

図 1. RT-Quic 法の至適条件の検討

(上段) 基質として rMoPrP、seed として Chandler 株感染マウス脳乳剤を使用した。

(下段) 基質として rHaPrP、seed として 263K 株感染ハムスター脳乳剤を使用した。

PBS は no-seed 反応、Mock は非感染マウス(上段)および非感染ハムスター(下段)の脳乳剤を seed とした。N=4 で実施し、4 検体中の陽性数を分子に示した。

7. 非定型 BSE 感染牛における異常型プリオンタンパク質蓄積の経時的解析

研究分担者 福田 茂夫 道総研 畜産試験場 基盤研究部 生物工学グループ 研究主任

研究協力者 岡田 洋之 農研機構 動物衛生研究所 インフルエンザプリオン病研究チーム

研究要旨

脳内接種による非定型 BSE 感染実験により、非定型 BSE の PrP^{Sc} の脳内出現部位および経時的な蓄積量の変化を明らかにする。また非定型 BSE の PrP^{Sc} が、物理・化学的処理によって受ける影響を明らかにし、BSE の発生機序に関する知見を得る。本年度は脳内接種による非定型 L 型 BSE 感染実験牛 4 頭を作出し、2 頭を接種後 4.7 ヶ月で病理解剖した。脳内 PrP^{Sc} の出現部位と蓄積量をウエスタンブロット法を用いて解析したところ、1 頭は中脳に、他の 1 頭は中脳、橋および延髄にわずかな PrP^{Sc} を検出した。脳内接種による非定型 L 型 BSE 感染牛の臨床症状が接種後 11 ヶ月頃から確認されることから、臨床症状が出現する約 6 ヶ月前に PrP^{Sc} が蓄積することが示唆された。

A. 研究目的

1986 年に英国で初めて確認された牛海綿状脳症 (BSE) は、1 種類のプリオン株 (定型 BSE) によると考えられてきたが、2003 年からこれまでに 90 例以上の非定型 BSE (L 型および H 型) と呼ばれる異なるプリオン株による BSE が日本を含む多くの国で散発的に確認されている。非定型 BSE 患者は、ほとんどが 8 歳以上の高齢牛で、定型 BSE の発生状況との関連性が低いことから、孤発性 (自然発生的) であることが示唆される。道総研畜産試験場では、これまでに脳内接種による定型または非定型 L 型 BSE の牛への感染試験を実施し、定型 BSE では、臨床症状と発症時期、異常プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の出現部位を明らかにした。また、非定型 L 型 BSE は、臨床症状の出現時期が定型 BSE よりも早いことから、そのプリオンは牛に対して病原性が強いことが示唆された。しかし、非定型 BSE の発生機序は不明であり、BSE 対策の残された問題として、消費者から原因究明を要望する声が挙がっていることから、非定型 BSE 感染牛を用いた試験研究による知見の集積が必要である。

本研究では牛への脳内接種による非定型 BSE 感染実験により、非定型 BSE の PrP^{Sc} の脳内出現部位および経時的な蓄積量の変化を明らかにする。また非定型 BSE の PrP^{Sc} が、物理・化学的処理によって受ける影響を明らかにし、BSE の発生

機序に関する知見を得る。

本年度は、脳内接種により非定型 L 型 BSE 感染牛を作出し、4.7 ヶ月間の経過観察を行った 2 頭について、病理解剖し、脳内 PrP^{Sc} の出現部位と蓄積量を解析した。また非定型 L 型 BSE 感染脳乳剤を 70℃ から 150℃ で加熱処理し、PrP^{Sc} を解析した。

B. 研究方法

1) 非定型 BSE 感染牛の PrP^{Sc} の脳内出現部位と経時的蓄積量

ホルスタイン種子牛 4 頭を用いた。各供試牛は麻酔処置し、直径 2mm のピンドリルで前頭骨右側を貫通し、その貫通穴より 18G のカテラン針を用いて中脳を標的に穿刺し、非定型 BSE (L 型) 感染牛の 10% 脳乳剤 1ml を脳内接種した。術後は BSE 隔離牛舎にて飼養し、経過観察を行った。

脳内接種した 2 頭について、経過観察を行った後 (4.7 ヶ月間) 病理解剖し脳を採取した。脳内 PrP^{Sc} の出現部位と蓄積量をウエスタンブロット (WB) 法を用いて解析した。その他 2 頭については経過観察中である (7 および 9 ヶ月間を予定)。

2) 物理・化学的処理による非定型 BSE の PrP^{Sc} への影響

非定型 L 型 BSE 感染脳を界面活性剤溶液中でビーズ破碎し、乳剤を作製した。乳剤を 70、100、

110、120、135 または 150℃でそれぞれ加熱処理した。処理後、乳剤をプロテイナーゼ K で消化し、抗 PrP 抗体により PrP^{Sc}を WB 法により検出し、PrP^{Sc}の変化を解析した。

(倫理面への配慮)

サンプル採取および分析は、研究従事者の危険排除に努めた。また動物実験は、北海道立総合研究機構畜産試験場動物実験委員会の承認を得、「地方独立行政法人北海道立総合研究機構におけるライフサイエンス実験に関する倫理及び安全管理規程」を遵守し実施した。感染性試料および感染動物の取り扱いは、「動物の伝達性海綿状脳症の実験指針」を遵守した。

C. 研究結果

1) 非定型 BSE 感染牛の PrP^{Sc} の脳内出現部位と経時的蓄積量

非定型 L 型 BSE 感染牛 2 頭の脳および脊髄を解析したところ、No.6981 では中脳に、No.7018 では中脳、橋および延髄にわずかな PrP^{Sc} を検出した (図 1)。

2) 物理・化学的処理による非定型 BSE の PrP^{Sc} への影響

非定型 L 型 BSE 感染脳乳剤を加熱処理したところ、70℃では白濁した状態を維持していたが、100℃以上で固形分の凝集が見られた。135℃以上では液状部分が透明となり、150℃では黄褐色に変色した。また WB では、70℃から 110℃まで明瞭な PrP^{Sc} のバンドが確認され、分子量およびバンドパターンに変化はなかった (図 2)。

D. 考察

今回解析した接種後 4.7 ヶ月の脳内接種非定型 L 型 BSE 感染牛 2 頭に蓄積する PrP^{Sc} は、脳幹部に局限し、蓄積量もわずかであったため、PrP^{Sc} を検出できる初期段階であったと考えられる。脳内接種による非定型 L 型 BSE 感染牛の臨床症状が接種後 11 ヶ月頃から確認され、約 16 ヶ月で起

立困難等となることから、臨床症状が出現する約 6 ヶ月前、終末期の約 11 ヶ月前に脳幹部から PrP^{Sc} を検出できることが示唆された。

加熱した非定型 L 型 BSE の PrP^{Sc} は、分子量やバンドパターンに変化は無かった。次年度、PrP^{Sc} の増幅性などを解析する予定である。

E. 結論

非定型 L 型 BSE 感染牛の臨床症状が確認される約 6 ヶ月前に PrP^{Sc} を検出できることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 福田 茂夫 脳内接種による BSE 感染牛の異常プリオンタンパク質の分布 (研究紹介) 北海道獣医師会雑誌 2015 (in press)

2. 学会発表

1) Fukuda, F., Fujii, T., Kageyama, S., Hirayama, H., Naito, A., Okada H., Yokoyama, T. Change of the resting score measured by pedometer as the index of clinical symptom of L-type BSE affected cattle. Asian Pacific Prion Symposium 2014 (July, 6-7, 2014, Jeju, Korea)

