

- hypothalamic lesions on the immune response, *Brain Res.* 196 (1980) 79–87.
- [24] B.D. Jankovic, K. Isakovic, Neuroendocrine correlates of the immune response. I. Effects of brain lesions on antibody production, *Int. Arch Allergy Appl. Immunol.* 45 (1973) 360–372.
- [25] W.H. Brooks, R.J. Cross, T.L. Rossman, W.R. Markesbery, Neuroimmunomodulation: anatomical basis for impairment and facilitation, *Ann. Neurol.* 12 (1982) 56–61.
- [26] H.O. Besedovsky, A. DelRey, E. Sorkin, M. Da Prada, H.H. Keller, Immuno regulation mediated by sympathetic nervous system, *Cell. Immunol.* 48 (1979) 346–355.
- [27] M. Stein, R.C. Schiavi, M. Camerino, Influence of brain and behavior on the immune system, *Science* 191 (1976) 435–440.
- [28] R.W. Bartrop, E. Luckhurst, L. Lazarus, L.G. Kiloh, R. Penny, Depressed lymphocyte function after bereavement depressed lymphocyte function after bereavement, *Lancet* i (1977) 834–836.
- [29] C.P. Phelps, J.M. Dong, L. T Chen, R.A. Menzies, Plasma interleukin-I  $\beta$ , prolactin, ACTH and corticosterone response to endotoxin after damage of the anterior hypothalamic area, *Neuroimmunomodulation* 9 (2001) 340–351.
- [30] T.J. Luparello, M. Stein, C.D. Park, Effect of hypothalamic lesions on rat anaphylaxis, *Am. J. Physiol.* 207 (1964) 911–914.
- [31] N.T. Macris, R.C. Schiavi, M.S. Camerino, M. Stein, Effect of hypothalamic lesions on immune processes in the guinea pig, *Am. J. Physiol.* 219 (1970) 1205–1209.

# プリオンタンパク質の正常機能とプリオン病における役割

坂口末廣

プリオンタンパク質 (PrP) は、その正常構造が変化し異常構造をとると「プリオン」となり、プリオン病を引き起こす。プリオン病では、正常 PrP が異常に変換することにより正常 PrP は減少し、正常機能が障害されていると考えられている。実際、プリオン病の病態と非常に類似した異常が PrP 欠損マウスに部分的に認められることが報告されている。一方、異常 PrP は神経毒性に作用すると考えられている。また興味深いことに、我々は、正常 PrP が神経保護機能を有し虚血または神経毒性タンパク質による神経細胞死を抑制することを見出した。つまり、プリオン病では正常 PrP が減少し異常 PrP が増加することにより、神経保護機能は減弱し神経毒性は増強すると考えられる。従って、プリオン病では、このように増強した神経毒性を介して、神経細胞死が起きている可能性が考えられる。

## 1. はじめに

プリオンタンパク質 (PrP) は宿主遺伝子にコードされた膜タンパク質である。「プリオン仮説」によると、PrP はそのタンパク質高次構造に変化を起こし特異な構造をとると感染性を獲得し、いわゆる「プリオン」となり、プリオン病を引き起こすと考えられている<sup>1)</sup>。PrP がプリオンになると宿主に感染し、構造変化を未だ起こしていない宿主 PrP の構造を変化させ、新たなプリオンを産生する<sup>2)</sup>。このようにして PrP は順次構造変化を来しプリオンの複製が行われる。タンパク質のみが、それも宿主タンパク質が構造変化を来したのみで感染性タンパク質に変換するというメカニズムは、これまでに確立された感染メカニズムと全く異なる。細菌やウイルスといったこれまでの病原微生物は、複製のための遺伝情報として核酸を保有している。しかしプリオンでは、複製のための情報がそのタンパク質構造に内在されている。最近、アミロイド症でも、プリオ

ン病と同様にタンパク質高次構造に異常を来した宿主タンパク質またはペプチドが、プリオンと同様に、感染性タンパク質に変化する可能性が報告されつつある<sup>3)</sup>。従って、プリオン病はこのような感染性タンパク質による疾患のプロトタイプとして、これからは新たに位置づけられていくのかもしれない。

本稿では、PrP のタンパク質構造や正常機能について紹介し、プリオンとの関係やプリオン病の病態における役割について、これまでの我々の研究成果や最近の知見を基に考察したいと考えている。

## 2. プリオンタンパク質

### 1) 遺伝子構造及び発現

プリオンタンパク質 (PrP) は宿主遺伝子にコードされた糖タンパク質である。ヒト及びマウス PrP 遺伝子はそれぞれ第 20 番染色体と第 2 番染色体上に存在する。ヒト PrP 遺伝子は二つのエキソンからなり、マウス PrP 遺伝子は三つのエキソンからなる。タンパク質翻訳領域は単一のエキソン内に存在し、ヒトでは 2 番目、マウスでは 3 番目のエキソン内にある<sup>4)</sup>。PrP のアミノ酸配列は動物種を超えて非常によく保存されている<sup>5)</sup>。遺伝子発現は、脳、心、肺、肝、脾、膵、腎など多くの組織または臓器に認められるが、特に脳において最も高い<sup>6)</sup>。脳内では、神経細胞に高く発現しているが、アストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞にも発現している<sup>6,7)</sup>。

徳島大学疾患酵素学研究中心-神経変性疾患研究部門  
(〒770-8503 徳島市蔵本町 3 丁目 18-15)

Physiological functions of prion protein and its roles in the pathogenesis of prion diseases

Suehiro Sakaguchi (Division of Molecular Neurobiology, The Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, Kuramoto-cho 3-18-15, Tokushima 770-8503, Japan)

## 2) 構造アイソフォーム

PrP には、アミノ酸組成は全く同じなのに、タンパク質高次構造が異なる二つのアイソフォームが知られている。一つは我々の様々な正常組織に発現する正常プリオンタンパク質 (cellular PrP: PrP<sup>C</sup>) であり、もう一つはプリオン病に特異的に検出される異常プリオンタンパク質 (scrapie PrP: PrP<sup>Sc</sup>) である<sup>9)</sup>。

マウス PrP<sup>C</sup> は、254 個のアミノ酸からなる前駆体タンパク質として翻訳される (図 1)。N 末端 23 個のアミノ酸はシグナルペプチドとして機能し、生合成の過程で除去される (図 1)<sup>9)</sup>。また C 末端 23 個のアミノ酸は、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーシグナルとして機能し、小胞体での GPI アンカー付着時に切断される (図 1)。さらに、179 番目と 214 番目のシステイン間で S-S 結合が形成され、181 番目と 197 番目の二つのアスパラギンに糖鎖が付加される (図 1)。このような生合成の過程を経た後、PrP<sup>C</sup> は分子量 33-37kDa の GPI アンカー糖タンパク質として細胞膜上 (主にラフト上) に発現する。

細胞膜上に発現した PrP<sup>C</sup> は、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、リソソームのタンパク質分解酵素により分解される。一部は、分解されることなくリサイクルされ、再び細胞膜に搬送される。PrP<sup>C</sup> の半減期は約 5 時間程度である。

PrP<sup>Sc</sup> は PrP<sup>C</sup> が構造変化を起こしたものである。円二色性法 (circular dichroism; CD) での解析の結果、PrP<sup>Sc</sup> は PrP<sup>C</sup> と比べて  $\beta$  シート構造の含有率が非常に高いことが明らかとなった。PrP<sup>C</sup> は 42% の  $\alpha$  ヘリックスと 3% の  $\beta$  シートを有し、PrP<sup>Sc</sup> は 30% の  $\alpha$  ヘリックスと 43% の  $\beta$  シートを有する (表 1)<sup>10)</sup>。また、両者の生化学的性質も著明に異なる。PrP<sup>C</sup> は界面活性剤の存在下で高い可溶性を示し、タンパク質分解酵素 (プロテイナーゼ K) にて容易に分解される (表 1)<sup>9)</sup>。しかし、PrP<sup>Sc</sup> は難溶性で凝集体を形成しやすく、プロテイナーゼ K でも消化されにくい (表 1)<sup>9)</sup>。

nuclear magnetic resonance (NMR) による構造解析の結果、PrP<sup>C</sup> は N 末端と C 末端の二つの領域 (ドメイン) から構成されることが明らかとなった。N 末端領域 (アミノ

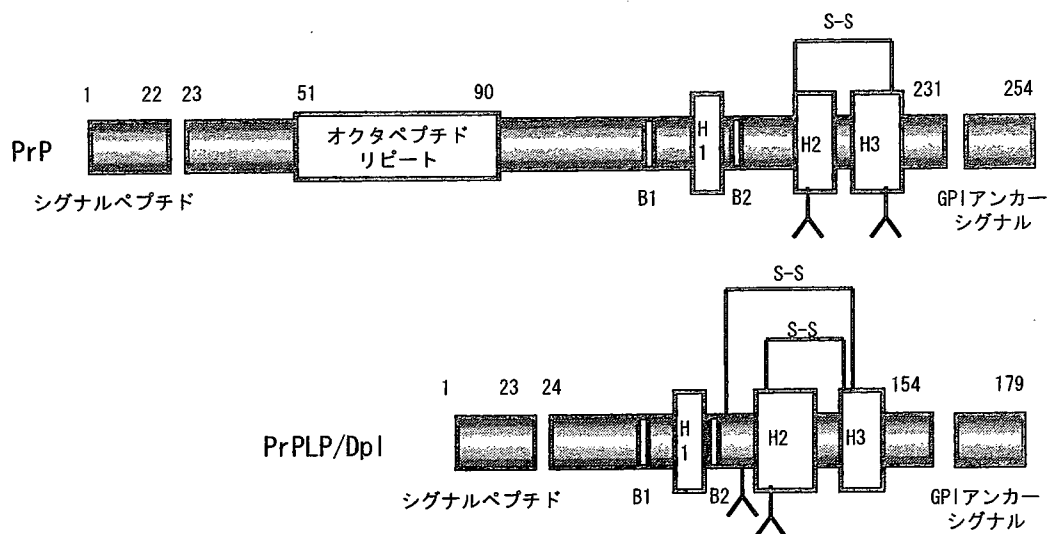


図 1 PrP と PrPLP/Dpl のタンパク質構造

PrP は、254 個のアミノ酸からなる前駆体タンパク質として翻訳される。N 末端 23 個のアミノ酸はシグナルペプチドとして働き、また C 末端 23 個のアミノ酸は GPI アンカーシグナルとして機能する。B1 (アミノ酸 128~131) と B2 (アミノ酸 161~164) は  $\beta$  シート構造領域を、H1 (アミノ酸 144~154)、H2 (アミノ酸 179~193) と H3 (アミノ酸 200~217) は  $\alpha$  ヘリックス構造領域を示している。PrPLP/Dpl は、179 個のアミノ酸からなる前駆体タンパク質として翻訳される。N 末端 23 個のアミノ酸はシグナルペプチドとして働き、また C 末端 25 個のアミノ酸は GPI アンカーシグナルとして機能する。B1 (アミノ酸 59~61) と B2 (アミノ酸 88~90) は  $\beta$  シート構造領域を、H1 (アミノ酸 73~82)、H2 (アミノ酸 101~125) と H3 (アミノ酸 129~145) は  $\alpha$  ヘリックス構造領域を示している。S-S はジスルフィド結合を、N は N 型糖鎖結合を示す。数字はアミノ酸番号を示す。

表 1 PrP アイソフォーム

プリオンタンパク質 (PrP)	タンパク質二次構造		プロテイナーゼ K	溶解性
	$\alpha$ ヘリックス	$\beta$ シート		
PrP <sup>C</sup>	42%	3%	感受性	可溶性
PrP <sup>Sc</sup>	30%	43%	抵抗性	難溶性

酸 23~120)は無構造なランダムペプチドであり, C末端領域(アミノ酸 121~231)は三つの $\alpha$ ヘリックスと二つの短い $\beta$ シートを有する球状構造である(図1)<sup>11)</sup>. N末端領域には, グリシンに富む8アミノ酸の繰り返し配列(octapeptide repeat: PHGGGWGQ)が存在する(図1). この領域は, ヒスチジン(H)残基にて銅イオンと結合し, 酸化ストレスの緩和に関与しているという報告があるが<sup>12)</sup>, 未だその機能に関しては十分に解明されていない. また PrP<sup>c</sup>は, 細胞膜に存在するメタロプロテアーゼのADAM(a disintegrin and metalloprotease) 10やTACE(tumor necrosis factor  $\alpha$ -converting enzyme; ADAM17)により, 中央部分(111番目と112番目のアミノ酸の間)で切断されることが報告されているが<sup>13)</sup>, その生物学的意義も不明である. PrP<sup>sc</sup>の構造については, PrP<sup>sc</sup>が凝集体を形成しやすいために, 未だ完全な解析が行われていない.

