

培養細胞におけるプリオン感染に関する研究

研究分担者：横山 隆 動物衛生研究所 プリオン病研究センター

研究協力者：清水 善久 動物衛生研究所 プリオン病研究センター

研究協力者：河西 和雄 動物衛生研究所 プリオン病研究センター

研究要旨

スクレイピーChandler 株への感受性を指標として分離したプリオン感受性(N2aAT)、非感受性細胞(N2a0719)に対する感染性を指標として、プリオン株を4種類に分類することができた。プリオンの感受性は、株と細胞の組み合わせに依存した。この2種類のN2a細胞に、スクレイピーChandler 株を暴露し、PrP^{Sc}の推移を観察した。感染したPrP^{Sc}は時間とともに減衰したが、感受性細胞では2~3日後に新たに合成されたPrP^{Sc}が検出され、2種類の細胞のプリオン感受性の差はPrP^{Sc}変換能の違いに起因すると考えられた。そこで、DNAマイクロアレイを用いて、2種類の細胞で発現量に差のある遺伝子の検索を行った。Q-PCRでの絞り込み、ならびに新たに作出した感受性細胞および非感受性細胞クローンでの再現性を確認したところ、非感受性細胞において高発現する1遺伝子を確認した。siRNAで、遺伝子発現を抑制すると、非感受性細胞の一部(4/24)でプリオン感染が認められた。

A. 研究目的

一部の培養細胞でプリオンが増殖することが知られているが、その感受性を規定するメカニズムについては明らかではない。プリオンの細胞内における動態および挙動について解析し、プリオン感染の分子機構を解明する。スクレイピー感受性および抵抗性細胞の選別とその性状解析により、細胞内におけるプリオン増幅のメカニズムを明らかにする。プリオンが感染できる細胞または、プリオンが感染するに必須な細胞側の条件を明らかにすることは、BSEにおけるプリオンの増幅部位(特定危険部位)の定義、範囲に科学的な論拠を加えることにつながる。

B. 研究方法

(1) スクレイピーChandler 株に対して感受性および非感受性のN2a細胞を分離する。

- (2) 分離した感受性細胞および非感受性細胞の他のプリオン株に対する感受性を評価する。
- (3) 両細胞にプリオンを感染させ、接種したプリオンの減衰、複製されたプリオンの増加を解析する。
- (4) 両細胞の遺伝子発現についてマイクロアレイを用いた網羅的解析を行い、プリオン感受性に関わる因子を探索する。

(倫理面への配慮)

プリオン感染動物および材料の取り扱いには動物衛生研究所内のバイオセーフティレベル(BSL)2(スクレイピープリオン)または3(その他のプリオン)実験施設にて行い、汚染物は135℃、30分間のオートクレーブ処理等により不活化した。すべての実験は動物衛生研究所バイオセーフティ委員会、実験動物委員会

の許可を受けて実施した。

C. 研究結果

- (1) N2a 細胞の各ラインから Chandler 株に対して感受性、非感受性の N2a 細胞を選択した。2 つの細胞間で PrP^C 発現量に差は認められなかった。
- (2) 検査した 7 株のマウス馴化プリオン株は 2 種類の細胞に対する感受性により 4 種類に分類された。
- (3) プリオンの細胞に対する感受性は、プリオン株と細胞の組み合わせに依存することが示された。
- (4) 両細胞にプリオンを感染させると、感受性細胞では 2~3 日後に合成された PrP^{Sc} が検出される。
- (5) 一方で、感染した PrP^{Sc} は、感受性細胞、非感受性細胞で同様に減衰する。
- (6) 両細胞について DNA マイクロアレイを用いて発現遺伝子の差異を比較した。
- (7) 非感受性細胞において高発現する 1 遺伝子を同定した。
- (8) siRNA で、この遺伝子発現を抑制すると、非感受性細胞の一部 (4/24) でプリオン感染が認められた。

D. 考 察

プリオンの感受性、非感受性は細胞とプリオン株の組み合わせで決定される。細胞内に侵入した PrP^{Sc} の大部分は代謝・分化され消失していく。樹立した 2 種類の細胞におけるプリオン感受性の差は、侵入過程ではなく PrP^{Sc} 変換能に起因していると考えられた。この 2 種類の細胞で発現量の異なる遺伝子を解析し、PrP^{Sc} 変換に関わる因子の同定が可能と考えられた。解析の結果、非感受性細胞で高発現する 1 遺伝子を発見した。この遺伝子の発現抑制は、非感受性細胞の一部をプリオン感受性へと変化させた。この遺伝子産物の PrP^{Sc} 変換への関与に関する解析をすすめて

いる。

E. 結 論

プリオンに対して感受性の異なる 2 種類の N2a 細胞を用いて PrP^{Sc} の動態を解析したところ、感受性の差は、PrP^{Sc} 変換能に起因すると考えられた。遺伝子の網羅的解析により、非感受性細胞で高発現する 1 遺伝子を同定し、その発現抑制は定率ながら、プリオンに対する感受性の獲得に作用した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Yokoyama T, Masujin K, Schmerr MJ, Shu Y, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Murayama Y, Mohri S. Intraspecies prion transmission results in selection of sheep scrapie strains. *PLoS One* 5(11) : e15450, 2010
- 2) Yokoyama T, Okada H, Murayama Y, Masujin K, Iwamaru Y, Mohri S. Examination of the Offspring of a Japanese Cow Affected with L-Type Bovine Spongiform Encephalopathy. *J Vet Med Sci* 73(1) : 121-123, 2011
- 3) Shimizu Y, Kaku-Ushiki Y, Iwamaru Y, Muramoto T, Kitamoto T, Yokoyama T, Mohri S, Tagawa Y. A novel anti-prion protein monoclonal antibody and its single-chain fragment variable derivative with ability to inhibit abnormal prion protein accumulation in cultured cells. *Microbiol Immunol* 54(2) : 112-121, 2010
- 4) Ushiki-Kaku Y, Endo R, Iwamaru Y, Shimizu Y, Imamura M, Masujin K, Yamamoto T, Hattori S, Itohara S, Irie

