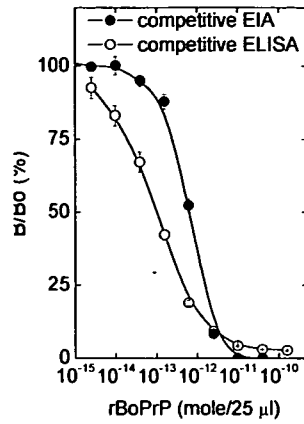


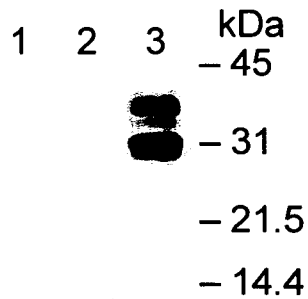
☒ 8



Standard curve for recombinant BoPrP.

The ratio of the fluorescence intensity of the bound antibody in the presence of rBoPrP to that in the absence of rBoPrP (B/Bo) were plotted against the amounts of rBoPrP added. Bars are means ± SE (n=3).

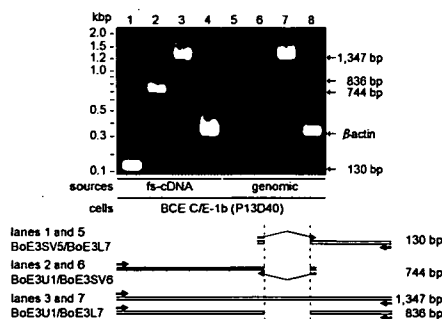
☒ 9



Expression of bovine PrP in *Prnp*-deficient neuronal HpL3-4 cells.

Whole cell lysates from the parental HpL3-4 cells (lane 1), empty vector-transfected cells (lane 2), and vector coding for bovine PrP gene-transfected cells (lane 3) were subjected to immunoblotting with 6H4 mAb.

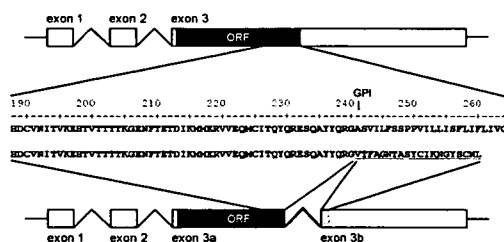
Figure 10



Detection of splice variant of bovine PrP mRNA using exon-exon junction primers.

BCE C/E-1b cells for 40 days after 13 passages (P13D40) were cultured. First strand-cDNA from total RNA (5 µg) and genomic DNA (25 ng) were prepared, followed by PCR using bovine prp exon-exon junction primers (BoE3SV5/BoE3L7, lanes 1 and 5; BoE3U1/BoE3SV6, lanes 2 and 6), bovine prp primers (BoE3U1/BoE3L7, lanes 3 and 7) and β-actin primers with Ex taq polymerase. PCR products were separated on a 2% agarose gel and visualized with ethidium bromide.

Figure 11



Schematic representation of alternative splicing model of bovine prp gene.

We confirmed the sequences of ordinary (upper panel) and alternatively spliced bovine *prp* gene (lower panel). Cryptic donor and acceptor sites are designated as exon 3a and 3b, respectively. The untranslated regions (white bars), ORFs (black bars), retained intron (double line), additional ORF (gray bar), and deduced amino acid sequences of ordinary and alternatively spliced (underlined) *prp* are indicated. The arrow indicates a GPI anchoring site.

異常型プリオンの検出のための処理方法に関する試験／調査研究

分担研究者 川崎ナナ（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第1室長）
協力研究者 伊藤さつき（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部）
高倉大輔（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部）

研究要旨 遺伝子組換え医薬品の製造工程における異常型プリオン (PrP^{Sc}) の除去／不活能評価のための PrP^{Sc} 選択的検出法の開発を目的として、正常型プリオン (PrP^C) 及び PrP^{Sc} の構造特性に関する調査研究、並びに PrP^C 及び PrP^{Sc} 構造特性解析のための効率的 PrP 分画法の検討を行った。

A. 研究目的

遺伝子組換え医薬品等の製造工程における異常型プリオン (PrP^{Sc}) の混入／迷入の低減は、医薬品の安全性を確保するための大きな課題であり、プリオンの不活化/除去評価として、PrP^{Sc} をスパイクし、各工程のクリアランス指標をもとめるクリアランス評価が検討されている。このクリアランス評価においては、画分ごとのプリオンの分配を定量する必要があるが、PrP^{Sc} の検出は *in vivo* アッセイが用いられることが多く、PrP^{Sc} の高感度高選択的検出法の開発が望まれている。PrP^{Sc} 高感度高選択的検出法の開発には、PrP^{Sc} と正常プリオン (PrP^C) の構造特性の違いを明らかにする必要がある。そこで、本年度は、PrP^{Sc}、及び PrP^C の構造特性、特に糖鎖と GPI アンカーの構造に関する調査研究を行うとともに、今後、PrP^{Sc}、及び PrP^C の糖鎖及び GPI アンカーの構造特性解析を実施するために、モデル試料としてラット脳粉末を用い、PrP^C の効率的分画を検討した。

B. 研究方法

1) PrP、及び PrP^{Sc} の構造に関する調査
以下の文献を参考にした。

構造全体

Stahl, N. et al., *Biochemistry*, 1990, **29**, 8879

Stahl, N. et al., *Biochemistry*, 1990, **29**, 5405

Stahl, N. et al., *FASEB J.*, 1991, **5**, 2799

Rudd, PM. et al., *Biochemistry*, 2001, **40**, 3759

Ermonval, M. et al., *Biochimie.*, 2003, **85**, 33

Lawson, VA. et al., *J. Neurochem.* 2005, **93**, 793

Baldwin, M. et al., *Method in Enzymol.*, 2005, **405**, 172

糖鎖構造

Haraguchi, T. et al., *Arch Biochem Biophys.*, 1989, **274**, 1

Endo, T. et al., *Biochemistry*, 1989, **28**, 8380

Stahl, N. et al., *Biochemistry*, 1993, **32**, 1991

Stimon, E. et al., *Biochemistry*, 1999, **38**, 4885

Rudd, PM. et al., *PNAS*, 1999, **96**, 13044

GPI アンカー構造

Stahl, N. et al., *Cell*, 1987, **51**, 229

Baldwin, MA. et al., *Anal Biochem.*, 1990, **191**, 174

Stahl, N. et al., *Biochemistry*, 1992, **31**, 5043

2) ラット脳内タンパク質の分画

市販のラット脳アセトン粉末、250 mg (Sigma) にクロロホルム/メタノール混液 (2/1, v/v), 30 ml を加え、ポリトロンを用いて1分間均質化後、室温で1時間放置した。遠心分離後 (3,000 rpm, 室温,

10分), 上清を除去し, 沈殿をメタノールで2回洗浄した. 洗浄した沈殿に 0.15 M 塩化ナトリウム, 1 mM EDTA 及び 1 mM PMSF を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.4 (均質化用緩衝液), 30 ml を加え, 懸濁した. 遠心分離後 (10,000×g, 4°C, 20分), 沈殿に均質化用緩衝液 20 ml を加え, 懸濁した後, 10% Triton X-114 を含む均質化用緩衝液 5 ml を加え, 4°C で一晩攪拌し, 膜画分の可溶化を行った. 可溶化溶液を遠心分離し (10,000×g, 4°C, 20分), 沈殿 (画分 P) と上清 (画分 S) を得た.

