

264残基のアミノ酸配列を有し、242-264残基はGPIアンカーシグナル配列と推定され、241残基のAlaを介して細胞膜上に結合している。一方、ウシPrPSV mRNAから推定されるアミノ酸配列は260残基からなり、1-240残基はPrPと共通だが、241-260残基は異なったアミノ酸配列を有している。予想されるウシPrPSVの構造は、ヒトと同様にそのC末端がPrPと異なっている。現在、241-260残基のアミノ酸を認識する抗体の作製を進めている。

ウシと同じ反芻動物のヒツジ脳及びヒツジ培養細胞を対象とし、その発現を確認した。ヒツジに自然発症するプリオン病としクレイパーが知られており、日本国内でも数例の発症が報告されている。ウシのプリオン病であるBSEは、スクレイパーに罹患したヒツジから動物性飼料を通じて伝達された可能性も指摘されており、スクレイパーの研究も精力的に行われている。最近、スクレイパー又はBSEに罹患したヒツジの血液を輸血した研究から、43%の確率でスクレイパーが、36%の確率でBSEがそれぞれ伝達されることが報告され、その高い確率から変異型CJD伝達のモデル動物としてヒツジが利用できる可能性が指摘された[Houston *et al.*, *Blood* 112: 4739-4745 (2008)]. ヒツジを輸血によるCJDやBSEの伝達実験のモデル動物として利用が可能であれば、本研究で報告したexon-exon junction primerを用いたRT-PCR法によるPrPSV mRNAの測定を通じて、それらのバイオマーカーとしての可能性の検証が期待される。

ヒツジ胎児脳由来細胞株OA1のmRNAを解析し、PrP (ARQ/ARR)及びPrPSV (ARQ/ARR)遺伝子を発現していることを明らかにした。ヒツジのスクレイパーに対する感受性は主にPrP遺伝子(*prnp*)のコードン136, 154及び171の多型により制御され、V136R154Q171/VRQ, ARQ/VRQ及びARQ/ARQの遺伝子を持つヒツジがスクレイパーに最も感受性が高く、ARQ/ARRの感受性は中程度とされている。OA1はARQ/ARRのヘテロ接合 $prnp$ のヒツジ由来の培養細胞で、スクレイパー易感染培養細胞としての利用できる可能性があり、PrPSVのスクレイパー感染に対する関与の解明に利用が期待される。

プリオン病のバイオマーカーとしてPrPSVを利用することを目的とし、PrPSV mRNAを特異的に検出するexon-exon junction primerを用いたRT-PCR法で血液中の白血球由来total RNAを測定した。測定にはRNAlaterで長期間保存していたウシ血液を検体として用いたところ、わずかながらPrPSV mRNAの発現を確認した。しかし、同じ試料を用いて行った定量RT-PCRでは、その発現量は検出感度以下であった。一般にRNAlater中では、-20°C以下ではRNAは半永久的に安定とされているが、今回用いた試料からは質の良いRNAを得ることができず、定性はできたものの、定量値を出すことができなかった。

今後は、新鮮なウシ血液の測定やバフィーコートによる白血球画分の調製を試みて正常なウシ血中を用いたPrPSV mRNAの定量法を確立した上で、プリオン病罹患牛への適応を考えている。

ヒトPrPSVを認識するモノクローナル抗体作製と同様な手法を用いてウシPrPSVを認識する抗ペプチド抗体の作製を試みた。合計63匹のマウスをBoPrPSV (241-260)-BSAで免疫し、抗体価が上昇したマウスから脾臓を摘出し、8回の細胞融合を行い、IgMクラスの抗体を産生するハイブリドーマを2株を樹立した。しかし、産生する抗体の特異性は低かった。そこで、新たに大腸菌の菌体から粗精製したBoPrPSV組換え蛋白質で21匹のマウスを免疫し、固相抗原としてBoPrPSV (241-260)-OVAを用いたELISAでスクリーニングを行った (Fig. 23)。粗精製した免疫原は大腸菌由来の蛋白質を含んでいたが、固相抗原にPrPSVの特異的なC末端ペプチドを用いたELISAで血清中の抗体価が高いマウスを選択し、細胞融合後、BoPrPSV (241-260)及びPrPSV組換え蛋白質を同様に認識するIgMクラスの特異抗体BPSV6を産生するハイブリドーマを樹立した。この抗体を用いてイムノプロット法を行ったが、今回の実験に用いた抗体の濃度ではrBoPrPSVの検出できなかった。マウス抗血清中の特異抗体はIgG ( $\gamma$ 2a,  $\lambda$ )で、細胞融合に十分な抗体価を有していた。先に樹立したヒトPrPSVのC末端を認識するHPSV178はIgGクラスの抗体で、イムノプロット法でヒト培養

細胞全抽出液中のPrPSVを検出可能であった。同様の手法でウシPrPSV検出法の開発を試みたが、合計84匹のマウスを免疫し、9回の細胞融合を行ったが、IgGクラスの特異抗体を産生するハイブリドーマは樹立できなかつた。今後はIgGクラスの特異抗体を産生するハイブリドーマを樹立するために、ウシPrPSV組換え蛋白質を大量に調製して高度に精製した免疫原の確保し、マウスの他にもニワトリを免疫し、脾細胞を用いてハイブリドーマの樹立およびファージディスプレイ法による特異抗体の調製を予定している。

今後はスクレイピーのマウス脳内投与による伝達実験を行い、感染へのPrPSVの関与、スクレイピー感染脳を抗原としたニワトリへの免疫による異常プリオン蛋白質特異的ニワトリ抗体の調製を予定している。