- S, Yokoyama T. Tracing conformational transition of abnormal prion proteins during interspecies transmission by using novel antibodies. *J Biol Chem* 285(16) : 11931-11936, 2010
- 5) Hasegawa K, Mohri S, Yokoyama T. Fragment molecular orbital calculations reveal that the E200K mutation markedly alters local structural stability in the human prion protein. *Prion* 4(1) : 38-44, 2010
 - 6) An SS, Lim KT, Oh HJ, Lee BS, Zukic E, Ju YR, Yokoyama T, Kim SY, Welker E. Differentiating blood samples from scrapie infected and non-infected hamsters by detecting disease-associated prion proteins using Multimer Detection System. *Biochem Biophys Res Commun* 392(4) : 505-509, 2010
 - 7) Gomi H, Yokoyama T, Itohara S. Role of GFAP in morphological retention and distribution of reactive astrocytes induced by scrapie encephalopathy in mice. *Brain Res* 1312 : 156-167, 2010
 - 8) Fukuda S, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Shimizu Y, Matsuura Y, Shu Y, Kurachi M, Murayama Y, Onoe S, Hagiwara K, Sata T, Mohri S, Yokoyama T, Okada H. Intraspecies transmission of L-type-like bovine spongiform encephalopathy detected in Japan. *Microbiol. Immunol* 53 : 704-707, 2009
 - 9) Masujin K, Shu Y, Okada H, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Mohri S, Yokoyama T. Two distinct prion strains were isolated from a scrapie sheep. *Arch. Virol* 154 : 1929-1932, 2009
 - 10) Yokoyama T, Masujin K, Iwamaru Y, Imamura M, Mohri S. Alteration of the biological and biochemical characteristics of bovine spongiform encephalopathy prions during interspecies transmission in transgenic mice models. *J. Gen. Virol* 90 : 261-268, 2009
 - 11) Iwamaru Y, Shimizu Y, Imamura M, Murayama Y, Endo R, Tagawa Y, Ushiki KY, Takenouchi T, Kitani H, Mohri S, Yokoyama T, Okada H. Lactoferrin induces cell surface retention of prion protein and inhibits prion accumulation. *Journal of Neurochemistry* 107 : 636-646, 2008
 - 12) Yokoyama T, Mohri S. Prion diseases and emerging prion diseases. *Current Medicinal Chemistry* 15 : 912-916, 2008
 - 13) Murakami K, Nishikawa F, Noda K, Yokoyama T, Nishikawa S. Structural analysis of r(GGA)₄ found in RNA aptamer for bovine prion protein. *Prion* 2 : 73-80, 2008
 - 14) Yamamoto T, Ushiki Y, Hara S, Hall WW, Tsukagoshi NH, Yokoyama T, Tagawa Y, Sata T, Yamakawa Y, Kinoshita N, Tamura F, Hattori S, Irie S. An advantageous method utilizing new homogenizing device BioMasher and a sensitive ELISA to detect bovine spongiform encephalopathy accurately in brain tissue. *J. Virol. Methods* 149 : 316-325, 2008
 - 15) Takenouchi T, Iwamaru Y, Sato M, Yokoyama T, Kitani H. Establishment of an SV40 large T antigen-immortalized bovine brain cell line and its neuronal differentiation by dibutyril-cyclic AMP. *Cell biology international* 33 : 187-191, 2008

- 16) Masujin K, Shu Y, Yamakawa Y, Hagiwara K, Sata T, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Okada H, Mohri S and Yokoyama T. Biological and biochemical characterization of L-type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) detected in Japanese black beef cattle. *Prion* 2 : 123-128, 2008
- 17) 横山 隆. 牛海綿状脳症 (BSE) の生物学. 草食実験動物 32 : 1-10, 2008
2. 学会発表
- 1) Yokoyama T, Ushiki-Kaku Y. Generation of conformation-specific anti-prion protein monoclonal antibodies by using prion protein-knockout mice. 2nd annual Congress of antibodies-2010, Beijing, China, 2010.3.24-26
- 2) Yokoyama T. Advance in TSE diagnosis and updated global situation on TSE. Fourth OIE/FAO-APHCA Regional Workshop and Working Group Meeting on BSE and Other Prion Diseases, in collaboration with NVRQS, MIFAFF, Seoul, Republic of Korea, 2010.2.24-26
- 3) Yokoyama T. Advance in prion distribution. Fourth OIE/FAO-APHCA Regional Workshop and Working Group Meeting on BSE and Other Prion Diseases, in collaboration with the Faculty of Veterinary Medicine of Chiang Mai University, MIFAFF, Cheng-mai, Thailand, 2010.8.30-9.3
- 4) Yokoyama T, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Matsuura Y, Mohri S. Limited neuroinvasion of CH1641-like prions in sheep. Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, 2010, Sapporo, Hokkaido, 2010.7.24-25
- 5) Yokoyama T, Masujin K, Schmerr MJ, Yujing S, Okada H, Iwamaru Y, Imamura Y, Matsuura Y, Murayama Y, Mohri S. Intra- and inter-species prion transmission results in selection of sheep scrapie strains, Prion2010, Salzburg, Austria, 2010.9.8-11
- 6) Yokoyama T, Masujin K, Yujing S, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Mohri S. Species barrier of BSE in rodent model. Prion Japan & Canada, Tokyo, Japan, 2010.11.11-12
- 7) Yokoyama T. A challenge to elucidate the existing enigmas of prion diseases-bovine spongiform encephalopathy and scrapie. International research on epidemiology of zoonosis and training for young researcher, Fujisawa, Japan, 2010.12.18
- 8) 横山 隆. 牛海綿状脳症の現状-BSE と非定型 BSE-. 第 20 回日本臨床寄生虫学会, 大阪
- 9) 横山 隆ら. 同じ PrP 遺伝子型を持つ羊への伝達で生じたスクレイピープリオンの性状変化. プリオン研究会, 蔵王, 2009.8
- 10) 横山 隆. ニホンジカのプリオン病 (CWD) サーベイランスについて. 第 15 回野生生物保護学会, 東京, 2009.11
- 11) 清水善久ら. 抗プリオン蛋白質アプタマー 60-3 と異常プリオン蛋白質の特異的結合. 第 147 回日本獣医学会, 宇都宮, 2009.4
- 12) 舒宇静ら. スクレイピー罹患ヒツジ個体から分離された 2 種類のプリオン株. 第 147 回日本獣医学会, 宇都宮, 2009.4
- 13) 横山 隆. BSE 研究. 感染経路・診断法開発. 市民講座, 名古屋, 2009.10
- 14) Yokoyama T, Shu Y, Masujin K, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y,

- Mohri S. BSE in hamsters : An animal model lacking PrPSc accumulation in lymphoid tissues. Prion 2009, Greece, 2009.9
- 15) Yokoyama T. Current status of bovine spongiform encephalopathy(BSE) in Japan. International symposium on "strategies for technology development for ensuring agro-food safety", Seoul, ROK, 2009.7
- 16) Yokoyama T. Prion diseases and emerging prion diseases. PepCon 2008, China, 2008.4
- 17) 長谷川浩司, 横山 隆. 家族性クロイツフェルト・ヤコブ病 E200K 変異がプリオン蛋白質の構造安定性に与える影響. 第35回生体分子科学討論会, 播磨, 2008.5
- 18) Hasegawa K, Yokoyama T. Fragment molecular orbital calculations reveal local structural instability in the human prion protein carrying a E200K Variant. Prion 2008, Madrid, 2008.10
- 19) Masujin K, Shu Y, Yamakawa Y, Hagiwara K, Sata T, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Kurachi M, Shimizu Y, Kasai K, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Biological and biochemical characterization of L-type BSE prions detected in Japanese beef cattle. Prion 2008, Madrid, 2008.10
- 20) 横山 隆, 舛甚賢太郎, 毛利資郎. 種の壁を利用した BSE プリオンの分類. 第33回草食実験動物研究会, 伊東, 2008.11
- 21) 横山 隆. BSE の今後の問題－非定型 BSE－. 日本獣医師会学会年次大会, 盛岡, 2009.1