3) ラット脳画分の SDS-PAGE

得られた画分 P, 及び S に含まれるタンパク質を 12.5%ゲルを用いて, 25 mM トリス塩酸塩, 0.19 M グリシン, 0.1% SDS を含む泳動用緩衝液中, 20 mA で泳動した (画分 P は得られた量の 1/1000, 画分 S は 4/100 をアプライした). 分離されたタンパク質は, Simply Blue SafeStain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて検出した.

4) タンパク質の同定

画分 P, 及び S について, SDS-PAGE で分離された主なバンドを切り出し, 30%アセトニトリルを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いて脱色後, アセトニトリルを加え脱水した. アセトニトリルを除去後, 減圧濃縮遠心エバポレーター (Speed Vac) を用いて, ゲル片を乾燥させた. 乾燥ゲル片に 10 mM DTT を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 100-150 µl を加え, 56°C で 1 時間反応させた後, 室温に戻した. 還元化溶液を除いた後, 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いてゲル片を洗浄した. 洗浄用溶液を除いた後, 55 mM モノヨード酢酸ナトリウムを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 100-150 µl を加え, 室温で遮光下 45 分間反応させた. 反応後, アルキル化溶液を除いた後, 洗浄用溶液を用いてゲル片を洗浄し, 50%アセトニトリルを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 (脱水用溶液) を用いてゲル片を脱水し, Speed Vac を用いてゲル片を乾燥させた.

ゲル内アルキル化を行った乾燥ゲル片にトリプシ

ン溶液 (20 µg/ml, 25 mM 重炭酸アンモニウム) を加え, 氷上で 30 分間放置し, ゲル片にトリプシン溶液を染み込ませた. 余分なトリプシン溶液を取り除き, 37°C で一晩反応させた. 50%アセトニトリル及び 1%トリフルオロ酢酸水溶液 (抽出溶液) 100 µl を加え, 室温で 30 分間振とうし, ペプチドを含む抽出液を回収した. 再度抽出操作を行った後, 抽出液をすべて回収し, Speed Vac を用いて濃縮した.

5) LC/MS

抽出された消化物を用いて, 以下の条件で LC/MS/MS を行った.

HPLC :

装置 : Paradigm MS4 (Michrom BioResource)

カラム : Magic C18 (Michrom BioResource, 0.2×50 mm, 3µ, 100+)

溶離液 A : 0.1%ギ酸を含む 2%アセトニトリル水溶液

溶離液 B : 0.1%ギ酸を含む 90%アセトニトリル水溶液

グラジエントプログラム : 5~65%B (0~20分)

流速 : 3 µl/min

MS :

装置 : Finnigan LTQ (Thermo Fisher Scientific)

イオン源 : nanoESI

キャピラリー温度 : 200°C

キャピラリー電圧 : 1.8 kV

スキャン範囲 (m/z) : 450-2000

衝突エネルギー : 35%

測定メソッド :

① single mass scan (m/z 450-2000)

② data-dependent MS/MS

6) データベース検索

検索エンジン : Mascot (Matrix Science 社)

データベース : NCBIInr, Rattus

略語

GPI, glycosylphosphatidylinositol; PIPLC, phosphatidylinositol-specific phospholipase C; PNGase F, peptide-N-glycosidase F; Endo H, Endoglycosidase H; Fuc, フコース; Gal, ガラクトース; GlcNAc, N-アセチルグルコサミン; NeuAc, N-アセチルノイラミン酸; 2-AB, 2-aminobenzamide; Man, マンノース; Ino, inositol; GalNAc, N-アセチルガラクトサミン;

(倫理面への配慮)

ヒト由来サンプル及び動物を使用していないので、特に配慮していない。

C. 結果と考察

(1) PrP^C, 及び PrP^{Sc} の構造に関する調査結果

構造全体

PrP は、アミノ酸 209 残基からなる GPI アンカー型の糖タンパク質である。一次構造は PrP^C, 及び PrP^{Sc} で変わらず、ラット, マウス, ハムスター, ヒトで約 90% の相同性を持つ。Asn181 (マウス: Asn180), 及び Asn196 (ヒト: Asn197) は N-型糖鎖結合可能位置であり, Asn231 には GPI アンカーが結合している。三次構造は, PrP^C において α -ヘリックス構造の割合が, PrP^{Sc} では, β -シート構造の割合が高くなっており, PrP^{Sc} は, 宿主 PrP^C の三次構造の変化によって生じると考えられている。また, PrP^C, 及び PrP^{Sc} の PIPLC に対する感受性 (PrP^C: +, PrP^{Sc}: -), 及び Proteinase K への抵抗性 (PrP^C: -, PrP^{Sc}: +) は異なる (変性させた場合, PrP^C, 及び PrP^{Sc} 共に, PIPLC, 及び Proteinase K の両方に対して感受性となる)。PrP は, SDS-PAGE で分子量約 33-35 kDa 付近に検出されるが, Proteinase K 消化された PrP^{Sc} (PrP27-30) は, 分子量約 27-30 kDa 付近で検出される。この他に, PrP には, Asn228 までの長さの GPI アンカーが結合していないものや, N 末端側から約 90 残基が切断されたもの, PrP^C では, 膜貫通型が存在する。糖タンパク質の糖鎖には結合部位特異的不均一性があるため, これらの長さの異なる PrP に対して, それぞれ複数のグリコフォームを持ち, PrP^{Sc} のグリコフォームの多様性は, PrP^{Sc} 株種によ

って異なる。

糖鎖構造

ハムスター脳より調製したマイクロソーム画分, 及びホモジネートについて, PNGase F, 及び Endo-H 消化前後の SDS-PAGE 上の PrP^C, 及び PrP^{Sc} の泳動パターンを比較することによって, PrP^C, 及び PrP^{Sc} には, コンプレックス型糖鎖が結合していることが示された。PrP^{Sc} より精製した PrP27-30 については, シアリダーゼ消化前後のレクチンとの結合を調べることによって, コンプレックス型糖鎖には非還元末端から NeuAc, Gal が, 還元末端側の GlcNAc に Fuc が結合していることが示されている。さらに, 精製されたハムスター脳 PrP27-30 の糖鎖について, ヒドラジンをを用いて糖鎖を遊離後, トリチウム標識し, カラムクロマトグラフィー, 逐次エキソグリコシダーゼ消化, メチル化分析等を組み合わせて構造が解析された。PrP^{Sc} には, 2 本鎖, 3 本鎖, 及び 4 本鎖のコンプレックス型糖鎖が結合しており, 400 以上のグリコフォームが存在することが報告されている。また, PrP^C, 及び PrP^{Sc} に結合する糖鎖構造の違いについて, ハムスター脳の PrP^C, 及び PrP27-30 よりヒドラジンで切り出された糖鎖の MS や, 還元末端を 2-AB で標識された糖鎖の HPLC 溶出位置が比較され, PrP^{Sc} では bisecting GlcNAc が結合した糖鎖の割合が減少し, 3 本鎖, 及び 4 本鎖糖鎖の割合が増加していることが報告されている。

