

2009 40009 B

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業

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

平成19～21年度 総合研究報告書

研究代表者 山口 照英

平成22(2010)年 4月

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

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

平成19～21年度 総合研究報告書

研究代表者 山口 照英

平成22(2010)年 4月

目 次

I. 総合研究報告	
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	1
山口 照英	
II. 分担総合研究報告	
1. 異常型プリオンの検出のための試験研究	43
川崎 ナナ	
2. 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 異常型プリオンの検出及び工程評価に関する試験研究	63
生田 和良	
3. プロセスバリデーションに適した PrP ^{Sc} 画分を用いた血液製剤製造工程の プロセスバリデーション.....	70
堀内 基広	
4. 異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究	80
菊池 裕	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	88
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
平成19～21年度総合研究報告書

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

研究代表者	山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長
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室長
	生田 和良	大阪大学 微生物病研究所教授
	堀内 基広	北海道大学大学院獣医科学研究科教授
	菊池 裕	国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部主任研究官
研究協力者	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
	中島 治	国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部主任研究官
	柚木 幹弘	(株)ベネシス研究開発本部枚方研究所
	浦山 健	(株)ベネシス研究開発本部枚方研究所
	田中 宏幸	(株)ベネシス研究開発本部枚方研究所
	前野 英毅	日本赤十字社血漿分画センター研究部
	萩原 克郎	酪農学園大学獣医学部 教授
	作道 章一	琉球大学医学部保健学科 准教授

研究要旨 遺伝子組換え医薬品等の異常プリオン(PrP^{Sc})の混入/迷入リスクを低減化するための検出法や試料調製法の最適化と、製造工程の PrP^{Sc} 除去/不活能評価法の標準化を目的として、1) PrP^{Sc} 高選択的検出法の開発を目指した PrP^{Sc} 及び正常プリオン(PrP^C)構造解析のための PrP^C濃縮法の構築、2) 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評価、3) 孔径15nmのウイルス除去膜を通過した感染性プリオンタンパク質の定量及び特性解析、4) Protein misfolding cyclic amplification (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、並びに 5) PrP^{Sc} 検出法への応用が期待できるウシスプライズ変異型プリオンタンパク質(PrPSV)の組換え蛋白質発現系の構築と特異抗体の調製並びにヒツジ PrPSV mRNA の解析を行った。

A. 研究目的

我が国では、伝達性ウシ海綿状脳症 (BSE) を主とする伝達性海綿状脳症 (TSE) のリスク対策として、原則的にウシ等由来原材料の原産国の地理的なリスク及び原材料部位のリスクを基本とした予防的な対策が進められている。特に、ウシ等由来製品については、①「原材料原産国の地理的なリスク及

び部位のリスク」、②「製造工程で用いる原材料のリスク」、及び③リスク低減のための原材料管理に係る措置等を踏まえた安全対策が行われている。しかし、カナダや米国において依然として BSE が発症しているように、ウシ等由来原材料の地理的分類に基づくリスク評価は、新たな知見の集積を踏まえて常に見直さざるを得ない状況に置かれている。従って、

シード細胞の樹立やセルバンクの確立, さらには製造工程の一部あるいは全工程にわたってウシ胎仔血清やウシ由来添加剤が用いられている細胞培養医薬品等多くのバイオ医薬品の製造において, 製品の安全性確保の観点から, 医薬品原材料や製造中間工程製品等に対する PrP^{Sc} の混入を否定する試験の実施が不可欠である. しかし, これまでに *in vivo* あるいは *in vitro* 等様々な系を用いた PrP^{Sc} 検出法の開発が試みられてきたが, いずれの方法にも試料調製法, 定量性, 検出に要する期間, あるいは検出の頑健性等に多くの課題が残されており, 未だ標準的方法といえる方法が確立されていないのが現状である. そのため, 血清等を用いる細胞培養医薬品や遺伝子組換え医薬品の安全性を確保するために, 製造に用いられる原料/原材料や製造中間工程製品等における PrP^{Sc} の有無の確認, あるいは製造工程バリデーションを行うための高選択的高感度 PrP^{Sc} 検査法, 並びに効率的 PrP^{Sc} 試料調製法の開発が望まれている.

本研究では, 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 検出法や試料調製法の最適化, 並びに 製造工程の PrP^{Sc} 除去/不活能評価法の標準化 をめざすものとして, 1) PrP^{Sc} 高選択的検出法開発を目指した PrP 構造特性解析のための PrP^C 分画法の検討, 2) 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評価, 3) 孔径15nmのウイルス除去膜を通過した感染性プリオンタンパク質の定量及び特性解析, 4) Protein misfolding cyclic amplification (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, 並びに 6) PrP^{Sc} 検出法への応用が期待できるウシスプライス変異型プリオンタンパク質 (PrPSV) の組換え蛋白質発現系の構築と特異抗体の調製並びにヒツジ PrPSV mRNA の解析

B. 研究方法

B-1 PrP 構造特性解析のための PrP^C 分画法の検討

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) 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°C, 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°C で1時間放置後, 遠心分離し (200,000×g, 4°C, 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レンでろ過した. 素通り画分を Lysis buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazole, pH8.0) を用いて 4°C 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°C, 30分) (沈殿:P6, 上清 S6), 得られた上清 S6 を, ニッケルスピнка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 Polyethyleneimine (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).

4) SDS-PAGE

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 20-30 mA で泳動した. 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.

