

Fig. 3 PMCA の結果の判定

プリオン非感染ハムスターの脳乳剤を同様の条件でPMCAを実施した場合、典型的なPrP^{Sc}由来のバンドよりも分子量が小さいバンドが検出される場合がある(No seed).このようなバンドが検出された場合、およびバンドが検出されなかった場合を陰性と判定した。+は陽性と判定したバンドを示す。

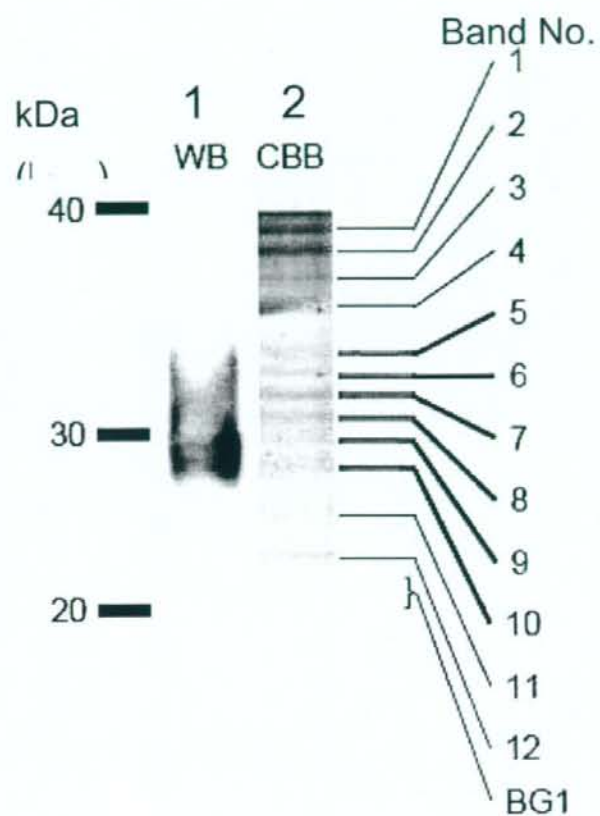


Fig. 4 PrP^C画分の SDS-PAGE

レーン1: ウェスタンブロッティング

レーン2: クマシー染色

Table 2. Planova 15Nろ過によるプリオン除去効果(定量的Bioassayでの評価)

	Western blot (Log arbitrary units)	Bioassay (Log ID ₅₀)
Before filtration	6.1 / 6.1	7.97 / 8.30
After filtration	<2.6 / <2.6	≤3.25 / 4.30
Reduction	≥3.5 / ≥3.5	≥4.72 / 4.00

界面活性剤および高出力超音波処理したスパイク材料を1/50量スパイクし、Planova 15Nでろ過した(50kPa, 2~8°C)。

Western blotではろ液に異常型プリオンは検出されなかったが、Bioassayでは2回の実験のうち1回で一部の感染性プリオンタンパク質がろ液に検出された。膜の能力としてはBioassayにおいても効果的な除去率(Reduction)を示した。

Table 3 Planova 15N ろ過によるプリオン除去効果 (定性的 Bioassay での評価)

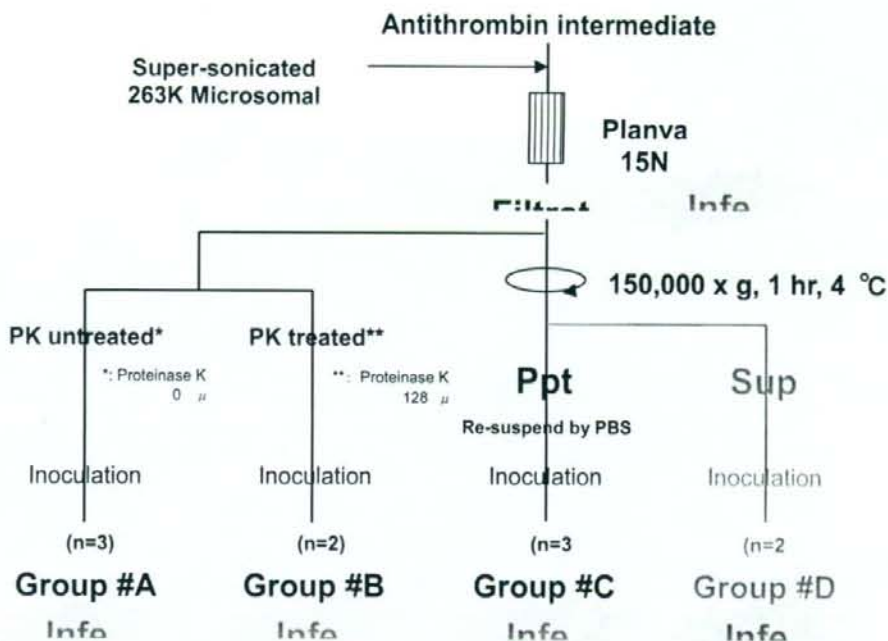
	Western blot (Log arbitrary units)	Bioassay (Qualitative)
Before filtration	3.6	Positive
After filtration	<0.8	Positive
Reduction	≥ 2.8	NA

NA: Not applicable

高出力超音波処理したスパイク材料を1/21量スパイクし、Planova 15Nでろ過した (50kPa、2~8°C)。Western blotではろ液に異常型プリオンは検出されなかったが、定性的Bioassayではろ液に感染性プリオン蛋白が検出された。

