

図4. 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。

表1. 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。

表 2. 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

a) 表1のスパイク用試料をPBSで100倍に希釈した。

表 3. FVIII 溶液のプロセスバリデーション(プラノバ 20N 濾過)

PrP ^{Sc} 画分	希釈列							総 PrP ^{Sc} 量 ^{d)} Log[PMCA ₅₀]
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
濾過前	NT	NT	+++ ^{b)}	+++	+++	+-- ^{c)}	---	10.6
濾過後	--- ^{a)}	---	---	NT	NT	NT	NT	<5.3

e) 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。

f) 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。

g) 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) PrP^{Sc}の検出結果から求めたPMCA力価と溶液量から総PrP^{Sc}量を算出した。

表 4. HBIG 溶液のプロセスバリデーション(プラノバ 35N 濾過)

PrP ^{Sc} 画分	希釈列							総 PrP ^{Sc} 量 Log[PMCA ₅₀]
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
濾過前	NT	NT	+++	+++	+++	+--	---	10.4
濾過後	NT	NT	+++	++-	---	---	--	8.9

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
-異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究-

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 菊池裕

研究要旨

遺伝子組換え医薬品等の安全性を確保するため、その原材料に混入する恐れがあるウシ異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の高感度な検出法の開発が望まれている。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たPrP^{Sc}の検出法の開発に資する基礎研究として、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、ヒツジPrPSV mRNAの探索、ウシ血液中からPrPSV mRNAの検出、大腸菌によるウシPrPSVの産生および抗ウシPrPSVモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ樹立を行った。

ウシPrP高発現細胞株の樹立にはPrP欠損マウス脳由来細胞株HpL3-4を用い、ウシPrP遺伝子を導入したクローンを樹立し、6H4抗体を用いたイムノブロット法でPrPの発現を確認した。本細胞株への遺伝子導入にはレトロウイルスベクターを用いたことから、PrPの安定的な産生が期待できる。

スプライス変異型PrP mRNAの探索にはウシ角膜細胞株BCE C/D-1b及び正常ウシ脳由来total RNAからcDNAを調製し、各種プライマーを用いて産生したPCR産物の塩基配列を解析し、ウシPrPのGPIアンカーシグナルペプチドを欠損したPrPSV mRNAをクローニングした。このmRNA由来fs-cDNAを特異的に増幅するエクソンジャンクションプライマーを用いたRT-PCRを構築した。

ヒツジPrPSV mRNAの探索にはヒツジ胎児脳由来培養細胞株OA1及び正常ヒツジ脳由来total RNAからcDNAを調製し、各種プライマーを用いて産生したPCR産物の塩基配列を解析し、ヒツジPrPのGPIアンカーシグナルペプチドを欠損したPrPSV mRNAをクローニングした。このmRNA由来fs-cDNAを特異的に増幅するexon-exon junction primerを用いたRT-PCRを構築した。

プリオン病のバイオマーカーへの適用を目的としたウシ血液中のPrPSV mRNAの検出は、全血から調製したtotal RNAを用いたRT-PCR法を行い、PrPSV mRNAの発現を確認した。しかし、その発現量は低く、定量RT-PCR法では検出できなかった。

大腸菌によるウシプリオン蛋白質(PrP)及びPrPSVの産生は、それぞれの遺伝子を導入した大腸菌溶解液をSDS-PAGEで泳動し、市販の抗PrPモノクローナル抗体6H4を用いたイムノブロット法を行い、その発現を確認した。得られたPrPSVを用い、抗PrPSVモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ樹立を行った。

以上の研究成果は、医薬品製造工程を汚染する恐れのあるBSE罹患ウシ由来製造原料の検出や、スクレイピー感染機構の解析等への応用が期待される。

A. 研究目的

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^Cを高発現しているヒトグリオブラストーマ細胞株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、ウシプライス変異型PrP (PrPSV) mRNAの探索、ウシ血液中から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。

B. 研究方法

1. 細胞培養

ウシ角膜細胞株BCE C/D-1b (JCRB9129)は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。

PrP欠損マウス脳由来細胞株HpL3-4は、東京大学東京大学大学院農学生命科学研究科応用免疫学 小野寺節教授より御供与して頂き、本研究に用いた。

ヒツジ胎児脳由来細胞株OA1 (ATCC Number: CRL-6538)は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. RT-PCR

培養細胞株、正常脳または血液から調製したtotal RNAから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PrP遺伝子のエクソン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、Pwo SuperYield DNA Polymerase (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)又はEx taq polymerase (タカラバイオ株式会社)を用いて行った。

3. 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・ダイアグノスティックス株式会社)又は抗PrPSV抗体を、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、化学発光法で検出した。

4. ウシPrP産生細胞の樹立

モロニーマウス白血病ウイルス(MoMuLV)由来のレトロウイルスベクターpBMN-I-GFPにウシPrP遺伝子エクソン3のORFを組み込み、当ベクターを導入したヒトHEK細胞由来パッケージ細胞の培養上清からウイルス粒子を調製し、プリオンノックアウトマウス(*prnp* ^{-/-})脳から樹立された培養細胞株HpL3-4に感染させ、ウシPrP産生細胞株を樹立した。

5. 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。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたり、「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。

C. 研究結果

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(Fig. 1)。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。

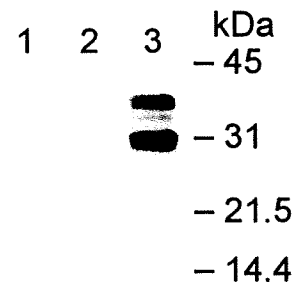


Fig. 1. Expression of bovine PrP in *Prnp*-deficient neuronal HpL3-4 cells.