2) 福田茂夫、陰山聡一、藤井貴志、平山博樹、内藤学、岡田洋之、横山隆 非定型 BSE 感染牛の歩様と行動量の変化 日本産業動物学会 (北海道) (9月11-12日、札幌)

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

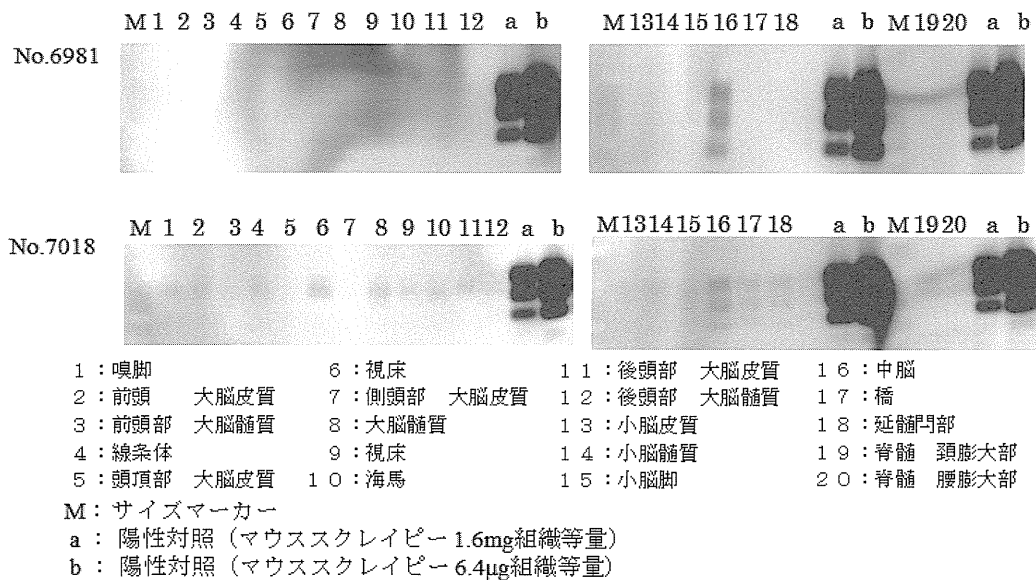


図1 接種後 4.7 ヶ月で解剖した非定型 L 型 BSE 感染牛の脳および脊髄の WB 法による解析

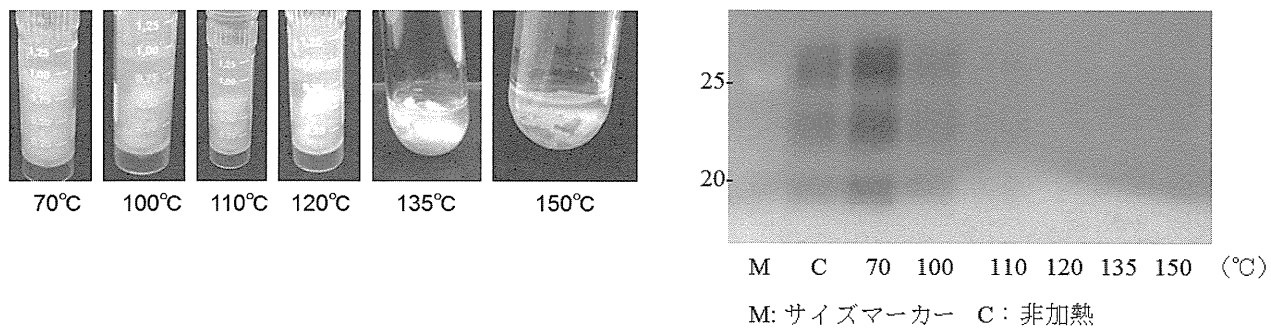


図2 70°Cから 150°Cで加熱処理した非定型 L 型 BSE 感染脳の WB 法による PrP^{Sc} 解析

8. 非定型 BSE および CWD プリオンの生物学的性状解析

研究分担者 帯広畜産大学 基礎獣医学研究部門 室井喜景 助教

研究要旨 慢性消耗病(CWD)は、シカ類に発生するプリオン病で米国およびカナダで発生がみられている。CWD プリオン(PrP^{CWD})はハムスターには伝達しないとされてきたが、PrP^{CWD} がハムスターに伝達することが確認された。3~4 週齢のハムスター、モルモット、スナネズミ、ラットに CWD(PrP^{CWD})感染エルク脳乳剤、L 型 BSE(BSE/JP24)(PrP^{LBSE})感染ウシ脳乳剤と、スクレイピーハムスター馴化株 263K(PrP^{263K})脳乳剤をハムスターに接種した。PrP^{CWD}、PrP^{LBSE} は共にハムスターにのみ伝達可能であった。発症までの平均日数は、PrP^{CWD} 接種ハムスターの初代では 632 日、2 代目では 297 日、L 型 BSE 接種ハムスターの初代では 496 日、2 代目では 183 日、3 代目では 172 日、PrP^{263K} 接種ハムスターでは 93 日であった。PrP^{CWD} 接種ハムスターでは、中脳、間脳視床下部、脊髄に空胞形成がみられ、免疫染色では、同部位へのび慢性沈着に加え、神経細胞周囲の星状沈着や血管壁への放射状沈着が特徴であった。PrP^{LBSE} 接種ハムスターでは、大脳皮質、海馬、間脳、小脳髄質、脊髄に空胞形成がみられ、免疫染色では、血管周囲や神経網に小斑状に沈着していた。PrP^{263K} 接種ハムスターでは、脳全般と脊髄に空胞形成がみられ、免疫染色では、脳全般に強い沈着がみられ、血管周囲に大型斑状から顆粒状沈着として認められた。今回の研究において、PrP^{CWD} のハムスターへの直接伝達を確認されたことにより、直接的な感染モデルが作出できた。病理組織学的に、PrP^{CWD}、PrP^{LBSE}、PrP^{263K} にはそれぞれ特徴的な PrP^{res} 沈着部位、沈着パターンがみられ、これらの株の生物学的性状が異なることが明らかとなった。

A. 研究目的

シカのプリオン病である慢性消耗病(CWD)は 1960 年代にアメリカの養鹿場のミュールジカで発見され、慢性の消瘦、衰弱が主な臨床症状であることからこの病名がつけられた。当初、人工飼育によるストレスと栄養素の欠乏によるものと考えられていたが、病理学的にスクレイピーや BSE と同様の伝達性海綿状脳症であることが 1991 年に判明した。CWD は野生のエルク、ミュールジカ、オジロジカでもみられ、当初、その感染はアメリカのコロラド州、モンタナ州に限局していたが、近年、カナダでも野生ジカでの発生が報告された。2001 年には韓国で、カナダから輸入したエルクに発生がみられ、その後も断続的に発生が報告されている。

CWD では、BSE などの他の動物プリオン病と同様の運動失調を主症状とするが、BSE に比べ歩様異常は軽度で、嚥下障害に唾液過多や軋歯が特徴的な臨床症状として知られている。脳内における PrP^{res} 沈着部位は中脳、間脳、視床、視床下部、嗅皮質、延髄で主にみられ、経口接種、脳内接種でも沈着部位は同じとされている。自然感染例と経口接種例では、PrP^{res} 沈着は、脳に加え、扁桃、GALT、咽頭リンパ節、脾臓など広範囲にみられることが報告されている。さらに、自然発生例で

は骨格筋や、心筋への沈着が特徴とされている。CWD の感染様式は明確にされていないが、唾液や糞便を介した水平伝播の可能性が疑われている。また、ヒツジのスクレイピーと同様に、CWD についても母子感染の可能性も否定できないとされている。