5) ウェスタンブロットによる PrP^C の検出

PrP^C 画分を SDS-PAGE で分離後, PVDF 膜に 20V

で 60 分間転写した. 一次抗体として, Anti-Prion monoclonal Antibody, mouse (3F4) (SIGNET), 2次抗体として Anti-mouse IgG-HRP, sheep (SIGMA) を用いた. 検出は, 化学発光法 (ECL-Plus, GE Healthcare) を用いた.

6) ゲル内消化

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, 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.

7) ゲル及び PVDF 膜からのペプチド回収に関する検討

モデル試料として BSA を使用した. BSA を還元カルボシキメチル化し, SDS-PAGE により分離した後, クマシーにより染色した. 染色された BSA のバ

ンドを切り出し、1 mm 程度の角片とし、30%アセトニトリル水溶液を用いて脱色後、50%アセトニトリル水溶液を加え脱水した。脱水液を除去後、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。ゲルの形状、消化酵素量、消化時間、及び抽出方法等を変えながら、消化及び抽出を行った。また、PVDF膜からのペプチド回収に関する検討では、カルボキシメチル化したBSAをSDS-PAGEで分離し、PVDF膜に転写した後、転写部分を切り取り、0.5%ポロビニルピロリドンK30を含む100 mM 酢酸でブロックした後、検討に用いた。

8) ゲルからのタンパク質回収に関する検討

(アガロースゲルからのタンパク質の回収)

還元カルボキシメチル化したBSAを5%アガロースゲルにアプライし、100 Vで分離後、クマシー染色を行った。検出されたBSAのバンドを切り取り、DNA回収用スピンカラム (Quantum Prep Freeze N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Column, Bio-Rad) を用いて、タンパク質の回収を行った。回収液をSDS-PAGEで分離し、クマシー染色により検出した。

(アクリルアミドゲルからのタンパク質の回収-1)

フェツインを還元カルボキシアミドメチル化した後、Cy5 (GE Healthcare) で蛍光標識した。12.5%アクリルアミドゲル、1レーンあたり1 µgをアプライし、25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS, pH8.3 泳動用緩衝液中で20 mAで泳動した。蛍光スキャナー (Typhoon9400, GE Healthcare) でフェツインのバンドを検出後、ゲルを切り取り、回収検討実験に用いた。ゲルからのフェツインの振とう抽出を行い、抽出条件によっては得られた抽出液のフィルターろ過、又はゲルろ過 (NAP-5, GE Healthcare) を行った。回収液をSDS-PAGEで分離し、蛍光検出、及びクマシー染色により検出し、回収度合いを確認した。一部のフェツインについては、キモトリプシンを0.1 µgを加え、2 mM 塩化カルシウムを含む100 mM 重炭酸アンモニウム (pH8.0) 中、37°C、24時間消化した。

(アクリルアミドゲルからのタンパク質の回収-2)

還元カルボキシアミドメチル化したフェツインをSDS-PAGEで分離した後、マーカー、及びフェツインの1レーン分についてクマシー染色を行い、これを参照レーンとして、未染色のゲルよりフェツインの泳動位置に相当するゲルを切り出し、振とう抽出を行った。回収液を再度SDS-PAGEで分離し、クマシー染色により検出し、回収度合いを確認した。

9) 溶解性ゲルからのタンパク質回収に関する検討

Hansen らの報告 (Hansen, JN. et al., Analytical Biochemistry, **105**, 192, 1980) を参考に、アクリルアミドゲルを作成する際に、N,N'-メチレンビスアクリルアミド (BIS) の代わりにN,N'-ビス(アクリロイル)シスタミン (BAC, $(\text{CH}_2\text{CHCONHCH}_2\text{CH}_2\text{S})_2$) を使用し、ゲルを作成した。アクリルアミドはBio-Rad社製、BACはSigma社製を使用し、溶解溶媒にホルムアミドを用いて、10%BAC-ポリアクリルアミドゲルを作成した。ゲルに還元カルボキシメチル化したフェツインを1レーンあたり1, 3, 5 µgをアプライし、89 mM Tris, 2.5 mM EDTA- Na_2 , 89 mM ホウ酸の泳動用緩衝液中で20 mAで泳動し、ゲルはクマシー染色を行った。

ゲルの溶解には、還元剤ジチオスレイトール (DTT), 又はトリス(2-カルボキシエチル)フォスフィン (TCEP) を用い、タンパク質を回収することを試みた。フェツインを含むゲルを切り出し、30%アセトニトリル水溶液で脱色後、1.25 M DTT, 又は0.5 M TCEP (Bond-Breaker TCEP solution, Neutral pH, PIERCE) を500 µL加え、ゲルを粉砕した後、室温で一晩振とうした。

溶解したゲル溶液からフェツインの回収するために、Sulfo Link Coupling Resin (PIERCE社製)、及び強イオン交換体カラム (Accell Plus QMA, Waters社製) を利用する方法を検討した。Sulfo Link Coupling Resin を利用する方法では、溶解したゲル溶液、Sulfo Link Coupling Resin と Coupling buffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH8.5) を一晩混合し、還元によりゲル内のS-S結合の開裂で生成したSH基をSulfo Link