結合部位ごとの糖鎖構造については, 精製されたマウス PrP^{Sc} を還元アルキル化後, トリプシン消化し, 逐次エキソグリコシダーゼ消化を組み合わせた LC/MS, 及び LC/MS/MS によって解析されている。Asn180 には, 2 本鎖, 及び 3 本鎖のコンプレックス型糖鎖が, Asn196 には, 3 本鎖, 及び 4 本鎖のコンプレックス型糖鎖が主に結合しており, Asn180 では, Lewis x 構造, Asn196 では, Lewis x 構造, 及び sialyl Lewis x 構造を非還元末端に持つ糖鎖の割合が高いことが示されている。

GPI アンカー構造

ハムスター脳 PrP27-30 を加水分解後, トリメチル

シリル化し、GC/MSを行うことによって、GPI アンカーは、エタノールアミン、イノシトール、リン酸、ステアリン酸で構成されることが示された。

GPI アンカーの糖鎖構造は、ハムスター脳 PrP27-30 について、PIPLC、及びエンドプロテイナーゼ Lys-C 消化で得られた GPI 結合ペプチドを単離し、HF 処理、メチル化後、MS/MS によって、また、単離された GPI 結合ペプチドについて、エキソグリコシダーゼ消化を組み合わせた MS によって解析されている。糖鎖部分の主な構造は、Man-Man-Man-(GalNAc-)Man-GlcN-Ino、又は Man-Man-(Gal-GalNAc-)Man-GlcN-Ino であることが示された他、NeuAc を含む構造 \pm Man-Man-Man-(NeuAc-Gal-GalNAc-)Man-GlcN-Ino が示された。GPI の糖鎖部分に Gal を含む構造は哺乳類で、NeuAc を含む構造はすべての種において初めての構造であり、PrP^C についても、NeuAc を含む GPI 構造を持つことが示されている。

(2) ラット脳をモデルとした PrP^C の分画法の検討

PrP^C は、脳に存在する GPI アンカー型の膜タンパク質である。脳には、脂質類が多く、タンパク質と混在した状態では、分画への影響が懸念された。そこで、クロロホルム/メタノール混液中で試料の均質化を行うことによって脱脂した後、分画を行うこととした。モデル試料として、ラット脳アセトン粉末を用い、脱脂後、非イオン性界面活性剤 Triton X-114 を用いて膜タンパク質の可溶化を行い、PrP^C を分画することを試みた。図 1 に示すような手順に従って分画を行い、得られた沈殿 (画分 P)、及び上清 (画分 S) に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で分離した (泳動図: 図 2, レーン 1: 分子量マーカー, 2: 画分 P(1/1000), 3: 画分 S(4/100))。

SDS-PAGE で分離・検出された主なバンド中に含まれるタンパク質は (画分 P: バンド 1-18, 画分 S: バンド 1-21)、ゲル内消化後、抽出されたペプチドについて LC/MS/MS を行い、得られたすべてのプロダクトイオンを用いたデータベース検索によって同定した。筆頭に同定されたタンパク質を表 1 に示す。PrP^C は筆頭に同定されなかったが、画分 S のバンド

2, 3, 7, 8, 及び 11 に含まれることが判った。バンド 2, 及び 3 で検出された PrP^C については、PrP^C のタンパク質部分の分子量が約 22,300Da であることから、分解物であると推定された。また、PrP^C がバンド 7, 8, 及び 11 の広範囲に検出されたのは、複数の構造を有する糖鎖、及び GPI アンカーの結合により多数の分子種が存在するためと考えられた。

以上のことから、脱脂後、非イオン性界面活性剤 Triton X-114 を用いて可溶化し、PrP^C を分画できることが判った。また、PrP^C が SDS-PAGE で分離されたゲル中の主なタンパク質でないことから、ゲル中の PrP^C を用いて構造解析を進めるには、PrP^C を高純度、高回収率で生体試料より分画する必要があると考えられた。このため、生体試料からの PrP^C の可溶化、混在するタンパク質の除去等の試料分画法の検討や、ゲル中の微量 PrP^C を用いて、糖鎖構造、及び GPI アンカー構造を解析するための試料調製方法、及び MS の分析条件検討が必要であると考えられた。また、PrP^{Sc} については、PrP^C 分画の検討を踏まえ、界面活性剤の選択や、Proteinase K 消化を組み合わせた分画方法を検討する必要があると考えられる。

D. 結論

PrP は、2 箇所の糖鎖結合可能部位 (Asn181, Asn196) を持つ糖タンパク質であり、PrP^C と比べると PrP^{Sc} には 3 本鎖、及び 4 本鎖のコンプレックス型糖鎖が多いこと、また、これらの糖鎖は主に Asn196 に結合していることが分かった。これまでに解析されたすべての種の PrP^C 及び PrP^{Sc} の GPI アンカー糖鎖は、NeuAc が結合したユニークな構造であったが、PrP^C 及び PrP^{Sc} の差異は明らかにされていなかった。以上の調査結果から、PrP^C 及び PrP^{Sc} の部位特異的糖鎖構造はまだ十分に解析されていないこと、また、GPI アンカー構造については差異が不明であることが確認され、PrP^{Sc} 選択的検出法の開発には、PrP^C 及び PrP^{Sc} の部位特異的糖鎖構造、及び GPI アンカーの糖鎖構造の差異を明らかにする必要があると考えられた。

そこで、本研究では、PrP^C 及び PrP^{Sc} の構造解析を行うために、モデル試料として、ラット脳粉末を

用いて、PrP^Cを分画するための予備検討を行った。
その結果、脱脂後、非イオン性界面活性剤 Triton
X-114 を用いて PrP^Cを可溶化し、分画できることが
判った。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井
則貴, 山口照英: 液体クロマトグラフィ
ー/質量分析法を用いた糖タンパク質構
造解析. 実験医学増刊号, 2007, 25,
1127-1136
- 2) Satsuki Itoh, Daisuke Takakura, Nana
Kawasaki, and Teruhide Yamaguchi:
Glycopeptide analysis using LC/MS and
LC/MS/MS, in The Protein Protocols
Handbook (John Walker, ed.) Humana,
Totowa, NJ. *in press*
- 3) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka
Hashii, Akira Harazono, Daisuke Takakura,
Teruhide Yamaguchi: Mass spectrometry
for analysis of carbohydrate heterogeneity
in characterization and evaluation of
glycoprotein products. Trends in Glycosci.
Glycotech. In press

2. 学会発表

- 1) 川崎ナナ: LC/MS を用いた糖鎖の微量か
つ網羅的解析と創薬への応用. 日本薬学
会第 128 年会一般シンポジウム「グライ
コサイエンスから創薬へ」. 横浜 (2008.
3. 26-28)
- 2) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖
と医薬品. 日本応用糖質科学会平成 19
年度大会 (2007. 8. 30) 平塚
- 3) 川崎ナナ: LC/MSⁿ を用いた糖蛋白質の特
性解析大阪大学蛋白質研究所セミナー
「蛋白質翻訳後修飾」吹田市 (2008. 1.
10, 11)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