本邦においては、これまで CWD の発生は報告されていないが、北海道ではニホンシカの亜種であるエゾシカ、本州ではニホンシカ、ニホンカモシカが野生動物として生息しており、これら疾患についての知見を蓄積することは重要と考えられた。今回、カナダより輸入されたエルク由来 CWD 感染脳の一部を分与されたので、それを用いて各種実験動物へ伝達試験を試みるとともに、ウシでみられた非定型 BSE(L 型 BSE)、ヒツジ由来スクレイピーハムスター馴化株 263K の 2 つのプリオン株と比較し、これら株の生物学的性状を解析することを目的とした。

B. 研究方法

1) 動物

プリオン接種動物として、ハムスター(4~5 週齢、雌)、ラット(4~5 週齢、雌)、スナネズミ(4~5 週齢、雌)、モルモット(4~5 週齢、雌)を使用した。また、未接種陰性対照として、ハムスター(4

～5 週齢、雌)を使用した。

それぞれの実験動物への投与材料は、動物衛生研究所から分与された CWD 感染エルク(Elk, 132M/M)(PrP^{CWD})の脳を用いて作製した 2.5%脳乳剤入りリン酸緩衝液(PBS)、日本で発生した L 型 BSE 感染ウシ(BSE/JP24)(PrP^{LBSE})の脳を用いて作製した 2.5%脳乳剤入り PBS、ヒツジ由来スクレイピーハムスター馴化株である 263K 感染ハムスターの脳(PrP^{263K})を用いて作製した 10%脳乳剤入り PBS を使用した。自然発生動物の脳乳剤を接種した実験動物を初代とした。初代の実験動物のうち、臨床症状あるいは病理学的に陽性と判断した初代実験動物の脳から脳乳剤を作製し、2 代目とした。さらに、同様の方法で 3 代目まで継代した。

脳内接種は、200 μ l ピペットチップを 26G の注射針に装着し、二段針としたものと、1mm のシリンジを用いて、脳内接種を行った。接種量は、ハムスターでは、PrP^{CWD} 2.5%脳乳剤入り PBS 50 μ l、PrP^{LBSE} 2.5%脳乳剤入り PBS 20 μ l、PrP^{263K} 脳乳剤入り 10%PBS 20 μ l、ラット、スナネズミでは PrP^{CWD}、PrP^{LBSE} 2.5%脳乳剤入り PBS 30 μ l、モルモットでは、PrP^{CWD}、PrP^{LBSE}、PrP^{263K} を 2.5%脳乳剤入り PBS 100 μ l をそれぞれ脳内接種した。

2) 組織学的検索および免疫組織学的検索

採材した部位は脳、脊髄、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、膵臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、子宮、乳腺、舌、横隔膜、骨格筋(前肢、後肢、内腸腰筋、胸最長筋、腰最長筋)である。採材した組織は 10%中性緩衝ホルマリンで 1 週間固定した後、切り出し、再固定を 2 日間行った。次に、98%蟻酸で 1 時間の処理を行いプリオンの感染性を消失させた。一昼夜水洗した後、定法に則り、脱水、パラフィン包埋を実施し、3 μ m パラフィン切片を作成し、HE 染色を行った。

免疫組織化学的検索では、ハムスターでは、一次抗体として抗 PrP^{res} 抗体である B103 抗体、二次抗体にはウサギ抗体を用いた。モルモットでは一次抗体として抗 PrP^{res} 抗体である 12F10 抗体を用いた。ラット、スナネズミでは、一次抗体として抗 PrP^{res} 抗体である T1 抗体を用いた。二次抗体として抗ウサギあるいは抗マウス HRR 標識抗体 (DAKO Envision Kit, DAKO, U.S.A) を使用した。PrP^{res} 免疫活性賦活化としてオートクレーブ法 (135°C、20 分) を施し、DAB 発色を行った。

3) 体重測定

PrP^{CWD} 接種ハムスター(2 代目)、PrP^{LBSE} 接種ハムスター(3 代目)、PrP^{263K} 接種ハムスターにおいて、接種から解剖まで 1 週間毎に体重を測定し、体重

の推移を記録した。

4) WB

凍結保存した初代・2 代目の PrP^{CWD}、3 代目 PrP^{LBSE}、PrP^{263K} の脳と CWD 感染エルク、L 型 BSE 感染ウシ脳において WB を実施した。

(倫理面への配慮)

動物実験は帯広畜産大学実験動物倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1) 臨床症状および肉眼所見

PrP^{CWD} では、ハムスターにのみ伝達を確認され、沈鬱、ふらつきなどの臨床症状がみられた。PrP^{LBSE} では、ハムスターにのみ伝達を確認され、沈鬱、ふらつきなどの臨床症状がみられた。ハムスター馴化株である PrP^{263K} では、沈鬱、ふらつきなどの臨床症状がみられた。いずれの動物においても、剖検時には、肉眼的に脳外観及び矢状断に著変はみられなかった。その他の臓器でも著変はみられなかった。

それぞれのプリオン株を接種し、発症した動物については生存日数を示した(表 1)。また、それぞれのプリオン株の Attack Rate を図 1、図 2 に示した。

2) 組織学的検索および免疫組織学的検索

PrP^{CWD} 接種ハムスターでは、初代 6 匹中 4 匹で、2 代目 7 匹中 7 匹で、中脳、間脳視床下部、脊髄で神経網内や神経細胞細胞質内に空胞形成が確認された。同部位における抗 PrP^{res} 抗体を用いた免疫染色によって PrP^{CWD} 接種ハムスター初代では、矢状断において局所的で軽微な PrP^{res} 沈着が確認された(図 3)。PrP^{CWD} 接種ハムスター 2 代目では、び漫性、顆粒状、プラーク状の PrP^{res} の沈着が確認された。特に、血管壁への放射状沈着や神経細胞周囲への特徴的な PrP^{res} 沈着が確認された(図 4)。CNS 以外の全身臓器において、病理組織学的な著変は認められなかった。心臓では、抗 PrP^{res} 抗体を用いた免疫染色で、陽性像のようなものが確認されたが、非特異との鑑別が困難だったため、今後の検討課題とした。

PrP^{LBSE} 接種ハムスターでは、初代 6 匹中 6 匹で、2 代目 6 匹中 6 匹で、3 代目 4 匹中 4 匹で、大脳皮質、海馬、間脳、小脳髄質、脊髄で神経網内や神経細胞細胞質内に空胞形成が確認された。同部位における抗 PrP^{res} 抗体を用いた免疫染色によってび漫性、顆粒状の強い PrP^{res} の沈着が確認された。特に、海馬への特徴的な PrP^{res} 沈着が確認され、血管周囲に小型斑状に PrP^{res} が沈着している像も確認された(図 5)。CNS 以外の全身臓器において、病理組織学的な著変は認められなかった。

PrP^{263K} 接種ハムスターでは、4 匹中 4 匹で、脳

全体及び脊髄において神経網や神経細胞細胞質内に空胞変性が確認された。同部位における抗PrP^{res}抗体を用いた免疫染色によってび漫性のPrP^{res}沈着が確認され、一部血管壁周囲にPrP^{res}が大型斑状に沈着する特徴的な像も確認された。

3) 体重計測

PrP^{263K}接種ハムスター、PrP^{LBSE}接種ハムスター、PrP^{CWD}接種ハムスターのすべてで病末期に体重減少が確認された(図6)。

4) WB

PrP^{LBSE}接種ハムスターから得られた脳では、L型BSE自然発症例の脳と同じパターンを示すPrP^{res}が検出されたのに対し、初代PrP^{CWD}接種ハムスターから得られた脳では、CWD自然発症例の脳と同じパターンを示すPrP^{res}が検出されなかった。しかし、2代目の脳のWBでは、CWD自然発症例と同じパターンを示すPrP^{res}が検出された(図7)。