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

酵母を用いた異種間プリオン感染の分子機構解明

研究分担者：田中 元雅 独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター

研究要旨

プリオン病の病態解明のためのモデル生物として優れている出芽酵母プリオン[PSI⁺]の系を用い、酵母プリオン蛋白質 Sup35 のアミロイドやオリゴマーの性質、プリオン株の表現型、異種間プリオン感染能の相関関係を明らかにすることを目的とする。Sup35 の異種間プリオン感染能を評価するための実験系を構築し、オリゴマー生成時において非天然相互作用の形成が高い感染力をもつプリオン凝集体の生成に重要であることを見出した。

A. 研究目的

酵母プリオンの系を用いて異種間プリオン感染能をもつアミロイドのスクリーニングを行い、異種間プリオン感染性をもつ酵母プリオン Sup35 変異体のアミロイドやオリゴマーの構造・性質と異種間プリオン感染率や生じたプリオン株の表現型との相関を明らかにする。それによってプリオン病の予防や治療戦略の開発を目指す。

B. 研究方法

Sup35 のプリオン化に重要なフラグメントである Sup35NM 蛋白質にランダムに変異を導入し、そのプラスミドを野生型の *S. cerevisiae* とは異なる種の Sup35 を発現するように改変した酵母内で過剰発現させ、異種間プリオン感染能を調べる実験系を構築した。また、アミロイドやオリゴマーの構造や物性をアミノ酸レベルで詳細に解析するための分光学的手法を確立し、それらの構造とプリオン株表現型、異種間プリオン感染能との相関について検討した。

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

低温下で生成する Sup35NM アミロイドのコア領域は、Sup35NM のプリオンドメインの N 末端の 35 個のアミノ酸であるのに対し、オリゴマー形成にかかわるアミノ酸を X 線小角散乱で検討した結果、オリゴマー形成には、N 末端の約 100 アミノ酸が関与していることを明らかにした。さらに、Sup35NM タンパク質におけるプリオンドメインの C 末端領域からなる非天然相互作用によってオリゴマー形成が誘導されることを明らかにした(大橋ら、*Nature Chem., Biol.*, 2010)。

S. cerevisiae の Sup35 のプリオンドメインに変異を導入し、その変異体の異種間プリオン感染能を調べるための実験系を構築した。これまでに多数のコロニーをスクリーニングし、異種間プリオン感染能をもつ Sup35NM 変異体を複数、新たに同定した。

D. 考察

非天然相互作用によって、N 末端の 35 個のアミノ酸という短いコア領域からなる脆弱なアミロイド構造が生成するため、細胞内で効率的にアミロイドが分断され、より多くの種(たね)を生じて感染性が高まる(強い表現

型を示す)ことが示唆された。異種間プリオン感染能をもつアミロイドに関してもその機序を検討する必要性が示唆された。

E. 結論

オリゴマー形成時における非天然相互作用が感染性の高いアミロイド構造を導くことを見出した。この成果は、プリオン病の新たな治療戦略の開発に大きく貢献するとともに、疾患原因のタンパク質がアミロイドを生成するほかの多くの神経変性疾患の病態解明や、新たな治療法の開発にも道を拓くと期待できる。

[参考文献]

1) Tanaka M, Collins S, Toyama B, Weissman JS. The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* 442 : 585-589, 2006

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Ohhashi Y, Ito K, Toyama B, Weissman J, Tanaka M. Differences in prion strain conformations result from non-native interactions in a nucleus. *Nature Chem. Biol* 6 : 225-230, 2010
- 2) 大橋祐美子, 田中元雅. オリゴマーの非天然相互作用が感染性の高いプリオン凝集体を誘導する. *実験医学* 28(8) : 1277-1280, 2010

2. 学会発表

- 1) Ohhashi Y, Tanaka M. Molecular Chaperones & Stress Responses. MOLECULAR BASIS OF YEAST

PRION [PSI⁺] STRAINS. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, 2008.5.1

- 2) 田中元雅. 酵母プリオンを用いたプリオン株出現の分子機構解明. 第8回日本蛋白質科学会, 東京, 2008.6.11
- 3) Tanaka M, Ohhashi Y. Molecular basis of prion strain phenotype in yeast prion. *BMB2008*, 神戸, 2008.12.10
- 4) 大橋祐美子, 田中元雅. 酵母プリオン Sup35 を異なる凝集体へと導く二種の経路の解明. 第9回日本蛋白質科学会, 熊本, 2009. 5.20
- 5) Tanaka M, Ohhashi Y. Molecular Basis of Yeast Prion Strains. FASEB summer research conferences (Amyloid fibril formation and protein misfolding), Snowmass village, Colorado, 2009. 6.30
- 6) 田中元雅, 大橋祐美子. 核形成時における非天然相互作用がプリオン株におけるコンフォメーションの差異を決定する. 第82回日本生化学大会, 神戸, 2009. 10.22
- 7) 田中元雅, 大橋祐美子. 酵母プリオン Sup35 のオリゴマー構造はプリオン株の表現型を決定する. 第48回生物物理学会年会, 仙台, 2010.9.21

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

プリオン立体構造変換初期過程の解析

分担協力者：桑田 一夫 岐阜大学 人獣感染防御研究センター
研究協力者：鎌足 雄司 岐阜大学 人獣感染防御研究センター
研究協力者：山本 典史 岐阜大学 人獣感染防御研究センター
研究協力者：木村 力 岐阜大学 人獣感染防御研究センター
研究協力者：武藤 淳二 岐阜大学 人獣感染防御研究センター
研究協力者：山口 圭一 岐阜大学 人獣感染防御研究センター
研究協力者：石川 岳志 岐阜大学 人獣感染防御研究センター
研究協力者：石倉 孝一 岐阜大学 人獣感染防御研究センター

研究要旨

プリオン立体構造変換の初期過程を、NMR を初めとする様々の実験及び計算機シミュレーションを用いて解明し、それに基づく治療薬の設計・開発を行った。種々の NMR 測定を用い、構造変換初期過程に関与する部分を推定した結果、TVT¹⁸⁹TTTKG(アミノ酸番号 189-195)周辺であることが明らかとなった。この部分(特に TTTT の連続配列)は哺乳類では存在するが、ニワトリなどの鳥類や、カメ、カエルなどの両生類では存在しない。同部位は、B-ヘリックスの C 端を形成しており、その立体構造は HD 交換反応でも保護されないくらい、構造も柔らかく、溶媒にも露出している。分子動力学シミュレーションにより、同部位は尿素でも特に変性しやすいことが分かった。また、我々が見出した抗プリオンリード化合物、GN8 も同部位に特異的に結合することにより、異常型への変換を抑制する。これら実験及び計算結果を総合すれば、B-ヘリックス C 端の TTTT 配列は、プリオン立体構造変換初期過程に関わっている可能性が極めて高い、と考えられる。

A. 研究目的

プリオンタンパク質が細胞型(PrP^C)からスクレイピー型(PrP^{Sc})に構造変換する過程を理解することは、プリオン病の発症機構の解明、及びプリオン病治療薬開発にとって、極めて重要である。プリオンの正常構造の崩壊を抑制するため、プリオン立体構造変換の初期過程を、NMR を初めとする様々の実験及び計算機シミュレーションを用いて解明する。