## E. 結論

- 1) PrP<sup>Sc</sup> 選択的検出法の開発を目的とした PrP<sup>C</sup> 及び PrP<sup>Sc</sup> の部位特異的糖鎖及び GPI アンカーの糖鎖構造解析の一環として、これまで単離が難しかった PrP を濃縮する方法を検討した。その結果、ハムスター脳に存在する PrP<sup>C</sup> は、界面活性剤 Octyl  $\beta$ -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により、濃縮されること。また、SDS-PAGE で分離された糖タンパク質は、ゲルを固定化せずに、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。
- 2) 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明らかになった。更に、PMCA 法による異常型プリオンの増幅条件はプリオン株ごとに最適化する必要があることが示唆された。
- 3) ウイルス除去膜などバイオ医薬品の製造工程によるプリオン除去能の評価に MF 等を使用するには、スパイク材料の調製法としての超音波処理や界面活性剤処理は有効であるが、サンプル調製に超遠心操作を導入するには留意する必要がある。また、平均孔径 15nm のウイルス

ろ過膜は感染性プリオン因子が漏出するものの、4 Log 以上の除去能を有し、効果的な除去手段であった。

- 4) 本研究では、プリオン感染ハムスター脳から調整した粒子径 35 nm 以下の PrP<sup>Sc</sup> 画分をスパイク試料とした、プリオン除去のプロセスバリデーションが実施可能であることを示した。異なる溶液中での PrP<sup>Sc</sup> の存在状態、膜への非特異的吸着等より詳細な検討は必要であるが、本研究で使用したスパイク試料を用いることで、より厳密なプリオン除去のプロセスバリデーションの実施が可能になると考えられる。
- 5) 従来、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。本研究ではウシ PrP<sup>Sc</sup> の新規検出法確立を目的とし、それらに資する基礎研究としてウシ PrPSV 組換え蛋白質発現系の構築、ウシ PrPSV 特異抗体の調製、PrPSV mRNA を検出する RT-PCR の確立、ヒツジ胎児脳由来細胞株 OA1 が発現する PrPSV mRNA の解析を行った。これらの結果は、新たな PrP<sup>Sc</sup> バイオアッセイ系の構築、プリオン病のバイオマーカー測定法開発への寄与が期待できる。今後はウシ PrPSV の産生を確認し、プリオン病のバイオマーカーとしての利用の可能性を調べる予定である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 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. 1419-1430 (2009)
- 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
  - 4) 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
  - 5) 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.
  - 6) 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
  - 7) 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*
  - 8) 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
  - 9) Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Kanai Y, Nishida A, Yoshikawa M, Ohkubo Y, Kawabata Y, Hagiwara K, Ikuta K. Infectious prion protein in the filtrate even after 15nm filtration. *Biologicals.* In press.
  - 10) Hirata Y, Ito H, Furuta T, Ikuta K, Sakudo A. Degradation and destabilization of abnormal prion protein using alkaline detergents and proteases. *Int J Mol Med.* 25, 267-270, 2010.
  - 11) Sakudo A, Ikuta K. Fundamentals of prion diseases and their involvement in the loss of function of cellular prion protein. *Protein Pept Lett.* 16, 217-229, 2009.
  - 12) Sakudo A, Ikuta K. Prion protein functions and dysfunction in prion diseases. *Curr Med Chem.* 16, 380-389, 2009.
  - 13) Nishimura T, Sakudo A, Xue G, Ikuta K, Yukawa M, Sugiura K, Onodera T. Establishment of a new glial cell line from hippocampus of prion protein gene-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 377, 1047-1050, 2008.
  - 14) 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* 365, 164-169, 2008.
  - 15) Sakudo A, Taniuchi Y, Kobayashi T, Onodera T, Ikuta K, Normal cytochrome c oxidase activity in prion protein gene-deficient mice, *Protein Peptide Lett* 15, 250-254, 2008.
  - 16) 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, 217-222, 2008.
- 17) Sakudo A, Onodera T, Ikuta K, PrP<sup>Sc</sup> level and incubation time in a transgenic mouse model expressing Borna disease virus phosphoprotein after intracerebral prion infection, *Neurosci Lett* 431, 81-85, 2008.
  - 18) 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.
  - 19) 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.
  - 20) 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.
  - 21) 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.
  - 22) 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.
  - 23) 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.
  - 24) 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 IIME*. 2007; 2, 8-18
  - 25) Sakudo A, Onodera T, Ikuta K. Prion protein gene-deficient cell lines: Powerful tools for prion biology (Review) *Microbiol Immunol*. 2007; 51, 1-13.
  - 26) Horiuchi, M. Characterization of prion susceptibility in Neuro2a mouse neuroblastoma cell subclones. *Microbiol. Immunol.*, 51: 661-667, 2007.
  - 27) 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.
  - 28) 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.
  - 29) 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.
  - 30) Song C-H, Furuoka H, Kim C-L, Ogino M, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi, M. Intraventricular infusion of anti-PrP mAb antagonized PrP<sup>Sc</sup> accumulation and delayed disease progression in prion-infected mice. *J. Gen. Virol*. 2008; 89:1533-1544.
  - 31) Muramatsu Y, Sakemi Y, Horiuchi M, Ogawa T, Suzuki K, Kanameda M, Tran Thi Hanh TT, and Tamura Y. Frequencies of PRNP gene polymorphisms in Vietnamese dairy cattle for potential association with BSE. *Zoonoses Public Health*. 2008; 55; 267-273.
  - 32) Takada N, Horiuchi M, Sata T, and Sawada Y.