D. 考察

CWDについては、エルク、ミュールジカ、オジロジカのそれぞれで発生したCWDをマウスなどの実験動物に接種し、伝達が試みられてきたが、これまでのところ野生型実験動物への直接伝達には成功していない。このため、シカPrP遺伝子を導入したTgマウスやフェレットに一度伝達し、その感染脳をさらにハムスターなどに伝達しているのが実際である。今回の研究により、エルク由来CWD(PrP^{CWD})はハムスターへ直接伝達することが確認できた。このことは、脳内におけるPrP^{res}沈着部位や沈着パターンを病理組織学的に検索を行うときは、通常脳の前額断組織を用いることが多く、PrP^{CWD}伝達初代ハムスターでみられたようなPrP^{res}沈着が軽微な場合は前額断組織では見落とされていた可能性がある。また、初代ハムスターで、ウエスタンブロットが陰性だったことは、試料の採材部位によっては陰性と判断される可能性があること、さらには、継代が成功しない要因となることを示すものと考えられた。今回CWD自然発症動物から直接ハムスターに伝達できたことから、同様に直接ハムスターに伝達可能なL型BSEやスクレイピーハムスター馴化株との比較が可能となった。

CWD感染ジカでは顕著な消瘦が特徴的な臨床症状として報告されている。この原因については特定されていないが、このプリオン株がもつ生物学的性状の一つと考えられる。このような特徴的な臨床症状が伝達動物においてもみられるかどうか検討を行った。今回研究で用いたプリオン株すべてにおいて病末期には体重減少が確認され、PrP^{CWD}接種ハムスターに顕著な変化はみられなかった。脳内接種では、自然発症動物の症状をそ

のまま反映するモデルを作製できなかったことから、感染ルートを変えて検討する予定である。

今回の研究は、自然感染動物からのプリオンの株化が目的であり、脳内接種を実施した。自然感染では、主に経口のルートが考慮されるべきであり、その上でPrP^{res}の脳内分布を比較する必要があると考えられる。しかしながら、脳内接種においても、PrP^{CWD}接種ハムスター、PrP^{LBSE}接種ハムスター、PrP^{263K}ハムスターはそれぞれ脳内におけるプリオン沈着部位や程度が異なっていたことは、それぞれのPrP^{res}の脳内組織親和性が異なることを示し、生物学的性状の違いの一端を示すものと思われた。

今回は、PrP^{res}沈着は脳内にもみ限局していたが、CWD自然発症例では、CNS以外にも脾臓を始めとするリンパ組織や消化管神経叢などの末梢神経系にも沈着が報告されている。摂取されたプリオン蛋白は回腸遠位部で取り込まれ樹状細胞・マクロファージなどの免疫系細胞で増幅した後、神経系に移行し、迷走神経を介して延髄を初めとするCNSに移行すると考えられている。しかしながら、BSEやL型BSE感染ウシでは、このようなリンパ組織への沈着は報告されておらず、CWDとは明らかに異なる。これら馴化株を末梢から摂取した場合の体内動態を検討することは、これらプリオン“株”のさらなる生物学的性状の違いについて明らかにすることができると考える。

E. 結論

CWD感染エルク脳をハムスター接種したところ伝達することができた。野生型実験動物への伝達はこれまでになく、L型BSEやスクレイピー株との生物学的性状について直接比較が可能となった。PrP^{CWD}、PrP^{LBSE}、PrP^{263K}をそれぞれ脳内接種したハムスターはプリオン沈着部位や程度が異なっており、組織親和性がプリオン株により異なることがあきらかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

表 1. 伝達結果と発症までの日数

Prion strain	Hamster	Rat	Gerbil	Guineapig
CWD	6146 ± 8.9	×	×	×
LBSE	495.5 ± 168	×	×	×
263K	92.8 ± 16.2	N.E.	N.E.	N.E.

図 1. CWD 接種hamsterの生存曲線

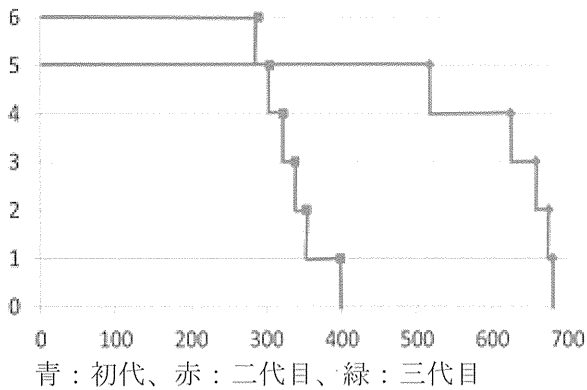


図 2. L型 BSE 接種hamsterの生存曲線

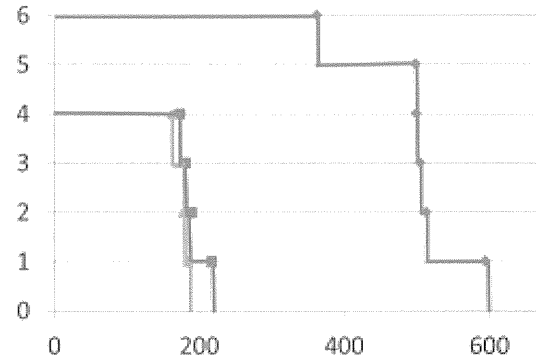


図 3. 初代 CWD hamster 脳

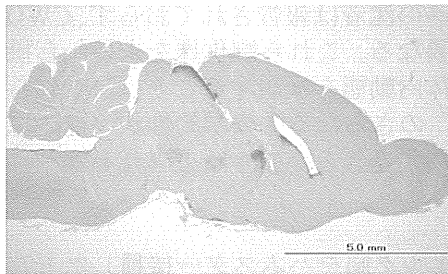


図 4. 初代 CWD hamster 脳

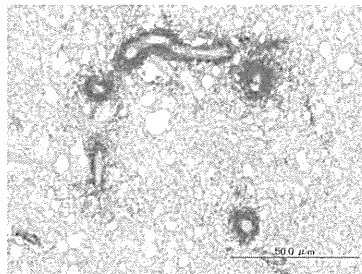


図 5. L型 BSE hamster 脳

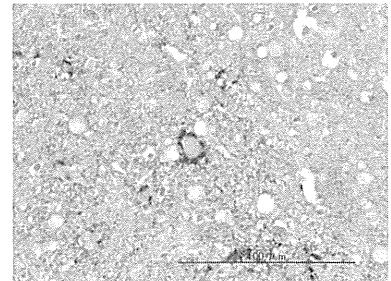


図 6. CWD hamster、L型 BSE hamster 体重推移

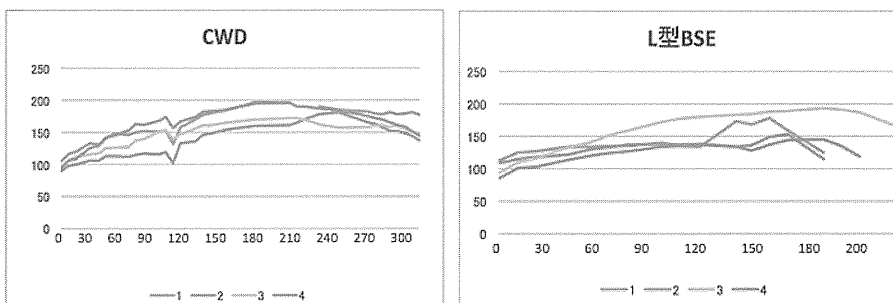
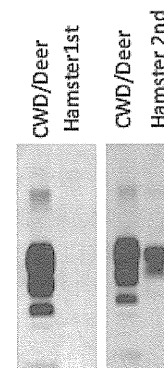