ン(PrP^C)を脳乳液(正常、及びプリオン感染マウス)と混合し、NMR スペクトルの経時変化を追跡する。これにより、構造変換初期過程に関与する部分を調べる。

- (2) レーザー温度ジャンプ法を用い、プリオンタンパク質の巻き戻り初期過程を観測する。
- (3) 分子動力学法により、構造変換初期過程をシミュレーションする。

B. 研究方法

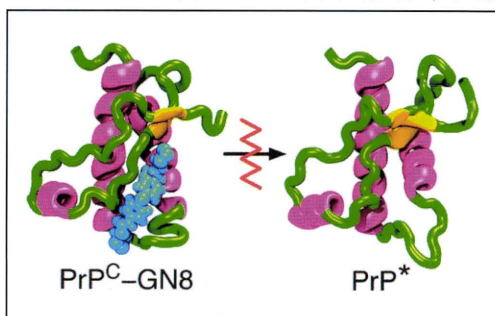
- (1) ¹⁵N ラベルされたリコンビナントプリオ

(倫理面への配慮)

該当なし

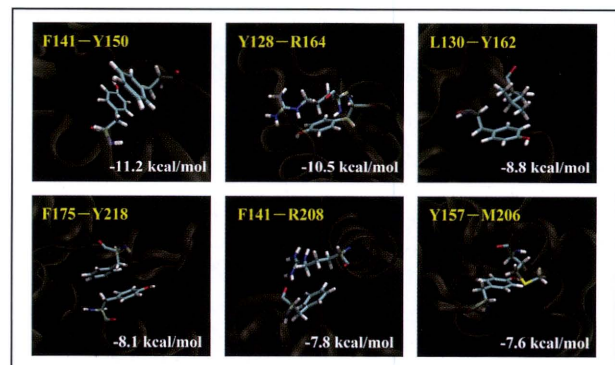
C. 研究結果

- (1) *in vitro* NMR conversion 法を用い、構造変化初期過程に関与する部分を総合的に推定した結果、TVTTTTKG (189-195) 周辺であることが明らかとなった。同部分は、特に構造変化しやすく、異常型存在下では特徴的な構造転移を示す。従って、同部位は、異常型との相互作用部位である可能性がある。興味深いことに、この部分(特に TTTT の連続配列)は哺乳類では存在するが、ニワトリなどの鳥類や、カメ、カエルなどの両生類では存在しない。この配列の特異性により、何故プリオン病が哺乳類には存在するが鳥類や両生類では存在しないか? という疑問を説明できる可能性がある。また、同部位は、B-ヘリックスの C 端を形成しており、その立体構造は HD 交換反応でも保護されないくらい、構造も柔らかく、溶媒にも露出している。
- (2) 温度ジャンプ実験により、数マイクロ秒の相が観測された。このことは、プリオンタンパク質が、際立って早い構造形成を行うことを示している。逆にいえば、プリオンは多様な立体構造を示すにも拘わらず、その間の自由エネルギーバリアーは相当低い。このことが、感染性や株の多様性を説明する根拠となるだろう。
- (3) NMR 実験で解明された構造変換初期過程に関与する部分、TVTTTTKG(アミノ酸番号 189-195) 周辺は尿素存在下で特に構造変化しやすいことが分子動力学計算により明らかとなり、同時にその部位は GN8 結合部位であることが分かった(下図参照、文献 5)。



従って、同部位はプリオンのフォールディング中間体(PrP*)において、構造が壊れている部位と考えられる。

抗プリオン物質である GN8 の結合状態の詳細を解明するため、量子化学計算プログラムを開発しプリオンに適用した。その結果、プリオン天然構造の安定性は主に van der Waals 力、すなわち疎水相互作用に大きく依存することが分かった(下図参照、文献 7)。



また GN8 及びその類縁体と PrP との相互作用も疎水結合による寄与が大きい。さらに疎水相互作用による結合自由エネルギーを強める方向で化学構造の最適化を行った結果、より抗プリオン作用の大きい化合物を得ることができた。逆に親水性残基による修飾は、抗プリオン作用を弱めた。このことは GN8 の抗プリオン作用が他の抗プリオン物質(ポリフェノールなどの親水性化合物)とは大きく異なり、部位特異的に作用することを示している。

D. 考察

我々が見出した抗プリオンリード化合物、GN8 は同部位に特異的に結合することにより、異常型への変換を抑制する。これら実験結果、及び計算結果を総合すれば、B-ヘリックス C 端の TTTT 配列は、プリオン立体構造変換初期過程に関わっている可能性が極めて高い、と考えられる。

E. 結 論

B-ヘリックス C 端から B-C ループにかけての部位が局所的に破壊された構造は、細胞型からスクレイピー型への遷移状態 (PrP*) である可能性が高い。またこれらの知見は、抗プリオン物質の一般的な設計原理、及びその最適化の方向を示す、と考えられる。

[参考文献]

- 1) Kuwata K, Li H, Yamada H, Legname G, Prusiner SB, Akasaka K, James TL. Locally disordered conformer of the hamster prion: a crucial intermediate to PrP^{Sc}? *Biochemistry* 41 : 12277-12283
- 2) Kuwata K, Kamatari YO, Akasaka K, James TL : Slow conformational dynamics in the hamster prion protein. *Biochemistry* 43, 4439-4446, 2004
- 3) 桑田一夫. プリオン病治療薬の論理的開発をめざして -蛋白質のダイナミクス解析から構造変換制御物質の探索へ-. *蛋白質核酸酵素* 53 : 727-732, 2008
- 4) 桑田一夫. 論理的創薬法による抗プリオン物質の設計と開発 (Rational design and development of anti-prion compounds) 月刊「化学工業」4月号 61(4) : 46-50
- 5) 桑田一夫: 正常および異常プリオン蛋白の構造. プリオン病と遅発性ウイルス感染症 編集: 厚生労働科学研究費保持金難治性疾患克服研究事業 「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班」 29-36, 2010.7.28
- 6) Partial energy gradient based on the fragment molecular orbital method : application to geometry optimization *Chemical Physics Letters* 500 : 149-154, 2010
- 7) Yamamoto N, Kuwata K. Redox behaviors of the neurotoxic portion in human prion protein, HuPrP(106-126), *Chemical Physics Letters* 498 : 184-187, 2010
- 8) Ishikawa T, Kuwata K. Accerelation of monomer self-consistent charge process in fragment molecular orbital method. *Chem-Bio Inform. J* 10 : 24-31, 2010
- 9) Ishikawa T, Kuwata K. Interaction Analysis of the Native Structure of Prion Protein with Quantum Chemical Calculations. *J. Chem.Theory Comput* 6 : 538-547, 2010
- 10) Yamamoto N, Kuwata K. Regulating the Conformation of Prion Protein through Ligand Binding. *Journal of Physical Chemistry B* 113 : 12853-12856, 2009
- 11) Yamamoto N, Kuwata K. Difference in redox behaviors between copper-binding octarepeat and nonoctarepeat sites in prion protein. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 14 : 1209-1218, 2009
- 12) Ishikawa T, Kuwata K. Theoretical study of the prion protein based on the fragment molecular orbital method. *Journal of Computational Chemistry* 30 : 2594-2601, 2009
- 13) Ishikawa T, Kuwata K. Fragment molecular orbital calculation using the RI-MP2 method. *Chemical Physics Letters* 474 : 195-198, 2009
- 14) Yamamoto N, Kuwata K. DFT studies on redox properties of copper-chelating

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Ishikawa T, Yamamoto N, Kuwata K.