孔径15nmのウイルス除去膜のろ液には、PK抵抗性の感染性プリオンタンパク質が存在した。

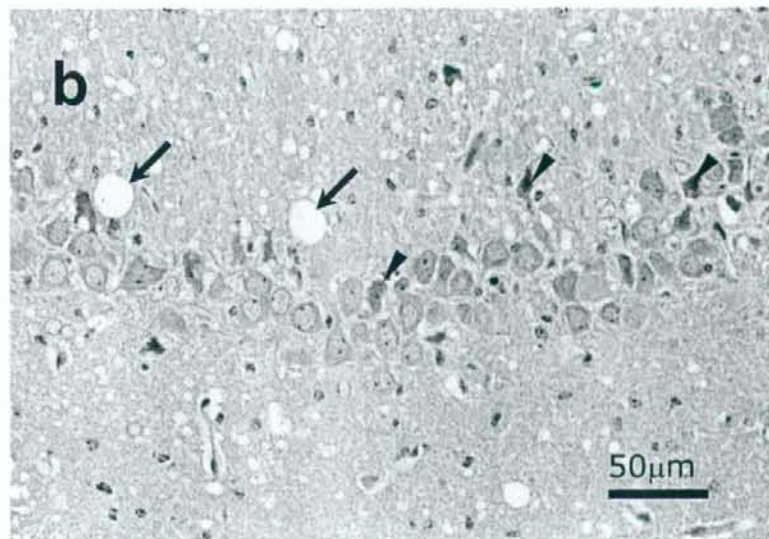
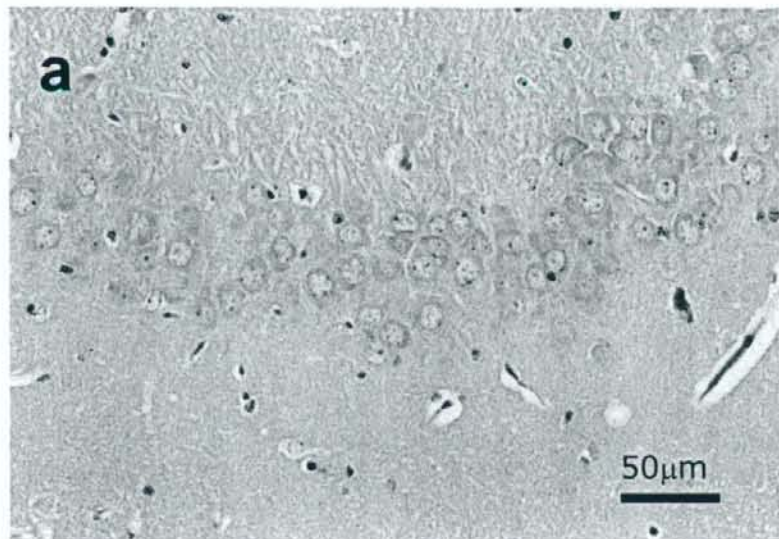
また、膜を通過し且つ超遠心操作(150,000 x g, 1hr)で沈殿しない画分にも感染性プリオン



	Group #A			Group #B		Group #C			Group #D	
	Animal No.			Animal No.		Animal No.			Animal No.	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Final judgment	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Day of clinical signs	175	111	118	115	118	-	111	11	125	175
Day of death post inoculation	179	118	135	118	130	-	118	11	132	179
PrP ^{res} in brain by Western blot	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lesions by histopathology	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A

+: scrapie positive; -, negative; A, autolysis; *1, find dead

Fig. 5 Planova 15N を通過した感染性プリオンタンパク質の定性的 Bioassay による挙動解析



a: 正常脳組織

b: 発症したハムスターの脳組織 (Animal No. 7、海馬)

bには、神経細胞の変性/壊死(くさび印)、空胞化(矢印)及びグリアの増加が観察された。

Fig. 6 脳組織の写真

Table 4. 各 PrP^{Sc} 画分の PMCA₅₀ 値

PrP ^{Sc} 画分	希釈列							PrP ^{Sc} 濃度 Log[PMCA ₅₀ /mL]
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	
スパイク用 試料	NT	NT	+++ ^{b)}	+++	+- ^{c)}	--- ^{d)}	---	11.3
プラノバ 20N 濾液	++ ^{a)}	++	+++	---	---	NT	NT	9.9
プラノバ 15N 濾液	+++	+++	---	---	---	NT	NT	8.9

a) n = 2で実施し, 2検体ともにPrP^{Sc}陽性であったことを示す.

b) n = 3で実施し, 3検体ともにPrP^{Sc}陽性であったことを示す.

c) n = 3で実施し, 1検体のみPrP^{Sc}陽性であったことを示す.

d) n = 3で実施し, 3検体ともPrP^{Sc}が増幅されなかったことを示す.

Table 5. SUS 濃度がスパイク用試料の PrP^{Sc} 力価に及ぼす影響

PrP ^{Sc} 画分	希釈列							PrP ^{Sc} 濃度 Log[PMCA ₅₀ /mL]
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
濾過前 ^{a)}	NT	NT	+++	+++	+-	---	---	8.6
プラノバ 35N 濾液	+	+++	+++	---	---	NT	NT	6.9

表1のスパイク用試料をPBSで100倍に希釈した.

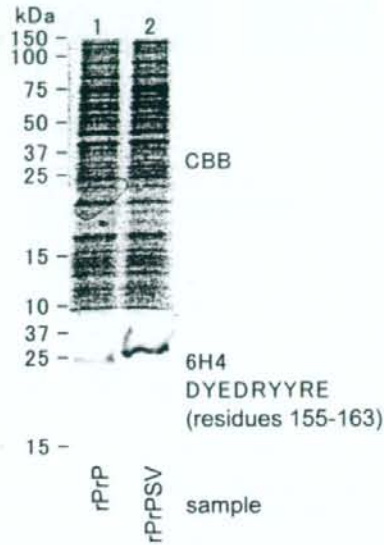


Fig. 7. Immunoblot analysis of recombinant bovine PrP and its splice variant.

The bovine PrP gene and splice variant were subcloned into and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and visualized with CBB stain (upper panel). Recombinant PrP and PrPSV were detected with anti-PrP mAb 6H4 (lower panel). Epitope recognition site located within PrP and PrPSV is shown as residues number.