Coupling Resin に結合させることによってゲルの分解物を除いた後、さらにゲルろ過 (NAP-5, GE Healthcare) によって還元剤を除いた。強イオン交換体カラムを利用する方法では、フェツインを含むゲルに 1.25 M DTT を含む 50 mM Tris-HCl, pH8.0, 500 μ L を加えて粉砕し、一晩振とうしながら溶解した後、強イオン交換体カラムにアプライしフェツインを吸着させ、カラムを 50 mM Tris-HCl, pH8.0 で洗浄後、1 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl, pH8.0 でフェツインを溶出し、さらに溶出液をゲルろ過 (NAP-10, GE Healthcare) で脱塩した。また、強イオン交換体カラムの回収度合いの確認のため、フェツイン、1 μ g を 50 mM Tris-HCl, pH8.0, 500 μ L に加え、同様に操作した。回収液は、それぞれ濃縮乾固した後、SDS-PAGE で分離し、クマシー染色により検出し、回収度合いを確認した。

10) 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:

1. Magic C18 (Michrom BioResource, 0.2 \times 50 mm, 3 μ , 100+)
2. L-column (化学物質評価機構, 0.075 \times 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 :

1. 2~65%B (0~50 分)
2. 2~65%B (0~100 分 ; フェツイン)

流速 : 0.3 μ L/min

MS :

装置 : Finnigan LTQ (Thermo Fisher Scientific)

イオン源 : nanoESI

キャピラリー温度 : 200 $^{\circ}$ C

キャピラリー電圧 : 1.8~2.0 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

<フェツイン>

① single mass scan (m/z 700-2000, FT 分解能 : 50000)

② data-dependent MS/MS

③ data-dependent MS/MS/MS

④ data-dependent MS/MS/MS/MS

⑤ data-dependent MS/MS/MS/MS/MS

11) データベース検索

検索エンジン :

1. Mascot (Matrix Science 社)
2. Bioworks (Thermo Fisher Scientific)

データベース :

1. NCBItr
2. Rattus
3. hamster
4. Swissprot

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;

B-2 近赤外分光法の有用性評価

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。スクレイプープリオン (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2)、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、スクレイプープリオン (Hamster adopted 263K) を接種し、発症したハムスターの剖検脳の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) 等について検討を行った。更に、いくつかのプリオン株について、Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA)法を用いたプリオン検出の高感度化について検討した。

B-3 孔径15nmのウイルス除去膜を通過した感染性プリオンタンパク質の定量及び特性解析

Hamster adopted 263K が感染した脳由来の microsomal fraction (MF)を超音波装置又は界面活性剤処理で平均粒子径を約100nm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)法により膜による除去能力を定量的に検討した。さらに、ろ液を超遠心処理 (150,000G, 1時間) し、沈殿・上清画分中の感染性について検討した。

B-4 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

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。

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。 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 (富士写真フィルム社) 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 μ m-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。

4) スパイク試料の調整

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°C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。

5) PMCA

PMCA 装置 (Elekon 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} をウェスタンプロットで検出した。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。

6) スパイク試験

FVIII 溶液に 1/20 量のスパイク用試料を添加し、30 分間攪拌した後、プラノバ 20N により濾過した。また、HBIG 溶液に 1/100 量のスパイク用試料を添加

し、30分間攪拌した後、プラノバ35Nにより濾過した。濾過前後の試料を回収し、PMCA法を行った。

B-5 PrPSVの組換え体発現系の構築と特異抗体の調製並びにヒツジPrPSV mRNAの解析

1) 細胞培養

ヒツジ胎児脳由来細胞株OA1 (ATCC Number: CRL-6538)をT75組織培養用フラスコで培養し、1週間に1度の継代を行った。長期間の培養は9-cm組織培養用シャーレで行い、4日ごとに培地を交換した。

2) ウシ血液

北海道畜産試験場で正常ウシから採血し、3倍量のRNAlater (Ambion)を加え、使用時まで-20°C下に保存した。

3) RT-PCR

培養したOA1細胞又は血液からDNase I消化したtotal RNAを調製し、スーパースクリプトIII RNase H-逆転写酵素(インビトロジェン株式会社)を用いてfs-cDNAを合成し、RT-PCRに用いた。同時にゲノムDNAを調製し、陽性対象としてPCRに用いた。PCRはウシ又はヒツジPRNPのエクソン3にコードされているオープンリーディングフレーム(ORF)のmRNAを検出する各種プライマーと、Ex taq polymerase (タカラバイオ株式会社)を用いて行った。

4) ウシPrPSVの発現

ウシPrP又はPrPSV遺伝子エクソン3のORFを組み込んだpET-22bベクターを*Escherichia coli* BL21(DE3)pLysSに導入し、Overnight Express Autoinduction System I (Novagen)を用いて発現を誘導した。

5) イムノブロット法

試料をSDS-PAGEで分離後にPVDF膜へ転写し、第1抗体として抗PrP抗体6H4(ロシュ・ダイアグノステイクス株式会社)を、第2抗体にHRP標識抗IgG抗体を用いたイムノブロッティングを行い、コニカイムノステインHRP-1000(生化学バイオビジネス株式会

社)で検出した。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたり、研究実施機関が定める「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規定」、「同病原体等安全管理規程」、「同動物実験に関する指針」及び「同遺伝子組換え実験安全管理規則」を遵守した。

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

プリオン感染サンプルは大阪大学微生物病研究所バイオセイフティー委員会の規定、DNA実験は遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)および大阪大学組換えDNA実験実施規則に従って行った。動物実験は微生物病研究所動物委員会の規定に従って行った。

C. 結果

C-1 PrP^{Sc}構造特性解析のためのPrP^C分画法の検討

PrP^{Sc}の特異的検出法を開発するためには、その構造を解析し、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、まず、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った。つぎに、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、モデル試料として正常ラット及びハムスター脳粉末を用い、PrP^Cの効率的な分画・濃縮法を検討した。さらに、電気泳動で分離されたゲル内の微量タンパク質を用いて部位特異的な糖鎖構造解析を行うために、ゲルからのペプチド、又は糖タンパク質の効率的回収法について検討した。