### 3) プリオンタンパク質類似分子: PrPLP/Dpl

我々とカナダのグループはそれぞれ独自に, PrP遺伝子の約16kb下流に, PrPと非常に類似した分子(PrPLP/Dpl)をコードする遺伝子を見出した<sup>14,15)</sup>. PrPLP/Dplは, PrPと同様に, GPIアンカータンパク質である(図1). N末端にはシグナルペプチドがあり, C末端にはGPIアンカーシグナルが存在する(図1). またPrPと同様に, PrPLP/Dplは三つの $\alpha$ ヘリックスと二つの短い $\beta$ シートからなる球状タンパク質である(図1)<sup>16)</sup>. さらにPrPと同様に, 2番目と3番目の $\alpha$ ヘリックスがS-S結合にて連結し, 2箇所にもN結合型の糖鎖が存在する(図1). しかしPrPLP/Dplには, PrPのN末端領域に相当する部分がない. そのためPrPLP/Dplは, PrPに特異的に存在するoctapeptide repeat領域に相当する配列を有しない(図1).

PrPLP/Dplは, 正常マウスの精巣, 心臓, 骨格筋, およ

び脾臓に発現する<sup>17)</sup>. 特に, 精巣で最も高い発現を示し, 精子細胞に発現している<sup>18,19)</sup>. Behrensらは, PrPLP/Dpl遺伝子欠損マウスを作製し解析した結果, 雄のマウスにおける精子細胞から精子への分化が部分的に阻害され, 精子の数が減少していることを報告した<sup>18)</sup>. また, 産生された精子の頭部は形態異常を起こしていた<sup>18)</sup>. これらの精子は機能的にも異常を示し, 卵子の透明帯を通過できなかった<sup>18)</sup>. 一方, 雌のPrPLP/Dpl遺伝子欠損マウスは正常に妊娠した<sup>18)</sup>. つまりこれらの結果は, PrPLP/Dplが精子の形成に重要であることを示している.

PrPLP/Dplは, PrPと異なり大人のマウスの脳では発現しない<sup>17)</sup>. しかし興味深いことに, 脳血管内皮細胞に特異的に, しかも生後1週をピークに一過性の発現が認められる<sup>17)</sup>. マウスの脳血液関門は生後1週頃に完成されると報告されている. 従って, PrPLP/Dplは脳血液関門の形成に重要な機能を担っているかもしれない. これからの研究成果に期待したい.

### 3. ノックアウトマウスによるプリオンタンパク質の機能解析

#### 1) プリオンタンパク質と神経細胞変性死

Weissmannらのグループが最初に報告したPrP欠損マウス(以下, Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウス)は, 何ら神経学的異常を呈しないことが報告された<sup>20)</sup>. しかし, 我々が独自に作製したPrP欠損マウス(以下, Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウス)は, 高齢になると小脳プルキンエ細胞の著明な変性死を起こし, 失調性歩行を呈した(図2)<sup>21)</sup>. さらに我々は, Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスにPrP遺伝子を再導入することにより, プルキンエ細胞死が正常に回復することを証明し, PrP<sup>c</sup>がプルキンエ細胞の長期生存維持に必要であることを示した<sup>22)</sup>. しかし, なぜこのような表現型の違いが起こるのか不明で

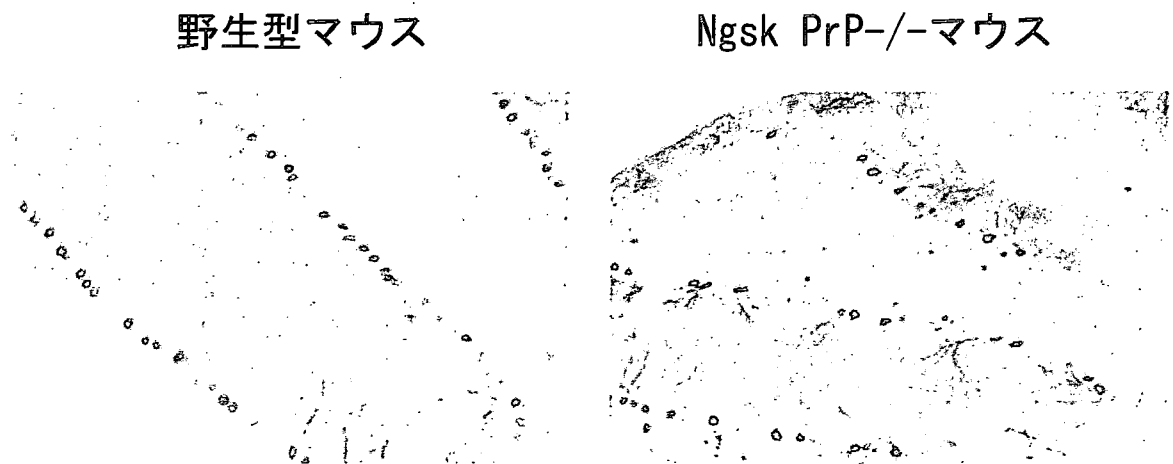


図2 Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスにおけるプルキンエ細胞変性死

野生型マウスの小脳では, 抗カルビンディン抗体で染色される多数のプルキンエ細胞が認められる. Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスでは, 変性死のため, その数が著明に減少している.

あった。

我々とカナダのグループはそれぞれ独自に、Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスのノックアウトされた PrP 遺伝子座ではスプライシング異常が起こり、下流に存在する PrPLP/Dpl 遺伝子が脳内で過剰発現していることを見出した (図3)<sup>14,15)</sup>。Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスではこのようなスプライシング異常は認められなかった<sup>14,15)</sup>。最近我々は、このスプライシング異常が PrP 遺伝子の最終エクソンのスプライシングアクセプターの欠損によることを、培養細胞系を用いて明らかにした<sup>23)</sup>。Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスではスプライシングアクセプターを含む領域がネオマイシン耐性遺伝子と置換され欠損している。しかし、Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスでは、この領域は正常のままである。従って、PrP<sup>c</sup>非存在下における PrPLP/Dpl の発現の違いが、両者間に認められた表現型の違いをもたらしている可能性が強く示唆された。そこで我々とカナダのグループは独自に、Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスに PrPLP/Dpl 遺伝子を導入した結果、Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスと同様に、これらのマウスが失調性歩行やプルキンエ細胞死を呈することを見出し、PrP<sup>c</sup>の非存在下に PrPLP/Dpl が過剰発現すると、プルキンエ細胞死が起こることを明らかにした<sup>24,25)</sup>。つまりこれらの結果は、PrP<sup>c</sup>は PrPLP/Dpl と機能的に拮抗し、PrPLP/Dpl の神経細胞変性作用を阻害す

ることを示した。

PrP<sup>c</sup>と PrPLP/Dpl との拮抗メカニズムは、現在不明である。Weissmann 博士は、大変興味深い仮説を提唱している (図4)<sup>26)</sup>。この仮説では、二つの分子 (未同定) を仮定している。一つは PrP<sup>c</sup> に対するリガンド分子で、もう一つは PrP<sup>c</sup> と同じような高次構造を持つ分子  $\pi$  である。正常マウスでは、PrP<sup>c</sup> がリガンド分子と強く結合し、プル

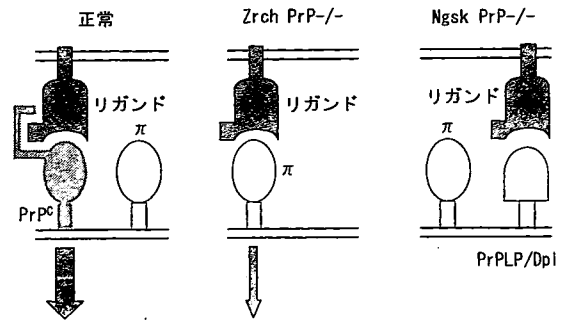
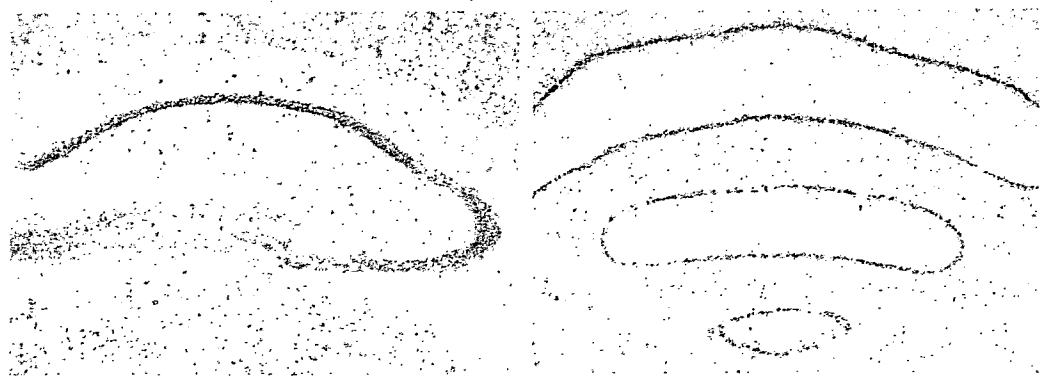


図4 プルキンエ細胞変性死の分子機構

正常マウスでは、PrP<sup>c</sup> がそのリガンドと結合し、プルキンエ細胞の生存に必要なシグナルを産生する。Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスでは、PrP<sup>c</sup> の代わりに PrP 類似タンパク質 ( $\pi$ ) が PrP のリガンドと結合しシグナルを産生する。Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスでは、PrPLP/Dpl の過剰発現により  $\pi$  とリガンドとの結合が阻害され、プルキンエ細胞変性死が起こる。

## 正常マウス

Ngsk PrP<sup>-/-</sup>



海馬領域

小脳

図3 *in situ* hybridization による PrPLP/Dpl の脳内発現

PrPLP/Dpl は正常マウスの脳内では発現していない。しかし、Ngsk PrP<sup>-/-</sup>マウスの脳内では、全ての神経細胞に PrPLP/Dpl の発現が認められる。特に、海馬領域の神経細胞や小脳プルキンエ細胞に強い発現が認められる。

キンエ細胞の生存に必要なシグナルを形成する。また Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスでは、PrP<sup>c</sup>の代わりに分子πがリガンドと弱いがながらも結合し、シグナルを伝達する。しかし、NgsK PrP<sup>-/-</sup>マウスでは、過剰発現する PrPLP/Dpl が分子πとリガンド分子との結合を阻害し、シグナルの伝達を妨害する。このため、ブルキンエ細胞死が起こる。この仮説を証明するためには、未知の二つの分子を同定する必要がある。

