体 (scFv) 抗体ライブラリーと遺伝子組み換えヒトプリオン蛋白 (aa23-231) を用いて、ヒトおよびウシプリオン蛋白に特異的なヒト抗体を単離した。また Collinge J (Science 283: 1935-37, 1999) らの方法に準じて、 β シート型プリオン蛋白オリゴマー (β -PrP) を作製し、 β -PrP に特異的に結合するが、native な構造のプリオン蛋白には反応しない、 β -PrP 特異的ヒト一本鎖抗体の単離に成功した。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、2005 年に 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、平成 18 年度はヒトおよびウシ全長プリオン蛋白の線維化に成功した。さらに、作製したプリオン蛋白フィブリルとヒト抗体ライブラリーを用いたスクリーニングを行ない、プリオン蛋白フィブリルに特異的抗体を単離した。作製したプリオン蛋白コンフォーマーの感染性の有無は重要な問題であるが、これらの分子にヒト抗体ファージライブラリーを直接反応させることで、プリオン蛋白の構造に特異的ヒト一本鎖抗体を単離した。以上の結果により、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_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。

プリオン蛋白のリフォールディング:
大腸菌の発現系を用いて発現・精製された組み換えヒト全長プリオン蛋白 (hPrP: 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、6 M 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立体構造を 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。また、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 に調製することで、プリオン蛋白のオリゴマー化を行った。

プリオン蛋白の繊維化: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、Baskakov IV ら (J. Mol. Biol. 346: 645-659, 2005) のプロトコールに準じ

て、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:リフォールディングしたプリオン蛋白を 35 mm 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 hPrPc (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

大腸菌の発現系を用いて発現・精製された組み換えヒト全長プリオン蛋白 (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、6 M 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 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。その結果、CD で β シート型吸収を示す β -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 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、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 β 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 β シート型構造にリフォールディングしたプリオン蛋白 (β -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、 β -PrP に特異的な抗体を2種類単離した。また、 α -helix 型にリフォールドしたプリオン蛋白 (α -PrP) を用いた探索から、 α -PrP に特異的な抗体を4種類単離した。これら4種類の抗体はウシおよびヒト由来の α -PrP と結合し、さらに1つの抗体は、ウシに比べてヒト由来の α -PrP に強い結合活性を示した。これらの抗体は、 α -PrP、アミロイド β 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。

これらの抗体を用いて、 α および β -form プリオンに対する結合特異性をELISAで評価したところ、 β -PrP から単離された抗体は、 β -PrP に対して結合活性を示すが α -PrP には結合できず、逆に α -PrP から単離された抗体は、 α -PrP に結合活性を示すが、 β -PrP とは反応しなかった。さらに、これらの抗体を用いてウェスタンブロッティング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する特異的な抗体を作製できることを明らかにした。また、Baskakov IV ら (J. Mol. Biol. 346: 645-659, 2005) のプロトコールに準じて、組み換えヒトプリオン蛋白を、1 M GuHCl, 3 M Urea, 10 mM Na-acetate, pH 3.7 の緩衝液を用いて 22 μ M に調製されたプリオン蛋白は、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 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、Jackson GS らの方法に準じて作製した β -PrP と同様に均一な粒子状であることが認められた。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。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 の緩衝液でオリゴマーの形成が認められ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強い結合活性を示すが、 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。Jackson GS らの方法に準じて作製した β シート型のプリオン蛋白から選別された 2 種類の抗体 (β -PrP7、 β -PrP30) を用いて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、これらの抗体は β -PrP に結合するだけでなくプリオン蛋白フィブリルにも結合できることが ELISA により認められた。

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。今後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

β 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。また、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、Jackson GS 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に結合する抗体 (β -PrP7、 β -PrP30) は、今回作製したプリオン蛋白フィブリルに対しても結合活性を有することから、プリオン蛋白オリゴマーとプリオン蛋白フィブリル中のプリオン蛋白の立体構造には、共通した構造領域があり、これらの抗体は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間で共通した構造領域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。

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、今後これらの抗体が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。

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

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コンフォーマーに、抗体ファージブラリーを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、 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増強した。この結果により、プリオン蛋白のコンフォメ

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、 β -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。また、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 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、ヒトおよびウシ由来の組み換え全長プリオン蛋白の線維化に成功した。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選別することで、異常プリオンを直接検出できる検査法を確立できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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)

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)

4. 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)
 5. 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
 6. 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
 7. 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)
 8. 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)
 9. 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

II. 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.	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

Shuheji 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 Kori-moto, 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.

20th IUBMB International Congress of
Biochemistry and
Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress

June 2006

Kyoto

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)

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

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

3, Dept. 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. The soluble β form (β -PrP) exhibited partial resistance to proteinase K digestion, and composed of small spherical particles (diameter 3 nm). Direct panning was done against β -PrP using a large scale of the human scFv-displaying phage library. After two rounds of panning, we successfully isolated two clones (β -PrP7, β -PrP30) specific to β -PrP. We also tested the binding activity of these clones using β -PrP samples incubated at 4°C by ELISA. The binding activity of β -PrP7 was dramatically increased dependent on the incubation time, indicating that β -PrP consists of various β -conformers and the content of ones of conformers change dynamically in the solution at 4°C. 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.

20th IUBMB International Congress of
Biochemistry and
Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress

June 2006

Kyoto