図 7. CWDWB



9. 非定型 BSE 感染牛の末梢組織における異常型プリオンタンパク質蓄積の解析

研究分担者 横山 隆 (独)農研機構動物衛生研究所 企画管理部長

研究協力者 松浦 裕一、岩丸 祥史、岡田 洋之、宮澤 光太郎

(独) 農研機構動物衛生研究所 インフルエンザ・プリオン病研究センター)

研究要旨

非定型牛海綿状脳症(BSE)は自然発症の可能性が示唆されている。非定型 BSE のヒトへの感染リスクを考える上で、可食部筋組織での感染性の有無ならびに感染価を明らかにすることは重要である。本研究では、非定型 BSE 実験感染ウシの筋組織に存在するプリオン感染性を明らかにし、食肉を介した非定型 BSE のヒトへの感染リスクを定量的に評価することを目的とする。H26 年度はトラスジェニックマウスを用い、L-BSE プリオンの感染価を測定する手法を開発した。また、臨床症状期の非定型 BSE 実験感染牛の筋紡錘に異常プリオンタンパク質が沈着することを明らかにした。

A. 研究目的

非定型牛海綿状脳症 (BSE) は、定型 BSE (C-BSE) と異なる生物学的ならびに生化学的性状を示し、L-BSE と H-BSE が存在する。C-BSE プリオンはヒトに感染し変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の原因であり、L-BSE プリオンはこれまでの動物実験でウシだけでなくヒトへの感染リスクも示唆されている。感染因子である異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) が C-BSE もしくは L-BSE、H-BSE の臨床症状期の牛において中枢や末梢の神経系に加えて筋組織にも蓄積しており、可食部筋組織での感染性の有無やその感染価を明らかにすることは、ヒトへの感染リスクを考える上で重要である。本研究では、非定型 BSE 実験感染ウシの筋組織に存在するプリオン感染性を調べ、食肉を介した感染リスクを定量的に評価することを目的とする。

H26 年度は、非定型 BSE プリオンの感染価とマウスの潜伏期間の関係を明らかにして、L-BSE プリオンの感染を定量的に算出する方法を確立する。また、L-BSE 感染ウシの筋組織における PrP^{Sc} の分布部位を免疫組織染色で調べる。

B. 研究方法

1) 終末限界希釈法による Tg マウス感染実験

L-BSE 牛の脳をリン酸緩衝液で 10 倍階段希釈して、ウシ型プリオン蛋白質遺伝子過剰発現型トランスジェニック (Tg) マウスの脳内に投与する。

BSE の症状を呈したマウスを安楽死して、脳での異常型プリオンタンパク質の蓄積をウエスタンブロット法で調べる。PrP^{Sc} の蓄積したマウスを陽性として、Spearman-Kärber 法を用いて牛脳内の L-BSE 感染価を算出する。さらに、希釈液ごとのマウスの潜伏期間と、感染価の関係を解析する。

2) L-BSE 感染牛の筋組織の免疫組織化学染色

国内 24 例目非定型 BSE を脳内投与した後、16 ヶ月で臨床症状を呈した牛の筋肉を用いて、ヘマトキシリン・エオジン染色と抗プリオンタンパク質抗体 F99/97.6.1 (VMRD, Pullman, WA, U.S.A.) での免疫組織化学染色を実施した。

(倫理面への配慮)

本実験は動物衛生研究所バイオセーフティ委員会にて承認され、プリオンの取り扱いは、農林水産省農林水産技術会議事務局の「動物の伝達性海綿状脳症実験指針 (平成 15 年 10 月)」を遵守する。遺伝子改変動物を用いた動物実験は組換え実験委員会ならびに動物実験委員会にて承認され、「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年 6 月)」を遵守する。

C. 研究結果

1) 終末限界希釈法による Tg マウス感染実験

L-BSE 牛脳の 10^{-1} ~ 10^{-5} 希釈液で、PrP^{Sc} 陽性マ

ウスが認められ、 10^{-6} 希釈液では脳内投与後 800 日経過したが陽性 Tg マウスは確認されなかった。Spearman-Kärber 法により L-BSE 牛脳は 1g 中 $10^{6.83}$ LD₅₀ の感染価であると算出され、表のように、L-BSE の感染価に応じた Tg マウスの潜伏期間が明らかとなった(相関係数 $R^2 = 0.98$)。

2) L-BSE 感染牛の筋組織の免疫組織化学染色

L-BSE 臨床症状期の牛の筋組織において、末梢神経との接合部である筋紡錘に PrP^{Sc} が沈着していた (図 a, b)。

D. 考察

L-BSE の臨床症状期の牛の筋組織における PrP^{Sc} の分布を明らかにした。PrP^{Sc} の蓄積部位が筋紡錘に限られていることから、L-BSE の感染性の有無を高感度に調べる必要がある。L-BSE に高感受性の Tg マウスを用いた感染価の測定基準が樹立され、L-BSE 感染牛の筋組織を Tg マウスへの感染実験によって定量的な感染リスクの評価が可能になった。

E. 結論

H26 年度は、L-BSE の感染価を測定する基準を作成し、臨床症状期の L-BSE 牛において筋組織の筋紡錘に PrP^{Sc} が蓄積することを明らかにした。

F. 健康危険情報

これまでの研究成果で国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Langeveld J.PM, Jacobs J.G, Erkens J.HF, Baron T., Andréoletti O., Yokoyama T., Keulen L.JM, Zijderfeld F.G, Davidse A., Hope J., Tang Y., Bossers A. Sheep prions with molecular properties intermediate between classical scrapie, BSE and CH1641-scrapie. Prion 8: 296-305, 2014

2. 学会発表

- 1) 横山ら、動物のプリオン病、生化学 86、p.64 (2014)
- 2) 横山、病原体を封じ込める、AFC フォーラム 8、p.22 (2014)
- 3) 横山ら、第 14 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会抄録集 p.42 (2014)
- 4) 横山、革新的医療研究開発で挑む神経変性疾患、口頭発表 (2015)

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

表 L-BSE 牛脳の内投与 Tg マウスの潜伏期間

希釈液 (log ₁₀)	感染価 (log LD ₅₀ /0.02 mL)	BSE感染率	潜伏期間 (平均日数± 標準偏差)
-1*	4.17	4/4	167 ± 1
-2	3.17	8/8	177 ± 3
-3	2.17	5/5	198 ± 5
-4	1.17	6/6	216 ± 12
-5	0.17	3/6	(255, 266, 271)
-6	-0.83	1/6	(285)
-7	-1.83	0/6	-†
-8	-2.83	0/5	-

* 10%脳乳剤を示す。

† 脳内投与後 800 日経過したが、BSE 感染マウスは確認されなかった。

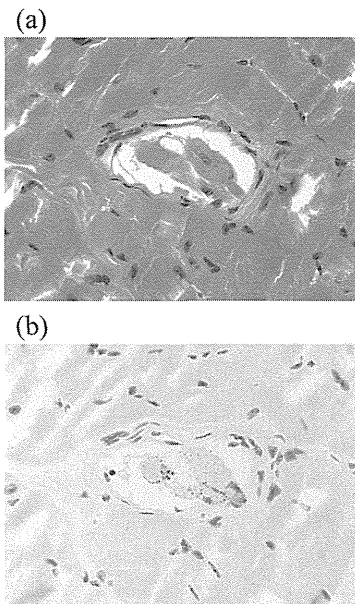


図 L-BSE 発症牛の筋組織のヘマトキシレン・エオジン染色(a)、免疫組織化学染色(b)