- Evaluation of methods for removing central nervous system tissue contamination from the surface of beef carcasses after splitting. *J. Vet. Med. Sci.* 2008; 70; 1225-1230.
- 33) Watanabe K, Tachibana M, Tanaka S, Furuoka H, Horiuchi M, Suzuki H, and Watarai M. Heat shock cognate protein 70 contribute Brucella invasion into trophoblast giant cells that cause infectious abortion. *BMC Microbiol.* 2008; 8; 212.
- 34) 堀内 基広. プリオンの増殖とその抑制. ウイルス感染症セミナー. 2008;10;13-25.
- 35) Shindoh R, Kim C-L, Song C-H, Hasebe R, Horiuchi M. The region approximately between amino acids 81 and 137 of proteinase K-resistant PrP<sup>Sc</sup> is critical for the infectivity of the Chandler prion strain. *J Virol.* 2009; 83; 3852-3860.
- 36) Song C-H, Honmou O, Nakamura K, Hamada H, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Effect of transplantation of immortalized human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions 2009; 83; 5918-5927.
- 37) Horiuchi M, Karino A, Fu J, Furuoka H, Ishiguro N, Kimura K, Shinagawa M. Generation of monoclonal antibody that distinguishes PrP<sup>Sc</sup> from PrP<sup>C</sup> and neutralizes prion infectivity. *Virology.* 2009; 394; 200-207.
- 38) Nakamitsu S, Kurokawa A, Yamasaki T, Uryu M, Hasebe R, Horiuchi M. Cell-density dependent increase of the amount of protease-resistant PrP in prion-infected Neuro2a mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol.* 2010; 91; 563-569.
- 39) Sakata, H., Horiuchi, M., Takahashi, I., and Kinjo, M. Conformational Analysis of Soluble Oligomers of GFP Tagged Prion Protein by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 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/MS<sup>n</sup> 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)
- 4) 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
- 5) 橋井則貴, 川崎ナナ, 中島 紫, 伊藤さつき, 山口照英: d<sub>5</sub>-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
- 6) 作道章一, 阿野泰久, 小林孝徳, 小野寺節, 生田和良. 可視・近赤外分光法によるマウススクレイパー感染病態解析, 第 146 回日本獣医学会学術集会, 2008 年 9 月, 宮崎
- 7) 田中宏幸, 浦山健, 大久保祐士, 柚木幹弘, 金井祐太, 萩原克郎, 生田和良. 感染性プリオン蛋白は孔径 15nm のウイルス除去膜を有価する. 第 56 回ウイルス学会. 2008 年, 岡山.
- 8) 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
- 9) Guoying Wu, Akikazu Sakudo, Keiichi Saeki, Kazuyoshi Ikuta, Takashi Onodera. Detection of PrP from murine Pmp-deficient neuronal cell line, transfected with hamster Pmp 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

- 10) 作道章一, 計屋由紀子, 小林孝徳, 上田眞世, 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54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
- 11) 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
- 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<sup>Sc</sup>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)
- 9) Song C-H, Honmou O, Furuoka H, Hasebe R, and Horiuchi M. Migration of mesenchymal stem cells to brain lesions of prion disease. Prion2008 (Sept. 26-28, 2008, Madrid, Spain)
- 10) Furuoka H, Horiuchi M, and Sata T. Pathology in guinea pig infected with bovine spongiform encephalopathy. Prion2008 (Sept. 26-28, 2008, Madrid, Spain)
- 11) Shindo R, Kim C-L, Song C-H Hasebe R., and Horiuchi M. Conformational stability and infectivity of protease-resistant prion protein derived from the Chandler strain. Prion2008 (Sept. 26-28, 2008, Madrid, Spain)
- 12) Yamasaki T, Uryu M, Nakamitsu S, and Horiuchi M. Localization of disease-specific prion protein in prion-infected cells. Asian-African Research forum on Emergig and Reemerging Infection. (Dec. 15-16, 2008, Sapporo, Japan)
- 13) Horiuchi M and Yamazaki T. Intracellular Localization of Disease-Specific Prion Protein. Symposium on emerging and reemerging infectious diseases (Feb. 17, 2009, Yokyo)
- 14) 前野英毅, 村井活史, 武田芳於, 鬼塚剛志, 脇坂明美, 沼田芳彰, 堀内基広. ウイルス除去膜濾過による異常型プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)の除去. プリオン研究会 2008 (2008年8月29-30日, 新得)
- 15) 宋昌鉉, 本望修, 古岡秀文, 長谷部理絵, 堀内基広. プリオン感染マウス脳における骨髄由来間葉系幹細胞の動態. プリオン研究会 2008 (2008年8月29-30日, 新得)
- 16) 山崎剛士, 瓜生匡秀, 中満智史, 堀内基広. 間接蛍光抗体法によるプリオン持続感染細胞に存在する PrP<sup>Sc</sup> の検出. プリオン研究会 2008 (2008年8月29-30日, 新得)
- 17) 鈴木章夫, 山崎剛士, 堀内基広 PrP-Fc 融合蛋白質と PrP<sup>Sc</sup> の結合条件の検討. プリオン研究会 2008 (2008年8月29-30日, 新得)
- 18) 堀内 基広, 瓜生 匡秀, 山崎 剛士, 中満智史, 長谷部 理絵. マウス神経芽腫細胞