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.

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(Fig. 2A, 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、

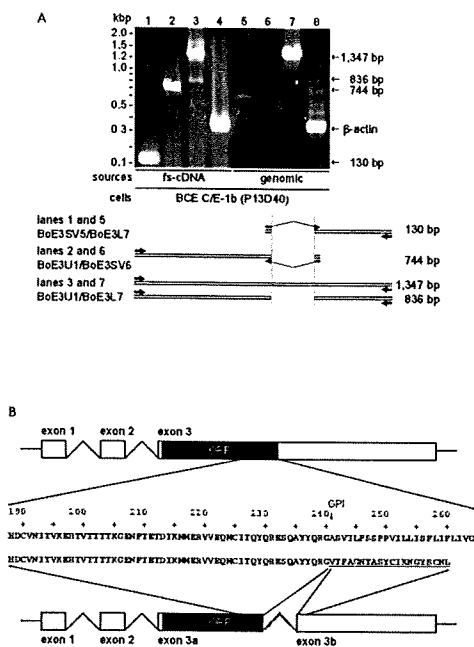


Fig. 2. Detection of splice variant of bovine PrP mRNA.

(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.

(B) 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.

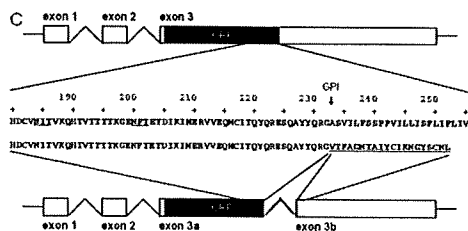
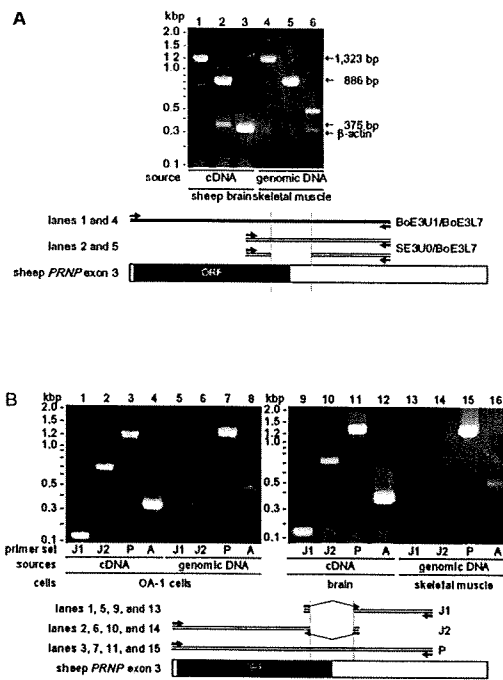
Fig. 3. Expression of the splice variant of PrP mRNA.

(A) First-strand cDNA from total RNA from sheep brain (5 µg) 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 µg) 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.



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(Fig. 2B)。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(Fig. 2A, 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(Fig. 3A, 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(Fig. 3C)。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(Fig. 3A, 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(Fig. 3A, 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(Fig. 3B, lanes 9-10)、genomic DNAではバンドが検出されなかった(Fig. 3B, 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の配列が欠落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(Fig. 3B, lanes 1-2)、ゲノムDNAではバンドが検出されなかった(Fig. 3B, 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(Fig. 4, 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で検出されたが(Fig. 4, lanes 5 and 9)、ゲノムDNAでは検出されなかった(Fig. 4, 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(Fig. 4, lanes 6 and 10)。

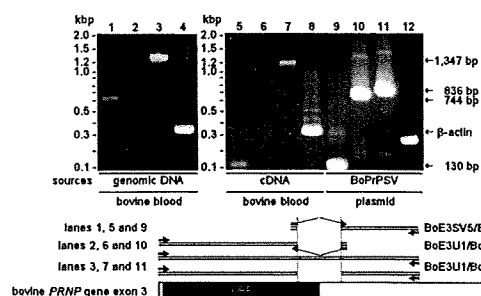


Fig. 4. Detection of the splice variant of PrP mRNA using exon-exon junction primers in total RNA from bovine blood.

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.

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(Fig. 1a)。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(Fig. 1a)。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(Fig. 1b)。

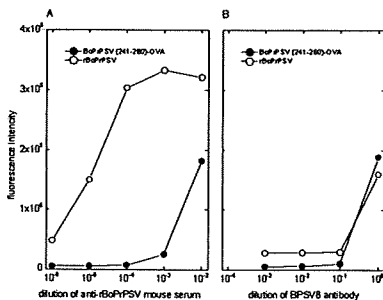


Fig. 5. Binding of antibodies to coating antigen in ELISA.