- cuprizone : Unusually high-valent copper(III) state. *Journal of Molecular Structure THEOCHEM* 895 : 52-56, 2009
- 10) Matsumoto T, Nakagawa T, Kuwata K. Cold destabilization and temperature jump of the murine prion protein mPrP (23-231). *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics* 1794 : 669-673, 2009
- 11) Hosokawa-Muto J, Kamatari YO, Nakamura HK, Kuwata K. A Variety of Anti-Prion Compounds Discovered through an *in silico* Screen Based on PrPc Structure : A Correlation Between Anti-Prion Activity and Binding Affinity Antimicrobial Agents and Chemotherapy 53 : 765-771, 2009
- 12) Yamaguchi K, Matsumoto T, Kuwata K. Critical Region for Amyloid Fibril Formation of Mouse Prion Protein : Unusual Amyloidogenic Properties of Helix 2 Peptide. *Biochemistry* 47 : 13242-13251, 2008
2. 学会発表
- 1) 鎌足雄司, 桑田 一夫. The low-lying excited states : from identification to drug discovery. 22nd Annual Symposium of The Protein Society, Manchestr Grand Hyatt San Diego, 2008.7.19-23
- 2) 中村寛則, 武藤淳二, 鎌足雄司, 桑田一夫. A novel evaluation scheme for anti-prion activity : Application to *in silico* screening. 22nd Annual Symposium of The Protein Society, Manchestr Grand Hyatt San Diego , 2008.7.19-23
- 3) 石川岳志, 石倉孝一, 桑田一夫. Theoretical study of molecular interaction in prion protein based on fragment molecular orbital method. CBI2008, National Center of Sciences Building, Hitotsubashi Memorial Hall, Tokyo, 2008.10.22-24
- 4) Nakamura HK, Kanamoto T, Terakubo S, Kodama KB, Nakashima H, Kuwata K. Small anti-HIV compounds found with *in silico* screening and MTT assay. CBI2008, National Center of Sciences Building, Hitotsubashi Memorial Hall, Tokyo, 2008.10.22-24
- 5) 桑田一夫, 松本友治, 鎌足雄司, 武藤淳二, 中村寛則. Dynamics based drug design (DBDD) to regulate the prion's pathogenic conversion process. Prion2008, Auditorium Hotel Madrid, 2008.10.8-10
- 6) 武藤淳二, 鎌足雄司, 中村寛則, 桑田一夫. A variety of anti-prion compounds discovered by an *in silico* screening based on PrPc structure : a correlation between anti-prion activity and binding affinity. Prion2008, Auditorium Hotel Madrid, 2008.10.8-10
- 7) 石倉孝一, 桑田一夫. Molecular dynamics simulation of the interaction between an anti-prion compound GN8 and cellular prion protein. Prion2008, Auditorium Hotel Madrid, 2008.10.8-10
- 8) 桑田一夫. Dynamics Based Design of Anti-Prion Compounds Uncovered the Hot Spots for Prion's Pathogenic Conversion Reaction. EHRlich II 2nd WORLD CONFERENCE ON MAGIC BULLETS Celebrating the 100th Anniversary of the Nobel Prize Awarded to Paul Ehrlich, Germany, 2008.10.3-5
- 9) 山口圭一. 部分ペプチドを用いたプリオンのアミロイド線維形成部位の系統的ス

- クリーニング. 第 72 回日本生化学会中部支部 例会・シンポジウム, 岐阜大学医学部記念会館, 2008.5.24
- 10) 武藤淳二. アミノ酸部位をピンポイント蛍光標識したプリオン蛋白質の作製. 第 72 回日本生化学会中部支部 例会・シンポジウム, 岐阜大学医学部記念会館, 2008.5.24
- 11) 鎌足雄司. 創薬のための構造生物学的基盤の構築と抗プリオン病化合物開発への応用. 第 72 回日本生化学会中部支部 例会・シンポジウム, 岐阜大学医学部記念会館, 2008.5.24
- 12) 奥田由美子. 論理的創薬法を用いた抗がん剤候補化合物の開発. 第 72 回日本生化学会中部支部 例会・シンポジウム, 岐阜大学医学部記念会館, 2008.5.24
- 13) 石川岳志. 量子化学計算によるプリオンタンパク質と低分子化合物との相互作用解析. 2008 年プリオン研究会 Prion Symposium 2008, 北海道上川郡新得町, サホロリゾート, 2008.8.29-30
- 14) 桑田一夫. Thermodynamics of quantum cryptography for representation of prion. 2008 年プリオン研究会 Prion Symposium 2008, 北海道上川郡新得町, サホロリゾート, 2008.8.29-30
- 15) 武藤淳二. *in silico* スクリーニングによる多様な抗プリオン病リード化合物の同定. 2008 年プリオン研究会 Prion Symposium 2008, 北海道上川郡新得町, サホロリゾート, 2008.8.29-30
- 16) 武藤淳二. 大規模な化合物データベースを用いたプリオン病治療薬リード化合物の探索～抗プリオン活性を示す多様な低分子化合物の発見. 第 146 回日本獣医学会学術集会, ワールドコンベンションセンター サミット, シーガイア, 2008.9.24-26
- 17) 武藤淳二, 山口圭一, 松本友治, 鎌足雄司, 桑田一夫. 4 塩基コドン法によるピンポイント蛍光標識プリオン蛋白質の作製. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山コンベンションセンター, 2008.10.26-28
- 18) 上田敦史, 萩原恭二, 中村寛則, 渡邊俊樹, 桑田一夫, 間 陽子. 抗インフルエンザ薬の開発を目指した Nucleoprotein 結合化合物のスクリーニング. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山コンベンションセンター, 2008.10.26-28
- 19) 石倉孝一, 桑田一夫. GN8-プリオン蛋白質間相互作用の分子動力学シミュレーションによる解析. 第 46 回日本生物物理学会年会, 福岡国際会議場, 2008.12.3-5
- 20) 早野陽介, 鎌足雄司, 桑田一夫. 抗プリオン化合物の作用機構による分類. 第 46 回日本生物物理学会年会, 福岡国際会議場, 2008.12.3-5
- 21) 山口圭一, 松本友治, 武藤淳二, 桑田一夫. シーディングによるマウス PrP アミロイド線維の伝播. 第 46 回日本生物物理学会年会, 福岡国際会議場, 2008.12.3-5
- 22) 鎌足雄司, 武藤淳二, 中村寛則, 早野陽介, 桑田一夫. ケミカルシャペロンとして働く抗プリオン化合物群の同定. 第 46 回日本生物物理学会年会, 福岡国際会議場, 2008.12.3-5
- 23) 山本典史, 桑田一夫. プリオン病における毒性作用の発現機構. 遷移金属イオンの生体作用を軸とした分子論的解析. 第 46 回日本生物物理学会年会, 福岡国際会議場, 2008.12.3-5
- 24) Yoshimura Y, Sakurai K, Chatani E, Kameda A, Sakai M, Yamaguchi K, Naiki H, Goto Y. B2 ミクログロブリンのフラグメントが形成するアミロイド線維構造の構造解析. 第 46 回日本生物物理学会年会, 福岡国際会議場, 2008.12.3-5
- 25) Kuwata K. Regulation of protein conformation by rationally designed drugs. International Symposium on