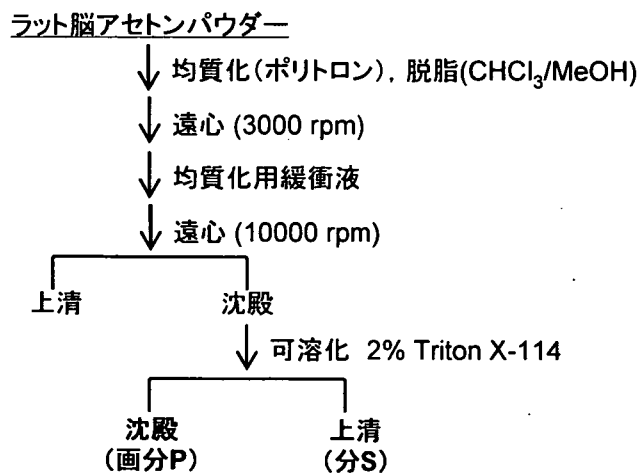


図1 ラット脳の分画

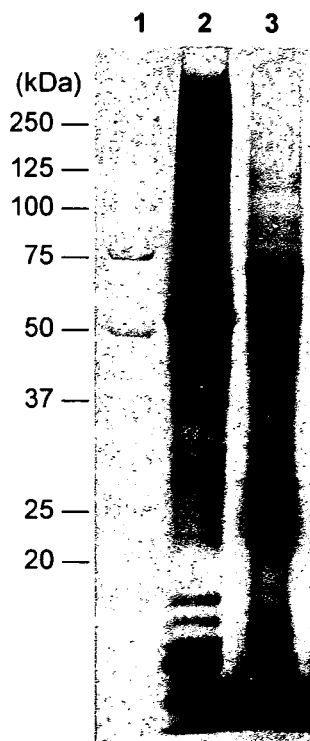
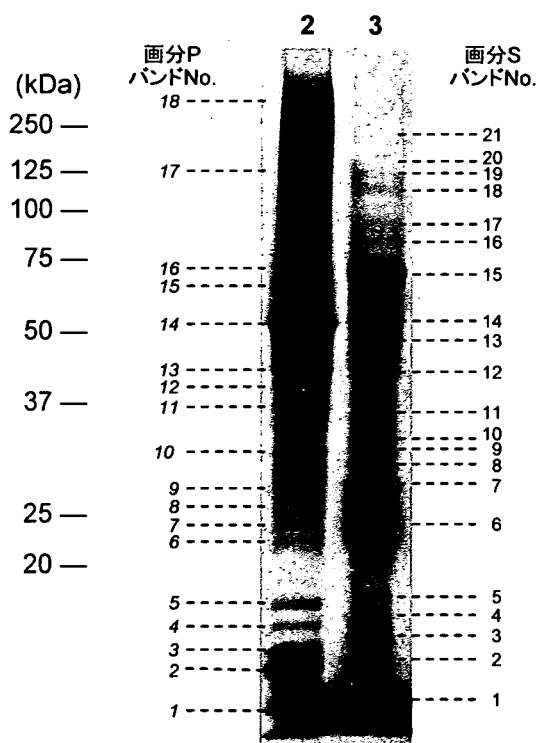


図2 ラット脳の各画分のSDS-PAGE

- 1: 分子量マーカー
- 2: 画分P (1/1000)
- 3: 画分S (4/100)

表1 タンパク質同定結果

画分	バンド No.	同定されたタンパク質 (Accession No.)	Score	PrPのScore
P	1	hemoglobin beta chain complex (gi 17985549)	1291	—
	2	myelin basic protein (gi 4504257)	576	—
	3	histone 3, H2ba (gi 13386452)	293	—
	4	myelin basic protein isoform 2 (gi 70166255)	407	—
	5	myelin basic protein isoform 1 (gi 70166245)	677	—
	6	tubulin, beta 2 (gi 4507729)	387	—
	7	glutathione S-transferase, pi 2 (gi 25453412)	376	—
	8	Tpi1 protein (gi 38512111)	553	—
	9	tyrosine 3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, zeta polypeptide (gi 675604)	530	—
	10	B-36 VDAC=36 kda voltage dependent anion channel (gi 299036)	467	—
	11	?Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (gi 120707)	667	—
	12	aldolase C, fructose-biphosphate (gi 6978489)	672	—
	13	?actin beta (gi 71620)	1774	—
	14	tubulin, beta 2 (gi 4507729)	1562	—
	15	tubulin, alpha 2 (gi 34740335)	784	—
	16	neurofilament, light polypeptide (gi 13929098)	1024	—
	17	?neural adhesion molecule F3 (gi 1095168)	450	—
	18	?Na+/K+ -ATPase alpha 3 subunit (gi 6978547)	850	—
S	1	hemoglobin beta chain complex (gi 17985949)	2683	—
	2	hemoglobin beta chain complex (gi 17985949)	944	39
	3	vesicle associated membrane protein 2B (gi 4894188)	377	60
	4	major beta-hemoglobin (gi 204570)	365	—
	5	confilin 1 (gi 8393101)	363	—
	6	thy-1 glycoprotein (gi 207308)	1119	—
	7	tyrosine 3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, zeta polypeptide (gi 675604)	672	99
	8	tyrosine 3/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, epsilon polypeptide (gi 5803255)	1044	66
	9	voltage-dependent anion channel 1 (gi 6755963)	779	—
	10	voltage dependent anion channel (gi 4105605)	807	—
	11	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform B1 (gi 14043072)	485	165
	12	growth associated protein 43 (gi 8393415)	862	—
	13	Ckb protein (gi 40807002)	751	—
	14	brain abundant, membrane attached signal protein 1 (gi 11560135)	691	—
	15	albumin (gi 19705431)	2165	—
	16	transferrin (gi 61556986)	745	—
	17	albumin (gi 19705431)	622	—
	18	Ncam1 protein (gi 74353679)	813	—
	19	neural adhesion molecule F3 (gi 1095168)	903	—
	20	Ncam1 protein (gi 74353679)	827	—
	21	ankyrin binding cell adhesion molecule neurofascin (gi 1842429)	1102	—



ラット脳画分のSDS-PAGE

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等バイオサイエンス総合研究事業）
（分担研究報告書）

遺伝子組換え医薬品等のプリオン安全性確保のための検出手法の標準化及び
プリオン除去工程評価への適用に関する研究（H19-医薬-一般-011）

分担研究者 生田 和良 大阪大学微生物病研究所 教授

分担研究協力者 柚木 幹弘 （株）ベネシス研究開発本部枚方研究所 グループマネージャー

研究要旨：

①プリオン病の非侵襲性迅速診断法としての近赤外分光法の有用性の検討を行った。スクレイピー脳内接種マウスの体表から得た近赤外スペクトルを多変量解析し、プリオン感染に特徴的と思われるスペクトルによる酸素化ヘモグロビンおよび Cytochrome c oxidase の変化を観察することができた。また、スクレイピー接種ハムスターの剖検脳の近赤外分光法解析により、プリオン迅速診断の可能性を検討し、ある程度の有用性が認められた。

②プリオンクリアランス試験に用いるプリオンの調製法について検討した。超音波処理を用いて粒子径を小さくしたものをを用いた場合、平均孔径 15nm のフィルターでそのほとんどが除去されるが、一部はフィルターを通過し、その画分には超遠心操作で沈殿しない画分が存在することがわかった。この結果により、粒子径を小さくする処理はクリアランス試験に用いるプリオン調製法としてより適切であること、サンプル処理に用いられる超遠心操作における留意点があること、除去の完全性を確認するには感染実験が推奨されることが明らかになった。