(A) Various concentration of anti-rBoPrPSV mouse serum were incubated with BoPrPr (241-260)-OVA (●) or rBoPrPSV (○) as coating antigen. (B) Various concentration of anti-rBoPrPSV antibody (BPSV6) were incubated with BoPrPSV (241-260)-OVA (●) or rBoPrPSV (241-260)-OVA (○) as coating antigen

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(Fig. 6, 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(Fig. 6, 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(Fig. 6, 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つた(Fig. 6, lower panel, lane 3)。

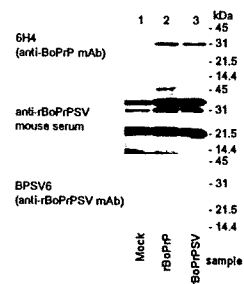


Fig. 6. Immunoblot analysis of recombinant bovine splice variant isoform of PrP.

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).

D. 考察

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脳由来細胞株HpL3-4でウシPrP遺伝子の導入を試みた。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. 2B)。ウシPrPは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スクレイピーが知られており、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、スクレイピ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、スクレイピーの研究も精力的に行われている。最近、スクレイピー又はBSEに罹患したヒツジの血液を輸血した研究から、43%の確率でスクレイピーが、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)遺伝子が発現していることを明らかにした。ヒツジのスクレイピーに対する感受性は主にPrP遺伝子(*prnp*)のコドン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ピ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、スクレイピー易感染培養細胞としての利用できる可能性があり、PrPSVのスクレイピ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。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った。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

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。

本研究ではウシPrP^{Sc}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^{Sc}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. Kikuchi Y, Kakeya T, Nakajima O, Sakai A, Ikeda K, Yamaguchi N, Yamazaki T, Tanamoto K, Matsuda H, Sawada J, Takatori K., Hypoxia induces expression of a GPI-anchorless splice variant of the prion protein. *FEBS J.* 275, 2965-2976 (2008)
2. 蜂須賀暁子, 児矢野聡, 菊池裕, 中島治, 青笹正義, 松田治男, 澤田純一, 手島玲子, 抗マウスプリオンペプチドファージ一本鎖抗体の反応性, 国立衛研報, 127, 26-30 (2009)

2. 学会発表

1. 菊池裕, 中島治, 掛谷知志, 酒井綾子, 池田喜久子, 山口直人, 山崎壮, 棚元憲一, 松田治男, 澤田純一, 高鳥浩介, 山口照英: GPIアンカー欠損型プリオン蛋白質産生に及ぼす低酸素応答の影響に関する研究, 2007年プリオン研究会, 平成19年8月25-26日, 新潟県津南町
2. 中島治, 菊池裕, 手島玲子, 松田治男, 澤田純一: 組換えヒトプリオンタンパクの発現と精製, 2007年プリオン研究会, 平成19年8月25-26日, 新潟県津南町
3. 遊佐精一, 菊池裕, 横山隆: 正常型プリオンタンパク質のプロセッシングの意義, 2007年プリオン研究会, 平成19年8月25-26日, 新潟県津南町
4. 菊池裕, 中島治, 掛谷知志, 酒井綾子, 池田喜久子, 山口直人, 山崎壮, 棚元憲一, 松田治男, 澤田純一, 高鳥浩介: Hypoxia induces an expression of a GPI-anchorless splice variant of prion protein in a human glioblastoma cell line T98G, 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会, 平成19年12月11-15日, 横浜市
5. 中島治, 菊池裕, 手島玲子, 松田治男, 澤田純一: 組換えプリオンタンパクの発現と精製, 第30回日本分子生物学会年会第80回

日本生化学会大会合同大会、平成19年12月
11-15日、横浜市

6. 菊池裕、中島治、山崎壮、手島玲子、棚元
憲一、石黒直隆、山口照英：ウシ角膜細胞
株BCE C/D-1bが発現するスプライス変異型
GPIアンカー欠損プリオン蛋白質mRNAの
解析、2008年プリオン研究会、平成20年8
月29-30日、北海道上川郡新得町
7. 菊池裕、遊佐精一、中島治、手島玲子、山
口照英：GPIアンカー欠損型プリオン蛋白
質産生に関する低酸素誘導因子の発現解
析、第31回日本分子生物学会年会第81回日
本生化学会大会合同大会、平成20年12月9-
12日、神戸市
8. T. Suzuki, A. Kohara, A. Ramadan, Y. Kikuchi,
M. Honma, M. Hayashi: Comparative study on
in vivo genotoxicity of ochratoxin A and
aristolochic acid as a causative for the Balkan
Endemic Nephropathy, 10th International
Conference on Environmental Mutagens
(ICEM), Aug. 20-25, 2009, Firenze, Italy
9. 菊池裕、中島治、豊田淑江、手島玲子、小
西良子、山口照英：低酸素条件下で誘導さ
れるGPIアンカー欠損型プリオン蛋白質の
発現解析、第82回日本生化学会大会、平成
21年10月21-24日、神戸市

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

I. 協力研究者

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
遊佐精一
国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
中島治
北海道畜産試験場 基盤研究部 尾上貞雄