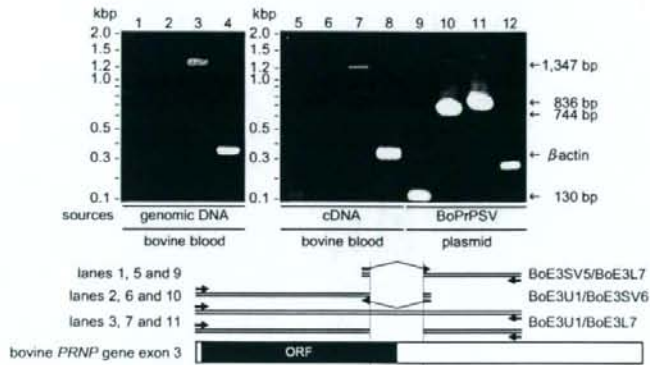


Fig. 8. Detection of the splice variant of PrP mRNA using exon-exon junction primers in total RNA from bovine blood.

We prepared genomic DNA and first-strand cDNA from total RNA from bovine blood and subjected it to PCR using exon-exon junction (lanes 2, 6 and 10, BoE3U1/BoE3SV6; lanes 1, 5 and 9; BoE3SV5/BoE3L7) and bovine *PRNP* exon 3 (lanes 3, 7 and 11, BoE3U1/BoE3L7), and β -actin primer sets using Ex Taq DNA polymerase. PCR products were separated on a 2% agarose gel and visualized with ethidium bromide.

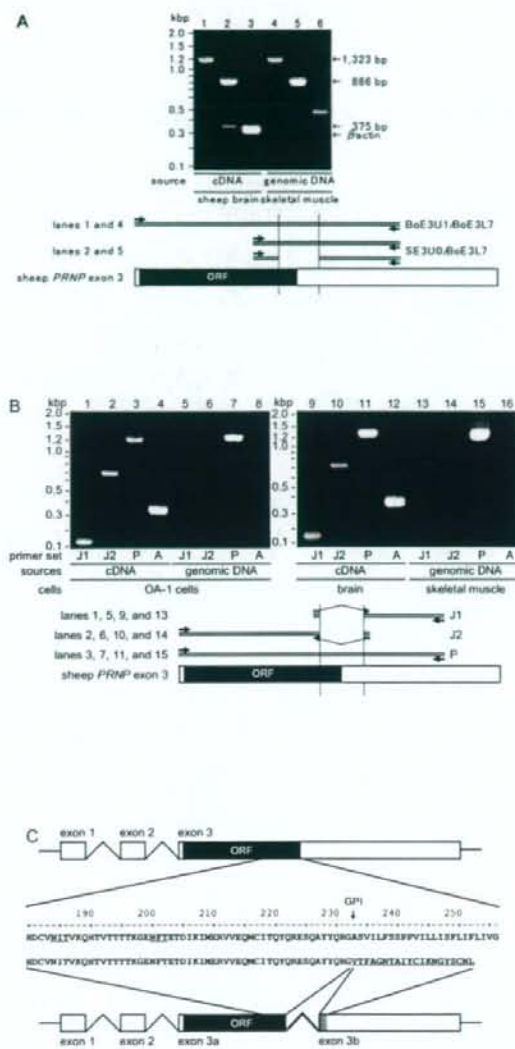


Fig. 9. Expression of the splice variant of PrP mRNA.

(A) First-strand cDNA from total RNA from sheep brain (5 μ g) and genomic DNA from sheep skeletal muscle were used for PCR using sheep *PRNP* exon 3 primers (BoE3U1/BoE3L7, lanes 1 and 2; SE3U0/BoE3L7, lanes 2 and 4) and β -actin primers (lanes 3 and 6) with Ex taq polymerase. PCR products were separated on a 2% agarose gel and visualized with ethidium bromide.

(B) OA1 cells were cultured for 40 days after 5 passages (P5D40). First-strand cDNA and genomic DNA from OA1 cells (left panel) were prepared. First-strand cDNA from sheep brain and genomic DNA from sheep skeletal muscle (right panel) were prepared. First-strand cDNA from total RNA (5 μ g) and genomic DNA (2.5 ng) were used for PCR using PrP primer set (P), exon-exon junction primer sets (J1 and J2) and β -actin primers (A) with Ex Taq DNA polymerase. PCR products were separated on a 2% agarose gel and visualized with ethidium bromide.

(C) We confirmed the sequences of ordinary (upper panel) and alternatively spliced sheep *PRNP* (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) *PRNP* are indicated. The arrow indicates a GPI anchoring site.

異常型プリオンの検出のための試験研究

研究分担者： 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
研究協力者： 高倉大輔 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
伊藤さつき 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
浦山 健 (株)ベネシス研究開発本部 大阪研究所
柚木 幹弘 (株)ベネシス研究開発本部 大阪研究所
生田 和良 大阪大学 微生物病研究所 ウイルス免疫分野教授

研究要旨 異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の特異的検出法の開発を目的とした正常プリオンタンパク質 (PrP^C) 及び PrP^{Sc} の構造特性解析を実施するため、正常ハムスター脳に発現する PrP^C を濃縮することを検討し、界面活性剤 Octyl β -glucoside 及び CHAPS による可溶化、並びに Ni カラムと PEI コーティングメンブランの併用により、PrP^C が濃縮されることを見出した。

A. 研究目的

遺伝子組換え医薬品等の開発において、異常型プリオンタンパク質 (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る。異常型プリオンタンパク質の特異的検出法の開発には、その構造を解析し、正常プリオンタンパク質 (PrP^C) との違いを明らかにする必要がある。プリオンタンパク質 (PrP) は、分子内に2本のN結合型糖鎖及びGPIアンカーを有する糖タンパク質であり、PrP^{Sc} の糖鎖やGPI構造は、Proteinase Kによって不純物を消化することによって得られる Hamster adapted prion scrapie 263K を用いた研究により、既に明らかにされている。しかし、PrP^C は、Proteinase K に対して感受性であるため同じ方法による精製が困難であり、構造に関する報告例は少ない。そこで本年度は、正常ハムスター脳に発現している PrP^C の濃縮を検討した。