一方 Wong らは、PrPLP/Dpl が過剰発現しているマウスの脳内では、PrPLP/Dpl を発現しない Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスの脳内より、酸化ストレスが高いことを報告している<sup>27)</sup>。また Bounhar らは、アポトーシスタンパク質 Bax によって誘導される神経細胞のアポトーシスを、PrP<sup>c</sup> が抑制することを報告している<sup>28)</sup>。これらの結果は、以下のような拮抗メカニズムの可能性を示唆している。つまり、PrPLP/Dpl の過剰発現は過剰な酸化ストレスをもたらし、ブルキンエ細胞を死に至らしめるが、PrP<sup>c</sup> は抗アポトーシス効果によってブルキンエ細胞死を阻害する。これからの研究成果に期待したい。

## 2) プリオンタンパク質と虚血性神経細胞死

我々は、PrP<sup>c</sup> が虚血性細胞死から神経細胞を保護する機能も有することを見出した<sup>29)</sup>。Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスの両側の総頸動脈を10分間一過性に閉塞すると、海馬神経細胞に著明なアポトーシスが認められた。興味深いことに、NgsK PrP<sup>-/-</sup>マウス (PrPLP/Dpl を発現する) に同様な一過性の虚血を与えると、Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスと比べてアポトーシスは増悪した。しかし、野生型マウスでは、このような海馬神経細胞のアポトーシスはほとんど認められなかった。他のグループも同様な結果を報告している。McLennan らは、Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスの中大脳動脈を完全に閉塞すると、野生型マウスと比べて、Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスでは梗塞巣が著明に拡大することを報告した<sup>30)</sup>。これらの結果は、PrP<sup>c</sup> が虚血ストレスからも神経細胞を保護する機能を有することを示した。

## 3) プリオンタンパク質と高次脳機能

Weissmann らのグループは、Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスに水迷路テスト (water-maze test) 等の学習・記憶テストを行い、PrP<sup>c</sup> がこのような高次脳機能に関与するのか検討した<sup>20)</sup>。その結果、Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスは野生型マウスと同様に正常な学習・記憶能力を示した<sup>20)</sup>。しかし後に、Collinge らは、Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウス脳の海馬 CA1 領域における電気生理学的解析を行い、学習・記憶に関係している長期増強 (long-term potentiation: LTP) の異常を報告し、PrP<sup>c</sup> が学習・記憶の高次脳機能に関与する可能性を示した<sup>31)</sup>。Nishida らは、Weissmann らのグループと異なる学習試験

(water-finding test) を NgsK PrP<sup>-/-</sup>マウスに行った結果、NgsK PrP<sup>-/-</sup>マウスが学習行動の異常を呈することを見出した<sup>32)</sup>。これらの結果は、PrP<sup>c</sup> が全ての学習・記憶でなく、あるタイプの学習・記憶に関与している可能性を示した。また Tobler らは、Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスが日内周期異常や睡眠異常を呈することを報告した<sup>33)</sup>。つまりこれらの結果は、PrP<sup>c</sup> が学習・記憶、体内時計の維持また睡眠の調節といった脳の高次機能に関与していることを示している。

## 4) プリオンタンパク質とグリア細胞機能

我々は、NgsK PrP<sup>-/-</sup>マウスの脊髄および末梢神経系に著明な脱髄を見出した<sup>22)</sup>。また我々は、Zrch PrP<sup>-/-</sup>マウスにおいても、同様な脱髄を見出した<sup>22)</sup>。脱髄は主に大径の神経繊維に認められ、その数や程度は齢とともに増強した。これらの結果は、PrP<sup>c</sup> が髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトやシュワン細胞の機能に関与し、髄鞘の形成維持に重要であることを示した。

## 5) プリオンタンパク質のリバースジェネティクス

PrP<sup>c</sup> が PrPLP/Dpl と拮抗し、ブルキンエ細胞変性死を抑制するという結果は、リバースジェネティクスによる PrP<sup>c</sup> の構造・機能解析を可能にした。我々は、欠損やアミノ酸変異を有する様々な PrP を NgsK PrP<sup>-/-</sup>マウスに発現させることにより、ブルキンエ細胞変性死を阻害するのに重要な PrP の領域を検索した<sup>34)</sup>。その結果、N 末端アミノ酸 23-88 を欠損する PrP $\Delta$ 23-88 は PrPLP/Dpl によるブルキンエ細胞死を阻害できないことを見出し、この部位に PrPLP/Dpl と拮抗する重要な領域が存在することを見出した<sup>34)</sup>。この部位は PrP に特有な octapeptide repeat 領域を含んでいるために、この領域が PrPLP/Dpl との拮抗に重要であると当初考えられた。しかし我々は、octapeptide repeat 領域 (アミノ酸 51-90) のみを欠損する PrP $\Delta$ OR も PrPLP/Dpl と拮抗しブルキンエ細胞死を抑制できることを見出した (未発表)。また我々は、octapeptide repeat 領域よりさらに N 末端領域 (アミノ酸 25-50) を欠損する PrP $\Delta$ preOR もブルキンエ細胞死を抑制できることも見出した (未発表)。つまりこれらの結果は、PrPLP/Dpl と拮抗しブルキンエ細胞死を抑制するのに重要な部位は、PrP<sup>c</sup> の N 末端領域の特定な 1 箇所部位でなく、PrP<sup>c</sup> の N 末端領域の広範な部位に少なくとも 2 箇所以上存在することを示した。

## 4. プリオン病におけるプリオンタンパク質の役割

### 1) プリオン病

プリオン病は、新規の病原体「プリオン」の感染により発症する致死性および伝播性海綿状脳症 (transmissible

spongiform encephalopathy) の総称である。組織病理学的変化は中枢神経系にのみ局限し、神経細胞死を伴う海綿状空胞変性、アストロサイトやミクログリアの増生(グリオシス)、またアミロイド斑(クールー斑)などが認められる<sup>8)</sup>。

動物では、ヒツジに自然発症する病因不明のスクレーピー(scrapie)が有名である。その他の動物のプリオン病としては、1986年頃から英国において大量に発生が認められたウシ海綿状脳症(狂牛病, bovine spongiform encephalopathy: BSE)、伝播性ミンク脳症、そしてシカ慢性消耗性疾患等が知られている<sup>35)</sup>。

ヒトのプリオン病には、クロイツフェルト・ヤコブ病(Creutzfeldt-Jakob disease: CJD)、ゲルストマン・ストロイスラー・シェインカー症候群(Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome: GSS)、クールー(Kuru)及び致死性家族性不眠症(fatal familial insomnia: FFI)がある(図5)<sup>8)</sup>。CJDは初老期に発症し、痴呆や小脳機能障害等を主症状とする。ほとんどのCJD(85~90%)は、病因は不明で散発性に発症する(散発性CJD: sporadic CJD)。10~15%のCJDは、PrP遺伝子に変異を有し、優性遺伝を呈する(家族性CJD: familial CJD)。さらに、感染が原因であると明らかに特定できる感染性CJDがある。その代表は、狂牛病から感染したと考えられる異型(variant)CJDと、CJD汚染成長ホルモン投与や汚染脳硬膜移植等による医原性(iatrogenic)CJDがある。またクールーは、パプア・ニューギニアのフォア(Fore)族の子供と成人女性に主にみられた小脳失調症を呈する疾患で、食人慣習による経口感染が病因と考えられている。GSSとFFIは、遺伝性プリオン病で、PrP遺伝子に変異を有する。

## 2) 新規病原体「プリオン」

プリオン(prion: proteinaceous infectious particle)とは、ノーベル医学・生理学賞を受賞したPrusiner博士が、プリオン病の病原体に対しこれまでの病原微生物と異なる病原

体として命名したものである<sup>3)</sup>。これまでに発見されている病原微生物(細菌、ウイルスおよび真菌など)は、増殖のための遺伝情報として必ずDNAやRNAなどの核酸を保持している。しかし、現在の分子生物学的手法を駆使しても、未だプリオンに特有な核酸は検出されていない。このことは、プリオンが増殖のために核酸を必要としない新規の病原体であることを意味している。実際、プリオンはDNaseやRNaseなどの核酸分解酵素や紫外線などに耐性を示す。しかし一方で、プリオンはフェノール、尿素および塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤に感受性である。つまりこれらの事実は、プリオンが核酸を保持しないタンパク質を主成分とする新規の病原体であることを示している。

## 3) プリオンとプリオンタンパク質

Prusiner博士らは、プリオン感染ハムスター脳よりプリオンを高純度に精製することに成功し、この精製成分に特異的に認められるタンパク質としてPrP<sup>Sc</sup>を同定した<sup>36)</sup>。さらに彼らは、PrP<sup>Sc</sup>とプリオン感染価の両者の挙動が一致することを示し<sup>37)</sup>、「プリオン仮説」または「タンパク質唯一仮説」を提唱した<sup>3)</sup>。この仮説によると、プリオンはPrP<sup>Sc</sup>から構成され、PrP<sup>Sc</sup>がPrP<sup>C</sup>をPrP<sup>Sc</sup>に変換させると考えられている。

我々や他の研究者らは、この仮説の是非を検討するために、PrP<sup>-/-</sup>マウスを独自に作製し感染実験を行った<sup>38-41)</sup>。その結果、野生型マウスは全て感染し死亡するのに対し、PrP<sup>-/-</sup>マウスはプリオンに感染せず1匹もプリオン病に罹らないことを報告した<sup>38-41)</sup>。また、野生型マウスではプリオンは増殖し、PrP<sup>Sc</sup>は過剰に産生されていた<sup>38-41)</sup>。しかし、PrP<sup>-/-</sup>マウスではプリオンもPrP<sup>Sc</sup>も産生されなかった<sup>38-41)</sup>。これらの結果は、プリオンの増殖、すなわちPrP<sup>Sc</sup>の産生にはPrP<sup>C</sup>が必要であるとするプリオン仮説とよく一致しプリオン仮説を強く支持した。

しかし、プリオン仮説を最終的に証明するためには、

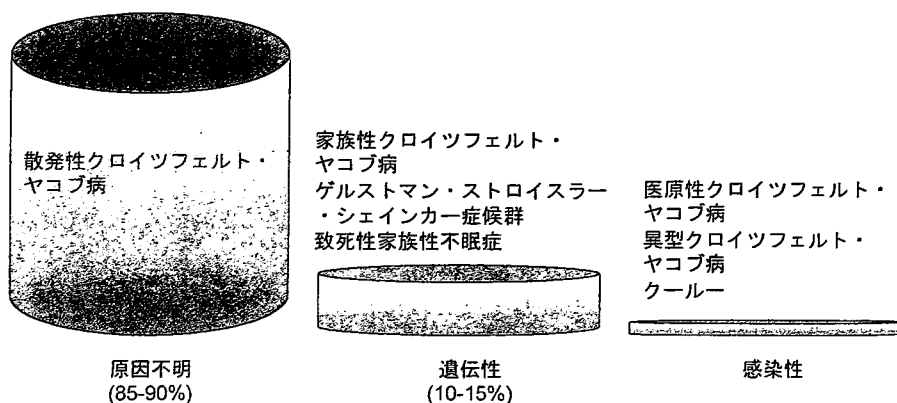


図5 ヒトプリオン病の成因による分類

PrP<sup>Sc</sup>がプリオンそのものであること、つまりPrP<sup>Sc</sup>それ自体が感染性でプリオン病を引き起こすことを示す必要がある。Kociskoらは、PrP<sup>Sc</sup>とPrP<sup>C</sup>の精製分画をある条件で*in vitro*で反応させると、PrP<sup>C</sup>がPrP<sup>Sc</sup>様PrP、すなわちプロテイナーゼK抵抗性PrPに変換することを報告した<sup>42)</sup>。最近、このように反応させた分画(PrP<sup>Sc</sup>様PrPが新たに産生される)の感染性が、何も反応させなかった分画(PrP<sup>Sc</sup>様PrPは産生されない)と比べて明らかに高いことが報告された<sup>43)</sup>。また、大腸菌から精製したリコンビナントPrPを、βシート構造を多く含有するPrP<sup>Sc</sup>様PrPに*in vitro*で変換することにより、このPrP<sup>Sc</sup>様リコンビナントPrPが感染性PrPに変換することが報告された<sup>44)</sup>。すなわちこれらの結果は、PrP<sup>Sc</sup>が感染性であるとするプリオン仮説に最終的な結論を導き出したと考えられる。