- Neuro2a におけるプリオンの細胞間伝播にはエクソソーム以外の因子が関与する. 第146回日本獣医学会 (2008年9月24-26日, 宮崎)
- 19) 宋昌鉉, 長谷部理絵, 堀内基広. プリオン感染マウス脳における骨髄由来間葉系幹細胞の動態. 第56回日本ウイルス学会 (2008年10月26-28日, 岡山)
- 20) 山崎剛士, 瓜生匡秀, 中満智史, 堀内基広. 間接蛍光抗体法によるプリオン持続感染細胞に存在する PrPSc の検出. 第56回日本ウイルス学会 (2008年10月26-28日, 岡山)
- 21) 堀内基広, 長谷部理絵. PrPSc の aa 81 - aa 137 の領域はプリオンの感染性に必須である. 第56回日本ウイルス学会 (2008年10月26-28日, 岡山)
- 22) Song C-H, Honmou O, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Identification of chemotactic factors for migration of mesenchymal stem cell to brain lesions of mice infected with prions. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
- 23) Yamasaki T, Nakamitsu S, Suzuki A, Horiuchi M. Recycling of PrPSc via retrograde transport pathway from endosome to TGN in Neuro2a mouse neuroblastoma cells. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
- 24) Sakata H, Horiuchi M, Kinjo M. Characterization of soluble oligomers of prion protein by fluorescence correlation spectroscopy. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
- 25) Sassa, Y., Yamasaki, T., Horiuchi, M., Inoshima, Y., and Ishiguro, N. PrPSc degradation pathway in macrophages. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
- 26) Horiuchi, M. Intracellular localization of abnormal isoform of prion protein. "Prion and Virus Infections" BSJ & ABA Joint Symposium, Tokushima, Japan, Oct. 30, 2009.
- 27) 中満智史, 黒川彩, 山崎剛士, 瓜生匡秀, 長谷部理絵, 堀内基広. プリオン持続感染細胞における蛋白質分解酵素抵抗性 PrP の量的変動に関与する因子の解析. プリオン研究会 2009. 蔵王. 2009年8月29-30日
- 28) 坂田啓司, 堀内基広, 高橋泉, 金城政孝. 蛍光相関分光法による可溶性 PrP オリゴマー形成過程の解析. プリオン研究会 2009. 蔵王. 2009年8月29-30日
- 29) 酒井景子, 長谷部理絵, 宋昌鉉, 堀内基広. Cd14 分子のプリオン病病態への関与. 第57回日本ウイルス学会. 東京. 2009年10月25-27日
- 30) 山崎剛士, 中満智史, 鈴木章夫, 堀内基広. クラスリン被覆構造は PrPSc のトランスゴルジネットワークへの輸送に関与する. 第57回日本ウイルス学会. 東京. 2009年10月25-27日
- 31) 宋昌鉉, 長谷部理絵, 堀内基広. 骨髄由来間葉系幹細胞のプリオン感染脳病変への走化に関与する因子の解析. 第57回日本ウイルス学会. 東京. 2009年10月25-27日
- 32) 大澤夏生, 宋昌鉉, 鈴木章夫, 堀内基広. 抗 PrP 抗体の末梢投与によるプリオン病の治療効果. 第57回日本ウイルス学会. 東京. 2009年10月25-27日
- 33) 堀内基広. 異常型プリオン蛋白の細胞内局在. 大阪大学蛋白質研究所セミナー2009「蛋白質立体構造を基盤とするプリオン現象の解明と制御」. 大阪. 2009年7月13-14日
- 34) 堀内基広. 遺伝子を持たないプリオンは変異し得るか? 第12回日本進化学会. 札幌. 2009年9月2-4日

#### 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

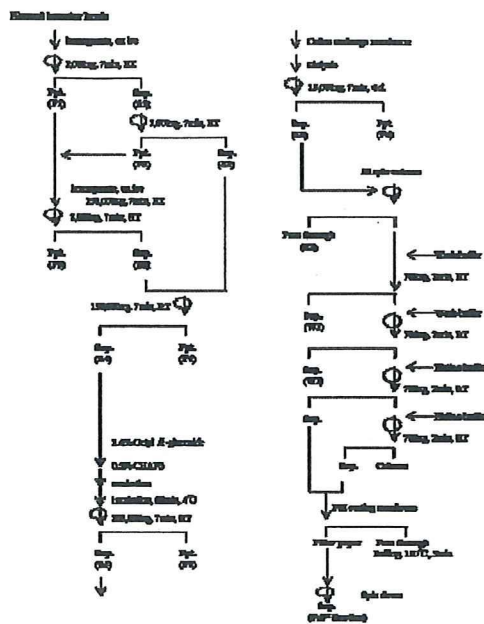
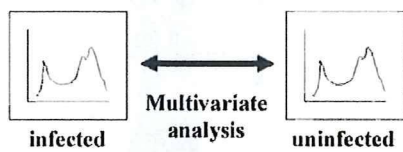


図 1. ハムスター脳からの PrP<sup>C</sup> の精製方法

NIRS for diagnosis of infectious diseases



NIRS (head)



NIRS (abdomen)