B. 研究方法

1) 正常ハムスター脳からの PrP^C の精製

正常ハムスター脳を10倍量の0.25 M ショ糖を含む20 mM Tris-HCl (pH7.4) 中で、氷冷しながらホモ

ジナイズした。遠心分離後 (2,000×g, 室温, 7分) (沈殿:P1, 上清 S1), 得られた上清 S1 を再度遠心分離し (2,000×g, 室温, 7分) (沈殿:P2, 上清 S2), 得られた沈殿 P2 を先に得られた沈殿 P1 と合わせ、先の半量の0.25 M ショ糖を含む20 mM Tris-HCl (pH7.4) 中で氷冷しながらホモジナイズした。遠心分離後 (2,000×g, 室温, 7分) (沈殿:P3, 上清 S3), 得られた上清 S3 と S2 を合わせ、遠心分離 (150,000×g, 4℃, 60分) した (沈殿:P4, 上清 S4)。得られた沈殿 P4 に、Octyl β -glucoside, 及び CHAPS をそれぞれ最終濃度1.4%, 及び0.5% になるように添加し、超音波照射を行った (45 kHz, 水中, 5分×2回)。4℃で1時間放置後、遠心分離し (200,000×g, 4℃, 60分) (沈殿:P5, 上清 S5), 得られた上清 S5 を陽イオン吸着メンブランでろ過した。素通り画分を Lysis buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazole, pH8.0) を用いて4℃下で一晩透析した。回収した透析内液を遠心分離し (10,000×g, 4℃, 30分) (沈殿:P6, 上清 S6), 得られた上清 S6 を、ニッケルスピカラムに加えて遠心分離した (700×g, 2分間)。Wash buffer (50mM

NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM imidazole, pH8.0) を加えて遠心分離し(700×g, 2分間), さらに Wash buffer を加えて同じ操作を繰り返した。同様に Elute buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250mM imidazole, pH8.0) を加えて遠心分離し (700×g, 2分間) (溶出液: E1), 得られた E1 を Polyethylencimine (PEI) コーティングメンブレンに通過させ, ろ過後のフィルターを回収した。回収したフィルターに 1×SDS buffer (60mM Tris-HCl, 3%SDS, 5%Glycerol, 5% β-ME, 0.005%BPB) を加えて 100°C で 3分間 boil し, Spin down した上清を回収した (図 1)。

2) PrP^C画分の SDS-PAGE

回収された PrP^C画分は, 12.5%アクリルアミドゲルを用いて, 25 mM Tris, 0.192mM Glycine, 0.1% SDS, pH8.3 泳動用緩衝液中でゲル 1 枚あたり 30 mA で泳動した。泳動後のゲルはクマシー染色を行い, 分離されたタンパク質を検出した。

3) PrP^Cの検出 (ウェスタンブロット)

PrP^C画分を SDS-PAGE で分離後, PVDF 膜に 20V で 60 分間転写した。一次抗体に, Anti-Prion monoclonal Antibody, mouse (3F4) (SIGNET), 2 次抗体に Anti-mouse IgG-HRP, sheep (SIGMA) を用いたウェスタンブロットを行い, 化学発光法 (ECL-Plus, GE Healthcare) で PrP^Cを検出した。

4) PrP^C画分中の混在タンパク質の同定

SDS-PAGE で分離され, クマシー染色されたタンパク質について, ウェスタンブロットで PrP^Cが検出された分子量範囲の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 分間振とう後, 超音波抽出を 10 分間行い, 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 : L-column (化学物質評価機構, 0.075×150 mm, 3 μ)

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 : 2~65%B (0~50 分)

流速 : 0.3 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: Bioworks (Thermo Fisher Scientific)

データベース: NCBIInr, hamster

(倫理面への配慮)

研究実施機関が定めた動物実験に関する要領を遵守して動物実験を行った。

C. 結果と考察

(1) 正常ハムスター脳 PrP^Cの精製

正常ハムスター脳を 0.25 M ショ糖を含む 20 mM Tris-HCl (pH7.4) 中で繰り返しホモジネートした後、Octyl β -glucoside、及び CHAPS を用いて PrP^C 画分を可溶化し、超遠心分離によって不溶化画分を除去した (Fig. 1)。さらに、ニッケルカラムと PEI コーティングメンブレンを併用することによって、PrP^C が濃縮されていることが確認された。

(2) SDS-PAGE において PrP^C 泳動位置に混在するタンパク質の同定

PrP^C 画分のタンパク質を SDS-PAGE で分離し、ウェスタンブロットを行った。その結果、分子量 27-34 kDa の範囲で PrP^C が検出され (泳動図: 図 2, レーン 1: ウェスタンブロット検出, 2: クマシー染色)、本精製方法を用いて PrP^C が分画されていることが確認された。また、検出された分子量範囲が広いことから、複数の構造の糖鎖、及び GPI アンカーの結合による多数の分子種の存在が示唆された。PrP^C の精製度合いを確認するために、SDS-PAGE 上で PrP^C 泳動位置に混在するタンパク質を同定した。PrP^C が検出されたバンド (図 2, レーン 2, バンド 5, 7, 9, 10) を切り出し、ゲル内消化後、抽出されたペプチドについて LC/MS/MS を行った。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、混在するタンパク質を同定した。結果を表 1 に示す。LC/MS/MS、及びデータベース検索では、PrP^C は、

バンド 5, 7, 及び 10 に含まれることが確認された。また、タンパク質の同定順位、Protein probability (P(pro)) や Score の値から、各バンドには、PrP^C より上位に同定されるタンパク質も複数の含まれることが判った (Protein probability は、あるデータベースに対しての同定結果の偶然性の確率。値が低いほど、結果の確実性は高くなる。Score は、タンパク質の同定する根拠となったペプチドの理論的 b , y イオンに対して、実際のスペクトルがどの程度一致しているかを数値化し、同定されたすべてのペプチドについて積算した値)。これらのことから、LC/MSⁿ による糖鎖及び GPI の構造解析を実施するためには、サンプル量を増やすこと、また、純度を高めるためにさらなる精製を行うことが不可欠であると考えられた。次段階の精製手法として、PrP^C 抗体カラムや、PrP^C の等電点が高いことを利用したクロマトフォーカシング等が有用であると考えられる。