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3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4, 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。

3) 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(図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。

PrP^C画分のタンパク質をSDS-PAGEで分離し、ウエ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5, レーン1: ウエ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5, 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2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。

4) ゲル内消化、及びPVDF膜消化によるペプチド回収に関する検討

ゲル内消化、及びPVDF膜消化の検討条件、及び結果について表3に示す。ゲル内消化効率については、データベース検索で同定されたBSAのペプチドから算出したアミノ酸配列のカバー率を指標とした。検討1, 2, 及び3の結果から、消化後のペプチドの抽出には、超音波抽出が有効であるが、溶液状態での消化効率(カバー率: 52.8%)に及ばないことが判った。検討4の結果から、酵素量は基質BSAに対して10:1の割合で加えたほうが消化効率は良く(カバー率: 23.2%)、検討5の結果から、ゲル内消化時、ゲルを粉砕したほうが消化効率は上がることが判った(カバー率: 29.3%)。さらに、消化時のゲル形状について、ミキサーを用いて粉砕し、消化時間についても検討したが(検討6, 及び7)、カバー率は上がらなかった。原因として、抽出後にゲル片を除くために行ったフィルターろ過の際に、ペプチドがフィルターに吸着し回収できなかったことが考えられた。また、PVDF膜にブロッティングしたBSAの消化効率(検討8, 及び9)についてもカバー率は上がらなかった。原因として、PVDF膜のブロッキングが不十分でキモトリプシンが膜に吸着し、十分に消化できなかったこと、消化後の抽出の際にブロッキングが剥がれ、生成したペプチドが吸着してしまったこと等が考えられた。以上の結果から、ゲルよりペプチドを回収する場合は、ゲル内消化を用い、消化及び抽出時にゲルは粉砕し、超音波抽出すると回収率は上がることが判った。

5) ゲルからのタンパク質回収に関する検討 (アガロースゲルからのタンパク質の回収)

5%アガロースゲルで分離する前のBSAと、分離後(図6)、DNA回収用スピナラムを用いて回収したタンパク質回収液を、SDS-PAGE(12.5%)で分離し、クマシー染色により検出した。その結果、アガロースゲルからは、全くBSAは回収されていないことが判った(図7)。原因としては、アガロースゲルの濃度が高すぎることや、タンパク質のゲルへの固定化が強固であることが考えられた。

(アクリルアミドゲルからのタンパク質の回収-1)

Cy5で蛍光標識したフェツインをSDS-PAGEで分離し、図8に示した抽出条件でゲルからの回収を試みた。抽出溶媒には、従来、多量のゲル内タンパク質の抽出に使用していたトリス緩衝液系溶液(条件①, ②, ③)や、高塩濃度溶液(条件④, ⑤)(参考文献: PIERCE, Technical Resource, TR0051.0)を検討した。回収液をSDS-PAGEで分離後、検出されたフェツインのバンドを比較した結果、条件⑤が最もよく抽出されており、回収前のフェツインとほぼ同じ濃さを示し(図8B)、タンパク質を固定化しないこと、及び抽出溶液が効果的であることが示された。また、本条件で抽出されたCy5標識フェツインについて、キモトリプシン消化を行い、LC/MSⁿで分析した結果、ゲルにアプライしなかったCy5標識フェツインの消化物のクロマトグラムと同様のパターンを示した(図9)。フェツインには、N-型糖鎖結合部位が3箇所、及びO-型糖鎖結合部位が2箇所存在するが、糖ペプチドの解析を行ったところ、N-型糖鎖結合部位のうち2箇所(Asn199, Asn256)について、糖鎖構造を解析することができた。いずれの結合部位にも、すでに報告されているような、主にコアフコースが結合していない3本鎖、及び2本鎖のコンプレックス型糖鎖が結合していた(Green, ED. et. al., *J. Biol. Chem.*, **263**, 18253)(図9)。また、これらの結果は、ゲルにアプライしなかったCy5標識フェツインの消化物のLC/MSⁿから解析された結果と一致していた。

(アクリルアミドゲルからのタンパク質の回収-2) フェツインをSDS-PAGEで分離後、マーカー、及

びフェツインの各1レーンを含むゲルを分割し、クマシー染色 (Simple Blue Stain) を行った。これを参照レーンとして、未染色のゲルより、フェツインの泳動位置に相当するゲルを切り出した (図 10A, レーン4, 破線で囲んだ部分)。図 8A の抽出条件⑤を用いて、ゲルからフェツインの振とう抽出を行った。抽出液をゲルろ過 (NAP-5, GE Healthcare) 後、SDS-PAGE で分離し、クマシー染色により検出した (図 10B)。検出されたフェツインのバンドの濃さを比較した結果、回収されたフェツインは回収前のフェツインとほぼ同様の濃さを示し、Cy-5 標識したフェツインと同様、タンパク質を固定化しないこと、及び高塩濃度の抽出溶液が効果的であることが示された。