4) プリオン複製 (PrP<sup>Sc</sup> 産生) モデル

プリオンはどのように複製するのであろうか。つまり、PrP<sup>C</sup>はどのようにPrP<sup>Sc</sup>へと構造変換するのであろうか。上述したように、PrP<sup>C</sup>は、αヘリックスが多くβシートが極端に少ない構造を有している。一方、PrP<sup>Sc</sup>では、αヘリックスよりβシートが多い構造となっている。従って、αヘリックスからβシートへの二次構造の変化が、PrP<sup>C</sup>からPrP<sup>Sc</sup>への変換に重要だと考えられている<sup>10)</sup>。しかし、その詳細な変換メカニズムは未だ解明されていない。ま

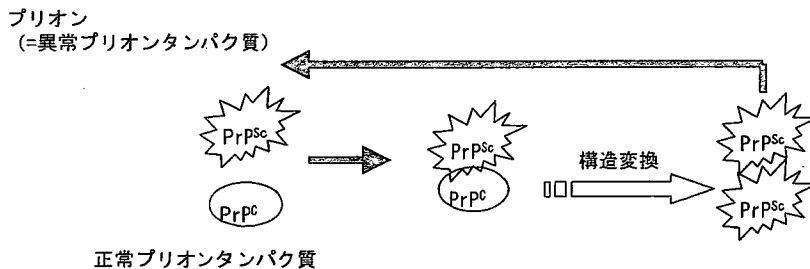
た、宿主由来のシャペロン分子がこの構造変換の促進に関与している可能性が示唆されているが、その実体も不明である<sup>45)</sup>。

現在、PrP<sup>C</sup>のPrP<sup>Sc</sup>への変換モデルとして、ヘテロダイマーモデルと核依存性重合モデルの二つのモデルが提唱されている<sup>46,47)</sup>。ヘテロダイマーモデルによると、1分子のPrP<sup>Sc</sup>が1分子のPrP<sup>C</sup>とヘテロダイマーを形成し、PrP<sup>Sc</sup>の触媒的作用を通してPrP<sup>C</sup>が構造変化を起こし、PrP<sup>Sc</sup>へと変換する(図6A)。新しく産生されたPrP<sup>Sc</sup>は、再び1分子のPrP<sup>C</sup>をPrP<sup>Sc</sup>へと変換させる(図6A)。このようにして、PrP<sup>Sc</sup>が産生され、プリオンは複製する。一方、核依存性重合モデルでは、PrP<sup>Sc</sup>は複数個重合し、核(seed)を形成する(図6B)。PrP<sup>C</sup>は、この核に順次重合(polymerization)することにより、構造変化を起こしPrP<sup>Sc</sup>へと変換する(図6B)。こうして出来た長いPrP<sup>Sc</sup>のポリマーは分断され、新たなPrP<sup>Sc</sup>の核が形成される(図6B)。つまり、PrP<sup>C</sup>はPrP<sup>Sc</sup>の核に重合することによりPrP<sup>Sc</sup>へと変換し、プリオンの増殖が起こる。どちらのモデルが正しいのか、今後の研究が待たれる。

5) プリオンタンパク質とプリオン病の分子病態

PrP<sup>-/-</sup>マウスがプリオンに感染してもプリオン病にかからないことは、PrP<sup>C</sup>からPrP<sup>Sc</sup>への構造変換が、プリオン病の病態の中心であることを示唆した<sup>38-41)</sup>。また、PrPの

A: ヘテロダイマーモデル



B: 核依存性重合モデル

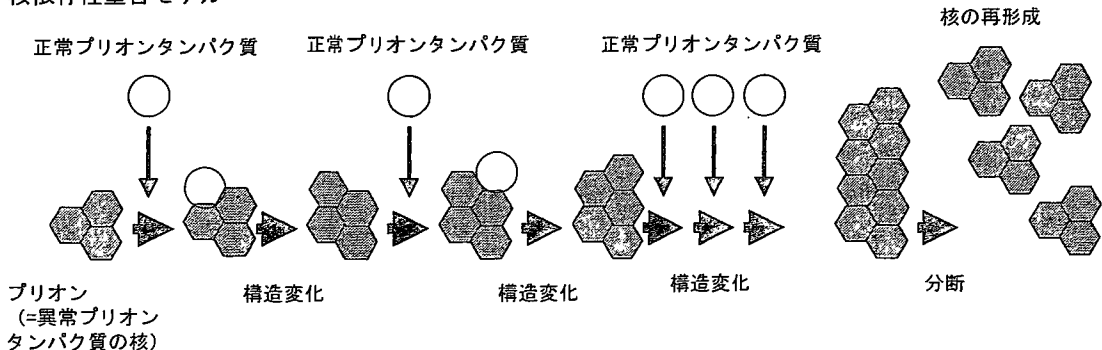


図6 プリオン複製モデル

詳細は本文参照。



コンディショナルノックアウトマウスを用いた感染実験の結果、PrP<sup>c</sup>の発現がプリオン感染の途中でノックダウンされると、マウスはプリオン病を発病しないことが示され、プリオン病の病態におけるPrPの構造変換の中心的役割がさらに支持された<sup>48)</sup>。しかし、プリオン病の詳細な分子病態は未だ完全に解明されていない。

プリオン病感染脳内では、PrP<sup>c</sup>からPrP<sup>sc</sup>への変換が神経細胞内で構成的に行われる。これにより、PrP<sup>sc</sup>は脳内に過剰に蓄積する。Forloniらは、PrPのアミノ酸106-126に相当する疎水性の強い領域のペプチド(PrP106-126)がPrP<sup>sc</sup>と同様に凝集しやすくアミロイドを形成すること、またPrP106-126が培養神経細胞にアポトーシスを起こしたり、グリア細胞の活性化を来したりすることを報告した<sup>49,50)</sup>。これらの結果は、脳内に蓄積したPrP<sup>sc</sup>が細胞毒性を示し、神経細胞を変性死に至らしめる可能性を示した。しかし一方、PrP<sup>c</sup>がPrP<sup>sc</sup>へ変換することによりPrP<sup>c</sup>は減少する。このため、プリオン感染脳内ではPrP<sup>c</sup>の正常機能が障害され、この機能障害がプリオン病の病態に関与している可能性が指摘されている。PrP<sup>-/-</sup>マウスに認められた神経細胞変性死、脱髄、失調性歩行、学習・記憶障害、日内周期異常及び睡眠障害等の異常表現型は、プリオン病の病態と非常に類似している(図7)<sup>21,22,31-33)</sup>。このことは、プリオン病の病態にPrP<sup>c</sup>の機能障害が関与しているとする説を支持している。

しかし上述したように、PrP<sup>c</sup>の機能消失のみではブルキンエ細胞変性死は起こらない。ブルキンエ細胞が変性死を起こすには、PrP<sup>c</sup>の機能消失とPrPLP/Dplの脳内異所性過剰発現が必要である(図8)。しかし、プリオン感染脳内では、PrPLP/Dplは発現していない<sup>51)</sup>。従って、PrPLP/Dplそれ自体はプリオン病の病態に関係がない。興味深いことに、ShmerlingらはPrPのN末端32-135を欠損するPrPΔ32-135をZrch PrP<sup>-/-</sup>マウスに発現させると、これらのマウスがブルキンエ細胞の変性死や顆粒細胞の変性死を起こし、小脳失調性歩行を呈することを報告した<sup>52)</sup>。PrPΔ32-135はPrPLP/Dplとの相同領域に相当する。つまり、PrPΔ32-135による神経細胞死とPrPLP/Dplの過剰発現によるブルキンエ細胞死には、同様な分子機構が関

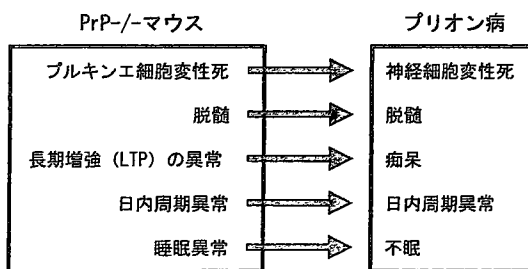


図7 PrP<sup>-/-</sup>マウスにおける異常表現型とプリオン病の病態との類似点

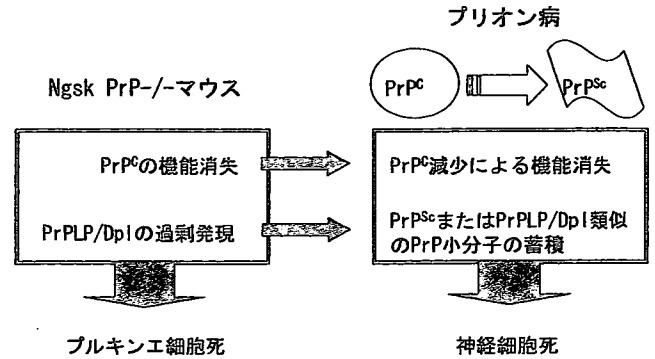


図8 Nsgk PrP<sup>-/-</sup>マウスのブルキンエ細胞変性死から推測されるプリオン病における神経細胞変性死のメカニズム

PrP<sup>c</sup>からPrP<sup>sc</sup>への変換に伴うPrP<sup>c</sup>の正常機能消失とPrP<sup>sc</sup>またはPrPLP/Dpl類似のPrP小分子の蓄積の両方が、プリオン病における神経細胞変性死には必要である。

与している可能性が考えられた。プリオン感染脳内でも、このようにN末端領域を欠損するプロテイナーゼK抵抗性のPrP分子が検出されている<sup>53)</sup>。従って、このようなPrPLP/Dpl類似のPrP小分子が、プリオン病の神経細胞変性死に関与しているかもしれない(図8)。または、PrP<sup>sc</sup>そのものがPrPLP/Dplと類似の機能を果たし、神経細胞変性死を来しているのかもしれない(図8)。今後の研究成果に期待したい。

5. おわりに

多くの研究者らの努力の結果、プリオン病研究は飛躍的に進歩してきた。しかし、未だプリオン病は不治の病である。治療法の確立を早急に行う必要がある。また、狂牛病から感染した異型CJDでは、従来のCJDと異なり、プリオンが中枢神経系のみでなく、扁桃腺や盲腸などのリンパ組織や血液など末梢の組織にも存在する<sup>54)</sup>。プリオン病は、発病前に診断することは非常に困難である。従って、潜在的にプリオンに感染しているヒトを介した2次感染の増大が危惧されている。実際英国では、輸血を介して感染したと考えられるケースが2例報告されている<sup>55,56)</sup>。また、移植医療などの高度医療が進むにつれ、その感染の危険性は増大すると考えられる。従って、このようなプリオン病の感染の連鎖を食い止めるには、プリオン病の発症前診断法の確立、及びプリオン病の予防法の確立、特にプリオンワクチンの開発が早急に必要である。