D. 結論

正常ハムスター脳から PrP^C を精製する方法を検討し、界面活性剤 Octyl β -glucoside 及び CHAPS による可溶化、並びに Ni カラムと PEI コーティングメンブレンの併用は、PrP^C の濃縮に有用であることが判った。しかし、PrP^C 画分中のタンパク質の同定結果から、依然としてタンパク質が混在していることが明かとなり、LC/MSⁿ による糖鎖及び GPI の構造解析を進めるためには、さらに PrP^C を精製する必要があることが示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Takakura, D., Qin, Y., Xiaoyu, H., Yamaguchi, T. The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals, *Biol. Pharm. Bull.* In press
- 2) Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Harazono, A., Takakura, D., Yamaguchi, T. Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in

characterization and evaluation of glycoprotein products. *Trends in Glycosci. Glycotech.* 2008; **20**, 97-116.

- 3) Akira Harazono, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Yukari Matsuishi-Nakajima, Toru Kawanishi, and Teruhide Yamaguchi: Simultaneous glycosylation analysis of human serum glycoproteins by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 2008, **869**, 20-30
- 4) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, and Teruhide Yamaguchi: Alteration of N-glycosylation in the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus: relative quantification of N-glycans using an isotope-tagging method. 2008, *Immunology*, *in press*
- 5) Satsuki Itoh, Akiko Hachisuka, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Reiko Teshima, Takao Hayakawa, Toru Kawanishi and Teruhide Yamaguchi: Glycosylation analysis of IgLON family proteins in rat brain by liquid chromatography and multiple-stage mass spectrometry. *Biochemistry*, 2008, **47**, 10132-54

2. 学会発表

- 1) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 篠原 聡, 山口照英: ヒト間葉系幹細胞の Thy-1 の糖鎖構造解析. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学大会 合同大会 (2008, 12, 9-12) 神戸
- 2) 橋井則貴, 川崎ナナ, 中島 紫, 伊藤さつき, 山口照英: d_3 -フェニルヒドラジンを用いた同位体標識法及び液体クロマトグラフィー/質量分析による糖鎖の定量解析. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学大会 合同大会 (2008, 12, 9-12) 神戸

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

Table 1 Summary of protein identification

Band No.	Protein	P (pro)	Score	MW	Accession	Peptide (Hits)	pI
5	1 mitochondrial ATP synthase, H+ transporting F1 complex beta subunit [Mesocricetus auratus]	1.13E-08	30.24	39359.4	89574019	5 (5 0 0 0)	4.98
	2 GTP-binding protein alpha o [Rattus norvegicus]	9.14E-08	10.20	40042.9	8394152	1 (1 0 0 0)	5.23
	3 GNAO2_CR1LO Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 2	9.14E-08	10.20	40072.0	120977	1 (1 0 0 0)	5.51
	4 eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2 [Mesocricetus auratus]	1.18E-06	10.15	53952.6	108802827	5 (5 0 0 0)	8.46
	5 RAB3B_MESAU Ras-related protein Rab-3B	2.85E-06	10.13	24709.2	81870701	1 (1 0 0 0)	4.79
	6 A Chain A, Solution Nmr Structure Of Recombinant Syrian Hamster Prion Rpp(90-231), 25 Structures	4.40E-06	20.18	16232.6	6729981	2 (2 0 0 0)	9.07
	7 prion protein [Mesocricetus auratus]	4.40E-06	10.18	26791.8	119489920	1 (1 0 0 0)	9.68
	8 beta actin [Homo sapiens]	9.34E-06	10.17	41709.7	4501885	1 (1 0 0 0)	5.18
	9 beta-actin [Mesocricetus auratus]	9.34E-06	10.17	19217.8	77997569	1 (1 0 0 0)	5.43
7	1 complement protein C1qB [Mesocricetus auratus]	1.59E-09	10.18	6530.9	86142876	1 (1 0 0 0)	3.45
	2 prion protein [Mesocricetus auratus]	4.74E-07	30.18	26791.8	119489920	4 (4 0 0 0)	9.68
	3 A Chain A, Solution Nmr Structure Of Recombinant Syrian Hamster Prion Rpp(90-231), 25 Structures	4.74E-07	20.18	16232.6	6729981	3 (3 0 0 0)	9.07
	4 eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2 [Mesocricetus auratus]	4.27E-06	10.15	53952.6	108802827	8 (7 1 0 0)	8.46
	5 beta-actin [Mesocricetus auratus]	5.15E-06	20.17	19217.8	77997569	2 (2 0 0 0)	5.43
	6 beta actin [Homo sapiens]	5.15E-06	10.17	41709.7	4501885	1 (1 0 0 0)	5.18
	7 GNAS complex locus gnas1-a [Rattus norvegicus]	7.77E-06	10.09	45635.0	9506737	1 (1 0 0 0)	5.61
	8 PRIO_CRIMI Major prion protein precursor (PrP) (PrP27-30) (PrP33-35C) (CD230 antigen)	2.99E-05	10.12	27837.4	3183139	1 (1 0 0 0)	9.61
	9 placental cathepsin L [Mesocricetus auratus]	6.22E-05	10.09	10900.2	64310849	1 (1 0 0 0)	4.33
9	1 succinate dehydrogenase complex subunit B [Mesocricetus auratus]	1.75E-11	50.21	28085.9	89573819	8 (8 0 0 0)	8.14
	2 GTP-binding protein alpha o [Rattus norvegicus]	5.29E-10	10.20	40042.9	8394152	2 (2 0 0 0)	5.23
	3 GNAO2_CR1LO Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 2	5.29E-10	10.20	40072.0	120977	2 (2 0 0 0)	5.51
	4 beta actin [Homo sapiens]	2.14E-09	20.26	41709.7	4501885	3 (3 0 0 0)	5.18
	5 eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2 [Mesocricetus auratus]	3.71E-06	10.15	53952.6	108802827	34 (31 3 0 0)	8.46
	6 beta-actin [Mesocricetus auratus]	2.58E-05	10.17	19217.8	77997569	2 (2 0 0 0)	5.43
10	1 RAB3B_MESAU Ras-related protein Rab-3B	3.45E-13	30.26	24709.2	81870701	5 (5 0 0 0)	4.79
	2 succinate dehydrogenase complex subunit B [Mesocricetus auratus]	4.49E-11	40.17	28085.9	89573819	6 (6 0 0 0)	8.14
	3 beta actin [Homo sapiens]	1.30E-10	10.24	41709.7	4501885	1 (1 0 0 0)	5.18
	4 smooth muscle alpha actin [Mesocricetus auratus]	1.30E-10	10.24	16621.3	21070328	1 (1 0 0 0)	4.52
	5 beta-actin [Mesocricetus auratus]	1.30E-10	10.24	11326.5	83727901	1 (1 0 0 0)	4.9
	6 GTP-binding protein alpha o [Rattus norvegicus]	1.06E-09	10.22	40042.9	8394152	2 (2 0 0 0)	5.23
	7 GNAO2_CR1LO Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 2	1.06E-09	10.22	40072.0	120977	2 (2 0 0 0)	5.51
	8 cytochrome c oxidase chain II [Mesocricetus auratus]	1.24E-09	10.25	25995.2	2581791	2 (2 0 0 0)	4.54
	9 eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2 [Mesocricetus auratus]	2.04E-07	10.17	53952.6	108802827	2 (2 0 0 0)	8.46
	10 APOA1_MESAU Apolipoprotein A-I precursor (Apo-A1) (ApoA-1)	2.07E-07	10.18	30719.7	62898986	1 (1 0 0 0)	5.81
	11 lipoprotein lipase [Mesocricetus auratus]	1.90E-06	10.10	53039.8	55700049	1 (1 0 0 0)	7.73
	12 A Chain A, Solution Nmr Structure Of Recombinant Syrian Hamster Prion Rpp(90-231), 25 Structures	6.40E-06	10.18	16232.6	6729981	1 (1 0 0 0)	9.07
	13 prion protein [Mesocricetus auratus]	6.40E-06	10.18	26791.8	119489920	1 (1 0 0 0)	9.68
	14 cyclooxygenase 2 [Mesocricetus auratus]	7.41E-05	8.06	11225.5	37992935	1 (0 1 0 0)	8.24