6) 溶解性ゲルからのタンパク質回収に関する検討

BAC の溶解溶媒にホルムアミドを使用して 10% BAC-ポリアクリルアミドゲルを作成し、還元カルボキシメチル化したフェツインを泳動後、クマシー染色を行った (図 11A)。フェツインを含むゲルを切り出し、30%アセトニトリル水溶液で脱色後、フェツインを含むゲルにそれぞれ 1.25 M DTT, 又は 0.5 M TCEP を 500 μ l 加え、ゲルを粉碎した後、室温で一晩振とうした。DTT, 及び TCEP のいずれの還元剤を用いた場合も、ゲルが溶解していることが目視で確認できた。DTT, 及び TCEP で溶解したゲル溶液を Sulfo Link Coupling Resin と一晩混合し、還元によって生成したゲル内の SH 基を Sulfo Link Coupling Resin に結合させた。ゲル溶解液を回収し、凍結乾燥後、ゲルろ過を行った後、SDS-PAGE で分離し、回収度合いを確認した。その結果、DTT, 及び TCEP のいずれの還元剤を用いた場合も、SDS-PAGE 用サンプリングバッファーに溶解した回収物は粘度が高く、また、泳動は乱れ、フェツインの回収も確認できなかった (データ示さず)。回収できなかった原因としては、ゲルの溶解が完全でなかった、吸着等によって微量のフェツインが回収できなかったことが考えられた。泳動の乱れについては、ゲルの溶解物がゲルろ過で除ききれなかったためと考えられた。

強イオン交換体カラムを利用する方法では、回収

した液を SDS-PAGE で分離し、クマシー染色により検出した結果、フェツインは検出されなかった (図 11B, レーン6-8)。回収できなかった原因としては、Sulfo Link Coupling Resin と同様、ゲルの溶解が完全でなかった、吸着等によって微量のフェツインが回収できなかったこと、また、参照実験として行ったフェツイン、1 μ g についても検出されなかったことから (図 11B, レーン4)、強イオン交換体カラムの使用条件がフェツインには適していないことが考えられた。

C-2 近赤外分光法の有用性評価

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、並びに、バイオ医薬品の製造工程におけるプリオン蛋白除去能力の評価手法の最適化に資する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。

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。スクレイパーを脳内接種した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化ヘモグロビンおよび Cytochrome oxidase の変化が観察された。スクレイパ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、プリオン感染生前診断への本法の可能性が示された。また、PMCA 法により、ハムスター-263K 株、マウス Obihiro 株、マウス Chandler 株の試験管内増幅による比較を行ったところ、263K 株と Chandler 株は既存の条件 (1% TritonX-100, 4mM EDTA 含 PBS, 40 cycle) での PrP^{Sc} (蛋白質分解酵素抵抗性 PrP) の増幅が可能であったが、Obihiro 株では同条件では増幅がされなかったことから、株ごとに条件設定が必要であることが明らかになった (表 4, 図 12)。

C-3 孔径 15nm のウイルス除去膜を通過した感染性プリオンタンパク質の定量及び特性解析

粒子径を約 100nm に調整した Hamster adopted 263K 感染脳由来の MF (MF) を 15nm の平均孔径をもつフィルターでろ過したところ、ろ液中に PrP^{Res} は WB 法で認められなかった。また、ほとんどの感染性のプリオンは除去され、その除去係数 (Log reduction factor) は ≥ 4.72 と 4.00 であったが、一部は膜を通過した。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 (150,000g, 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明らかとなった。(表 5, 図 13)。

C-4 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

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} オリゴマーの供給源として、1) プリオン持続感染細胞の培養上清中に放出されるプリオン、および 2) プリオン感染脳から界面活性剤処理により抽出される画分の 2 つについて検討した。また、PrP^{Sc} を高感度に検出可能な 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。さらに、

この方法を用いて、血液凝固第 VIII 因子製剤[VIII] および人免疫グロブリン製剤[HBIG]製造工程のウイルス除去工程におけるプリオン除去のプロセスバリデーションを実施した。

1) 培養細胞上清中に放出されるプリオンの性状解析

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 14)。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 15)。総 PrP は脂質ラフトのマーカである 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 14)。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 16)。

2) PMCA を用いたプリオン除去のプロセスバリデーションの検討

1%SUS 処理後の 263K 株感染ハムスター脳乳剤をプラノバ 35N で濾過した画分(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(表 6, 図 17)。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 サイクルの PMCA を実施することで、 10^5 – 10^6 のレンジのプロセスバリエ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。

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 7)。

スパイク用試料を添加した濾過前後の FVIII 溶液を 10 倍段階希釈して PMCA を行い、PrP^{Sc}の PMCA 力価を算出したところ、濾過前の試料の総 PMCA 力価は $10.6\text{Log}(\text{PMCA}_{50})$ であったが、濾過後の試料からは PrP^{Sc}は増幅されなかったことから、PrP^{Sc}の PMCA 力価は $<5.3\text{Log}(\text{PMCA}_{50})$ と推定された。従って PrP^{Sc}の減少率は >5.3 であった(表 8)。

同様にスパイク用試料を添加した濾過前後の HBIG 溶液を 10 倍段階希釈して PMCA を行い、PrP^{Sc}の PMCA 力価を算出したところ、濾過前の試料は $10.4\text{Log}(\text{PMCA}_{50})$ であったが、濾過後の試料からは、 10^{-4} 希釈まで PrP^{Sc}が増幅されたことから、PrP^{Sc}の PMCA 力価は $8.9\text{Log}(\text{PMCA}_{50})$ と推定された。従って PrP^{Sc}の減少率は 1.5 と推定された(表 9)。

C-5 PrPSV の組換え体発現系の構築と特異抗体の調製並びにヒツジ PrPSV mRNA の解析

人のプリオン病には硬膜移植等によって発症した感染性 CJD, プリオン蛋白質遺伝子(*PRNP*)にコードされた 253 残基のアミノ酸に変異がある遺伝型 CJD 及び *PRNP* に変異のない散発型 CJD が知られ、約 85-90% を散発性 CJD が占めている。一方、1996 年に英国で発症が確認された変異型 CJD は、従来の