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Itoh S., Takakura D., Kawasaki N., Yamaguchi T.	Glycosylation analysis using LC/MS and LC/MSn. Site-specific glycosylation analysis of a glycoprotein.	John Walker	The protein Protocols Hand-book. Third Edition.	Humana Press	U.S.A.	2009	1419-1430
Kawasaki N., Itoh S., Yamaguchi T.	LC/MS of oligosaccharides	Naoyuki Taniguchi	Glycoscience Lab. Manual.			In press	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	25	1127-1136	2007
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
Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Takakura, D., Qin, Y., Xiaoyu, H., Yamaguchi, T.	The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals,	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>			In press
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.	<i>Trends in Glycosci. Glycotech.</i>	20	97-116	2008

Harazono, A., Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N. Matsuishi-Nakajima, Y., Kawanishi, T., Yamaguch, T.	Simultaneous glycosylation analysis of human serum glycoproteins by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry.	J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.	869	20-30	2008
Itoh S, Hachisuka A, Kawasaki N, Hashii N, Teshima R, Hayakawa T, Kawanishi T, Yamaguchi T.	Glycosylation analysis of IgLON family proteins in rat brain by liquid chromatography and multiple-stage mass spectrometry.	Biochemistry	47	10132-1011 54	2008
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.	Immunology			In press
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
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
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
Sakudo A, Ikuta K.	Prion protein functions and dysfunction in prion diseases.	Curr Med Chem.	16	380-389	2009
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

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
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
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
Sakudo A, Onodera T, Ikuta K	PrPSc level and incubation time in a transgenic mouse model expressing Borna disease virus phosphoprotein after intracerebral prion infection,	Neurosci Lett	431	81-85	2008
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	36	27-36	2008
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.	362	522-524	2007
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.	32	135-141	2007
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	14	1-6	2007

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	50	190-196	2007
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	69	329-337	2007
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 JiME.	2	8-18	2007
Sakudo A, Onodera T, Ikuta K.	Prion protein gene-deficient cell lines: Powerful tools for prion biology (Review)	Microbiol Immunol.	51	1-13	2007
Horiuchi, M.	Characterization of prion susceptibility in Neuro2a mouse neuroblastoma cell subclones.	Microbiol. Immunol.	51	661-667	2007
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
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
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
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 ^{Sc} accumulation and delayed disease progression in prion-infected mice.	J. Gen. Virol.	89	1533-1544	2008

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.	55	267-273	2008
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.	70	1225-1230	2008
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.	8	212	2008
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	10	13-25	2008
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 ^{Sc} is critical for the infectivity of the Chandler prion strain.	J Virol.	83	3852-3860	2009
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	J Virol.	83	5918-5927	2009
Horiuchi M, Karino A, Fu J, Furuoka H, Ishiguro N, Kimura K, Shinagawa M.	Generation of monoclonal antibody that distinguishes PrP ^{Sc} from PrP ^C and neutralizes prion infectivity.	Virology.	394	200-207	2009
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.	91	563-569	2010
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

Frequencies of PrP Genotypes in Meat Breeds of Japanese Sheep and Trail of Selective Breeding in Experimental Sheep Flock

Jiro OHARA¹⁾, Tetsuro TOGARI²⁾, Aya KUROKAWA¹⁾, Junko MAEDA¹⁾, Naotaka ISHIGURO³⁾, Hidefumi FURUOKA⁴⁾ and Motohiro HORIUCHI¹⁾

¹⁾Laboratory of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-0818, ²⁾Poultry and Sheep Research Unit, Hokkaido Animal Research Center, Shintoku 081-0038,

³⁾Laboratory of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Applied Biological Science, Gifu University, Yanagito, Gifu 501-1193 and ⁴⁾Department of Pathological Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro 080-8555, Japan

(Received 8 June 2007/Accepted 23 August 2007)

ABSTRACT. The selection of sheep with scrapie-resistant PrP genotypes is one of the control measures for transmissible spongiform encephalopathies in ruminants. In this study, we investigated the frequencies of PrP genotypes in meat breeds in Japan. The nationwide surveillance revealed that nearly half of the Suffolk sheep, a major meat breed in Japan, carried scrapie-susceptible AQ/AQ and AQ/VQ genotypes. In addition, the VQ haplotype, which confers high susceptibility to scrapie within sheep, was also found in Poll Dorset sheep. A trial of selective breeding using sires with scrapie-resistant PrP genotypes AQ/AR and AR/AR could raise the ratio of scrapie-resistant sheep from less than 50% to 80% within 3 years. However, the use of sires with the AR/AR genotype and the selection of ewes would be required to achieve a higher ratio of scrapie-resistant sheep.

KEY WORDS: prion, scrapie, transmissible spongiform encephalopathy.

J. Vet. Med. Sci. 69(12): 1325-1329, 2007

Scrapie is a fatal neurodegenerative disease of sheep and goats, and is classified as a transmissible spongiform encephalopathy (TSE). In the sheep prion protein (PrP) gene, nucleotide polymorphisms causing amino acid substitutions have been reported in more than 20 codons [14]. Among these, polymorphisms at codons 136 (valine [V]/alanine [A]) and 171 (glutamine [Q]/arginine [R]/histidine [H]/lysine [K]) are closely associated with susceptibility to scrapie. The VQ haplotype confers a high susceptibility to the disease, and the wild-type AQ haplotype also confers disease susceptibility while the AR haplotype is associated with resistance to scrapie [16]. Due to the clear genetic susceptibility to the disease, the scrapie susceptibility of sheep and flocks can be estimated by analyzing PrP genotypes.