Normal hamster brain

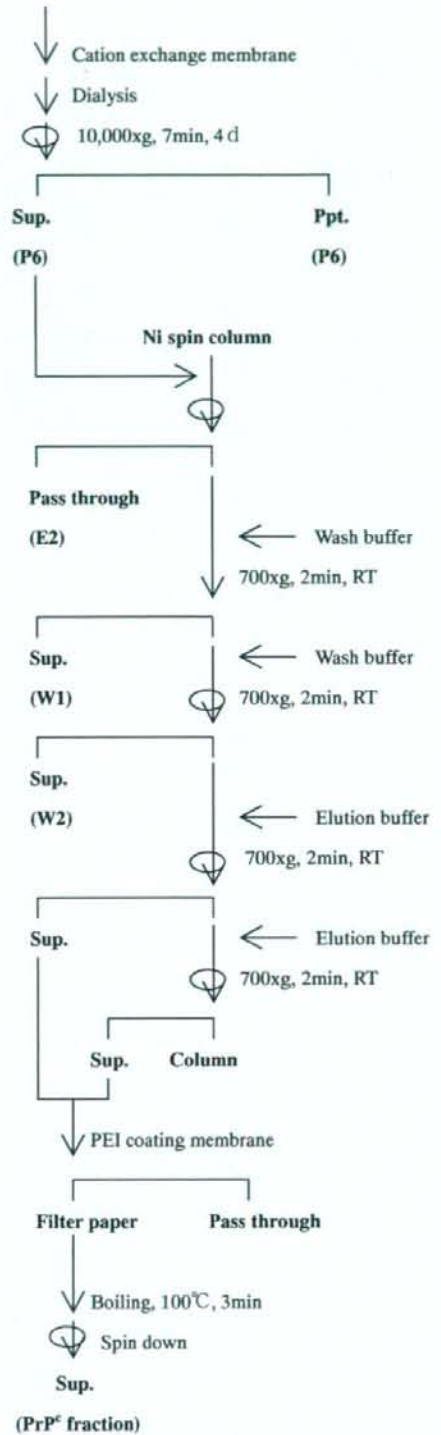
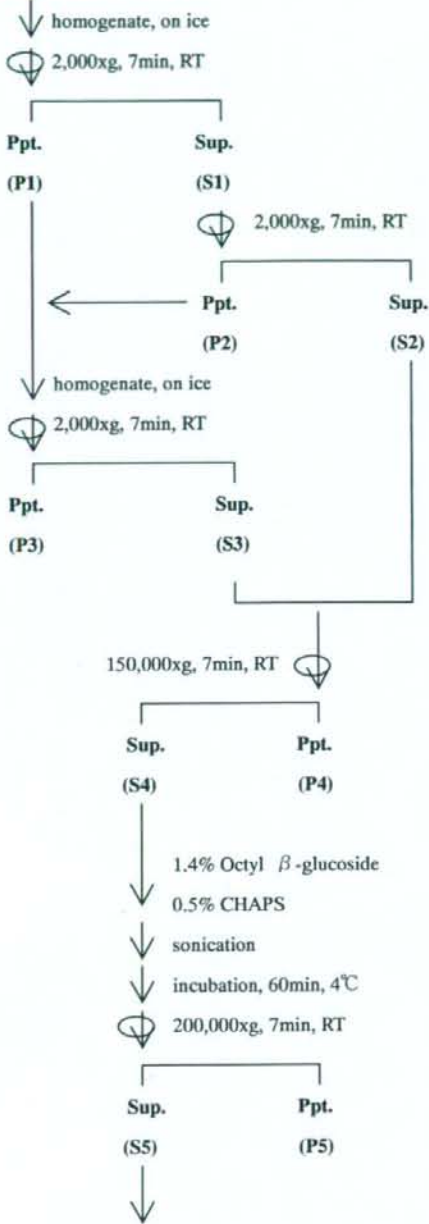