- Multi-Scale Dynamic of Protein Complex Formation and Function, The University of Tokyo, 2009.7.14-16
- 26) Kuwata K, Kimura T, Kamatari YO, Hosokawa-Muto J, Yamaguchi K, Ishikawa T, Ishikura T, Yamamoto N, Okuda Y. Rational design of anti-prion compounds targeting the PrP characteristic sites. Prion2009, Thessaloniki-Chalkidiki Greece, 2009.9.23-25
- 27) Hosokawa-Muto J, Yamaguchi K, Kamatari YO, Kuwata K. Development of double-fluorescent-labeled prion protein system for FRET analysis. VIII European Symposium of The Protein Society, Zurich Switzerland, 2009.6.14-18
- 28) Nakamura H, Hosokawa-Muto J, Kamatari YO, Kuwata K. New evaluation scheme for anti-prion compounds using ensemble of docking modes. VIII European Symposium of The Protein Society, Zurich Switzerland, 2009.6.14-18
- 29) Kamatari YO, Hosokawa-Muto J, Nakamura H, Hayano Y, Kuwata K. Identification of a variety of anti-prion compounds that acts as chemical chaperons. VIII European Symposium of The Protein Society, Zurich Switzerland, 2009.6.14-18
- 30) Yamamoto N, Kuwata K. Regulating Conformation of Prion Protein through Ligand Binding. The 23rd Symposium of The Protein Society, Boston Massachusetts, 2009.7.24-29
- 31) 桑田一夫. 低分子化合物による難治感染症克服—ケミカルバイオロジーから創薬—異常プリオンを抑える物質の発見とそのメカニズムの解明. 第 147 回日本獣医学会学術集会, 栃木県総合文化センター, 2009.4.2-4
- 32) 山本典史, 桑田一夫. 抗プリオン化合物の作用機序: ケミカルシャペロンによるプリオンタンパクの構造制御. 第 3 回分子科学討論会, 名古屋大学, 2009.9.21.-24
- 33) 武藤淳二, 山口圭一, 鎌足雄司, 桑田一夫. アンバーおよび 4 塩基コドンを用いたデュアルピンポイント蛍光標識プリオン蛋白質の合成. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 都市センターホテル, 2009.10.25-27
- 34) 桑田一夫. プリオン病—感染メカニズムとダイナミクスに基づく創薬. 日本生物物理学会第 47 回年会, アスティとくしま, 2009.10.30-11.1
- 35) 山本典史, 桑田一夫. ケミカルシャペロンとして働く抗プリオン化合物 GN8. 日本生物物理学会第 47 回年会, アスティとくしま, 2009.10.30-11.1
- 36) 山口圭一, 松本友治, 武藤淳二, 桑田一夫. シーディングによる 2 種類のプリオンアミロイド線維の伝播. 日本生物物理学会第 47 回年会, アスティとくしま, 2009.10.30-11.1
- 37) 木村 力, 武藤淳二, 鎌足雄司, 桑田一夫: 抗プリオン化合物 GN8 の類縁体合成および活性評価. 第 40 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 岐阜大学, 2009.11.7-8
- 38) 桑田一夫. 論理的創薬による人獣共通感染症の治療薬開発. 第 84 回日本感染症学会総会, 国立京都国際会館, 第 84 巻臨時増刊号, 2010.4.5-6
- 39) 桑田一夫. 素数と生物その 2「21 世紀の新パラダイム」(オーガナイザー) 数論、ダイナミクス、プリオン. 生物物理第 48 回年会講演 予稿集 29-36, 東北大学・川内北キャンパス, 2010.9.20-22

- 40) 桑田一夫. プリオン立体構造変換機構の
解明と医薬シャペロンの論理的開発. 第
14 回創薬情報研究会, 新大阪マルビル新
館, 2010.5.31
- 41) 桑田一夫. プリオン病と理論的創薬. 第
56 回日本薬学会東海支部大会, 岐阜薬科
大学, 2010.7.3

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

プリオン病診断のためのモノクローナル抗体の応用 ヒト H-FABP 特異的モノクローナル抗体の作製と検出系の構築

研究分担者：松田 治男 広島大学大学院生物圏科学研究科
研究分担者：畠田 昌至 広島大学大学院生物圏科学研究科
研究協力者：佐藤 克也 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
研究協力者：西田 教行 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

研究要旨

本研究において作製した心臓型 FABP(H-FABP)特異的モノクローナル抗体(ニワトリ抗体およびマウス抗体)を活用して髄液中の H-FABP の検出のための ELISA 系を構築し、その実用性を評価した。これまでに作製したニワトリモノクローナル抗体(25 種類)とマウスモノクローナル抗体(5 種)について精査を行った。その結果、マウスモノクローナル抗体(3E9)を固相化抗体、ニワトリモノクローナル抗体(HUFa10)を検出抗体にした組み合わせで、32 例の髄液のうち 19 例全例の CJD を検出できた。また、検出用抗体に別のニワトリモノクローナル抗体(HUFa26)の組み合わせで計 120 例の髄液(54 例の CJD 典型例を含む)を調べ、高精度な検出系になることを確認した。

A. 研究目的

CJD の有用な髄液マーカーとしては、タウタンパク質、14-3-3 タンパク質などの他に H-FABP(1)の検出が注目されている。本研究では、ヒトプリオン病診断用の H-FABP 検出系を構築し、これを用いて計 150 例以上の髄液サンプルで H-FABP の検出を試みた。

B. 研究方法

1. FABP

用いる抗体の FABP 型特異性を調べるために、入手可能であった L-FABP、H-FABP、A-FABP、E-FABP、B-FABP および M-FABP の 6 種の FABP を使用した。

2. 抗体

組換えヒト H-FABP を高度免疫した BALB/C 純系マウス及び HB-15 純系ニワトリの脾細胞を出発材料として、抗 H-FABP モノクローナル抗体を作製した。マウス抗体

は細胞融合法により、ニワトリ抗体はファージディスプレイ法で作製した。なお、ニワトリ抗体は最終的に真核系細胞で発現させた二価抗体(IgY 型抗体)を構築した。

5 種のマウスモノクローナル抗体の中から 3E9(IgG1)を選抜して固相化抗体として使用した。一方、検出用抗体としては、25 種のニワトリモノクローナル抗体の中から 2 種(HUFa10 および HUFa26)を選抜し、組換え IgY 型抗体を精製した後、パーオキシダーゼ(HRP)を標識して使用した。H-FABP の検出は、3E9-HUFa10 あるいは 3E9-HUFa26 の組み合わせのサンドイッチ ELISA 系で実施した。反応時間は、最終的に一次反応を 37°C・30 分、二次反応を 37°C・30 分で行い、発色は OPD を用いて行った。