図 2



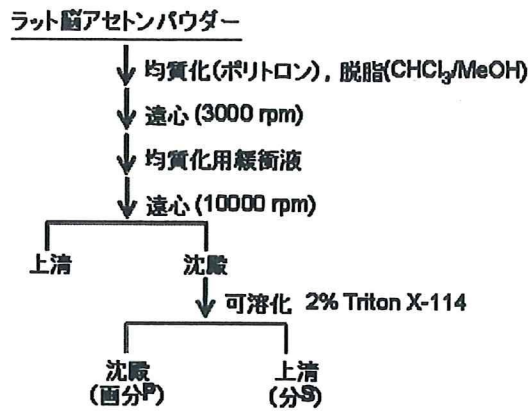


図 3. ラット脳の分画

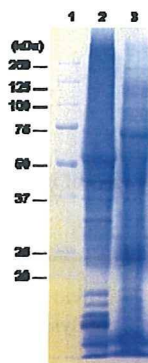


図 4. ラット脳の各画分の SDS-PAGE

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : 画分 P (1/1000)

レーン 3 : 画分 S (4/100)

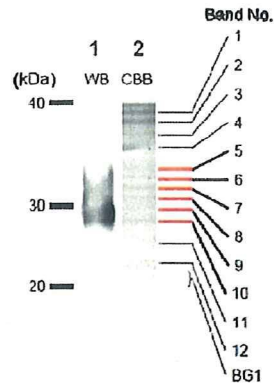


図 5. PrPc 画分の SDS-PAGE

レーン 1 : ウェスタンブロット

レーン 2 : クマシー染色

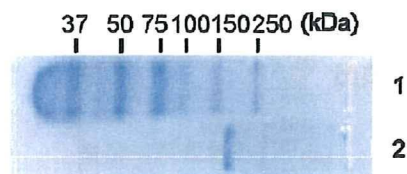


図 6. 5%アガロースゲル電気泳動による BSA の分離

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : BSA

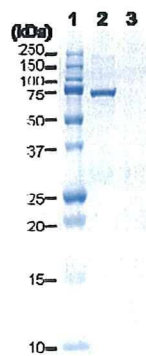


図 7. BSA 回収実験の結果

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : アガロースゲルによる分離前の BSA (Control)

レーン 3 : アガロースゲルより回収した BSA

(A)

抽出条件	ゲル形状	抽出溶液	抽出後の処理
①	角片	20 mM Tris-HCl (pH8.0)	—
②	粉砕(ミキサー使用)	20 mM Tris-HCl (pH8.0)	フィルター過
③	粉砕(ミキサー使用)	20 mM Tris-HCl (pH8.0) + 1% Octylglucoside	ゲルろ過
④	粉砕(ミキサー使用)	150 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (pH8.0)	ゲルろ過
⑤	粉砕(ミキサー使用)	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA (pH7.5)	ゲルろ過

(B)

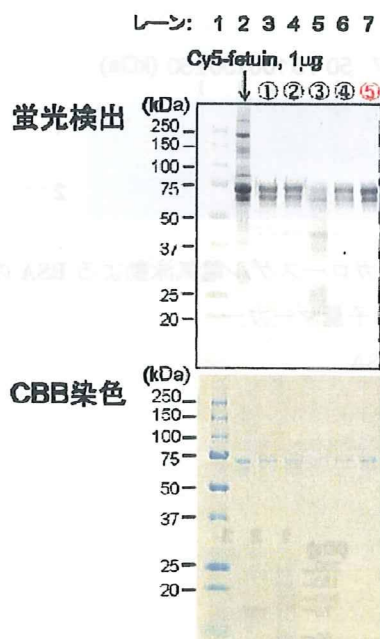


図8. フェツインの回収実験条件と結果 (アクリルアミドゲルからの回収-1)

(A) Cy5 標識したフェツインのゲルからの抽出条件

(B) 抽出回収液の SDS-PAGE (上: 蛍光検出, 下: クマシー染色)

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : 回収前のフェツイン (Control)

レーン 3-7 : 抽出条件①-⑤で回収したフェツイン

(A)

MKSFVLLFCL AQLWGCHSIP LDPVAGYKEP ACDDFDTEQA ALAAVEYINK  
HLPRGYKHTL NQIDSVKWWP RRPTGEVYDI EID<sup>1</sup>LET<sup>2</sup>CH VLDPTPLAN<sup>199</sup>C  
SVRQQTQHAV EGD<sup>3</sup>CDIHVLK QDGQFSVLEF KCDSSPDSAE DVRKLCPCCP  
LLAPLN<sup>256</sup>DSRV VHAVEVALAT FNAESN<sup>277</sup>GSYL QLVEISRAQF VPL<sup>2</sup>VSVSVE  
FAVAATDCIA KEVVDPTKCN LLAEKQYGF<sup>3</sup>C KGSVIQKALG GEDVRVTC<sup>1</sup>L  
EQTQ<sup>2</sup>VIPQF QPDGAEAEAP SAVPDAAGPT E<sup>3</sup>SAAGPPVAS VVGPSVVAV  
PLPLHRAHYD LRETFSGVAS VESSSGEAFH VGK<sup>1</sup>PIVQF SIPGGPVRLC  
PGRIRYFKI

(B)