散発型 CJD とは異なって若年性の患者で発症し、異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の生化学的研究及び英国で多発していた牛海綿状脳症(BSE)に関する疫学研究から、ウシ PrP^{Sc}の人への伝達によって発症すると考えられている。また、輸血によって変異型 CJD を発症したと推定される症例が 4 件報告されており、血液を介した CJD の伝達が注目を集めている。遺伝子組換え医薬品等の製造工程ではウシ胎児血清を用いた細胞培養を行うものが多く、医薬品に PrP^{Sc}が混入するおそれから、ウシ由来原材料中の PrP^{Sc}測定法の確立が望まれている。

先の厚生労働科学研究費補助金で、遺伝子組換え医薬品等の製造原材料の品質確保および種々の製造工程の安全性評価を目的とし、PrP^{Sc}の検出法の開発に資する基礎研究として、PrP^{Sc}を高発現しているヒトグリオプラストーマ細胞株 T98G を対象とした研究を行ってきた。T98G 細胞は継代を重ねた後の長期間培養で、プリオン蛋白質(PrP)の C 末端と GPI アンカーシグナル配列が欠落したスプライス変異型 PrP mRNA の発現することを確認し、その C 末端部位を認識するモノクローナル抗体 HPSV178 を用いてスプライス変異型 GPI 欠損プリオン蛋白質(GPI-PrPSV)を同定した[Kikuchi *et al.*, *FEBS J.* 275: 2995-2976 (2008)]。

以上の知見をもとに、本研究では異常型プリオン蛋白質の新規検出法の開発に資する研究として PrP^{Sc}易伝達性細胞を用いた検出法の確立を目的としたウシ PrP 高発現培養細胞株の樹立、ウシスプライス変異型 PrP (PrPSV) mRNA の探索、ウシ血液から PrPSV mRNA の検出、大腸菌によるウシ PrPSV の産生、抗ウシ PrPSV モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ樹立およびヒツジ PrPSV mRNA の探索を行った。

1. ウシ PrP 産生細胞株の樹立

レトロウイルスベクターを用い、プリオンノックアウトマウス(*prnp* -/-)脳由来の PrP 欠損細胞株 HpL3-4 にウシ PrP 遺伝子の ORF を導入し、イムノブロット法で BoPrP の産生を調べた(図 18)。親株の HpL3-4 細胞(lane 1)及びレトロウイルスベクター

pBMM-I-GFPを導入した細胞(lane 2)から調製した全細胞溶解液では、6H4抗体が認識するバンドは検出されなかった。一方、ウシPrP遺伝子のORFを導入した細胞から調製した全細胞溶解液では、6H4が認識する35及び31 kDaのバンドを示した(lane 3)。数回の継代後にもBoPrPの産生を確認し、樹立したBoPrP産生細胞株として凍結保存した。

2. スプライス変異型プリオン蛋白質mRNAの解析

ウシPrP mRNAの発現様式を調べるため、長期間培養したウシ角膜細胞株BCE C/D-1bから調製したtotal RNAを鋳型として、RT-PCRを行った。13回の継代後に40日間培養したBCE C/E-1b細胞(P13D40)のtotal RNAから合成したfs-cDNAを鋳型としたRT-PCRでは、1,347 bpのバンドのほかに、産生量は少ないが836 bpのバンドを検出した(図19A, lane 3)。それぞれのバンドをゲルから切り出して塩基配列を解析したところ、1,347 bpの塩基配列はORFを含むウシPrPエクソン3をコードし、836 bpの塩基配列ではBoPrPのC末端に位置するGPIアンカーシグナル配列を含む511 bpが欠落していた(図19B)。同時に調製したBCE C/E-1b細胞(P13D40)のゲノムDNAを鋳型としたPCRでは1,347 bpのバンドが検出され、その塩基配列はtotal RNA由来の1,347 bpのバンドと一致したが、836 bpのバンドは検出されなかった(図19A, lane 7)。以上の結果から、BCE C/D-1b細胞はウシPrPエクソン3のスプライス変異によってPrPSV mRNAを発現することが示唆された。ウシPrPSV mRNAの発現は培養細胞で特異的なものではなく、同様の実験を市販のウシ正常脳から調製したtotal RNA (Zyagen Laboratories)を用いて行い、その発現を確認した。

次に、ヒツジPrP mRNAの発現様式を調べるため、市販のヒツジ脳から調製したtotal RNA (Zyagen Laboratories)から合成したfs-cDNAを鋳型としたRT-PCRを行った。cDNAを測定したRT-PCR法では、PrPに相当する1,323 bpと886 bpのバンドの他に、発現量は少ないが375 bpのバンドを検出した(図20A, lanes 1 and 2)。それぞれのバンドをゲルから