謝辞

本稿に紹介しました研究成果は、私が長年在籍しました長崎大学大学院分子病態学講座分子解析学分野(片峰茂教授)の皆さんの協力によるものです。ここに、感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Prusiner, S.B. (1982) *Science*, 216, 136-144.
- 2) Zhang, H., Sawashita, J., Fu, X., Korenaga, T., Yan, J., Mori, M., & Higuchi, K. (2006) *FASEB J.*, 20, 1012-1014.
- 3) Prusiner, S.B. (1991) *Science*, 252, 1515-1522.
- 4) Schatzl, H.M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F.E., & Prusiner, S.B. (1995) *J. Mol. Biol.*, 245, 362-374.
- 5) Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., Prusiner, S.B., & Weissmann, C. (1985) *Cell*, 40, 735-746.
- 6) Moser, M., Colello, R.J., Pott, U., & Oesch, B. (1995) *Neuron*, 14, 509-517.
- 7) Brown, D.R., Besinger, A., Herms, J.W., & Kretzschmar, H.A. (1998) *Neuroreport*, 9, 1425-1429.
- 8) DeArmond, S.J. & Prusiner, S.B. (1995) *Am. J. Pathol.*, 146, 785-811.
- 9) Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., & Prusiner, S.B. (1987) *Cell*, 51, 229-240.
- 10) Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F. E., & Prusiner, S.B. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10962-10966.
- 11) Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R., & Wuthrich, K. (1997) *FEBS Lett.*, 413, 282-288.
- 12) Brown, D.R., Nicholas, R.S., & Canevari, L. (2002) *J. Neurosci. Res.*, 67, 211-224.
- 13) Vincent, B., Paitel, E., Saftig, P., Frobert, Y., Hartmann, D., De Strooper, B., Grassi, J., Lopez-Perez, E., & Checler, F. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 37743-37746.
- 14) Moore, R.C., Lee, I.Y., Silverman, G.L., Harrison, P.M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S.H., Chishti, M.A., Liang, Y., Mastrangelo, P., Wang, K., Smit, A. F., Katamine, S., Carlson, G.A., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Melton, D.W., Tremblay, P., Hood, L.E., & Westaway, D. (1999) *J. Mol. Biol.*, 292, 797-817.
- 15) Li, A., Sakaguchi, S., Atarashi, R., Roy, B.C., Nakaoke, R., Arima, K., Okimura, N., Kopacek, J., & Shigematsu, K. (2000) *Cell. Mol. Neurobiol.*, 20, 553-567.
- 16) Mo, H., Moore, R.C., Cohen, F.E., Westaway, D., Prusiner, S. B., Wright, P.E., & Dyson, H.J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 2352-2357.
- 17) Li, A., Sakaguchi, S., Shigematsu, K., Atarashi, R., Roy, B.C., Nakaoke, R., Arima, K., Okimura, N., Kopacek, J., & Katamine, S. (2000) *Am. J. Pathol.*, 157, 1447-1452.
- 18) Behrens, A., Genoud, N., Naumann, H., Rulicke, T., Janett, F., Heppner, F.L., Ledermann, B., & Aguzzi, A. (2002) *EMBO J.*, 21, 3652-3658.
- 19) Peoch, K., Serres, C., Frobert, Y., Martin, C., Lehmann, S., Chasseigneaux, S., Sazdovitch, V., Grassi, J., Jouannet, P., Launay, J.M., & Laplanche, J.L. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 43071-43078.
- 20) Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., & Weissmann, C. (1992) *Nature*, 356, 577-582.
- 21) Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T., & Noda, T. (1996) *Nature*, 380, 528-531.
- 22) Nishida, N., Tremblay, P., Sugimoto, T., Shigematsu, K., Shirabe, S., Petromilli, C., Erpel, S.P., Nakaoke, R., Atarashi, R., Houtani, T., Torchia, M., Sakaguchi, S., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., & Katamine, S. (1999) *Lab. Invest.*, 79, 689-697.
- 23) Yoshikawa, D., Kopacek, J., Yamaguchi, N., Ishibashi, D., Yamanaka, H., Yamaguchi, Y., Katamine, S., & Sakaguchi, S. (2007) *Gene*, 386, 139-146.
- 24) Moore, R.C., Mastrangelo, P., Bouzamondo, E., Heinrich, C., Legname, G., Prusiner, S.B., Hood, L., Westaway, D., DeArmond, S.J., & Tremblay, P. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 15288-15293.
- 25) Yamaguchi, N., Sakaguchi, S., Shigematsu, K., Okimura, N., & Katamine, S. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 319, 1247-1252.
- 26) Weissmann, C. & Aguzzi, A. (1999) *Science*, 286, 914-915.
- 27) Wong, B.S., Liu, T., Paisley, D., Li, R., Pan, T., Chen, S.G., Perry, G., Petersen, R.B., Smith, M.A., Melton, D.W., Gambetti, P., Brown, D.R., & Sy, M.S. (2001) *Mol. Cell. Neurosci.*, 17, 768-775.
- 28) Bounhar, Y., Zhang, Y., Goodyer, C.G., & LeBlanc, A. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 39145-39149.
- 29) Sakurai-Yamashita, Y., Sakaguchi, S., Yoshikawa, D., Okimura, N., Masuda, Y., Katamine, S., & Niwa, M. (2005) *Neuroscience*, 136, 281-287.
- 30) McLennan, N.F., Brennan, P.M., McNeill, A., Davies, I., Fotheringham, A., Rennison, K.A., Ritchie, D., Brannan, F., Head, M.W., Ironside, J.W., Williams, A., & Bell, J.E. (2004) *Am. J. Pathol.*, 165, 227-235.
- 31) Collinge, J., Whittington, M.A., Sidle, K.C., Smith, C.J., Palmer, M.S., Clarke, A.R., & Jefferys, J.G. (1994) *Nature*, 370, 295-297.
- 32) Nishida, N., Katamine, S., Shigematsu, K., Nakatani, A., Sakamoto, N., Hasegawa, S., Nakaoke, R., Atarashi, R., Kataoka, Y., & Miyamoto, T. (1997) *Cell. Mol. Neurobiol.*, 17, 537-545.
- 33) Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A., & Manson, J.C. (1996) *Nature*, 380, 639-642.
- 34) Atarashi, R., Nishida, N., Shigematsu, K., Goto, S., Kondo, T., Sakaguchi, S., & Katamine, S. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 28944-28949.
- 35) Prusiner, S.B. (1997) *Science*, 278, 245-251.
- 36) Bolton, D.C., McKinley, M.P., & Prusiner, S.B. (1982) *Science*, 218, 1309-1311.
- 37) McKinley, M.P., Bolton, D.C., & Prusiner, S.B. (1983) *Cell*, 35, 57-62.
- 38) Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., & Weissmann, C. (1993) *Cell*, 73, 1339-1347.
- 39) Prusiner, S.B., Groth, D., Serban, A., Koehler, R., Foster, D., Torchia, M., Burton, D., Yang, S.L., & DeArmond, S.J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10608-10612.
- 40) Manson, J.C., Clarke, A.R., McBride, P.A., McConnell, I., & Hope, J. (1994) *Neurodegeneration*, 3, 331-340.
- 41) Sakaguchi, S., Katamine, S., Shigematsu, K., Nakatani, A., Moriuchi, R., Nishida, N., Kurokawa, K., Nakaoke, R., Sato, H., Jishage, K., Kuno, J., Noda, T., & Miyamoto, T. (1995) *J. Virol.*, 69, 7586-7592.
- 42) Kocisko, D.A., Come, J.H., Priola, S.A., Chesebro, B., Raymond, G.J., Lansbury, P.T., & Caughey, B. (1994) *Nature*, 370, 471-474.
- 43) Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., & Soto, C. (2005) *Cell*, 121, 195-

- 206.
- 44) Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., & Prusiner, S.B. (2004) *Science*, 305, 673-676.
- 45) Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., & Prusiner, S.B. (1995) *Cell*, 83, 79-90.
- 46) Cohen, F.E., Pan, K.M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R. J., & Prusiner, S.B. (1994) *Science*, 264, 530-531.
- 47) Lansbury, P.T. (1994) *Science*, 265, 1510.
- 48) Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klohn, P.C., Brandner, S., & Collinge, J. (2003) *Science*, 302, 871-874.
- 49) Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O., & Tagliavini, F. (1993) *Nature*, 362, 543-546.
- 50) Forloni, G., Del Bo, R., Angeretti, N., Chiesa, R., Smioldo, S., Doni, R., Ghibaudi, E., Salmona, M., Porro, M., Verga, L., Giaccone, G., Bugiani, O., & Tagliavini, F. (1994) *Eur. J. Neurosci.*, 6, 1415-1422.
- 51) Tuzi, N.L., Gall, E., Melton, D., & Manson, J.C. (2002) *J. Gen. Virol.*, 83, 705-711.
- 52) Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blattler, T., Brandner, S., Gotz, J., Rulicke, T., Flechsig, E., Cozzio, A., von Mering, C., Hangartner, C., Aguzzi, A., & Weissmann, C. (1998) *Cell*, 93, 203-214.
- 53) Chen, S.G., Teplow, D.B., Parchi, P., Teller, J.K., Gambetti, P., & Autilio-Gambetti, L. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 19173-19180.
- 54) Hill, A.F., Butterworth, R.J., Joiner, S., Jackson, G., Rossor, M. N., Thomas, D.J., Frosh, A., Tolley, N., Bell, J.E., Spencer, M., King, A., Al-Sarraj, S., Ironside, J.W., Lantos, P.L., & Collinge, J. (1999) *Lancet*, 353, 183-189.
- 55) Llewelyn, C.A., Hewitt, P.E., Knight, R.S.G., Amar, K., Cousens, S., Mackenzie, J., & Will, R.G. (2004) *Lancet*, 363, 417-421.
- 56) Peden, A.H., Head, M.W., Ritchie, D.L., Bell, J.E., & Ironside, J.W. (2004) *Lancet*, 364, 527-529.
-

日本臨牀 第65巻・第8号（平成19年8月号）別刷

特集：プリオン病と遅発性ウイルス感染症

## プリオン伝播（プリオン蛋白異常化）の メカニズム

坂口末廣

## 各論 プリオン病

プリオン伝播(プリオン蛋白異常化)の  
メカニズム

坂口末廣

## Mechanisms of the prion transmission

Suehiro Sakaguchi

Division of Molecular Neurobiology, The Institute for Enzyme Research,  
The University of Tokushima

## Abstract

Prions, the causative agents of prion diseases, consist of the abnormal isoform of prion protein, PrP<sup>Sc</sup>. PrP<sup>Sc</sup> is generated by conformational conversion of the normal isoform of prion protein, PrP<sup>C</sup>, a glycosyl-phosphatidyl-inositol-anchored glycoprotein abundantly expressed on the surface of neurons. Prions or PrP<sup>Sc</sup> having invaded the body interact with PrP<sup>C</sup> and induce changes in structure of the interacting PrP<sup>C</sup> into that of PrP<sup>Sc</sup>, leading to prion replication. At the same time, this constitutive conversion causes the detrimental accumulation of PrP<sup>Sc</sup> in the brain tissue. Here, I will introduce the structural and biochemical properties of PrP<sup>C</sup> and PrP<sup>Sc</sup> and discuss the nature of prions and the mechanisms of prion replication in more detail.