(倫理面への配慮)

研究に使用する実験動物は、広島大学実験

動物取扱規定に遵守して取り扱った。ヒトプリオン病他の脳脊髄液を用いた H-FABP の検出は長崎大学で実施した。実施に当たって、長崎大学倫理委員会の規定に従った。

C. 研究結果

1. 3E9-HUFa10 系での髄液検査

プリオン病患者及び他の神経疾患患者、健康人の脳脊髄液を H-FABP 検査試料として、設定条件でサンドイッチ ELISA を実施した。その結果、既存の H-FABP 検出用キットよりも高感度に H-FABP を検出でき、更に偽陽性も見られなかった(図 1)。

2. 固相化抗体 3E9 の交差反応性の再検討

H-FABP 検出のためのサンドイッチ ELISA で用いる固相化抗体 3E9 は FABP 交差反応性を再検討した結果、3E9 抗体は H-FABP と強く反応するものの、A-FABP および M-FABP と弱く交差する抗体であることが判明した。

3. 髄液多検体を用いた検査系の再評価

3E9-HUFa10 系を用いた髄液検査において、図 1 に示した通り、100% の CJD 診断効果が認められた。この系で用いた組換えニワトリモノクローナル抗体 HUFa10 の生産系が少し劣ることから、多数ある抗 H-FABP ニワトリモノクローナル抗体の中から比較的反応性の優れた HUFa26 を選び、3E9-HUFa26 系を用いて 120 例の髄液検査を実施した。その結果を図 2 にまとめた。120 例のうち、54 例は classical CJD で、有意に高値を示した。また possible CJD 25 例もまた、non-CJD 41 例と比較し有意であった。

D. 考察

CJD 患者の髄液中に H-FABP が出現する理由は正確にはわかっていないが、これまでの報告(1)を元に、H-FABP 特異抗体(マウス抗体とニワトリ抗体)を作製し、サンドイッチ ELISA を実施した。3E9-HUFa10 および

3E9-HUFa26 のいずれの系でも 100% の高感度で CJD を診断することができた。感度の点で優れた 3E9-HUFa26 の系は今後有望な CJDF 診断法の一つとなるだろう。

E. 結論

ニワトリ抗体とマウス抗体を活用した H-FABP 検出のためのサンドイッチ ELISA を構築し、CJD の髄液検査を実施し、その有効性を実証した。

[参考文献]

- 1) Guillaume E, Zimmermann C, Burkhard PR, Hochstrasser DF, Sanchez J-C. A potential cerebrospinal fluid and plasmatic marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics*, 3 : 1495-1499, 2003

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Ishigaki Y, Katagiri H, Gao J, Yamada T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Kaneko K, Ogihara T, Ishihara H, Sato Y, Takigawa K, Nishimichi N, Matsuda H, Sawamura T, Oka, Y. Impact of plasma oxidized LDL removal on atherosclerosis. *Circulation* 118 : 75-83, 2008
- 2) Iwamoto S, Nishimichi N, Tateishi Y, Sato Y, Horiuchi H, Furusawa S, Sawamura T, Matsuda H. Generation and characterization of chicken monoclonal antibodies against human LOX-1. *mAbs* 1 : 357-363, 2009
- 3) Fujita Y, Kakino A, Nishimichi N, Yamaguchi S, Sato Y, Machida S, Cominacini L, Delneste Y, Matsuda H,

Sawamura T. Oxidized LDL receptor LOX-1 binds to C-reactive protein and mediates its vascular effects. Clin Chem 55 : 289-294, 2009

K, Yoshimoto R, Sawamura T. LOX-1 index, a novel predictive biochemical marker for coronary heart disease and stroke. Clin Chem 56 : 550-558, 2010

- 4) Nishimichi N, Higashikawa F, Kinoh HH, Tateishi Y, Matsuda H, Yokosaki Y. Polymeric osteopontin employs integrin $\alpha 9 \beta 1$ as a receptor and attracts neutrophils by presenting a de novo binding site. J Biol Chem 284 : 14769-14776, 2009
- 5) Sakaguchi S, Ishibashi D, Matsuda H. Antibody-based immunotherapeutic attempts in experimental animal models of prion diseases. Expert Opin 19 : 907-917, 2009
- 6) Matsui Y, Satoh K, Matsukura K, Watanabe T, Nishida N, Matsuda H, Sugino M, Shirabe S, Eguchi K, Kataoka Y. Development of an ultra-rapid diagnostic method based on heart-type fatty acid binding protein levels in the CSF of CJD patients. Cell Mol Neurobiol 30 : 991-999, 2010
- 7) Inoue N, Okamura T, Kokubo Y, Fujita Y, Sato Y, Nakanishi M, Yanagida K, Kakino A, Iwamoto S, Watanabe M, Ogura S, Otsui K, Matsuda H, Uchida

2. 学会発表

- 1) 畠田昌至, 松田治男, 松井佑貴, 佐藤克也. プリオン病診断のためのモノクローナル抗体の応用ーヒトH-FABP 特異的モノクローナル抗体の作製と検出系の構築ー. プリオン研究会, 新得町, 2008.8.29
- 2) Hatada M, Matsui Y, Sato K, Shirabe S, Matsuda H. Development of a sandwich ELISA for detection of FABP in cerebral spinal fluid from CJD patients. Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, 2010.7.24