切り出して塩基配列を解析したところ、1,323 bpの塩基配列はORFを含むヒツジPRNP遺伝子エクソン3をコードし、886 bpの塩基配列ではPrPのC末端に位置するGPIアンカーシグナル配列を含む511 bpが欠落していた(図20C)。一方、ヒツジ骨格筋から調製したゲノムDNAを測定したPCR法では全長1,323 bpのPrPに相当するバンドを示し(図20A, lane 4)、その塩基配列はtotal RNA由来の1,323 bpのバンドと一致したが、886 bpのバンドは検出されなかった(図20A, lane 5)。以上の結果から、ヒツジ脳ではPRNP遺伝子エクソン3のスプライス変異型mRNAを発現することが示唆された。エクソン結合部位に結合するプライマー(exon-exon junction primer)を設計し、スプライス変異型PrPのmRNAを特異的に検出するRT-PCRを構築した。スプライシングで欠落する部位(511 bp)を挟み、その両端の配列を結合させたプライマーを用いたPCRは、fs-cDNAに130及び716 bpのバンドを示したが(図20B, lanes 9-10)、genomic DNAではバンドが検出されなかった(図20B, lanes 13-14)。また、切り出した130及び716 bpのバンドの塩基配列は、エクソン3のそれぞれ641及び1,227 bpに相当する部位から511 bpの配列が欠失したものと一致した。

次に、長期間培養したヒツジ胎児脳由来細胞株OA1からtotal RNA及びゲノムDNAを調製し、同様の実験を行った。5回の継代後に40日間培養したOA1細胞(P5D40)のtotal RNAから合成したfs-cDNAを鋳型としたRT-PCRでは、130及び716 bpのバンドを示したが(図20B, lanes 1-2)、ゲノムDNAではバンドが検出されなかった(図20B, lane 5-6)。

以上の結果から、設計したexon-exon junction primerはエクソン結合部位と結合し、構築したRT-PCRでスプライス変異型PrPのmRNAを特異的に検出可能なことが示された。

3. ウシ血液中からPrPSV mRNAの検出

ウシ血液からtotal RNAを調製し、exon-exon junction primerを用いたRT-PCR法でPrPSV mRNAの産生を調べた。RNA later中で長期間保存していたウシ血液の白血球を含む画分からvanadyl ribonucleoside complexを用いてtotal RNAを調製

し、同じ画分から定法にしたがってゲノムDNAを調製した。PrP全長を検出するプライマー(BoE3U1/BoE3L7)ではゲノムDNA及びtotal RNAから調製したcDNAでは1,347 bpのバンドを示し(Fig. 4, lanes 3 and 7), コントロールとして用いたPrPSV遺伝子を含むプラスミドでは511 bpを欠失した836 bpのバンドが検出された(図21, lane 11)。

PrPSVを特異的に検出する exon-exon junction primer (BoE3SV5/BoE3L4)ではプラスミドと同様な130 bpのバンドがわずかながらcDNAで検出された(図21, lanes 5 and 9), ゲノムDNAでは検出されなかった(図21, lane 1)。しかし、744 bpのバンドを検出する exon-exon junction primer (BoE3U1/BoE3SV6)では、cDNAでバンドは検出されなかった(図21, lanes 6 and 10)。

4. 抗ウシPrPSVモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

先に確認したウシPrPSVのORFは260アミノ酸をコードし、1-240残基まではPrPと同じ一次構造を有している。PrPSVの蛋白質発現を確認するため、C末端に相当するペプチドに対するマウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立を行った。ウシPrPSVの241-260残基に相当するペプチドでマウスを免疫し、脾細胞からハイブリドーマ2株を樹立した。産生するIgMクラスの抗体はELISAで固相抗原のペプチドを認識した。しかし、ハイブリドーマのクローニングを数回繰り返しても、それらの特異性は低く、十分な反応性を有する抗体は得られなかった。

次に、ウシPrPSV組換え蛋白質でマウスを免疫し、固相抗原としてウシPrPSVの241-260残基に相当するペプチド及びウシPrPSV組換え蛋白質を用いたELISAで抗体価を測定した。5回免疫後のマウスの抗血清は、免疫原のrBoPrPSVに対して高い抗体価を示した(図22a)。抗血清中には免疫原のrBoPrPSVのC末端を特異的に認識する抗体も存在し、固相抗原のBoPrPSV (241-260)-OVAにも弱いながら反応性を示した(図22a)。そこで、このマウスから脾臓を摘出し、細胞融合を行った。固相抗原として

BoPrPSV (241-260)-OVAを用いたELISAで培養上清を測定し、BoPrPSVのC末端を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ1株を樹立した。ハイブリドーマが産生する抗体(BPSV7)はIgMクラスの抗体で、rBoPrPSVとBoPrPSV (241-260)-OVAを同様に認識した(図22b)。

5. イムノプロット法によるウシPrPSV組換え蛋白質の検出

大腸菌の蛋白質発現系を用い、導入したウシPrP及びPrPSV組換え蛋白質を調製し、イムノプロット法で抗体の反応性を調べた。細胞融合に用いたマウス由来抗血清は、免疫原中に含まれるrBoPrPSV以外の菌体由来蛋白質に対する反応性を示した(図23, middle panel, lanes 1-3)。抗PrPモノクローナル抗体6H4は、ウシPrP遺伝子を導入した全細胞溶解液の31 kDa付近にバンドを検出した(図23, upper panel, lane 2)。同様に、ウシPrPSV遺伝子を導入した全細胞溶解液でバンドを検出した(Fig. 6, upper panel, lane 3)が、プラスミドのみを導入した全細胞溶解液ではバンドが検出されなかった(図23, upper panel, lane 1)。構築した発現系では、6H4抗体が認識するPrPSVを産生することが確認された。しかし、抗ウシPrPSVモノクローナル抗体BPSV6は、実験に用いたハイブリドーマの培養上清中の抗体濃度では、PrPSV組換え蛋白質を認識しなかった(図23, lower panel, lane 3)。

D. 考察

D-1 PrP構造特性解析のためのPrP^C分画法の検討

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、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。また、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。