**Key words:** prion, prion protein, prion disease, protein-only hypothesis, conformational conversion

## はじめに

プリオン病または伝播性海綿状脳症を引き起こす‘プリオン’は、細菌やウイルスといったこれまでに知られている病原体とは全く異なる新規の病原体である<sup>1)</sup>。これまでに発見された病原体は、DNAやRNAといった核酸をゲノムとして保有している。この核酸ゲノムには、それぞれの病原体の複製・増殖また病原性を決定するのに必要な遺伝情報がすべてコードされている。したがって、これまでの病原体は、核酸の複製なしでは増殖できず、病原体として機能できない。しかし、プリオンは核酸をゲノムとし

てもたない<sup>1)</sup>。したがって、プリオンは、核酸の複製がなくても、増殖し病気を引き起こすことができる。

本稿では、プリオン蛋白の発見により次第に明らかとなってきたプリオンの実体やその複製のメカニズムについて紹介したいと考えている。

## 1. プリオン蛋白について

プリオン蛋白にはアミノ酸組成が全く同じなのに、高次構造が異なる2つの構造アイソフォームが存在する<sup>1)</sup>。一つは正常プリオン蛋白 (cellular prion protein: PrP<sup>C</sup>)である。PrP<sup>C</sup>は、グリコシル・ホスファチジル・イノシトール

徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門

表 1 プリオン蛋白 (PrP) アイソフォームの相違点

	蛋白高次構造		溶解性	プロテイナーゼ K に対する感受性
	$\alpha$ ヘリックス	$\beta$ シート		
正常 PrP (PrP <sup>C</sup> )	42%	3%	易溶性	感受性
異常 PrP (PrP <sup>Sc</sup> )	30%	43%	難溶性	抵抗性

ル・アンカーにて細胞膜の表面に連結している糖蛋白で、我々の正常組織、特に中枢神経系に強く発現している<sup>1)</sup>。もう一つは、異常プリオン蛋白 (scrapie prion protein: PrP<sup>Sc</sup>) で、プリオン感染細胞または組織に特異的に検出される<sup>1)</sup>。

PrP<sup>Sc</sup> は PrP<sup>C</sup> が構造変化を起こし産生される。PrP<sup>C</sup> の構造は  $\alpha$ ヘリックスに比べて  $\beta$ シートが非常に少なく、42%の  $\alpha$ ヘリックスと3%の  $\beta$ シートから構成される (表 1)<sup>2)</sup>。一方、PrP<sup>Sc</sup> は  $\beta$ シート構造の含有率が著明に高く、30%の  $\alpha$ ヘリックスと43%の  $\beta$ シートを有する (表 1)<sup>2)</sup>。したがって、 $\alpha$ ヘリックスから  $\beta$ シートへの構造変換が、PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Sc</sup> への変換に重要であると考えられている。また、PrP<sup>C</sup> と PrP<sup>Sc</sup> は異なる生化学的特質を有する。PrP<sup>C</sup> は高い溶解性を示し、蛋白分解酵素 (プロテイナーゼ K) にて完全に消化される (表 1)<sup>3)</sup>。しかし、PrP<sup>Sc</sup> は難溶性で凝集しやすく、プロテイナーゼ K でも消化されにくい (表 1)<sup>3)</sup>。このプロテイナーゼ K に対する抵抗性の差を利用して、PrP<sup>Sc</sup> と PrP<sup>C</sup> との識別が行われる。

## 2. プリオンの実体と複製メカニズム

### a. プリオン仮説

ノーベル医学・生理学賞を受賞した Prusiner 博士らのグループは、プリオンを高純度に精製しその構成分子を検索した結果、高分子蛋白として PrP<sup>Sc</sup> を唯一検出することができた<sup>4)</sup>。また彼らは、PrP<sup>Sc</sup> がプリオンの感染価と非常に一致した挙動を呈することを見だし<sup>5)</sup>、PrP<sup>Sc</sup> がプリオンであるとする 'プリオン仮説' または '蛋白唯一仮説' を提唱した<sup>6)</sup>。この仮説によると、プリオンつまり PrP<sup>Sc</sup> が細胞膜上に発現する PrP<sup>C</sup> に結合し、何らかのシャペロン様機構を介して、結合した PrP<sup>C</sup> の構造を PrP<sup>Sc</sup> の構造

へ変化させる (図 1)。こうして、PrP<sup>Sc</sup> が新たに産生され、プリオンは複製すると考えられている (図 1)。

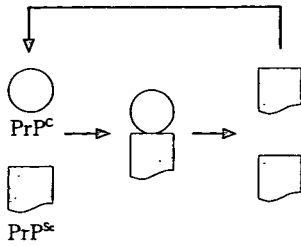
### b. ノックアウトマウスはプリオンに感染しない

プリオン仮説は正しいのであろうか。もし PrP<sup>C</sup> がなくてもプリオンが増殖できるなら、プリオン仮説は間違っていることとなる。つまり、もし PrP<sup>C</sup> 欠損 (PrP<sup>-/-</sup>) マウスがプリオンに感染しプリオン病を発症すれば、PrP<sup>C</sup> が存在しなくてもプリオンは複製できることが証明され、プリオン仮説は完全に否定される。反対に、PrP<sup>-/-</sup> マウスがプリオンに感染しなければ、プリオンの複製に PrP<sup>C</sup> が必須であることが証明され、プリオン仮説が強く支持される。そこで著者らは、PrP<sup>-/-</sup> マウスを独自に作製し感染実験を行った。その結果、野生型マウスはすべて感染しプリオン病を発症するのに対し、PrP<sup>-/-</sup> マウスはプリオンに感染せず 1 匹もプリオン病を発症しなかった<sup>7)</sup>。また野生型マウスでは、プリオンは著明に増殖し、過剰な PrP<sup>Sc</sup> の産生を来していた<sup>7)</sup>。しかし、PrP<sup>-/-</sup> マウスではプリオンと PrP<sup>Sc</sup> の産生は全く認められなかった<sup>7)</sup>。同様な結果が他の研究室からも報告されている<sup>8,9)</sup>。つまりこれらの結果は、プリオンの増殖には PrP<sup>C</sup> が必須であることを明らかに示し、プリオン仮説を強く支持した。

### c. PrP<sup>Sc</sup> は感染性?

プリオン仮説を最終的に証明するためには、PrP<sup>Sc</sup> がプリオンそのものであること、つまり PrP<sup>Sc</sup> それ自体が感染性でプリオン病を引き起こすことを示す必要がある。Kocisko らは、PrP<sup>Sc</sup> と PrP<sup>C</sup> の精製分画をある条件で反応させ、PrP<sup>C</sup> を PrP<sup>Sc</sup> 様 PrP、すなわちプロテイナーゼ K 抵抗性 PrP に変換させる *in vitro* システムを開発し

a. ヘテロダイマーモデル



b. 核依存性重合モデル

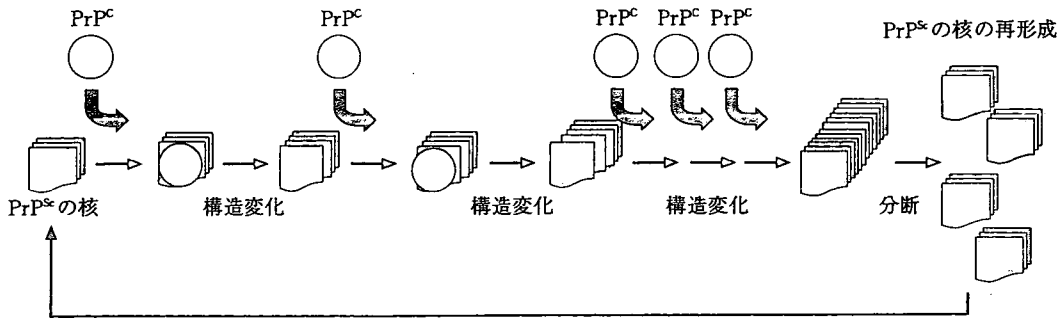


図1 プリオン複製モデル  
詳細は本文参照.

た<sup>10)</sup>。したがって、この *in vitro* で産生された PrP<sup>sc</sup> 様 PrP が感染性であることを証明できれば、プリオン仮説の最終的な証明となると考えられる。最近、Soto らのグループは、このように *in vitro* で産生された PrP<sup>sc</sup> 様 PrP が感染性であることを報告した<sup>11)</sup>。また Prusiner らのグループは、大腸菌から精製したレコンビナント PrP を、βシート構造を多く含有する PrP<sup>sc</sup> 様 PrP に *in vitro* で変換することにより、感染性 PrP を作製できることを報告した<sup>12)</sup>。すなわちこれらの結果は、PrP<sup>sc</sup> が感染性であることを示し、プリオン仮説が正しいことを証明した。

d. プリオン複製モデル

プリオンが感染すると、PrP<sup>c</sup> はどのようなメカニズムを通じて PrP<sup>sc</sup> に変換するのだろうか。その詳細な変換メカニズムは不明であるが、ヘテロダイマーモデル<sup>13)</sup>と核依存性重合モデル<sup>14)</sup>の2つのモデルが提唱されている。ヘテロダイマーモデル(図1-a)では、1分子の PrP<sup>sc</sup> がプリオンとして機能する。生体内に侵入した1分

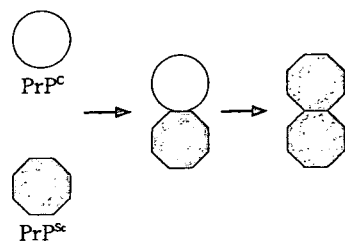
子の PrP<sup>sc</sup> は、正常組織に発現する PrP<sup>c</sup> とヘテロダイマーを形成し、PrP<sup>sc</sup> のシャペロンの機能を通して PrP<sup>c</sup> を PrP<sup>sc</sup> へと構造変換させる。更に、新しく産生された PrP<sup>sc</sup> は、再び PrP<sup>c</sup> を PrP<sup>sc</sup> へと変換させる。このようにして、PrP<sup>sc</sup> が順次産生され、プリオンは複製する。

一方、核依存性重合モデル(図1-b)では、PrP<sup>sc</sup> は複数個重合し核(seed)を形成する。この PrP<sup>sc</sup> の核が、プリオンとして機能する。生体内に侵入した PrP<sup>sc</sup> の核は、正常組織に発現する PrP<sup>c</sup> を順次重合(polymerization)させることにより、構造変化を起こさせ、PrP<sup>sc</sup> へと変換させる。こうしてできた長い PrP<sup>sc</sup> のポリマーは分断され、新たな PrP<sup>sc</sup> の核、つまりプリオンが多数産生される。こうして、プリオンの複製が起こると考えられている。どちらのモデルが正しいのか、今後の成果が待たれる。

3. プリオン“株”

プリオンには、ウイルスと同様に、性質が異

## a. プリオン A 株の複製 (ヘテロダイマーモデル)



## b. プリオン B 株の複製 (ヘテロダイマーモデル)

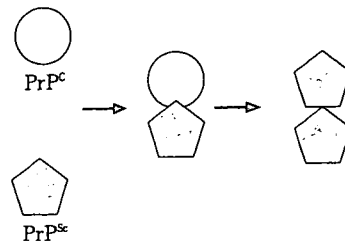


図2 ヘテロダイマーモデルにおけるプリオン A 株と B 株の複製モデル

プリオン A 株と B 株の PrP<sup>Sc</sup> は株特有の蛋白構造を有し、両者は異なる。プリオン A 株の PrP<sup>Sc</sup> は、PrP<sup>C</sup> を自分と同じ構造をもつ A 株型の PrP<sup>Sc</sup> へと変換させる。また、プリオン B 株の PrP<sup>Sc</sup> は PrP<sup>C</sup> を自分と同じ構造をもつ B 株型の PrP<sup>Sc</sup> へと変換させる。こうして、同一の PrP<sup>Sc</sup> の構造は受け継がれ、プリオン株特有の性質は保存される。