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

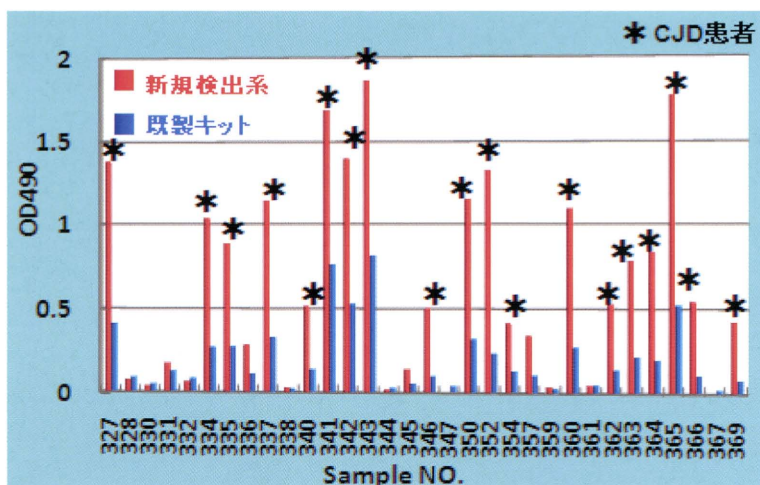


図1 sCJDを含む脳疾患患者髄液からのH-FABPの検出 * : CJD患者試料を示す

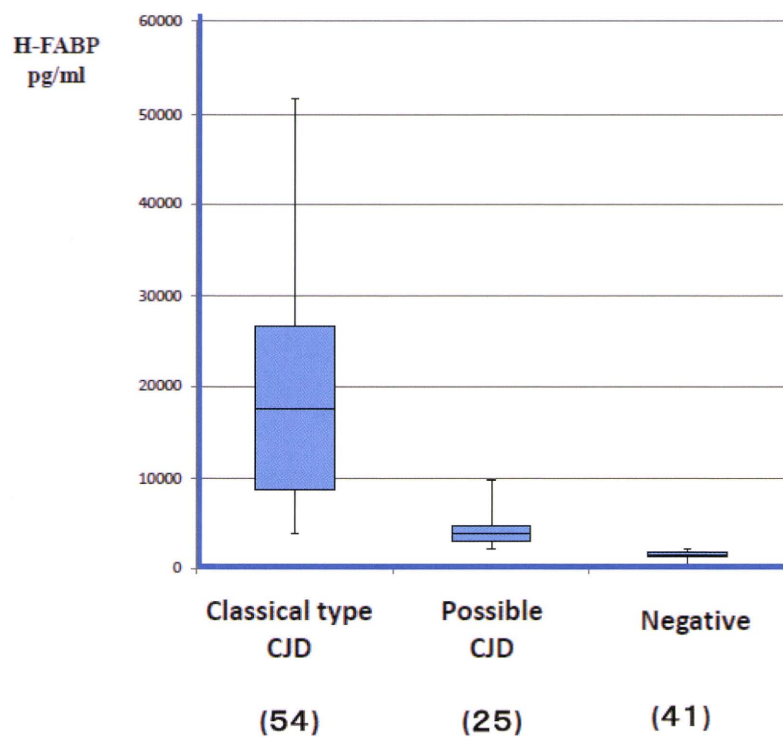


図2 3E9-HUFa26系を活用した髄液検査

Real-time QUIC 法 (QUaking-Induced Conversion) による クロイツフェルトヤコブ病患者由来髄液中の PrP^{Sc} の検出

研究分担者：新 竜一郎	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究分担者：佐藤 克也	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究分担者：佐野 和憲	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究分担者：布施 隆行	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究分担者：山口 尚宏	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究分担者：石橋 大輔	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究分担者：松原 岳	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究分担者：中垣 岳大	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究分担者：山中 仁木	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究分担者：調 漸	長崎大学医学部・歯学部附属病院	へき地病院再生支援・教育機構	
研究分担者：山田 正仁	金沢大学大学院医学系研究科	脳病態医学講座脳老化・神経病態学(神経内科学)	
研究分担者：水澤 英洋	東京医科歯科大学大学院	医歯学総合研究科	脳行動病態学 脳神経機能病態学分野
研究分担者：北本 哲之	東北大学大学院	医学系研究科附属創生応用医学研究センター	プリオン蛋白研究部門
研究分担者：西田 教行	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野

研究要旨

我々は、大腸菌から精製したリコンビナント PrP(*rPrP-sen*)を試験管内で異常型 (*rPrP-res*)に、高い効率で変換する方法を開発し、それを用いて、新たなプリオン病の診断法への応用を試みた。この方法は、多量の *rPrP-sen* とごく少量の感染動物由来の PrP^{Sc}を混合し、間欠的に攪拌を繰り返すことにより、*rPrP-sen* から *rPrP-res* への変換反応を試験管内で劇的に促進させることができるというものである (Quaking-Induced Conversion ; QUIC 法)。さらに、この QUIC 法をプログラム可能な攪拌機能のついた蛍光プレートリーダーとアミロイドフィブリル生成のモニターに使用されるチオフラビン T(ThT)測定とを組み合わせることにより、ほぼ real-time で *rPrP-res* の増幅過程を測定可能な系を確立した (real-time QUIC 法)。この real-time QUIC 法を用いることにより、CJD 患者由来髄液中の異常型 PrP を増幅し検出することに成功し、CJD の生前確定診断の可能性を大きく高めた。

A. 研究目的

近年、試験管内で異常型プリオンタンパク (PrP^{Sc})を増幅する方法が開発され、プリオン病の診断法への応用が摸索されている。しかし、いまだクロイツフェルトヤコブ病 (CJD) を始めとするヒトのプリオン病での高感度な

PrP^{Sc} 検出の成功例は報告されていない。本研究ではヒトプリオン病に適応可能な試験管内異常型プリオンタンパク増幅法を新規に開発し、それを用いて CJD 患者由来髄液中に含まれるごく微量の PrP^{Sc}を増幅することにより、CJD の生前確定診断法を確立すること

を目的とする。

B. 研究方法

大腸菌からヒト配列の *rPrP-sen* をアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、変換反応の基質として用いた。CJD 患者由来の brain homogenate をシードとして QUIC 反応の条件検討を行った。変性剤(グアニジン塩酸、尿素)の濃度、塩濃度、pH, *rPrP-sen* の濃度などを中心として行い、real-time QUIC 法の最適条件を決定した。

その後、実際に日本での CJD の definite case 由来髄液 18 例と非 CJD 症例由来髄液 35 例を用いて real-time QUIC 法を行い、感度、特異度について検証した。さらに Australian National Creutzfeldt-Jakob Disease Registry との共同研究により提供された 30 例の髄液について Blind test を行い、この方法の有用性について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究課題ではプリオン感染試料、特に CJD 感染試料を用いるのですべての実験はバイオハザード実験室にて執り行い、感染性物質の外部への搬出等のない様細心の注意を払って行った。患者検体は長崎大学医学部付属病院その他の共同研究グループにより患者・家族のインフォームドコンセントの下、採取され、供給された。

C. 研究結果(図表を 1~2 点添付)

日本での CJD 髄液、15/18 で陽性であった。一方、陰性コントロールとして用いた CJD 以外の疾患由来の髄液 35 症例はすべて陰性であった。Blind test では CJD 髄液、14/16 で陽性、非 CJD 髄液ではすべて陰性であった。

D. 考察

日本での症例での感度は 83.3%、特異度は 100%、一方オーストラリア症例での Blind

test では感度は 87.5%、特異度は 100%であった。この結果はこれまで CJD の髄液マーカーとして用いられている 14-3-3 タンパクを感度では同等、特異度では上回るものである。また real-time QUIC 法が髄液中の PrP^{Sc} を増幅して検出する方法であることから CJD の診断的意義は非常に高いと考えられる。

E. 結論

今回の研究により、real-time QUIC 法は CJD の診断に有用性が高く、特に生前の確定診断が髄液検査により可能となったと考えている。

F. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, Klug G, McGlade A, Collins SJ, Nishida N. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nature Medicine* 2011, in press
- 2) Wiham JM, Orru CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, Meade-White KD, Taubner LM, Timmes A, Caughey B. Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathogens* 6(12) : e1001217, 2010.12.2
- 3) Kim JI, Cali I, Surewicz K, Kong Q, Raymond GJ, Atarashi R, Race B, Qing L, Gambetti P, Caughey B, Surewicz WK. Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors. *J Biol Chem* 285(19) :