図1 ハムスター脳からの PrP^C の精製方法

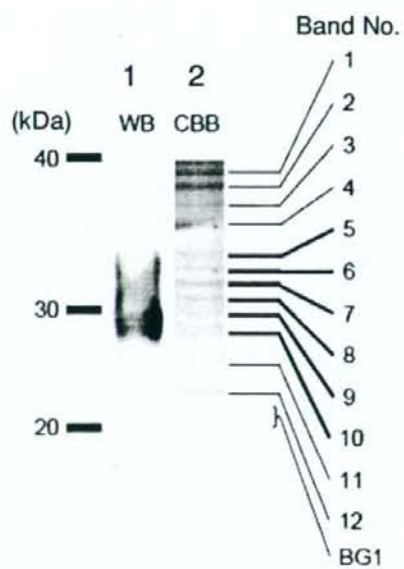


図2 PrP^C画分のSDS-PAGE
 検出 レーン1:ウェスタンブロット
 レーン2:クマシー染色

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
プリオン除去工程評価への適用に関する研究

研究分担者 生田 和良 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨 異常型プリオンの検出手法開発及びナノフィルトレーシ
ョンによるプリオンろ過工程評価に関する試験研究を行った。

A. 研究目的

遺伝子組換え医薬品等のPrP^{Sc}の混入/迷
入リスクを低減化するための検出手法や試料
調製法の最適化を行うと共に、製造工程の
PrP^{Sc}除去/不活能評価法の標準化をめざす
。このために、細胞培養技術応用医薬品の
製造原料/原材料や中間工程製品に用いる
ことができるPrP^{Sc}検出手法の最適化に関す
る試験研究及び調査研究を行うと共に、開
発した検出手法を用いた製造工程がもつ異
常型プリオンの除去能等の能力評価への適
用についても検討する。

B. 研究方法

ナノフィルトレーションでろ過される26
3K株由来PrP^{Sc}や持続感染培養株由来PrP^{Sc}の
物理化学性状および生化学性状を解析する
とともに、明らかにした特性に基づいて、
プリオン検出の高感度化や迅速化や近赤外
領域における吸収パターンを多変量解析す
ることにより、その存在を非破壊的に検出
する新しい手法（近赤外分光法）等の適用
について検討を行った。

C. 研究結果

スクレイビー263K株を用いた孔径15nmの
フィルターを用いたろ過実験において、ほ
とんどの感染性のプリオンは除去されるも
の、一部は通過して超遠心操作によつて
も沈殿しないことが明らかになった。また
、スクレイビ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を行い、
感染により変化している近赤外波長を調べ
ると、酸化ヘモグロビンやCytochrome c
オキシダーゼに関連する波長が変化して
いることが明らかになった。

D. 考察 製造工程のPrP^{Sc}除去/不活能評
価法の標準化のための有用な情報が得られ
た。一方、近赤外スペクトル変化について
は類似疾患で観察されないかの詳細な検討
が必要である。

E. 結論 本研究から、製造工程標準化と
プリオン検出高度化のための第一歩となる
重要な情報が得られた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Hattori
S, Ohtani M, Ohkubo Y, Kawabata Y, Mi
yatake Y, Nanjo A, Iwao E, Morita M, W
ilson E, MacLean C, Ikuta K. Prion rem
oval by nanofiltration under different
experimental conditions. *Biologicals*.
36, 27-36. 2008.

Nishimura T, Sakudo A, Xue G, Ikuta K,
Yukawa M, Sugiura K, Onodera T. Estab
lishment of a new glial cell line from
hippocampus of prion protein gene-def
icient mice. *Biochem Biophys Res Commu*
n. 377, 1047-1050, 2008.

Sakudo A, Wu G, Onodera T, Ikuta K. Oc
tapeptide repeat region of prion prote
in (PrP) is required at an early stage
for production of abnormal prion pro
tein in PrP-deficient neuronal cell lin
e. *Biochem Biophys Res Commun* 365, 16
4-169, 2008.

Sakudo A, Taniuchi Y, Kobayashi T, Ono
dera T, Ikuta K. Normal cytochrome c o
xidase activity in prion protein gene-
deficient mice. *Protein Peptide Lett* 1
5, 250-254, 2008.

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* 21, 217-2
22, 2008.

Sakudo A, Onodera T, Ikuta K. PrP^{Sc} le
vel and incubation time in a transgeni
c mouse model expressing Borna disease
virus phosphoprotein after intracereb
ral prion infection. *Neurosci Lett* 431
, 81-85, 2008.