A. 研究目的

- ①プリオン病の生前診断法としての近赤外分光法の有用性を検討する。
- ②超音波処理によって粒子系分布をコントロールしたプリオンサンプルを用いて、平均孔径 15nm のナノフィルターによるプリオン除去評価を行い、クリアランス評価への応用を検討する。

法による解析と、対象としてウェスタンブロット法によるプリオン出現の確認を行った。

②Hamster adopted 263K が感染した脳由来の microsomal fraction (MF) を超音波装置で約 100nm の平均粒子径にしたものをバイオ製剤に添加し、平均孔径 15nm のナノフィルターを用いてろ過した。ろ液の中の 263K について Western blotting (WB)法と動物接種(BA)法により検討した。

B. 研究方法

- ①本年度は、新しいプリオン感染診断法として、近赤外分光法の可能性について検討を行った。スクレイピープリオン (chandler および Obihiro) をマウスへ脳内接種し、体表からの近赤外分光測定 (600-1100nm) を行い (図 1)、プリオン感染を Western blotting もしくは免疫組織化学染色で確認後、近赤外スペクトルの多変量解析を行い、プリオン感染によるスペクトル変化を調べた。また、スクレイピープリオン (Hamster adopted 263K) を接種し、発症したハムスターの剖検脳を直接近赤外分光

C. 研究成果

- ①スクレイピー脳内接種マウス体表から得た近赤外スペクトルの多変量解析によりプリオン感染による酸素化ヘモグロビンおよび Cytochrome c oxidase の変化が観察され、プリオン感染生前診断への本法の有効性が確認された。スクレイピープリオン接種ハムスターの剖検脳の近赤外分光法解析により、ウェスタンブロット法によるプリオン出現の確認結果と一部一致しない結果はあるものの、かなりのサンプルで一致する結果が得られた。

②15nmの平均孔径をもつフィルターであってもWB法ではろ液に263Kは認められないが、BA法では感染性が認められることが判明した。更にそのろ液中の感染性プリオン蛋白について検討を行ったところ、ろ液の超遠心操作(150000g, 1時間, 2回)の沈殿画分のみならず上清画分にも感染性プリオン因子が存在していることがわかった(表2、図2)。

D. 考察

①本実験条件におけるマウスの incubation time は chandler で 197.3 ± 5.6 , Obihiro で 193.7 ± 6.5 日であった。近赤外分光法により、プリオン感染を識別可能な時期は、耳部と腹部のどちらの近赤外スペクトルを用いた場合も incubation time よりも早期であったため(表1)、本法は生前診断法として有用であると考えられた。しかし、生前診断法として用いる場合、様々な類似の疾患で同様の変化が観察されないか、詳細に検討を行う必要がある。また、ハムスターの結果から一部ウェスタンブロット法の結果と一致しない場合があったことから、今後、感度等について検討していく必要がある。

②感染性のプリオン因子は少なくとも15nmの平均孔径を有するフィルターでそのほとんどが捕捉されるものの、その一部は通過することが可能であり、その性状は超遠心操作の沈殿及び上清画分の両方に存在することが明らかになった。このことはWB時の感度向上やバッファー交換を目的とした超遠心操作でプリオンを濃縮するときの留意点を提議しており、プリオン除去の完全性を確認するには感染実験が必要であることを示唆している。

E. 結論

①近赤外スペクトル法はプリオン病の生前診断法として有用であることが判明した。

②プリオンクリアランス試験用のスパイク材

料の調製法としての超音波処理は有効であるが、感染性プリオンの一部は超遠心操作で沈殿しないことから、サンプル調製法としての超遠心操作には留意点があることが判明した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表 (○は本科研費に直接関係する論文) 論文発表

・ Sakudo A, Taniuchi Y, Kobayashi T, Onodera T, **Ikuta K**. Normal cytochrome c oxidase activity in prion protein gene-deficient mice. *Protein Peptide Lett* (in press)

・ Sakudo A, Nakamura I, Tsuji S, **Ikuta K**. GPI-anchor-less human prion protein is secreted and glycosylated but lacks SOD activity. *Int J Mol Med*. 2008, 21:217-222.

・ Sakudo A, Onodera T, **Ikuta K**. PrP^{Sc} level and incubation time in a transgenic mouse model expressing Borna disease virus phosphoprotein after intracerebral prion infection. *Neurosci Lett*. 2008, 431:81-85.

・ Sakudo A, Wu G, Onodera T, **Ikuta K**. Octapeptide repeat region of prion protein (PrP) is required at an early stage for production of abnormal prion protein in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 365: 164-169.

・ Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Hattori S, Ohtani M, Narita Y, Kawabata Y, Miyatake Y, Nanjo A, Iwao E, Morita M, Wilson E, MacLean C and **Ikuta K**. Prion removal by nanofiltration under different experimental conditions. *Biologicals*. 2008; 36: 27-36.

・ Nojima J, Sakudo A, Hakariya Y, Kuratsune H, Watanabe Y, Kanakura Y, **Ikuta K**. Spectroscopic diagnosis of anti-phospholipid antibodies by visible and near-infrared spectroscopy in SLE

patients' plasma samples. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007: 362, 522-524.

・ Sakudo A, Yoshimura E, Tsenkova R, **Ikuta K**, Onodera T. Native State of Metals in Non-digested Tissues by Partial Least Squares Regression Analysis of Visible and Near-infrared Spectra. *J Toxicol Sci.* 2007: 32, 135-141.

・ Sakudo A, Nakamura I, Lee DC, Saeki K, **Ikuta K**, Onodera T. Neurotoxic prion protein (PrP) fragment 106-126 requires the N-terminal half of hydrophobic region of PrP in the PrP-deficient neuronal cell line. *Protein & Peptide Lett* 2007: 14, 1-6.

・ Nakamura I, Xue G, Sakudo A, Saeki K, Matsumoto Y, **Ikuta K**, and Onodera T. Novel single nucleotide polymorphisms in SP1-binding site of Bovine PRNP promoter in Japanese Black cattle: Impairment of its activity. *Intervirology* 2007: 50, 190-196.

・ Sakudo A, Nakamura I, **Ikuta K**, Onodera T. Recent development in prion disease research: diagnostic tools and in vitro cell culture models (Review). *J Vet Med Sci.* 2007: 69, 329-337.

・ Sakudo A, Hakariya Y, Kobayashi T, **Ikuta K**. Visible and near-infrared (Vis-NIR) spectroscopy: introduction and perspectives for diagnosis of chronic fatigue syndrome (Review). *J liME.* 2007: 2, 8-18

・ Sakudo A, Onodera T, **Ikuta K**. Prion protein gene-deficient cell lines: Powerful tools for prion biology (Review) *Microbiol Immunol.* 2007: 51, 1-13.