なる“株”が存在する。異なるプリオン株は、それぞれ異なる潜伏期と異なる病理変化を来す<sup>15)</sup>。ウイルスの場合は、これらの性質の違いは遺伝子である核酸にコードされている。しかし、プリオンでは、PrP<sup>Sc</sup> の蛋白高次構造の違いに、異なるプリオンの性質がコードされている<sup>16)</sup>。つまり、ある構造をした PrP<sup>Sc</sup> が接種されると、接種された PrP<sup>Sc</sup> は宿主細胞に発現する PrP<sup>C</sup> を自分と全く同じ高次構造をもつ PrP<sup>Sc</sup> へと変換させる (図2)。こうして、PrP<sup>Sc</sup> の高次構造は引き継がれ、プリオンの性質は保存される。実際、異なるプリオン株の感染により産生される PrP<sup>Sc</sup> をプロテイナーゼ K で消化すると、PrP<sup>Sc</sup> はそれぞれ異なる長さに切断される<sup>17)</sup>。つまりこの結果は、異なるプリオン株により産生される PrP<sup>Sc</sup> は、異なる高次構造をとっているために、蛋白分解酵素切断点が変わり、それぞれ異なる長さに切断されることを示している。

## 4. プリオンと“種の壁”

プリオン感染には、“種の壁”と呼ばれる現象が認められる<sup>18)</sup>。つまり、動物種を超えたプリオンの感染では、感染しないか感染しても極めて長い潜伏期が必要である。実際、疫学的調査の結果、ヒツジのプリオン病 (スクレーピー) は

ヒトには感染しないことが報告されている<sup>18)</sup>。しかし驚くことに、最近、ウシのプリオン病 (牛海綿状脳症または狂牛病) はヒトに感染し、新型 Creutzfeldt-Jakob 病を引き起こすことが報告され、ウシのプリオンは種の壁を乗り越えることが明らかとなった<sup>19)</sup>。つまり、ヒツジの PrP<sup>Sc</sup> はヒトの PrP<sup>C</sup> を PrP<sup>Sc</sup> に変換できないが、ウシの PrP<sup>Sc</sup> はヒトの PrP<sup>C</sup> を PrP<sup>Sc</sup> に変換できる。プリオン感染の種の壁の分子メカニズムは不明であるが、PrP<sup>C</sup> に結合する宿主由来のシャペロン分子が種の壁の決定に関与する可能性が報告されている<sup>20)</sup>。しかし、その実体はまだまだ不明である。今後の成果に期待したい。

## おわりに

最近、Alzheimer 病の Aβ 蛋白<sup>21)</sup> やアミロイドーシス症のアミロイド蛋白<sup>22)</sup> が、プリオンと同様に伝播性である可能性が報告されつつある。プリオン病をはじめ、これらの疾患はまだまだ不治の病である。人類は、多大な努力の結果、細菌やウイルスによる多くの感染症をこれまで克服してきた。これからは、更に、新規の病原体“感染性蛋白”による感染症を克服するための新たな戦いに果敢に臨んでいくことが期待されている。



## 図文 献

- 1) Prusiner SB: Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**: 1515-1522, 1991.
- 2) Pan KM, et al: Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10962-10966, 1993.
- 3) Oesch B, et al: A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**: 735-746, 1985.
- 4) Bolton DC, et al: Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**: 1309-1311, 1982.
- 5) McKinley MP, et al: A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* **35**: 57-62, 1983.
- 6) Prusiner SB: Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**: 136-144, 1982.
- 7) Sakaguchi S, et al: Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *J Virol* **69**: 7586-7592, 1995.
- 8) Bueler H, et al: Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**: 1339-1347, 1993.
- 9) Prusiner SB, et al: Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10608-10612, 1993.
- 10) Kocisko DA, et al: Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* **370**: 471-474, 1994.
- 11) Castilla J, et al: In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* **121**: 195-206, 2005.
- 12) Legname G, et al: Synthetic mammalian prions. *Science* **305**: 673-676, 2004.
- 13) Cohen FE, et al: Structural clues to prion replication. *Science* **264**: 530-531, 1994.
- 14) Lansbury PT: Mechanism of scrapie replication. *Science* **265**: 1510, 1994.
- 15) Bruce ME, Fraser H: Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol* **172**: 125-138, 1991.
- 16) Telling GC, et al: Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* **274**: 2079-2082, 1996.
- 17) Bessen RA, Marsh RF: Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* **68**: 7859-7868, 1994.
- 18) Carlson GA, et al: Genetics of prion infections. *Trends Genet* **7**: 61-65, 1991.
- 19) Donnelly CA, et al: The epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. I. Epidemiological processes, demography of cattle and approaches to control by culling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **352**: 781-801, 1997.
- 20) Telling GC, et al: Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* **83**: 79-90, 1995.
- 21) Meyer-Luehmann M, et al: Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* **313**: 1781-1784, 2006.
- 22) Zhang H, et al: Transmissibility of mouse AApoAII amyloid fibrils: inactivation by physical and chemical methods. *FASEB J* **20**: 1012-1014, 2006.

## Biopanning of Antibody-Phage Clones Using Immunoplates Coated with Gel Slices of Electrophoresis: Immunogel-Biopanning

Takayuki HAMASAKI,<sup>a</sup> Shunsuke UCHIDA,<sup>a</sup> Tomoki YOSHIHARA,<sup>a</sup> Shuhei HASHIGUCHI,<sup>a</sup> Yuji ITO,<sup>a</sup> and Kazuhisa SUGIMURA<sup>\*,a,b</sup>

<sup>a</sup>Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Kagoshima University, 1-21-40 Korimoto, Kagoshima, Kagoshima 890-0065, Japan; and <sup>b</sup>Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation; Saitama 332-0012, Japan. Received January 17, 2007; accepted May 11, 2007

**Biopanning of a phage library using a Western blotting membrane is difficult because of high background binding. We propose a reliable biopanning method, namely, immunogel-biopanning, which is performed using immunoplates coated with a molecular species fractionated from a crude sample by native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The efficacy of this method was determined in model experiments using a human interleukin-18 (IL-18)-specific single chain Fv (scFv) phage clone.**

**Key words** biopanning; antibody; phage library; native gel; ELISA

To establish a monoclonal antibody (mAb), a phage library does not require immunization, in contrast to cell-hybridization technology, which requires immunizing mice.<sup>1,2)</sup> In a phage library, the antigen-specificity repertoire is not substantially limited because of the absence of biological negative clonal selection. This feature is particularly important for the development of antibody medicine, which often targets self-antigens. Among the revolutionary features of antibody-displaying phage libraries, several reports have suggested that a Western blotting membrane could be blotted with a phage library, resulting in the establishment of scFvs against new unknown molecules.<sup>3,4)</sup> However, nonspecific binding of phage clones to membranes has hampered and restricted its availability in most cases. Furthermore, SDS-PAGE primarily resolved the denatured proteins, implying that it is hard to isolate the antibody clones specific to a conformation that is critical for biological function.

To overcome these problems, we attempted to establish an alternative approach, immunogel-biopanning, with less nonspecific binding. The two salient features of immunogel-biopanning are that the biopanning is performed using immunoplates coated with proteins eluted from sliced gels of electrophoresis and that the sensitivity to detect the target molecule can be highly elevated with biological amplification by using a phage clone as a probe.

In an experimental model using an established antigen-specific phage clone, we evaluated the feasibility and sensitivity of this method employing cell lysates mixed with a minute amount of IL-18. To achieve this, we employed a native PAGE for molecular separation and an anti-IL18 svFv-displaying phage clone, h18-108 as a probe that recognizes the receptor-binding-site 3 of native IL-18 but not denatured form.<sup>5)</sup> Expecting a practical experimental condition, the amount of cell lysate was set as the highest dose of our preparation. We demonstrated that immunogel-biopanning was effective when cell lysates of 6.4  $\mu\text{g}$  contained 50 ng of IL-18 and when the phage solution of  $10^{11}$  cfu contained 10 cfu of target-specific phage clones. DNA sequencing of isolated phage clones after the fourth round of biopanning directly demonstrated that over 80% was the h18-108 clone.

Immunogel-biopanning is useful for the establishment of mAbs against new native conformations, such as prion pro-

tein and for the quantitative analysis of a given target molecule.

### MATERIALS AND METHODS

**Antibody-Phage Clone, Cell Lysate and Cytokine** Native human IL-18-specific phage clone, h18-108 was employed.<sup>5)</sup> The soluble h18-108 scFv has 50 nm of Kd. A murine neuroblastoma cell line, N2a was provided by S. Katamine (Nagasaki University Graduate School of Medical Science, Nagasaki). The cell lysates were prepared as described.<sup>6)</sup> Recombinant IL-18 was purchased from MBL (Nagoya). The concentration of protein was determined using the D<sub>c</sub> Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.).

**Electrophoresis** Samples were not denatured by heating and SDS. Native PAGE (12.5%) was performed using running buffer without SDS as described.<sup>5,7)</sup> Gel staining was carried out with a Silver Staining II kit (Wako, Osaka) or Coomassie Brilliant Blue (CBB; Nacalai Tesque, Kyoto).

**Immobilization of Eluted Proteins onto Immunoplates** Gels of experimental lanes were cut into several fractions. Each gel fraction was placed in 1.7 ml-tubes (Seiko, Fukuoka, Japan) punched with a 27G needle (TERUMO, Tokyo, Japan) and crushed by pushing them through the pore using the gasket of a 1 ml-syringe (TERUMO). Each gel fragment was incubated with phosphate-buffered saline (PBS) in immunoplates (F96 Maxisorp Nunc-Immuno Plate, Nunc, Roskilde, Denmark) at 4 °C. Ten hours later, the gel fragments were discarded, and the immunoplates were blocked with PBS containing 5% skim milk (Becton, Dickinson, Sparks, MD, U.S.A.). These immunoplates were used for immunogel-biopanning as well as the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**ELISA** ELISA was performed as described.<sup>5,8)</sup> Briefly, a phage solution ( $8 \times 10^{10}$  cfu/40  $\mu\text{l}$ /well) or anti-human IL-18 mAb (100 ng/40  $\mu\text{l}$ /well, clone # 125-2H; MBL) was added to the protein-coated wells. The phage clone was detected using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-M13 mAb at a dilution of 1 : 1000 (Amersham Biosciences, Uppsala). Anti-human IL-18 mAb was detected with HRP-conjugated anti-mouse IgG at a dilution of 1 : 1000 (Jackson Im-

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: kazu@be.kagoshima-u.ac.jp

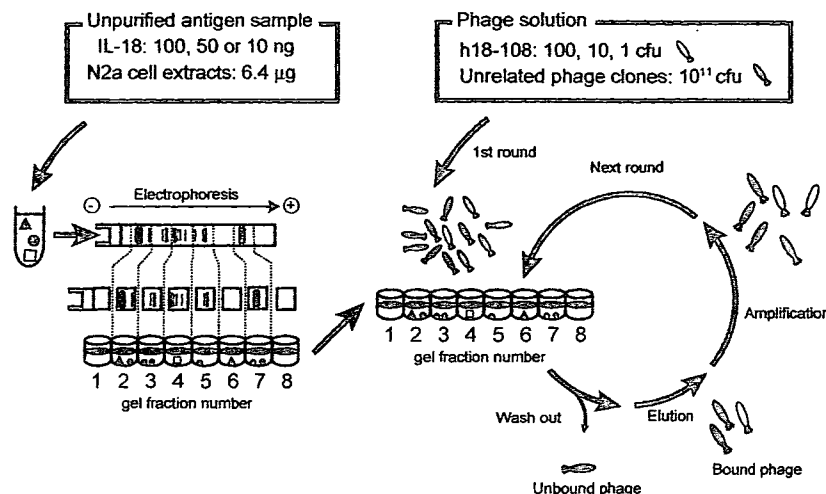


Fig. 1. Outline of the Immunogel-Biopanning

After samples (8  $\mu$ l/lane) were separated by PAGE, running gels were fractionated by slicing gels. Each gel fragment was put into immunoplate wells, crushed to elute the proteins, and incubated overnight to coat the wells with the eluted proteins. Biopanning was performed in these wells.

munoResearch Lab., Inc., West Grove, PA, U.S.A.). After incubation with a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution, the absorbance was measured at 450 nm.