2. 学会発表

可視・近赤外分光法によるマウススクレイ
ビー感染病態解析、第146回日本獣医学会
学術集会、2008年9月、宮崎

H. 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

PMAC 法を用いたプロセスバリデーションに適した PrP^{Sc}画分の検討

研究分担者 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

研究協力者 前野 英毅 日本赤十字社 血漿分画センター研究部 研究員

研究要旨

培養細胞を用いて生産される医薬品や、血液製剤などの医薬品のプリオン汚染リスクを適切に評価するために、粒子径の小さい PrP^{Sc} 凝集体を用いて製造工程における PrP^{Sc} の除去効果を調べることが求められている。しかし、そのような小さな PrP^{Sc} 凝集体を大量に得ることは困難である。本研究では、Protein misfolding cyclic amplification (PMCA) 法を PrP^{Sc} の検出系に用い、プラノバ 35N を通過する粒子径の小さな PrP^{Sc} が、スパイク用試料として応用可能であるかについて検討した。1% Sodium Undecyl Sulfate (SUS) で処理した 263K 株感染ハムスター脳由来 PrP^{Sc} をプラノバ 35N で濾過した場合、濾液には $10^{11.3}$ PMCA₅₀/mL の力価の PrP^{Sc} が回収できることが判明した。プラノバ 35N 通過画分に存在する PrP^{Sc} 力価は SUS の濃度を下げるにより減少したが、0.01% SUS 存在下でも 10^3 ~ 10^4 の範囲でプリオン除去効果を評価可能なスパイク用試料が得られた。従って、SUS 処理後のプラノバ 35N 通過画分は、小さな PrP^{Sc} 凝集体を含むスパイク用試料として有用で、プロセスバリデーションに応用可能であると考えられた。

A. 研究目的

医薬品の製造工程におけるプリオン除去効率を評価するプロセスバリデーションが、医薬品のプリオン汚染リスクを検証する方法の一つとして用いられている。医薬品やその原材料の製造工程に PrP^{Sc} を添加して、実験的に除去効果が検討されているが、これまでの報告の多くは、プリオン感染動物の脳乳剤あるいはマクロソーム画分を添加した試料を用いて、プリオン除去効果を評価している。脳乳剤やマクロソーム画分に存在する PrP^{Sc} は、遠心操作により容易に沈殿するような粒子サイズの大きい PrP^{Sc} 凝集体が多く含まれている。一方、血液等に存在する可能性が

あるプリオンを構成する PrP^{Sc} の粒子サイズは小さいことが予想される。従って、使用するスパイク用試料によっては、適切なプロセスバリデーションが実施できていない可能性がある。我々は、粒子サイズの小さい PrP^{Sc} オリゴマーをプロセスバリデーションのスパイク用試料として用いることを検討してきた。しかし、粒子サイズの小さな PrP^{Sc} を大量に回収することは容易ではない。そこで、粒子サイズの小さい PrP^{Sc} オリゴマーを、PrP^{Sc} を高感度に検出可能な Protein misfolding cyclic amplification (PMCA) 法により検出することで、実用に耐えうるプロセスバリデーションが実施可能か否かを検討し

た。

B. 研究方法

1. 細胞

263K 株に感染したハムスターの10%脳乳剤に Sarkosyl を1%となるように添加し、100,000×g、30分の超遠心により沈殿画分を得た。沈殿画分を PBS で溶解後、1%となるよう Sodium Undecyl Sulfate(SUS)を加え、37℃で1時間放置した。これをプラノバ 35N(平均孔径 35 nm)で濾過し、スパイク用試料とした。

2. PMCA

スパイク用試料をプリオン非感染ハムスターの10%脳乳剤で段階希釈し、PMCA 装置 (Elektron 社製) を用いて PrP^{Sc}を増幅した。一回の PMCA 反応は、30分毎に8秒間5回の超音波処理を1サイクルとして、42サイクル実施した。1回目の PMCA 反応液をプリオン非感染ハムスターの10%脳乳剤で希釈し、再度 PMCA 反応を実施した。2回目の PMCA 反応液を Proteinase K で処理した後に、PrP^{Sc}をウェスタンブロットで検出した。各検体を n = 3 回で試験し、50%の確率で増幅産物を検出できる PrP^{Sc}量を PrP^{Sc}力価(PMCA₅₀/mL)と定義して、定量解析を行った。

C. 研究結果

プラノバ 35N を通過した画分 (スパイク用試料) を 10 倍段階希釈して、PMCA 反応を行い、スパイク用試料の PrP^{Sc}力価を求めたところ、力価は 10^{11.3} PMCA₅₀/mL であった。プラノバ 35N を通過する画分の粒子径は 35 nm 以下と考えられる。このような粒子径の小さ

な PrP^{Sc}凝集体でも、2回の PMCA を実施することで、10⁵~10⁶のレンジのプロセスバリデーションが実施可能な力価のスパイク用試料が得られることが判った。スパイク用試料をプラノバ 20N(平均孔径 19 nm)で濾過した画分中の PrP^{Sc}力価は 10^{9.9} PMCA₅₀/mL であった(表1)。

このスパイク用試料には 1% SUS が含まれる。界面活性剤の濃度が粒子径の小さな PrP^{Sc}凝集体の維持に必要であるかを検討するために、スパイク用試料を PBS で 100 倍に希釈して、プラノバ 35N で濾過し、濾過前後の PrP^{Sc}力価を調べた。濾過前の希釈試料の PrP^{Sc}力価は 10^{8.6} PMCA₅₀/mL であり、濾液中の PrP^{Sc}力価は 10^{6.9} PMCA₅₀/mL であった。SUS の濃度が 0.01% になった場合、プラノバ 35N の濾過により試料中の PrP^{Sc}力価は約 1/50 に低下したことになる(表2)。

D. 考察

1% SUS 存在下では、広範なレンジでプロセスバリデーションを実施可能なスパイク用試料が得られた。実際のプロセスバリデーションを考慮した場合、被検試料に SUS で処理したスパイク用試料を添加した場合、SUS 濃度は低下する。そこで、SUS 濃度の低下が、PrP^{Sc}力価に及ぼす影響を検討したところ、SUS の濃度低下により、プラノバ 35N を通過する画分の PrP^{Sc}力価は低下した。PrP^{Sc}力価の低下が、PrP^{Sc}がより大きな凝集体を形成したためか、あるいは PrP^{Sc}プラノバ膜に吸着しやすくなったためであるかは判らない。しかし、それでも 10³~10⁴のレンジでのプロセスバリデーションが可能な PrP^{Sc}力価を有するスパイク用試料が得られたこと