学会発表

・ 作道章一, 小林孝徳, 菅沼嘉一, 佐伯圭一, 小野寺節, **生田和良**. プリオン蛋白質(PrP)遺伝子欠損細胞株を用いた PrP 機能およびプリオン増殖機構の解析. 第 41 回獣医生化学会学

術集会. つくば, 平成 18 年 3 月 20 日

・ Guoying Wu, Akikazu Sakudo, Keiichi Saeki, **Kazuyoshi Ikuta**, Takashi Onodera. Detection of PrP from murine Prnp-deficient neuronal cell line, transfected with hamster Prnp gene and infected with scrapie agents, 第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 平成 18 年 11 月 19-21 日

・ 作道章一, 計屋由紀子, 小林孝徳, 上田真世, 中屋隆明, 馬場宏一, **生田和良**. 新しいインフルエンザウイルス感染診断法開発: インフルエンザウイルス感染患者鼻汁の可視—近赤外スペクトル多変量解析, 第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 平成 18 年 11 月 19-21 日

・ 作道章一, 小野寺節, **生田和良**. RK13 細胞発現系を用いた組換え分泌性ヒトプリオンタンパク質の発現および性状解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 平成 19 年 10 月 21-23 日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特許取得: なし

実用新案登録: なし

その他: なし

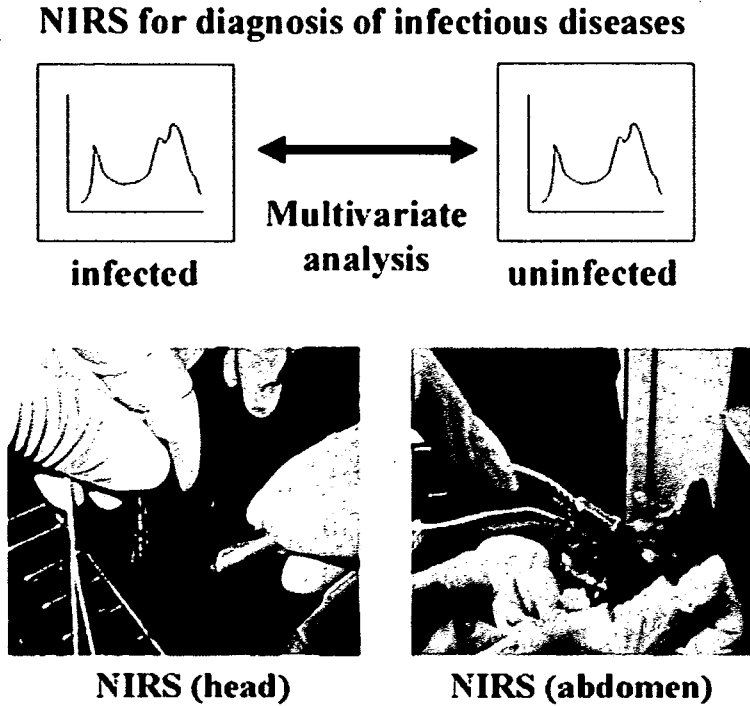


表 1

近赤外分光法により有意な違いの検出された接種後日数(非感染群との比較; $p < 0.05$)

Day	Chandler		Obihiro	
	Abdomen	Ear	Abdomen	Ear
0				
3				
5				
20				
39		*		
50				
60				*
71		*		
81		*		
90		*	*	
99		*		
124*		*	*	
140		*		*
160*		*	*	*
170*		*	*	*
182*		*	*	*
189*		*	*	*
196*		*	*	*
201*		*	*	*
208*		*	*	*
215*		*	*	*
222*		*	*	*
242*		*	*	*
250*		*	*	*

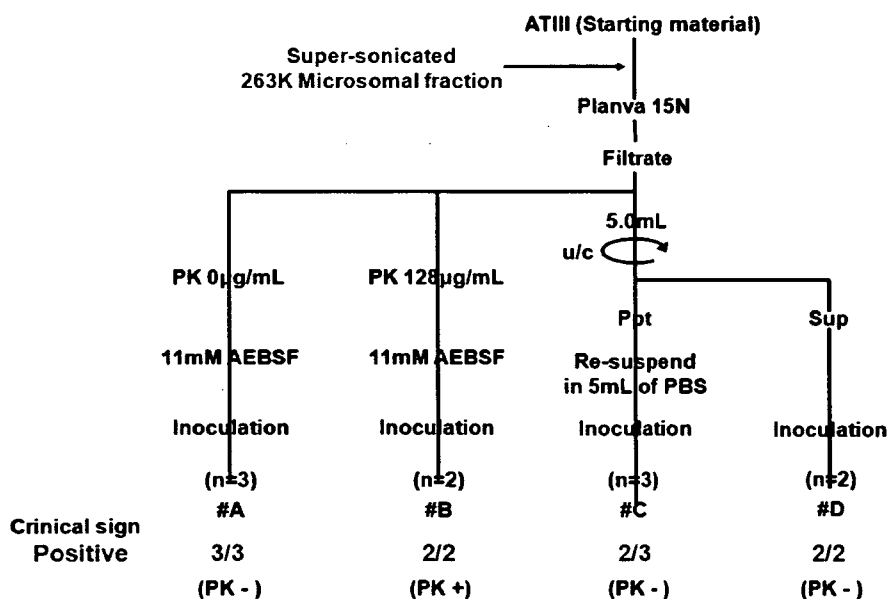
表 2

TSE spiking study for Planova 15N filtration of antitrombin

Spiking material		Detergent treated microsomal fraction	Super sonicated microsomal fraction (sMF)
Treating method for spiking material		263K MF was treated with 0.1% sarkosyl for 30 min at room temperature.	263K MF was "super-sonicated" then 220 nm-filtered prior to spiking.
Spike ratio		1/50	1/21
Facility		BioReliance	Benesis
Western blotting	Load	3.1 / 3.1	3.6
	Filtrate	0.0 / 0.0	<0.8*
	Reduction	≥3.1 / ≥3.1	≥2.8
Bioassay	Load	Not tested	+ve
	Filtrate	Not tested	+ve*
	Reduction	Not tested	Not applicable

☒ 2

Present result of additional study



培養細胞由来医薬品のプリオン汚染検査法に関する研究
- 培養細胞から放出されるプリオンの物理化学的性状の解析 -

分担研究者 堀内 基広 北海道大学大学院獣医科学研究科 プリオン病学講座 教授

研究要旨

培養細胞を用いて産生される医薬品のプリオン汚染リスクを評価するためには、培養細胞から放出されるプリオンの性状を知る必要がある。そこで、本研究では培養細胞から放出されるプリオンの物理化学的性状について検討した。プリオン持続感染細胞 ScN2a-3 は培養上清中に、非感染細胞に伝達可能なプリオンを放出する。ScN2a-3 の培養上清を分別遠心により分画して、各画分におけるプリオン感染性を調べたところ、プリオン感染性は 10,000×g で沈殿する画分(10p)に最も多く、100,000×g で沈殿する画分(100p)にも存在した。これらの画分中から蛋白分解酵素(PK)抵抗性 PrP^{Sc} の検出を試みたが、安定した結果は得られなかった。従って、培養細胞から放出されるプリオンを構成する PrP^{Sc} は、PK 抵抗性が弱いと考えられた。培養細胞から放出されるプリオンのうち、粒子サイズの小さいものは、200 nm の孔径は通過するが 20 nm の孔径は通過しなかった。これらの結果は、培養細胞由来医薬品等のプリオン汚染の検出法、およびリスク評価のための基礎データとなると思われる。