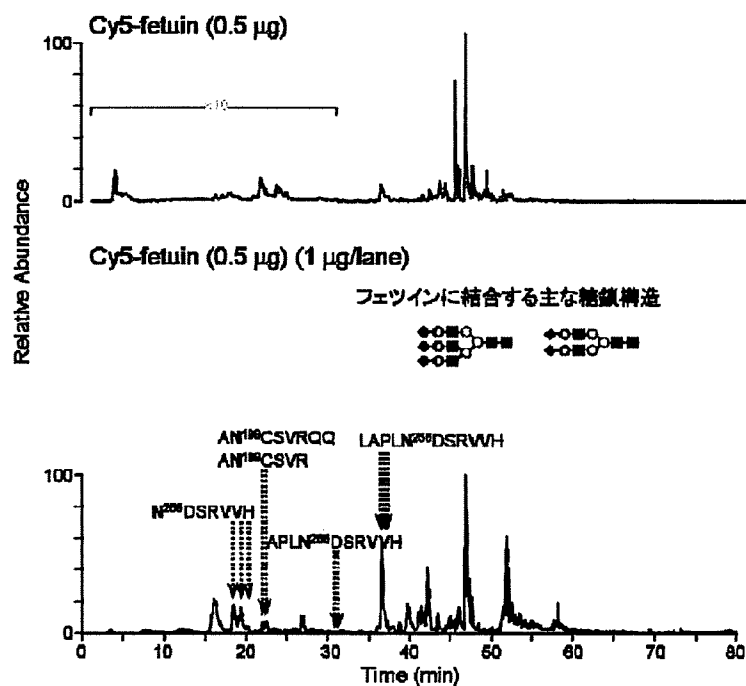


図 9.

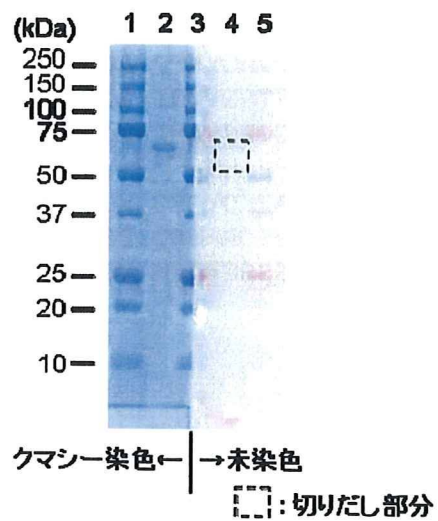
(A) フェツインのアミノ酸配列 (太字は糖鎖結合部位)

(B) Cy5 標識フェツインのキモトリプシン消化物の LC/MS の TIC

上: Cy5 標識フェツインのキモトリプシン消化物

下: ゲルから回収した Cy5 標識フェツインのキモトリプシン消化物

(A)



(B)

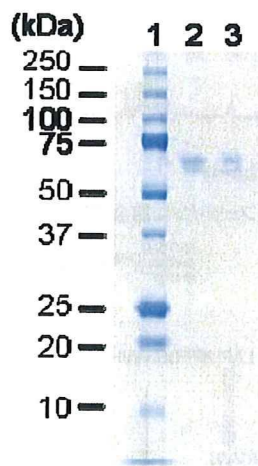


図 10. フェツインの回収実験結果 (アクリルアミドゲルからの回収-2)

(A) 回収前の SDS-PAGE

レーン 1, 3, 5: 分子量マーカー

レーン 2 (参照レーン): フェツイン (1 µg, クマシー染色)

レーン 4: フェツイン (1 µg, 未染色)

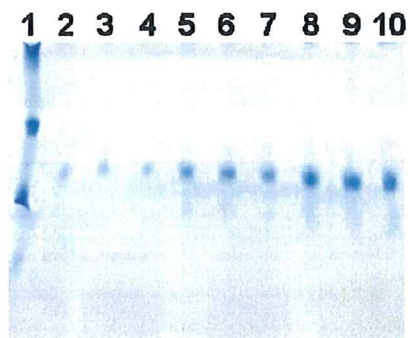
(B) 抽出回収液の SDS-PAGE

レーン 1: 分子量マーカー,

レーン 2: 回収前のフェツイン (1 µg) (Control)

レーン 3: 回収後フェツイン

(A)



(B)

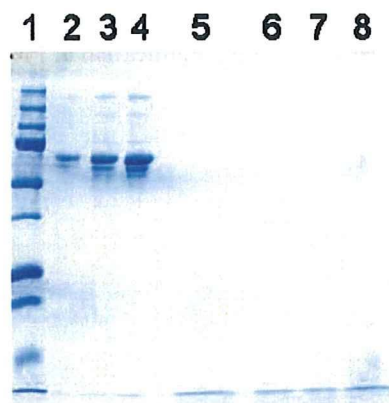


図 11. フェツインの回収実験結果 (10%BAC-ポリアクリルアミドゲルからの回収)

(A) 回収前の泳動図

レーン 1: マーカー

レーン 2, 3, 4: フェツイン (1 µg)

レーン 5, 6, 7: フェツイン (3 µg)

レーン 8, 9, 10: フェツイン (5 µg)