In Japan, there are around 20,000 sheep, more than half of which are being reared in Hokkaido. Although the sheep population is relatively small in Japan, there are sporadic occurrences of scrapie. In a previous study, we analyzed the PrP genotypes of Japanese Suffolk sheep, although their numbers are limited [18]. It is important to estimate the scrapie susceptibility of sheep flocks for the control of scrapie prevalence; however, the recent and precise frequencies of PrP genotypes in Japanese sheep remain unclear.

Breeding programs that aim to increase the population of scrapie-resistant sheep by eliminating the scrapie-susceptible VQ haplotype and increasing the scrapie-resistant AR haplotype are considered as part of the measures to eradicate scrapie. In European countries including the UK, the Netherlands, France, and Germany, breeding programs have

been started [9, 11]. However, in Japan, a breeding program has not been implemented yet.

In order to contribute to the control measures for TSE in Japan, we carried out large-scale PrP genotyping of meat breeds of sheep in Japan. In addition, to estimate the efficacy of selective breeding using sires carrying the scrapie-resistant PrP genotype, we have conducted a trial of selective breeding using an experimental sheep flock since 2002. Here we report the frequencies of sheep PrP genotypes in Japan and the transition of the frequencies of PrP genotypes by selective breeding using sires carrying the AR haplotype.

For the investigation of the frequencies of PrP genotypes in Japan, a total of 880 sheep, including 648 Suffolk, 92 Poll Dorset, 20 Southdown, 44 cross-bred Suffolk and Southdown, and 76 cross-bred Poll Dorset and Southdown sheep, were used in this study. The genomic DNA of 195 Suffolk sheep was obtained from the obex samples that were used for active surveillance of scrapie in sheep, and other DNA samples were obtained from the venous blood collected at the farms. These samples were collected between 2003 and 2005. For the evaluation of the efficacy of selective breeding, blood samples were collected from 884 Suffolk sheep in the experimental flock of Shintoku Hokkaido Animal Research Center (HARC). Samples at HARC were collected during 2001-2006. The QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) and the DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) were used for purification of genomic DNA from blood and obex, respectively.

DNA fragments corresponding to the open reading frame of the PrP gene were amplified using PCR with primers sPrP104 and sPrP105 (Table 1). After amplification, the excesses of primers and nucleotides were removed using an S-300HR spin column (GE Healthcare), and the amplified

* CORRESPONDENCE TO: HORIUCHI, M., Laboratory of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-0818, Japan. e-mail: horiuchi@vetmed.hokudai.ac.jp

Table 1. Nucleotide sequencing of primers and Taqman probes used in this study

Primers for PCR and/or nucleotide sequencing	
sPrP104	5'-CATCATGGTGAAAAGCCACATAGGCAG-3'
sPrP105	5'-ATGAAAACAGGAAGGTTGCCCTATCC-3'
sPrP109	5'-GGTCAAGGTGGTAGCCACAG-3'
sPrP110	5'-GTCAGTTTCGGTGAAGTTCTC-3'
Primers for SNPs analysis	
356F	5'-CTGCAGCTGGAGCAGTGGTA-3'
450R	5'-GTCCTCATAGTCATTGCCAAAATGTATA-3'
467F	5'-ACATGTACCGTTACCCCAACCA-3'
553R	5'-TGTTGACACAGTCATGCACAAAAG-3'
Taqman probes for SNPs analysis ^{a)}	
136A	5'-FAM-TGCTGGGAAGTGCCA-MGB-3'
136V	5'-VIC-ATGCTGGGAAGTGTCA-MGB-3'
171Q	5'-VIC-CAGTGGATCAGTATAGTAA-MGB-3'
171R	5'-FAM-CAGTGGATCGGTATAGTA-MGB-3'

a) Taqman probes possess fluorophore (either FAM or VIC) at 5' and MGB quencher at 3'.

fragments were subjected to direct sequencing with the above primers and additional internal primers, sPrP109 and sPrP110. The sequencing reaction was performed using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, and nucleotide sequences were determined using an ABI-3100 Avant-Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) at codons 136 (GCC for alanine and GTC for valine) and 171 (CAG for glutamine and CGG for arginine) were analyzed by allelic discrimination using Taqman assay. The PCR primers used for SNPs analysis at codon 136 were 356F and 450R, and those for codon 171 were 467F and 553R (Table 1). Taqman probes used for SNPs analysis at codon 136 were 136A and 136V, and those for codon 171 were 171Q and 171R (Table 1). SNPs analysis was performed in a 25 μ l reaction mixture consisting of 10 ng of genomic DNA, 900 nM of each primer for PCR, 250 nM of each Taqman probe, and 1x Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Cycling conditions were one cycle of 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, followed by 35 cycles of 15 sec at 92°C and 1 min at 60°C. The PCR reaction and the following allelic determination were carried out with an ABI PRISM 7900 HT using SDS 2.1 software (Applied Biosystems).