A. 研究目的

培養細胞由来医薬品等のプリオン汚染の検出、プロセスバリデーション、あるいはリスク評価のためには、培養細胞中に存在するプリオンの物理化学的性状を知る必要がある。プリオン感染動物の脳由来の PrP^{Sc} を界面活性剤処理することで、PrP 分子 10 数個の凝集体からなるプリオンが産生されるように (Silveira, J. R., *et al.* Nature 437: 257-261 (2005))、プリオンの感染性を担う PrP^{Sc} 凝集体の粒子サイズは小さいと考えられる。また、我々は過去3年間の本研究班における研究で、プリオン感染動物脳乳剤を Sarkosyl (N-ラウロイルサルコシンナトリウム) 処理することで、孔径 35nm 以下のプリオン

が抽出可能であることを示した。このように、人工的な処理を加えて得たプリオンの粒子サイズに関する知見は集積しつつある。一方、培養細胞から放出されるプリオンは、PrP^{Sc} 凝集体単独で存在するのではなく、エクソソームなどの小胞に付随した形で放出されることが示唆されているが (Fevrier, B., *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 101: 9683-9688 (2004))、その詳細な物理化学的性状は不明である。そこで、本研究では、培養細胞から放出されるプリオンの物理化学的性状について解析した。

B. 研究方法

1. 細胞

マウス神経芽細胞 N2a のサブクローン N2a-3 および、N2a-3 にプリオン Chandler 株が持続感染した ScN2a-3 を使用した(Uryu, M., *et al. Microbiol. Immunol.* 51: 661-667 (2007))。

2. 培養上清の分画およびプリオン感染性の評価

ScN2a-3 の培養上清を回収し、2,000 ×g, 10 分間遠心した。得られた上清を、10,000 ×g, 30 分間遠心した。このとき得られた画分を 10p として実験に用いた。10,000 ×g の遠心上清をさらに 100,000 ×g, 45 分間遠心して沈殿を回収した (100p)。10p および 100p 画分は、出発材料の 1/10 量の DMEM に懸濁し、これらを N2a-3 に接種した。N2a-3 を 4-8 代連続継代した後、PrP^{Sc} を検出することでプリオンの感染性を評価した。

PrP^{Sc} および α-tublin の検出はドットプロットにより行なった。細胞を 200 μl の lysis buffer に溶解し、低速遠心により除核した。上清を DNase I で処理した後、α-tublin の検出用に、100 μl の lysate を Bio-dot (Bio-Rad 社) にて吸引しながら PVDF 膜にドットした。残りの 80 μl の lysate は Proteinase K (20 μg/ml) で 37°C、1 時間処理した。これを Bio-dot にて吸引しながら PVDF 膜にドットした。α-tublin は抗 α-tublin モノクローナル抗体(mAb)により検出した。PrP^{Sc} の検出には、PVDF 膜を 3 mol/L GdnSCN で処理した後、mAb 31C6 により検出した。抗原抗体複合体は ECL Western blotting detection system (Amersham bioscience)を用いて化学発光法により検出した。検出には LAS-3000 (富士写真フイルム社) を使用し、定量解析を行なった。

3. 分離培養によるプリオンの粒子サイズの推定

孔径 8 μm-20 nm のトランスウエル インサート (Nunc 社) を用いて、ScN2a-3 と N2a-3 の分離培養を行った。インサートに ScN2a-3 を、外側 (シャーレ) には N2a-3 を巻き込み、72 時培養した。インサートを取り除いた後、N2a-3 を 4-8 代連続継代した。N2a-3 へのプリオンの伝達は、PrP^{Sc} をドットプロットで検出することにより判定した。

(倫理面への配慮)

感染性を含む試料の使用は北海道大学大学院獣医学研究科 BSL2 実験施設にて行った。

C. 研究結果

ScN2a-3 の培養上清中のプリオン感染性は 10p および 100p 画分に存在した (結果は示さず)。そこで、10p および 100p 画分におけるプリオン感染性の比較定量解析を実施した (図 1)。その結果、10p 画分に存在するプリオン感染性は 100p 画分の 4-8 倍であった。10p および 100p にプリオン感染性が存在したことから、これらの画分からの PK 抵抗性 PrP^{Sc} の検出を試みた。10p および 100p 画分をショ糖密度勾配を用いて分画し、各々の画分から、PK 処理を行わずに総 PrP、および PK 抵抗性 PrP^{Sc} の検出を行った (図 2)。総 PrP は脂質ラフトのマーカーである GM1 と同じ画分から検出されたが、PK 抵抗性 PrP^{Sc} のバンド強度は非常に弱く、PrP^{Sc} の存在を確認するには至らなかった。従って、培養上清中に放出されるプリオン感染性は、PK 抵抗性が弱い PrP^{Sc} に付随する可能性が示唆された。

100p 画分にもプリオン感染性が検出さ

れた (図 1)。培養細胞から放出されるプリオンの一部は、既報のように、エクソソームのような粒子径の小さい膜小胞に付随している可能性が示唆されたことから、孔径の異なるトランスウエルを用いて分離培養を行い、粒子サイズの推定を行った。その結果、プリオン感染性のうち最も小さいものは、200 nm の孔径は通過するが 20 nm の孔径は通過しないことが判明した (図 3)。

D. 考察

培養細胞由来医薬品等のプリオン汚染の検出、あるいはプロセスバリデーションのためには、培養細胞中に存在するプリオンの物理化学的性状を知る必要がある。当研究室で樹立した N2a-3 にプリオンが持続感染した ScN2a-3 は、培養上清中に、細胞を用いたアッセイで容易に検出できる量のプリオン感染性を放出することから、ScN2a-3 の培養上清中に放出されるプリオンの物理化学的性状について解析した。

培養上清中に存在するプリオンの 80% 以上は 10p 画分に検出されることから、比較的大きな粒子サイズであると考えられる。しかし、PK 抵抗性 PrP^{Sc} は容易に検出されないことから、PrP 分子のみで大きな凝集体を形成しているのではなく、PK 抵抗性が弱い PrP^{Sc} 凝集体が比較的大きな膜小胞に付随して存在する可能性が示唆された。

エクソソームは、粒子径はおおよそ 30 - 100 nm であり、ウイルス粒子と同様に 100p 画分に回収される。100p 画分に存在するプリオン感染性は、10p 画分と比較して明らかに少かったことから、培養上清中のプリオンの多くはエクソソームには付随していないと思われる。

一方、プリオン感染性の一部は、ウイ

ルス粒子と同様に 100p 画分に回収され、かつ、孔径 200 nm を通過することが明らかとなった。これらの性状はエクソソームと一致すること、また、エクソソームの形成に関与する Alix や Tsg101 の発現を siRNA で抑制することにより、200 nm を通過する画分の感染性は著しく低下したことから (結果は示さず)、プリオン感染性の少なくとも一部は、既報のように (Fevrier, B., et al. Proc Natl Acad Sci USA 101: 9683- 9688 (2004))、エクソソームに付随すると考えられる。

E. 結論

培養細胞の上清中に放出されるプリオンの物理化学性状を調べた結果、プリオン感染性は 10,000×g で沈殿する画分 (10p) に最も多く、100,000×g で沈殿する画分 (100p) にも存在した。しかし、培養上清中に放出されるプリオンを構成する PrP^{Sc} は、PK 抵抗性が弱いと考えられた。また、培養上清中に放出されるプリオンのうち、粒子サイズの小さいものは、200 nm の孔径は通過するが 20 nm の孔径は通過しなかった。これらの結果は、培養細胞由来医薬品等のプリオン汚染の検出法、およびリスク評価のための有用な基礎データとなると考えられる。

F. 健康危険情報

実験室内感染、外部への病原体の拡散などの事故は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uryu, M., Karino, A., Kamihara, Y., and Horiuchi, M. Characterization of prion susceptibility in Neuro2a mouse neuroblastoma cell subclones.