抗プリオンタンパク質抗体を用いた免疫組織化学染色により筋紡錘に PrP^{Sc}が検出された。

III. 研究成果に関する刊行一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

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
*Yamasaki T, Baron GS, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M.	Characterization of intracellular dynamics of inoculated PrP-res and newly generated PrPSc during early stage prion infection in Neuro2a cells.	Virology	450-451C	324-335	2014
Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M.	Comparison of anti-prion mechanism of four different anti-prion compounds, anti-PrP monoclonal antibody 44B1, Pentosan polysulfate, chlorpromazine and U18666A, in prion-infected mouse neuroblastoma cells.	PLoS One	9	e106516	2014
Hasebe R, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M.	Temporary upregulation of anti-inflammatory cytokine IL-13 expression in the brains of CD14 deficient mice in the early stage of prion infection.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	454	125-130	2014
Uchida L, Heriyanto A, Thongchai C, Hanh TT, Horiuchi M, Ishihara K, Tamura Y, Muramatsu Y.	Genetic diversity in the prion protein gene (PRNP) of domestic cattle and water buffaloes in Vietnam, Indonesia and Thailand.	J. Vet. Med. Sci.	76	1001-1008	2014
Akasaka K, Maeno A, Murayama T, Tachibana H, Fujita Y, Yamanaka H, Nishida N, Atarashi R.	Pressure-assisted dissociation and degradation of "proteinase K-resistant" fibrils prepared by seeding with scrapie-infected hamster prion protein.	Prion	8	314-318	2014
Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Fuse T, Sano K, Satoh K, Atarashi R, Nishida N.	Persistent prion infection disturbs the function of Oct-1, resulting in the down-regulation of murine interferon regulatory factor-3.	Sci. Rep.	4	6006	2014
*Sano K, Atarashi R, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Nishida N.	Conformational properties of prion strains can be transmitted to recombinant prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion.	J. Virol.	88	11791-11801	2014
Qina T, Sanjo N, Hizume M, Higuma M, Tomita M, Atarashi R, Satoh K, Nozaki I, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kobayashi A, Kitamoto T, Murayama	Clinical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation in the prion protein gene.	BMJ Open	4	e004968	2014

S, Murai H, Yamada M, Mizusawa H.					
Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Sano K, Atarashi R, Nishida N.	Increased expression of p62/SQSTM1 in prion diseases and its association with pathogenic prion protein.	Sci. Rep.	4	4504	2014
*Murayama Y, Masujin K, Imamura M, Ono F, Shibata H, Tobiume M, Yamamura T, Shimozaki N, Terao K, Yamakawa Y, Sata T.	Ultrasensitive detection of PrPSc in the cerebrospinal fluid and blood of macaques infected with bovine spongiform encephalopathy prion.	J. Gen. Virol.	95	2576-2588	2014
Langeveld JPM, Jacobs JG, Erkens JHF, Baron T, Andréoletti O. Yokoyama T, Keulen LJM, Zijderveld FG, Davidse A, Hope J, Tang Y, Bossers A.	Sheep prions with molecular properties intermediate between classical scrapie, BSE and CH1641-scrapie.	Prion	8	296-305	2014
*堀内 基広	BSE の発生とその対策を振り返って	日本獣医師会雑誌	67	345-353	2014

*代表的成果として、「IV. 研究成果の刊行物・別刷」の項に掲載した。

IV. 研究成果の刊行物・別刷



Characterization of intracellular dynamics of inoculated PrP^{res} and newly generated PrP^{Sc} during early stage prion infection in Neuro2a cells



Takeshi Yamasaki^a, Gerald S. Baron^b, Akio Suzuki^a, Rie Hasebe^a, Motohiro Horiuchi^{a,*}

^a Laboratory of Veterinary Hygiene, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-0818, Japan

^b Laboratory of Persistent Viral Diseases, Rocky Mountain Laboratories, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Hamilton, MT, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 September 2013

Returned to author for revisions

15 October 2013

Accepted 4 November 2013

Keywords:

Prions

Membrane trafficking

Endosomes

Neurodegenerative diseases

Rab proteins

ABSTRACT

To clarify the cellular mechanisms for the establishment of prion infection, we analyzed the intracellular dynamics of inoculated and newly generated abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}) in Neuro2a cells. Within 24 h after inoculation, the newly generated PrP^{Sc} was evident at the plasma membrane, in early endosomes, and in late endosomes, but this PrP^{Sc} was barely evident in lysosomes; in contrast, the majority of the inoculated PrP^{Sc} was evident in late endosomes and lysosomes. However, during the subsequent 48 h, the newly generated PrP^{Sc} increased remarkably in early endosomes and recycling endosomes. Overexpression of wild-type and mutant Rab proteins showed that membrane trafficking along not only the endocytic-recycling pathway but also the endo-lysosomal pathway is involved in *de novo* PrP^{Sc} generation. These results suggest that the trafficking of exogenously introduced PrP^{Sc} from the endo-lysosomal pathway to the endocytic-recycling pathway is important for the establishment of prion infection.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Prions are causative agents of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), neurodegenerative disorders that are characterized by accumulation of an abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}) in the central nervous system (CNS). PrP^{Sc} is the only known proteinaceous component of prions, and infectivity of prions is thought to be associated with PrP^{Sc} oligomers (Silveira et al., 2005; Wang et al., 2010). PrP^{Sc} is a conformational isomer of a cellular prion protein (PrP^C) and is rich in β -sheet; PrP^{Sc} is generated from PrP^C, a protein that is expressed on the surface of host cells (Prusiner, 1998). Conversion of PrP^C to PrP^{Sc} is thought to be triggered by direct contact between “seed” PrP^{Sc} and “substrate” PrP^C.

The intracellular dynamics of PrP^{Sc} immediately following exposure of the cells to prions have been analyzed to understand the mechanisms by which a prion infection becomes established. Although PrP^C is not necessary for the internalization of PrP^{Sc} (Greil et al., 2008; Hijazi et al., 2005; Jen et al., 2010; Magalhaes et al., 2005; Paquet et al., 2007), some candidates such as laminin receptor, heparan sulfate, or low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) have been reported to act as receptors

that mediate internalization of exogenously inoculated PrP^{Sc} (Gauczynski et al., 2006; Horonchik et al., 2005; Jen et al., 2010).

During the early stage after inoculation of PrP^{Sc}, internalized PrP^{Sc} has been reported to be directed to late endosomes/lysosomes via the endo-lysosomal pathway (Jen et al., 2010; Magalhaes et al., 2005). In cells persistently infected with prions, a number of studies have shown that PrP^{Sc} localizes throughout the endocytic compartments—specifically the plasma membrane, early endosomes, recycling endosomes, late endosomes, secondary lysosomes, and the peri-nuclear Golgi region (Marijanovic et al., 2009; McKinley et al., 1991; Pimpinelli et al., 2005; Taraboulos et al., 1990; Veith et al., 2009; Vey et al., 1996; Yamasaki et al., 2012). Earlier studies suggested that the generation of PrP^{Sc} occurs on the cell surface or within the endocytic pathway (Borchelt et al., 1992; Caughey and Raymond, 1991; Taraboulos et al., 1992). Marijanovic et al. reported that the endocytic recycling compartment (ERC) may be the site where the conversion of PrP^C to PrP^{Sc} occurs (Marijanovic et al., 2009). In a very early stage of prion infection where new PrP^{Sc} formation was measured within minutes after initiation of infection, Goold et al. recently reported that the plasma membrane is a primary site of conversion (Goold et al., 2011).