If samples showed polymorphisms at both codons 136 and 171, the PCR products amplified with primers sPrP104 and sPrP105 were cloned into a pCRII-TOPO vector (Invitrogen) and then sequenced. The PrP haplotype was determined by the co-incidence of the polymorphisms at codons 136 and 171 in the cloned fragments.

In a previous study, six haplotypes, MARQ, TARQ, MVRQ, MAHQ, MARR, and MARH, based on polymorphic codons at 112, 136, 154, and 171, were identified in Japanese Suffolk sheep [18]. In the present study, nucleotide sequencing of the PrP gene in 98 Suffolk sheep revealed four haplotypes, MARQ, TARQ, MVRQ, and MARR. Since polymorphisms at codons 136 and 171 greatly influence scrapie susceptibility, in the following study we focused on determining polymorphisms at codons 136 and 171 using SNPs analysis. Table 2 shows the frequencies of PrP genotypes in Japanese Suffolk sheep. The frequencies of the scrapie-susceptible AQ/AQ and AQ/VQ genotypes were 48.0%, indicating that nearly half of the Japanese Suffolk sheep are susceptible to the disease. In contrast, only 9.6% of the sheep were homozygous for AR. Nationwide surveillance also revealed that PrP genotype frequencies varied with location; Tochigi and Miyagi prefectures showed higher frequencies of AQ/AQ and AQ/VQ genotypes than Hokkaido ($p < 0.05$ in χ^2 test).

Table 3 shows the frequencies of PrP genotypes in meat breeds at 14 private farms in Hokkaido. In the Suffolk sheep, the frequency of the AQ/AQ genotype varied from 30.9% to 100%. In four out of ten farms, more than half of the Suffolk sheep carried the AQ/AQ genotype, indicating that scrapie susceptibility varies with the flocks. At farm D, the percentage of sheep bearing the AR/AR genotype (27.4%) was higher than that at other farms. The breeding records confirmed that a single sire was primarily used for breeding at this farm, suggesting that the genotypes of sires used for breeding influenced the scrapie susceptibility of the flocks. We also investigated the PrP genotypes of Poll Dorset sheep at two farms and those of Southdown sheep and cross-breeds at two other farms (Table 3). The Poll Dorset sheep showed a lower frequency of the AQ/AQ genotype than the Suffolk sheep, and had a high percentage of sheep carrying the AR haplotype (72.2% at farm L and 93% at farm K). Furthermore, the percentage of sheep carrying the VQ haplotype among the Poll Dorset sheep (13.1% at farm

Table 2. Frequencies of PrP genotypes in Suffolk sheep from various parts of Japan

Genotype	Prefectures								Japan ^{a)}	
	Hokkaido		Aomori		Miyagi		Tochigi		n=648	%
	n=468	%	n=18	%	n=24	%	n=130	%		
AQ/AQ	200	42.7	9	50.0	13	54.2	82	63.1	307	47.4
AQ/VQ	0	0	0	0	2	8.3	2	1.5	4	0.6
AQ/AR	209	44.7	8	44.4	9	37.5	41	31.5	272	42.0
AR/AR	57	12.2	1	5.6	0	0	4	3.1	62	9.6
AR/VQ	2	0.4	0	0	0	0	1	0.8	3	0.5

a) In addition to sheep samples collected from the prefectures indicated in the table (n=640), total number includes 8 additional sheep samples from Niigata (n=7) and Ishikawa (n=1) prefectures.

Table 3. Frequencies of sheep PrP genotypes at private farms in Hokkaido

Farms	Breed	n ^{a)}	Genotype									
			AQ/AQ		AQ/AR		AR/AR		AQ/VQ		AR/VQ	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
A	Suffolk	14	8	57.1	5	35.7	1	7.1	0	0	0	0
B	Suffolk	55	17	30.9	30	54.5	8	14.5	0	0	0	0
C	Suffolk	20	10	50.0	9	45.0	1	5.0	0	0	0	0
D	Suffolk	73	24	32.9	29	39.7	20	27.4	0	0	0	0
E	Suffolk	88	37	42.0	39	44.3	12	13.6	0	0	0	0
F	Suffolk	57	22	38.6	26	45.6	8	14.0	0	0	1	1.8
G	Suffolk	32	10	31.3	20	62.5	2	6.3	0	0	0	0
H	Suffolk	12	6	50.0	6	50.0	0	0	0	0	0	0
I	Suffolk	6	6	100	0	0	0	0	0	0	0	0
J	Suffolk	6	2	33.3	1	16.7	3	50.0	0	0	0	0
K	PollDorset	61	14	23.0	27	44.3	12	19.7	3	4.9	5	8.2
L	PollDorset	29	0	0	11	37.9	13	44.8	2	6.9	3	10.3
M	Southdown	8	4	50.0	3	37.5	1	12.5	0	0	0	0
	PD × SD ^{b)}	76	10	13.2	45	59.2	17	22.4	3	3.9	1	1.3
N	Southdown	12	3	25.0	3	25.0	6	50.0	0	0	0	0
	S × SD ^{c)}	44	13	29.5	19	43.2	11	25.0	1	2.3	0	0

a) Number of sheep analyzed.

b) Poll Dorset crossed with Southdown.

c) Suffolk crossed with Southdown.