Microbiol. Immunol., 51: 661-667, 2007.

- 2) Ohara, J., Tokari, T., Kurokawa, A., Maeda, J., Ishiguro, N., Furuoka, H. and Horiuchi, M. Frequencies of PrP genotypes in meat breeds of Japanese sheep and trail of selective breeding in experimental sheep flock. J. Vet. Med. Sci., 69 : 1325-1329, 2007.
 - 3) Fujii F, Horiuchi M, Ueno M, Sakata H, Nagao I, Tamura M, and Kinjo M. Detection of prion protein immune complex for bovine spongiform encephalopathy diagnosis using fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy. Anal Biochem., 370: 131-141, 2007.
 - 4) Watanabe, Y., Hiraoka, W., Shimoyama, Y., Horiuchi, M., and Kuwabara, M. Instability of familial spongiform encephalopathy-related prion mutants. Biochem. Biophys. Res. Commun., 366: 244-249, 2008.
2. 学会発表
- 1) Song, C.-H., Furuoka, H., Suzuki, A., Ogino, M., Horiuchi, M. Effect of intraventricular infusion of anti-PrP mAbs on the disease progression in scrapie-infected mice. NeuroPrion 2007 (2007, 9/26-28, Edinburg, UK)
 - 2) Nakamitsu, S., Kurokawa, A., Uryu, M., Horiuchi, M. Cell-density-dependent fluctuation of PrP-res in prion-infected Neuro2a cells. NeuroPrion 2007 (2007, 9/26-28, Edinburg, UK)
 - 3) Horiuchi, M. Prion propagation and its inhibition. The 14th International Symposium for Zoonosis Control. -Prescription for fighting against zoonoses- (2007, 10/31, Sapporo, Japan)
 - 4) 進藤亮、山河芳夫、佐多徹太郎、横山隆、古岡秀文、堀内基広 日本で発生した BSE 由来 PrP^{Sc} の生化学的性状の解析 2007年プリオン研究会 (2007, 8/25-26, 新潟)
 - 5) 中満智史、黒川、彩、瓜生匡秀、堀内基広 プリオン持続感染細胞内における異常型プリオン蛋白質の量的変動 第 55 回日本ウイルス学会 (2007, 10/21-23, 札幌)
 - 6) 宋昌鉉、古岡秀文、鈴木章夫、長谷部理絵、前田秋彦、堀内基広 抗 PrP 抗体の脳室内投与によるプリオン病の治療効果 第 55 回日本ウイルス学会 (2007, 10/21-23, 札幌)
 - 7) 瓜生匡秀、堀内基広 神経芽腫細胞 Neuro2a サブクローンにおけるプリオンの細胞間伝播 第 55 回日本ウイルス学会 (2007, 10/21-23, 札幌)
 - 8) 堀内 基広 プリオンの増殖とその抑制 第 55 回日本ウイルス学会 (2007, 10/21-23, 札幌)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
本年度は該当なし。
 2. 実用新案登録
本年度は該当なし。
 3. その他

本年度は該当なし

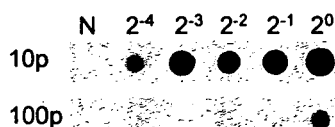


図1. ScN2a-3 の培養上清中に存在するプリオン感染性の比較定量解析。

培養上清の 10p および 100p 画分を 2 倍段階希釈したものを N2a-3 に接種した。8 継代後にドットプロットにより PrP^{Sc} を検出した。10p 画分では 2⁻⁴ 希釈まで PrP^{Sc} が検出されたが、100p 画分では 2⁻¹~2⁻² 希釈まで PrP^{Sc} が検出された。従って、10p 画分は 100 p 画分の 4~8 倍のプリオン感染性を含むと考えられる。

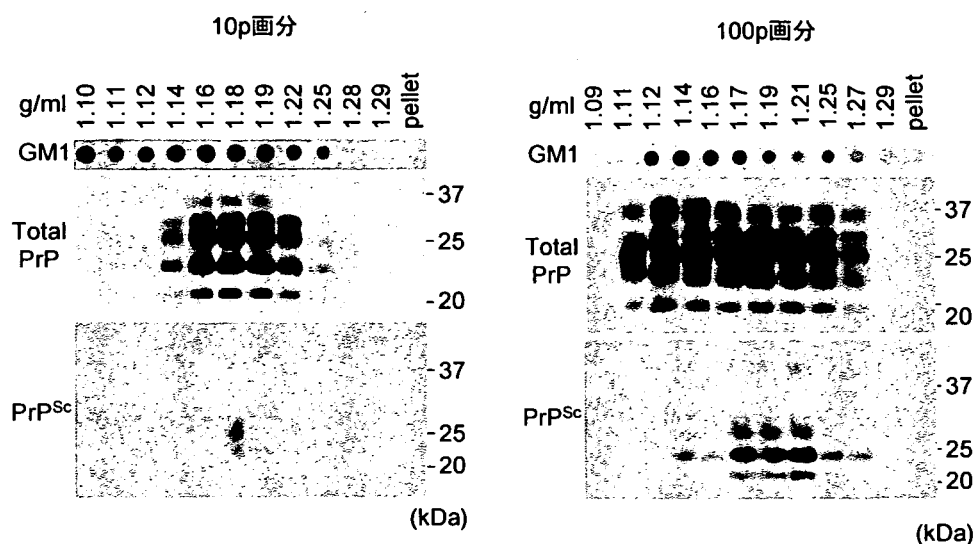


図2. 10p および 100p 画分の総 PrP(total PrP)および PK 抵抗性 PrP^{Sc}

10p および 100p 画分を、ショ糖密度勾配遠心でさらに分画した。GM1 糖脂質は HRP 標識コレラトキシン B サブユニットにより検出した。各画分の PK 未処理の試料から total PrP を検出した。PK 処理を行い PK 抵抗性 PrP^{Sc} の検出に用いた。図上の数値は各画分の比重を示す。Total PrP は明瞭に検出されたが、PK 抵抗性 PrP^{Sc} の検出は再現性が乏しく、PrP^{Sc} の存在を結論するには至らなかった。

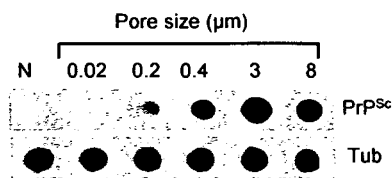


図3. ScN2a-3 の培養上清中のプリオン感染性の粒子サイズの推定

ScN2a-3 を各種孔径のトランスウェルを用いて N2a-3 と分離培養した。N2a-3 へのプリオンの伝播を PrP^{Sc} を指標に判定した。プリオン感染性は 200 nm の孔径は通過するが 20 nm の孔径は通過しなかった。