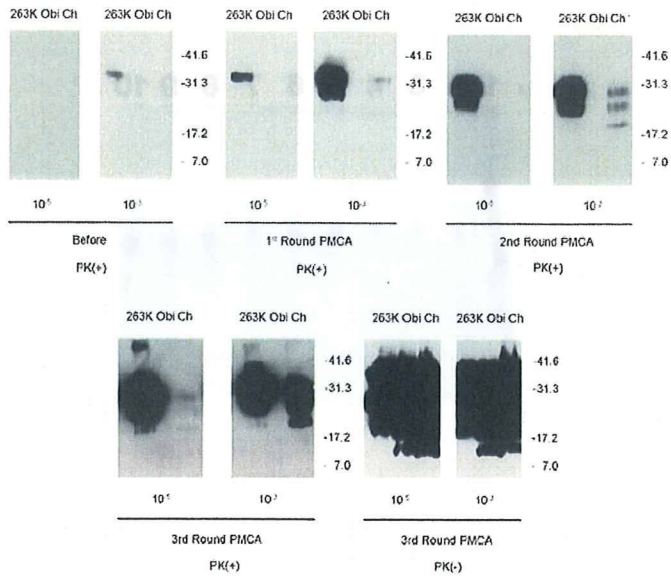
(B) 強イオン交換体カラムで処理した回収液

レーン 1: マーカー

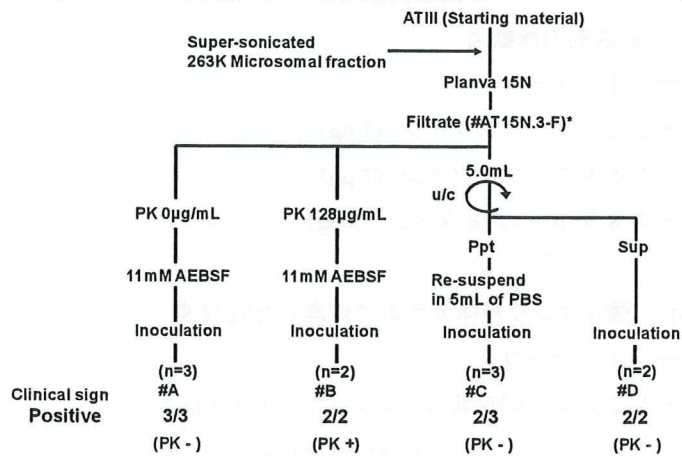
レーン 2, 3, 4: 回収前のフェツイン (1, 3, 5 µg)

レーン 5: フェツイン (1 µg) (Control)

レーン 6, 7, 8: 回収後のフェツイン (1, 3, 5 µg)



☒ 12. *In vitro* amplification of PrP<sup>res</sup>



☒ 13.

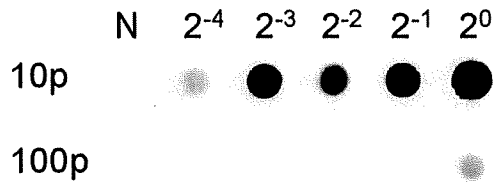


図 14. 培養上清中に存在するプリオン感染性の比較定量解析

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<sup>Sc</sup> を検出した。10p 画分では 2<sup>-4</sup> 希釈まで PrP<sup>Sc</sup> が検出されたが、100p 画分では 2<sup>-1</sup>~2<sup>-2</sup> 希釈まで PrP<sup>Sc</sup> が検出された。従って、10p 画分は 100p 画分の 4~8 倍のプリオン感染性を含むと考えられる。

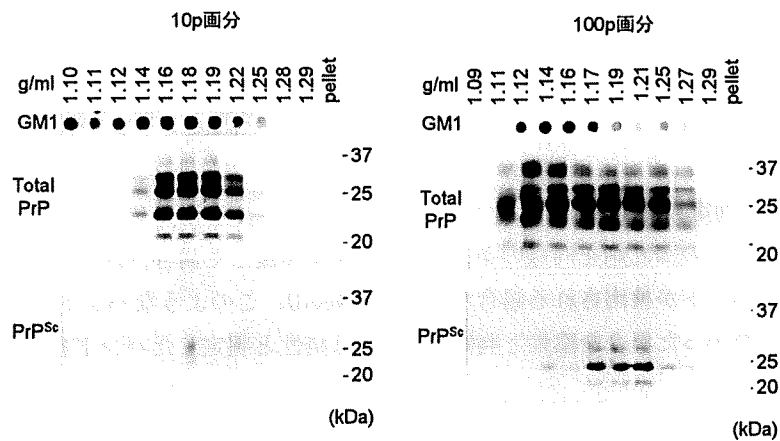


図 15. 10p および 100p 画分の総 PrP(total PrP)および PK 抵抗性 PrP<sup>Sc</sup>

10p および 100p 画分を、シヨ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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> の検出は再現性が乏しく、PrP<sup>Sc</sup> の存在を結論するには至らなかった。



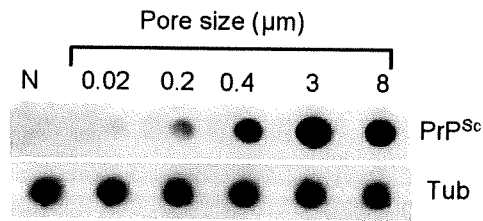


図 16. ScN2a-3 の培養上清中のプリオン感染性の粒子サイズの推定

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<sup>Sc</sup> 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。

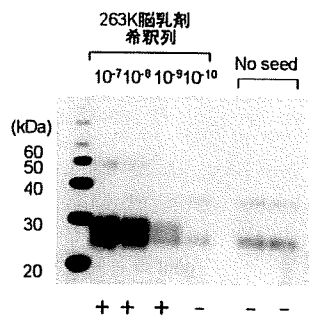
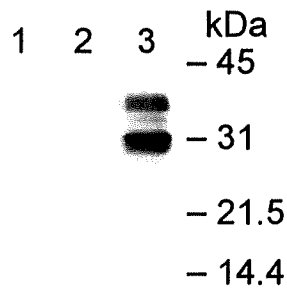