Table 4. PrP genotype of sires and ewes used for selective breeding at HARC

PrP genotype		2001	2002	2003	2004	2005
Sire	AQ/AQ	4	0	0	0	0
	AQ/AR	3	3	5	4	6
	AR/AR	0	0	0	2	3
Ewe	AQ/AQ	–	59	68	56	61
	AQ/AR	–	37	43	53	67
	AR/AR	–	8	11	12	18

L and 17.2% at farm K) was higher than that in the Suffolk sheep. The PrP genotype distributions of the Poll Dorset sheep were similar to those reported in other countries [17].

At HARC, a trial of selective breeding using sires with the AQ/AR and AR/AR genotypes has been conducted since 2002. Table 4 shows the PrP genotype of sires and ewes used for the breeding program. More than 100 ewes were used every year, however, only sires have been selected on the basis of PrP genotype since 2002. Table 5 shows the transition of the frequencies of PrP genotypes in lambs born in each season. There were significant differences in the frequencies of PrP genotypes between lambs born before

Table 5. The transition of the frequencies of PrP genotypes in the experimental flock at HARC

a. Genotype frequency

Genotypes ^{a)}	2002		2003		2004		2005		2006	
	n=186	%	n=220	%	n=214	%	n=220	%	n=154	%
AQ/AQ	97	52.2	86	39.1	60	28.0	44	20.0	37	24.0
AQ/AR	71	38.2	104	47.3	116	54.2	132	60.0	78	50.6
AR/AR	18	9.7	30	13.6	38	17.8	44	20.0	39	25.3

b. Statistical analysis^{b)}

	2002	2003	2004	2005	2006
vs 2002	–	7.09 (<0.05)*	24.85 (<0.001)*	46.64 (<0.001)*	32.20 (<0.001)*
vs 2003	–	–	6.14 (<0.05)*	19.54 (<0.001)*	13.17 (<0.01)*
vs 2004	–	–	–	3.96 (0.14)	3.21 (0.20)
vs 2005	–	–	–	–	3.25 (0.20)

a) Genotypes of lambs born in each year were determined by SNPs analysis.

b) Differences in the frequencies of PrP genotypes between years were analyzed by χ^2 test. χ^2 -values and *p*-values (in parentheses) are shown. Asterisks indicate significant differences.

(born in 2002) and after selective breeding (born in 2003 and later). In the selective breeding during 2002, which brought lambs early in 2003, we used only three sires with the AQ/AR genotype. However, the frequencies of the PrP genotypes in lambs born during 2003 differed significantly from those in 2002. In 2005, three years after the implementation of selective breeding, the ratio of the AQ/AQ genotype was reduced from 52.2% to 20%, and that of the scrapie-resistant genotypes (AQ/AR and AR/AR) increased from 47.9% to 80%. However, no increase in the ratio of scrapie-resistant genotypes was observed between 2005 and 2006.

The results in this study revealed that the Japanese Suffolk sheep population, the main breed in Japan, is largely comprised of scrapie-susceptible sheep. The frequencies of the scrapie-susceptible genotypes are higher, and those of the resistant genotypes are lower than those reported in European countries [12]. In the UK, where selective breeding was started in accordance with the National Scrapie Plan, more than 90% of Suffolk sheep are reported to have the AR/AR or AQ/AR genotype [10]. Restriction on the use of rams carrying the VQ haplotype is the highest priority in the selective breeding of scrapie-resistant flocks. Although PrP genotype distributions differ with breed, the Suffolk and Poll Dorset sheep used here possessed the VQ haplotype. Selective breeding programs have not been implemented in Japan, however the high percentage of scrapie-susceptible sheep and the presence of the VQ haplotype suggest a requirement for selective breeding to raise the ratio of scrapie-resistant sheep.

Before beginning selective breeding, sires carrying AR/AR in the flock at HARC were rare so that we used sires with the AQ/AR genotype in the first two years of breeding. Although we used sires with the AQ/AR genotype and ewes were used randomly, the breeding program could convert flocks into more scrapie-resistant ones within 2 or 3 years. However, the increase in the ratio of scrapie-resistant sheep appeared to plateau between 2005 and 2006. This suggests that the use of sires with AR/AR and the selection of ewes based on PrP genotype are required to raise the ratio of scrapie-resistant genotypes to a higher level.

It is also important to determine whether the selection of sheep with a specific PrP genotype affects any traits such as meat quality and production. Several studies have reported that some traits, such as litter size, 135 days weight, and daily liveweight gain, could be influenced by PrP genotypes in some breeds [1, 5, 8, 19]. However, it is unlikely that unfavorable associations of scrapie-resistant PrP genotypes with performance parameters, if they really exist, will be a common occurrence in sheep. In fact, no association between PrP genotypes and traits has been observed in the Suffolk sheep produced by the selective breeding at HARC so far (Tokari et al. unpublished results). In Japan, the selective breeding for scrapie-resistance has not been implemented yet; however, because of the small number of sheep populations, it is relatively easy to control sheep PrP genotypes using high-performance sires with scrapie-resistant

genotypes. The PrP genotyping carried out in this study will contribute to the selection of sires and ewes used for breeding in the future.