そこで、電気泳動で分離されたタンパク質について、ゲル内消化及び PVDF 膜消化によってペプチドを、あるいはゲルから糖タンパク質を高収率で回収する方法を検討した。ペプチドの回収に関しては、ゲル内消化後、ゲルを粉碎し、超音波抽出する方法を検討したが、回収率は高くなかった。また、アクリルアミドゲルから糖タンパク質を固定化せずに、高塩濃度溶液で抽出することによって、高収率で回収できることが判った。

D-2 近赤外分光法の有用性評価

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、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エ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。

D-3 孔径 15nm のウイルス除去膜を通過した感染性プリオンタンパク質の定量及び特性解析

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、そのプリオン因子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際に留意点する必要があることを提議しており、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しており、製造工程の PrP^{Sc} 除去/不活性化評価法の標準化および高度化のために留意すべき重要なポイントが明らかになった。

また、動物を用いないプリオン検出系として、広範なプリオン株に適応可能な PMCA 条件の構築が必要であることも示唆された。

D-4 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

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。その一部は 200 nm を通過する比較的小きな粒子径であったが、その量は少ないことから、プロセスバリデーションのスパイク用試料として利用することは難しいと考えられた。

一方、プリオン感染ハムスター脳を 1% SUS で処理した試料を用いることで、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になる。

このスパイク用試料を用いてFVIII製造工程およびHBIG製造工程のウイルス除去行程をモデルとして、プリオン除去効率を検討した。その結果、プリオンの減少率はFVIII製造工程では>5.3、HBIG製造工程では1.5と推定された。FVIII製造工程のモデルとしてプラノバ20Nを用いたが、スパイク試料中のSUS濃度が低下すると、試料中のプリオンはプラノバ15Nや20Nなど濾過サイズの小さい膜を通過しなくなる傾向があることから、異なる溶媒中でのプリオンの存在状態など、より詳細にスパイク試料中のプリオンの生化学的および物理学的性状を検討して、プロセスバリデーションの評価結果に反映させる必要がある。

D-5 PrPSVの組換え体発現系の構築と特異抗体の調製並びにヒツジPrPSV mRNAの解析

プリオン病の検出法には、試料をマウス脳内に接種してプリオン病の発病を観察するバイオアッセイ、脳や脾臓の病理切片を用いた免疫染色法、脳乳液を試料としたイムノプロット法やELISA等がある。また、周期的に超音波処理をくり返すprotein misfolding cyclic amplification (PMCA)により、試料中の異常プリオン蛋白質を増幅して検出感度を向上させる試みがなされている。しかし、最も高感度な測定法は発症やPrP^{Sc}の蓄積を検出するバイオアッセイで、検出には数か月間を要している。本研究では異常プリオン蛋白質の新規検出法の確立を目的とし、プリオン病のスクリーニングに利用されているELISAの改良、新たなバイオアッセイ系に用いるPrP^{Sc}易感染細胞株の樹立、プリオン病の新たな代理バイオマーカー(sarrogate marker)の検索を行った。

プリオン病のバイオアッセイにはマウスやハムスターへの脳内接種が用いられているが、発病までに長期間を要することから、培養細胞へPrP^{Sc}を伝達す

る迅速化が試みられている。PrP^{Sc}を持続的に維持する培養細胞はScN2a等があり、主にマウス神経系の細胞が利用されている。しかし、プリオン病には動物種のバリアが存在し、動物種が異なる脳乳液を接種したマウスでは発病が遅れる例が知られている。本研究ではウシ異常プリオン蛋白質の検出を行うことから、バイオアッセイにウシ型のPrPを発現する細胞の樹立を目的として、プリオン欠損マウス由来細胞株HpL3-4でウシPrP遺伝子の導入を試みた(Fig. 21)。また、安定した発現細胞を得るために、導入には持続的に蛋白質を発現させるレトロウイルスベクターを用いた。樹立した細胞株は6H4抗体が認識するウシ型のPrPを発現し、その発現は数回の継代後も維持されていた。今後は、この細胞株を用いたPrP^{Sc}の伝達実験を予定している。

プリオン病の診断には、脳内のPrP^{Sc}を直接測定する代わりに、罹患状態で特異的に増減するバイオマーカーを検出して生前診断に利用する試みとして、脳脊髄液中の14-3-3蛋白質の7種類アイソフォームやtau蛋白質の測定や、血液又は尿中の蛋白質の検索が行われている。しかし、これらは代理マーカーで、すべてのプリオン病で共通の指標にするには注意が必要である。先の厚生労働科学研究費補助金で、我々は培養細胞及びヒト各種臓器由来のtotal RNA中でスプライス変異型PrP mRNAを検出し、抗体によりヒト培養細胞中でPrPSVの産生を確認した[Kikuchi *et al.*, *FEBS J.* 275: 2995-2976 (2008)]。ヒトPrPSVはGPI欠損型のPrPで、細胞外への放出が予想される。従来より、PrP遺伝子のORFにはスプライス変異はないとされていたが、本研究でウシ及びヒツジのprnpエクソン3にスプライス変異が存在し、GPIアンカーシグナルペプチドが欠損しているPrPSV mRNAを発現していることを始めて明らかにした。そこで、プリオン病のバイオマーカーとしてスプライス変異型PrPを利用することを目的とし、ウシ培養細胞から調製したtotal RNAを用いて検索を行った。ヒトPrPSVの検索と同様の手法を用い、ウシ角膜細胞株BCE C/D-1bからスプライス変異型PrP mRNAを同定し、その塩基配列から蛋白質のアミノ酸配列を推定した(Fig. 22B)。ウシPrPは