**Biopanning** Biopanning was performed as described previously.<sup>5,9</sup> The model phage library was prepared by combining IL-18-nonbinding scFv-phage clones with a fixed number of h18-108 scFv-phage clones. The unrelated phage clones stand for the mixture of IL-18-nonbinding scFv-phage clones. Briefly, the protein-coated wells were incubated with the phage solution ( $1 \times 10^{11}$  cfu/300  $\mu$ l/well). Bound phages were eluted by 0.1 M glycine-HCl (pH 2.2) and immediately neutralized with 1 M Tris-HCl (pH 9.1). The eluates were used for the measurement of the titer and the amplification of the recovered phage by infection with *E. coli* TG-1 as described.<sup>5</sup> The amplified phages were used for the subsequent biopanning in the identical way to the first round.

**DNA Sequencing** The DNA sequence of the phages was determined using the Dye Terminator method as described.<sup>5</sup>

## RESULTS

**Outline of Immunogel-Biopanning** Crude samples are separated by native PAGE without the treatment of SDS and heating. After electrophoresis, running gels are fractionated by slicing. Each gel fragment is put into immunoplate wells, crushed to elute the proteins, and incubated overnight to coat the wells with the eluted proteins. Both biopanning and ELISA are performed using immunoplates treated with the same procedure. One of the duplicated lanes is stained with silver or CBB so that the running pattern can be visualized. The eluted phages are propagated as described under "Biopanning" in Materials and Methods. This procedure is repeated several times to amplify the sensitivity and focus the binding specificity. To determine the feasibility of this method, we tested the model system using a specificity-defined antibody phage clone.<sup>5</sup>

**An IL-18-Specific scFv-Phage Clone, h18-108, Detects IL-18 Coated from Native PAGE Gel** To determine the separation pattern of IL-18, IL-18 alone (100 ng/lane) was run on native PAGE. A discrete major band at fraction #3 or

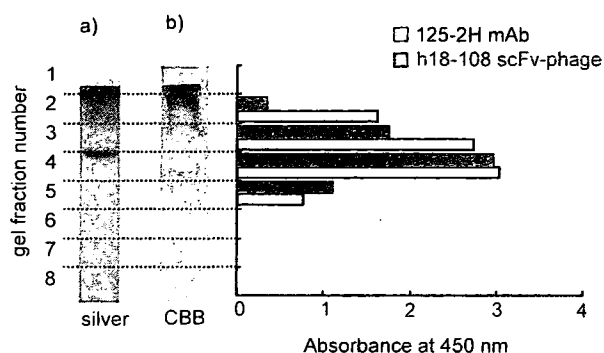


Fig. 2. Native-PAGE of Recombinant Human IL-18 Mixed with or without Cell Extracts

(a) Silver staining of the gel loaded with IL-18 alone. (b) Left panel: CBB staining of gel loaded with 8  $\mu$ l of cell lysates (800  $\mu$ g/ml) mixed with IL-18. The cell lysates were applied at the highest amounts of the prepared lysate. Right panel: Binding activity of 125-2H mAb and h18-108 scFv-phage to wells coated with IL-18 of eluates from each gel fraction as determined by ELISA.

4 was visible by silver staining (Fig. 2a). Under the identical condition, cell lysates mixed with 100 ng of IL-18 were resolved by native PAGE (Fig. 2b). Expecting a practical experimental condition, the amount of cell lysate was set as the highest dose (6.4  $\mu$ g) of our preparation. The control lane was stained with CBB, while the gels of experimental lanes were sliced for fractionation and incubated in immunoplate wells. Although the resolved band of IL-18 was invisible by CBB staining, a murine anti-human IL-18 mAb, 125-2H, detected IL-18 in the four separated fractions, #2, 3, 4, and 5 in ELISA (Fig. 2b). No residual IL-18 was detected in wells coated with other fractions. Consistent with these results, the h18-108 scFv-phage clone showed identical ability to 125-2H for detecting IL-18, indicating that h18-108 definitely detects the trace of IL-18 under experimental conditions and also suggesting that the content in #2 and 5 appeared to be less than the detection level of silver staining.

**Detection Sensitivity Related to the Contents of Target Protein** Cell lysates (6.4  $\mu$ g) mixed with varying amounts of IL-18 (100, 50, or 10 ng) were subjected to native PAGE. As described in Fig. 1, proteins in each gel fraction were

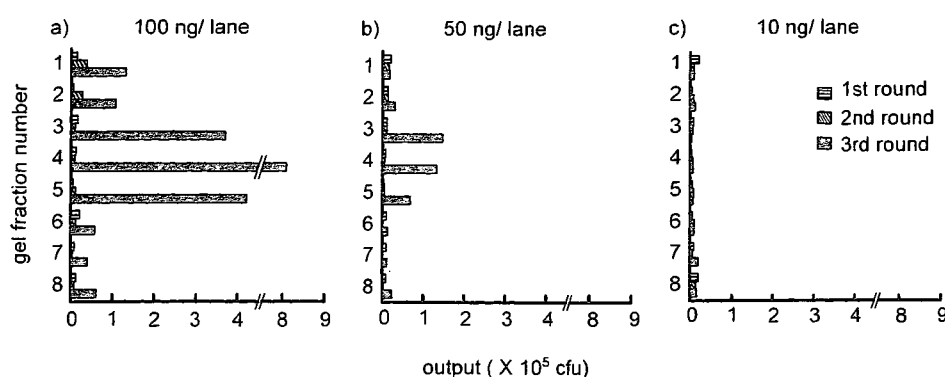


Fig. 3. Immunogel-Biopanning: Content of the Target Molecule in Crude Extracts

A cell extract mixed with varying amounts of IL-18 (a: 100 ng, b: 50 ng, or c: 10 ng/8  $\mu$ l/lane) was subjected to native PAGE. Immunoplates were coated with proteins contained in each gel fraction followed by incubation with an scFv-phage solution ( $10^{11}$  cfu) containing 100 cfu of the h18-108 scFv-phage. The numbers of eluted phages were counted by phage titration.

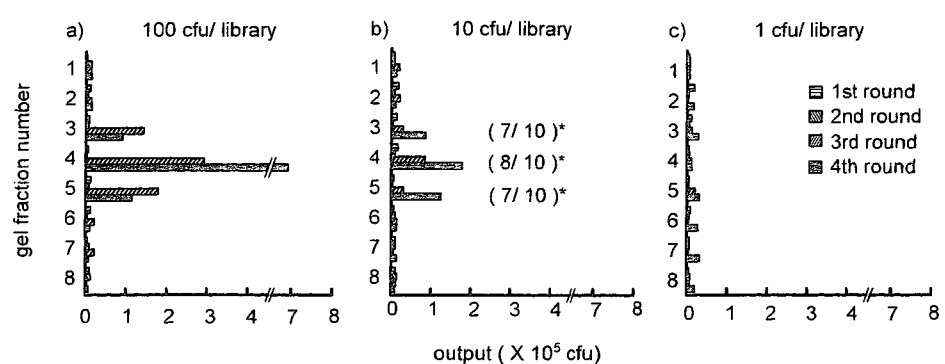


Fig. 4. Minimum Number of Target-Specific Phage Clones in a Phage Library

Cell lysates mixed with IL-18 (100 ng) were subjected to native PAGE. Immunoplates were coated with each gel fraction followed by incubation with an scFv-phage solution ( $10^{11}$  cfu) containing varying numbers of the h18-108 scFv-phage (a: 100 cfu, b: 10 cfu, or c: 1 cfu). The eluted phage was titrated and amplified. After the fourth round, the h18-108 clone was identified by DNA sequencing. The number in parentheses indicates the number of h18-108 clones among all clones tested (h18-108/total tested).

coated to immunoplates. IL-18 coated in immunoplate wells was quantitatively estimated with ELISA using 125-2H mAb. When the cell lysates combined with 100 ng of IL-18 were resolved on PAGE, 2, 27, 38, or 5 ng of IL-18 was detected at the gel fractions #2, 3, 4, or 5, respectively. In the case of 50 ng of IL-18, the amount of the coated IL-18 was almost 1/10 of that in the case of 100 ng of IL-18. IL-18 was not detected in 10 ng under this procedure. Biopanning was performed using these immunoplates (Fig. 3). In the first round, the protein-coated wells were incubated with  $10^{11}$  cfu of unrelated phage clones containing 100 cfu of the h18-108 scFv-phage. The amplified phages from each well were panned to the same duplicated well at subsequent rounds. The numbers of eluted phages on each round were calculated by phage titration. After the third round, a significant number of phages were recovered at gel fractions #3, 4, and 5 in the case of 100 ng (a) or 50 ng (b) of IL-18 but not at other gel fractions. In the case of 10 ng of IL-18, no increase in the number of phages was attained at any gel fraction. These patterns were consistent with the results shown in Fig. 2, indicating that this method definitely works if the crude extracts contain 50 ng of the target protein at the beginning of native PAGE.

**Minimum Number of Target-Specific Phage Clones in a Phage Library** The requirement of the minimum number of target-specific phage clones was estimated for the availability of a phage library to perform immunogel-biopanning.

Cell lysates (6.4  $\mu$ g) mixed with 100 ng of IL-18 were subjected to native PAGE and coated to immunoplates as described (Fig. 1). The phage solution was prepared by mixing a limited number of h18-108 scFv-phage clones with  $10^{11}$  cfu of unrelated phage clones and put into each protein-coated well. In the third round of biopanning, a significant increase in the number of recovered phages was observed at #3, 4, and 5 gel fractions when the phage solution contained 100 cfu or 10 cfu of the h18-108 scFv-phage (Figs. 4a, b). The fourth round produced significantly amplified results.

**Efficacy of Immunogel-Biopanning** The phage solution contains a limited number of h18-108 scFv-phage clones with  $10^{11}$  cfu of unrelated phage clones. The applied protein sample contains a minute amount of target protein in the presence of a large amount of unrelated proteins of cell lysates. Therefore, it is important whether or not the amplified results faithfully reflect the specific amplification to confirm the feasibility of this method. To verify the specificity of this amplification, the randomly selected phage clones were directly sequenced on these scFv genes. The results demonstrated that over 80% were the h18-108 clone (data presented in parentheses marked with \* of Fig. 4b). This result indicated the reliability of this method, immunogel-biopanning. The salient feature is that there is no increase in binding of phages for the rest of the gel fractions, even after the fourth round, indicating the fine specificity for this detection. This result indicates that non-specific binding of phages as