Unusual scrapie cases in sheep with the ARR/ARR and ARQ/ARR genotypes have recently been reported in Germany, the UK, France, and Belgium [6, 7, 10, 13]. This raises questions regarding the increase in sheep populations bearing the ARR haplotype, although the risk of the atypical scrapie to public health remains to be elucidated [3]. The unusual scrapie cases have not been recognized in Japan so far, thus increasing the frequency of scrapie-resistant genotypes is still believed to be effective in reducing and/or eliminating a prevalence of classical scrapie, even though sheep carrying the ARR/ARR genotype are not fully resistant to scrapie [18]. Sheep carrying ARR/ARR genotype were resistant to BSE [3, 4, 20] although not completely [2, 15]. This fact also suggests that selection of the ARR haplotype will contribute to reducing the possibility of human exposure to BSE via sheep. The control of PrP genotype distributions through genotyping, not only for codons 136 and 171, but also for codons 141 and 168 that appear to influence TSE susceptibility especially for atypical scrapie, in addition to continuous surveillance of TSE occurrence, will contribute to the control of TSE in small ruminants.

ACKNOWLEDGEMENTS. This work was supported by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (17270701), a Grant-in-Aid from the BSE Control Project of the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, and Strategic cooperation to control emerging and re-emerging infections funded by the Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT).

REFERENCES

- Alexander, B. M., Stobart, R. H., Russell, W. C., O'Rourke, K. I., Lewis, G. S., Logan, J. R., Duncan, J. V. and Moss, G. E. 2006. *J. Anim. Sci.* **83**: 455–459.
- Andréoletti, O., Morel, N., Lacroux, C., Rouillon, V., Barc, C., Tabouret, G., Sarradin, P., Berthon, P., Bernardet, P., Mathey, J., Lugan, S., Costes, P., Corbière, F., Espinosa, J. C., Torres, J. M., Grassi, J., Schelcher, F. and Lantier, F. 2006. *J. Gen. Virol.* **87**: 1043–1046.
- Baylis, M. and McIntyre, K. M. 2004. *Nature* **432**: 810–811.
- Bellworthy, S. J., Hawkins, S. A., Green, R. B., Blamire, I., Dexter, G., Dexter, I., Lockey, R., Jeffrey, M., Ryder, S., Berthelin-Baker, C. and Simmons, M. M. 2005. *Vet. Rec.* **156**: 197–202.
- Brandma, J. H., Janss, L. L. G. and Visscher, A. H. 2004. *Livest. Prod. Sci.* **85**: 59–64.
- Buschmann, A., Lühken, G., Schultz, J., Erhardt, G. and Groschup, M. H. 2004. *J. Gen. Virol.* **85**: 2727–2733.
- De Bosschere, H., Roels, S., Dechamps, P. and Vanopdenbosch, E. 2006. *Vet. J.* **173**: 449–451.
- de Vries, F., Borchers, N., Hamann, H., Drogemüller, C., Reinecke, S., Luppig, W. and Distl, O. 2004. *Vet. Rec.* **155**: 140–143.

9. Defra 2001. National Scrapie Plan. <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/otherises/scrapie/nsp/index.html> (Accessed March 2006)
10. Defra 2004. National Scrapie Plan for Great Britain. Consultation on a strategic review. <http://www.defra.gov.uk/corporate/consult/nsp-stratreview/index.htm>. pdf
11. EC 2003. *OJEC*. **L41**: 41–45
12. EC 2004. Report on the monitoring and testing of ruminants for the presence of transmissible spongiform encephalopathy (TSE) in the EU in 2003, including the results of the survey of prion protein genotypes in sheep breeds. http://europa.eu.int/comm/food/food/biosafety/bse/annual_reps_en.htm (Accessed March 2006)
13. Everest, S. J., Thorne, L., Barnicle, D. A., Edwards, J. C., Elliott, H., Jackman, R. and Hope, J. 2006. *J. Gen. Virol.* **87**: 2433–2441.
14. Goldmann, W., Baylis, M., Chihota, C., Stevenson, E. and Hunter, N. 2005. *J. Appl. Microbiol.* **98**: 1294–1302.
15. Houston, F., Goldmann, W., Chong, A., Jeffrey, M., González, L., Foster, J., Parnham, D. and Hunter, N. 2003. *Nature* **423**: 498.
16. Hunter, N. 1997. *Trends Microbiol.* **5**: 331–334.
17. Hunter, N. and Cairns, D. 1998. *J. Gen. Virol.* **79**: 2079–2082.
18. Ikeda, T., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Muramatsu, Y., Grathwohl, K.-U. and Shinagawa, M. 1995. *J. Gen. Virol.* **76**: 2577–2581.
19. Isler, B. J., Freking, B. A., Thallman, R. M., Heaton, M. P. and Leymaster, K. A. 2006. *J. Anim. Sci.* **84**: 783–788.
20. Jeffrey, M., Ryder, S., Martin, S., Hawkins, S. A., Terry, L., Berthelin-Baker, C. and Bellworthy, S. J. 2001. *J. Comp. Pathol.* **124**: 280–289.