In spite of the efforts described above, the events required for the establishment of prion infection in cells, especially those that occur in the early stage after introduction of the infectious prions,

* Corresponding author. Tel./fax: +81 11 706 5293.

E-mail address: horichi@vetmed.hokudai.ac.jp (M. Horiuchi).

are poorly understood. Simultaneous analysis of inoculated PrP^{Sc} and newly generated PrP^{Sc} in a short period after challenge with prions is important for understanding the early events of prion infection. However, such analysis is limited due to the technical difficulties in the distinction of PrP^{Sc} from PrP^C and also in the distinction of newly generated PrP^{Sc} from inoculated PrP^{Sc}. For example, antibody epitope-tagging has been used to specifically detect host cell-derived PrP or input PrP^{Sc} (Greil et al., 2008; Vorberg et al., 2004) but not both. Specific labeling of PrP^{Sc} with anti-PrP antibody via pre-treatment of cells with chaotropic agents such as guanidinium salt has been widely used to detect PrP^{Sc} in cells (Marijanovic et al., 2009; Pimpinelli et al., 2005; Taraboulos et al., 1990). However, this method is limited because weak PrP^{Sc} signals such as newly generated PrP^{Sc} may be lost or obscured because the detector gain or exposure times need to be adjusted to

a level at which signals from endogenous PrP^C are below the detection limit.

We recently reported that mAb 132, an anti-PrP monoclonal antibody that recognizes an epitope consisting of amino acids 119–127 of mouse PrP, allowed us to visualize PrP^{Sc} in prion-infected cells by indirect immunofluorescence assay (IFA) without specific manipulation of threshold setting to diminish PrP^C signals (Yamasaki et al., 2012). Here, we established a method in which inoculated PrP^{Sc} and newly generated PrP^{Sc} can be distinguished by combining the use of fluorescent-dye-labeled purified proteinase K (PK)-resistant PrP^{Sc} (PrP-res) as inoculum with PrP^{Sc}-specific staining with mAb 132. By using this method, in the present study, we extensively analyzed the fate of the inoculated PrP-res and the appearance of newly generated PrP^{Sc} in Neuro2a cells during the early stages of prion infection.

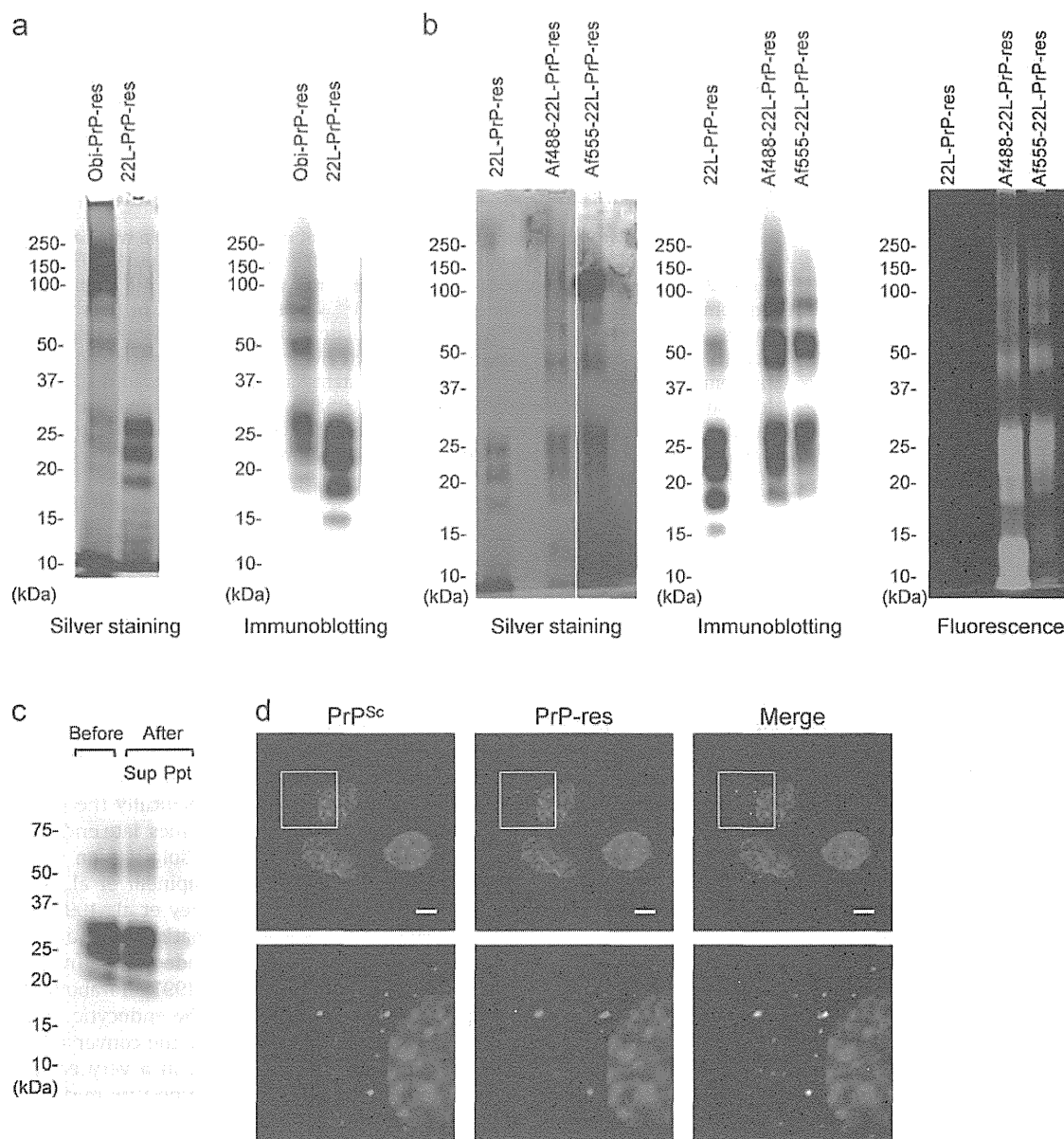


Fig. 1. Characterization of purified PrP-res. (a) Purity of the PrP-res preparation. Purified PrP-res fractions from the brains of mice infected with the Obihiro strain (Obi-PrP-res) and the 22-L strain (22-L-PrP-res) were subjected to SDS-PAGE followed by silver staining and immunoblotting with mAb 31C6. (b) Purity of fluorescent-dye-labeled PrP-res. The purified 22-L-PrP-res was labeled with Alexa Fluor 488 (Af488-22-L-PrP-res) or Alexa Fluor 555 (Af555-22-L-PrP-res). Purity and fluorescent-dye-labeling were analyzed with silver staining, immunoblotting with mAb 31C6, and fluorescence imaging. (c) Influence of sonication on purified PrP-res. Purified 22-L-PrP-res was sonicated and then before and after centrifugation at $10,000 \times g$ for 10 min [supernatant (Sup), precipitate (Ppt)] the PrP-res was subjected to immunoblotting with mAb 31C6. (d) PrP^{Sc}-specific staining of cells inoculated with PrP-res. N2a-3 cells were incubated with Af555-22-L-PrP-res for 6 h at 37 °C, and then subjected to PrP^{Sc}-specific staining. The top panel shows the images of PrP^{Sc} detected with mAb 132 (green, left) and Af555-22-L-PrP-res (red, center), and their merged image (right). The bottom panel shows the corresponding high-magnification images of the boxed regions. Cells were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 10 μm.