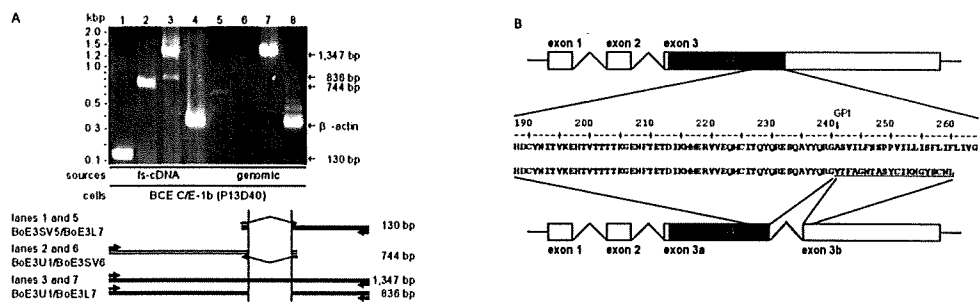
図 17. PMCA の結果の判定

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<sup>Sc</sup> 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。



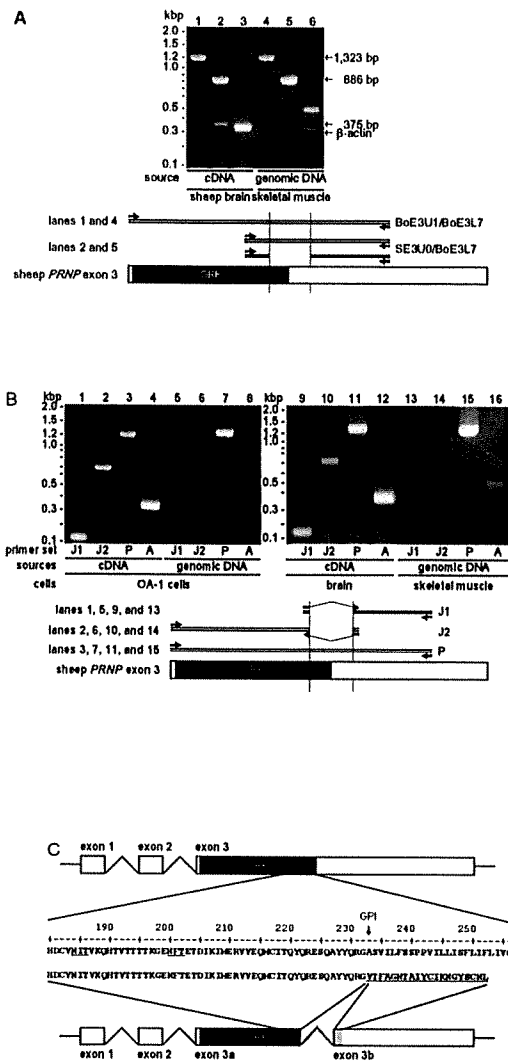
**Fig. 18. Expression of bovine PrP in *Prnp*-deficient neuronal HpL3-4 cells.**

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.



**Fig. 19. Detection of splice variant of bovine PrP mRNA.**

(A) 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.

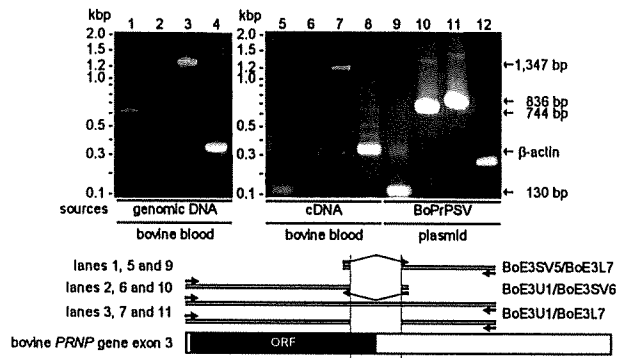


**Fig. 20. Expression of the splice variant of PrP mRNA.**

(A) First-strand cDNA from total RNA from sheep brain (5  $\mu$ 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  $\beta$ -actin primers (lanes 3 and 6) with Ex taq polymerase. PCR products were separated on a 2% agarose gel and visualized with ethidium bromide.

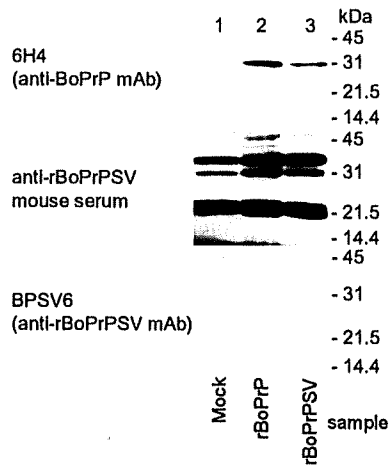
(B) OA1 cells were cultured for 40 days after 5 passages (P5D40). First-strand cDNA and genomic DNA from OA1 cells (left panel) were prepared. First-strand cDNA from sheep brain and genomic DNA from sheep skeletal muscle (right panel) were prepared. First-strand cDNA from total RNA (5  $\mu$ g) and genomic DNA (2.5 ng) were used for PCR using PrP primer set (P), exon-exon junction primer sets (J1 and J2) and  $\beta$ -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.



**Fig. 21. 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  $\beta$ -actin primer sets using Ex Taq DNA polymerase. PCR products were separated on a 2% agarose gel and visualized with ethidium bromide.



**Fig. 22. Immunoblot analysis of recombinant bovine splice variant isoform of PrP.**

The mock, bovine PrP gene and splice variant were subcloned into and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE. Mock (lane 1), recombinant PrP (lane 2) and PrPSV (lane 3) were detected with anti-PrP mAb 6H4 (upper panel), anti-rBoPrPSV mouse serum (middle panel) and anti-PrPSV mAb BPSV6 (lower panel).