Results

Purification and labeling of PrP-res

To monitor the intracellular dynamics of PrP-res after inoculation, PrP-res was purified from the brains of mice infected with the 22-L or Obihiro scrapie strain and the purified PrP-res was labeled with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 555 succinimidyl ester. Silver staining and immunoblotting of the labeled and unlabeled preparations showed the expected three major bands ranging from 35 to 20 kDa corresponding to the three PrP glycoforms, demonstrating purity of the PrP-res fraction (Fig. 1a and b). However, both preparations contained bands less than mol wt 15 kDa that did not react with mAb 31C6 (Fig. 1a). Fluorescence imaging, as well as silver staining and immunoblotting of Alexa Fluor 488- or 555-labeled purified PrP-res (Af488-22-L-PrP-res or Af555-22-L-PrP-res, respectively), revealed that the purity was satisfactory for the analysis of intracellular trafficking of 22-L-PrP-res by fluorescent microscopy (Fig. 1b). The size of PrP^{Sc} aggregates influences the uptake of PrP^{Sc} into cells (Greil et al., 2008; Jen et al., 2010; Magalhaes et al., 2005); therefore, the 22-L-PrP-res was extensively sonicated and large aggregates were removed by centrifugation. The PrP-res that largely remained in the supernatant (Fig. 1c) was used as the inoculum for N2a-3 cells, a Neuro2a clone which is susceptible to prion infection (Uryu et al., 2007). As was the case in previous studies (Jen et al., 2010; Magalhaes et al., 2005), the Af555-22-L-PrP-res that was internalized by cells was dynamically moving throughout the cells at 6 h after inoculation (Supplementary video 1). Most of the Af555-22-L-PrP-res particles were co-localized with PrP^{Sc} signals by immunostaining with mAb 132 (Fig. 1d), which demonstrated the utility of detection of Alexa Fluor 555 signals for monitoring the trafficking of inoculated PrP-res by fluorescence microscopy.

Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.11.007>.

Intracellular localization of inoculated PrP-res

To analyze the intracellular trafficking of the inoculated PrP-res, particularly in the very early stages after internalization, trafficking of the Af555-22-L-PrP-res was monitored in cells that transiently express enhanced green fluorescent protein (EGFP)-tagged wild-type Rab4a, 5a, 7, 9, 11a, or 22a as markers of distinct endocytic compartments as follows: Rab4a, early endosomes including rapid endocytic recycling endosomes; Rab5a, early endosomes; Rab7, late endosomes; Rab9, late endosomes involved in retrograde transport to the *trans*-Golgi network (TGN); Rab11a, recycling endosomes; Rab22a, early endosomes involved in transport to recycling endosomes and TGN (Stenmark, 2009). To reduce the possibility of observing ectopically targeted Rab GTPase-EGFP fusion proteins, cells showing relatively weak EGFP signals were selected for these observations. Within 2 h after the initiation of incubation with Af555-22-L-PrP-res, we observed particles of Af555-22-L-PrP-res that were incorporated into the EGFP-positive vesicles and thereafter, PrP-res particles moved together with the EGFP-positive vesicles throughout the cells. These dynamics were observed in cells that expressed any type of Rab GTPase-EGFP fusion protein (Fig. 2, arrows). These observations indicated that exogenously introduced PrP-res was most likely transported throughout endocytic compartments within a short period after internalization.

Transferrin (Tfn) binds to the Tfn receptor, which is internalized from the cell surface by clathrin-coated pits, transported to early endosomes and then recycled back to the plasma membrane via the ERC (Maxfield and McGraw, 2004). In contrast, low-density lipoprotein (LDL) binds to the LDL receptor, which is also

internalized from the cell surface via clathrin-coated pits; however, after dissociation from the LDL receptor in early endosomes, LDL is transported to late endosomes for degradation (Ikonen, 2008). Herein we define the pathway by which the Tfn receptor is recycled between the plasma membrane and the ERC as “endocytic-recycling pathway” and the pathway by which LDL is directed to late endosomes or lysosomes for degradation as “endo-lysosomal pathway”. To analyze the trafficking of PrP-res immediately after internalization, Af555-22-L-PrP-res and Alexa Fluor 488-conjugated Tfn (Af488-Tfn) or Alexa Fluor 488-conjugated LDL (Af488-LDL) were inoculated simultaneously into N2a-3 cells. Time-lapse imaging showed that within 2 h after the initiation of incubation with PrP-res, a particle of Af555-22-L-PrP-res on the cell surface was internalized and merged with Af488-Tfn signals (Fig. 3a, between 1 min 40 s and 4 min 30 s) during transport to a peri-nuclear region, and thereafter, Af555-PrP-res and Af488-Tfn moved together back to a peripheral region of the cell (e.g., 10 min 20 s). We also observed internalization of an Af555-22-L-PrP-res particle from the cell surface that subsequently merged with an Af488-LDL-positive vesicle (Fig. 3b, between 7 min 50 s and 9 min 5 s), and thereafter, Af555-PrP-res and Af488-LDL moved together (e.g., 10 min 5 s).

To clarify the trafficking pathway of the inoculated PrP-res, cells incubated with Af555-22-L-PrP-res for 6 h were subsequently cultured for up to 30 h. Six hours after the incubation with PrP-res, some of the Af555-22-L-PrP-res signals co-localized with the Af488-Tfn signal not at the center of the cluster of the Af488-Tfn signal, but at a region around the cluster (Fig. 3c, Tfn, 0 h). On the other hand, a large portion of the Af555-22-L-PrP-res appeared to co-localize with Af488-LDL throughout the cells (Fig. 3c, LDL, 0 h). Quantitative analysis of the co-localization revealed that Af555-22-L-PrP-res co-localized more with Af488-LDL (53%) than Af488-Tfn (26%). The co-localization of Af555-22-L-PrP-res with Af488-LDL was still obvious (49%) 30 h after the inoculation, whereas, the co-localization of Af555-22-L-PrP-res with Af488-Tfn had apparently decreased (4%) (Fig. 3c, LDL and Tfn, 30 h). These results suggested that internalized PrP-res entered both the endocytic-recycling pathway and the endo-lysosomal pathway immediately following internalization, but a large portion of the inoculated PrP-res was eventually directed to the endo-lysosomal pathway.

The kinetics of inoculated PrP-res metabolism and generation of PrP^{Sc}

To determine the fate of the inoculated PrP-res and detect *de novo* generation of PrP^{Sc}, the PrP-res level in cells inoculated with Af488-22-L-PrP-res was analyzed with immunoblotting. The level of inoculated Af488-22-L-PrP-res, which was detected with an anti-Alexa Fluor 488 antibody, was drastically decreased within 24 h post inoculation (hpi) (Fig. 4a). In contrast, the total PrP-res level, which was detected with an anti-PrP antibody reactive to both the inoculated PrP-res and newly generated PrP^{Sc}, was unchanged at 24 hpi but increased thereafter (Fig. 4a). The decrease in the inoculated PrP-res was also consistent with the decrease in the PrP-res signal observed by live-cell imaging of Af555-22-L-PrP-res over the same time period (Fig. 4b). The increase of the mono-glycosylated PrP-res on immunoblots of total PrP-res at 24 hpi suggested that the *de novo* generation of PrP^{Sc} takes place within 24 hpi (Fig. 4a, arrowhead). Therefore, we analyzed the inoculated PrP-res and newly generated PrP^{Sc} simultaneously in individual cells by IFA. We used Af555-22-L-PrP-res in combination with mAb 132-mediated specific detection of PrP^{Sc} to distinguish *de novo* PrP^{Sc}, which could be detected only with mAb 132 (Fig. 4c, arrows), from exogenous PrP-res, which was labeled with both Alexa Fluor 555 and mAb 132 (Fig. 4c, arrowheads). Signals from newly generated PrP^{Sc} became detectable at 24 hpi, especially at a peri-nuclear region of the cells (arrows), and the

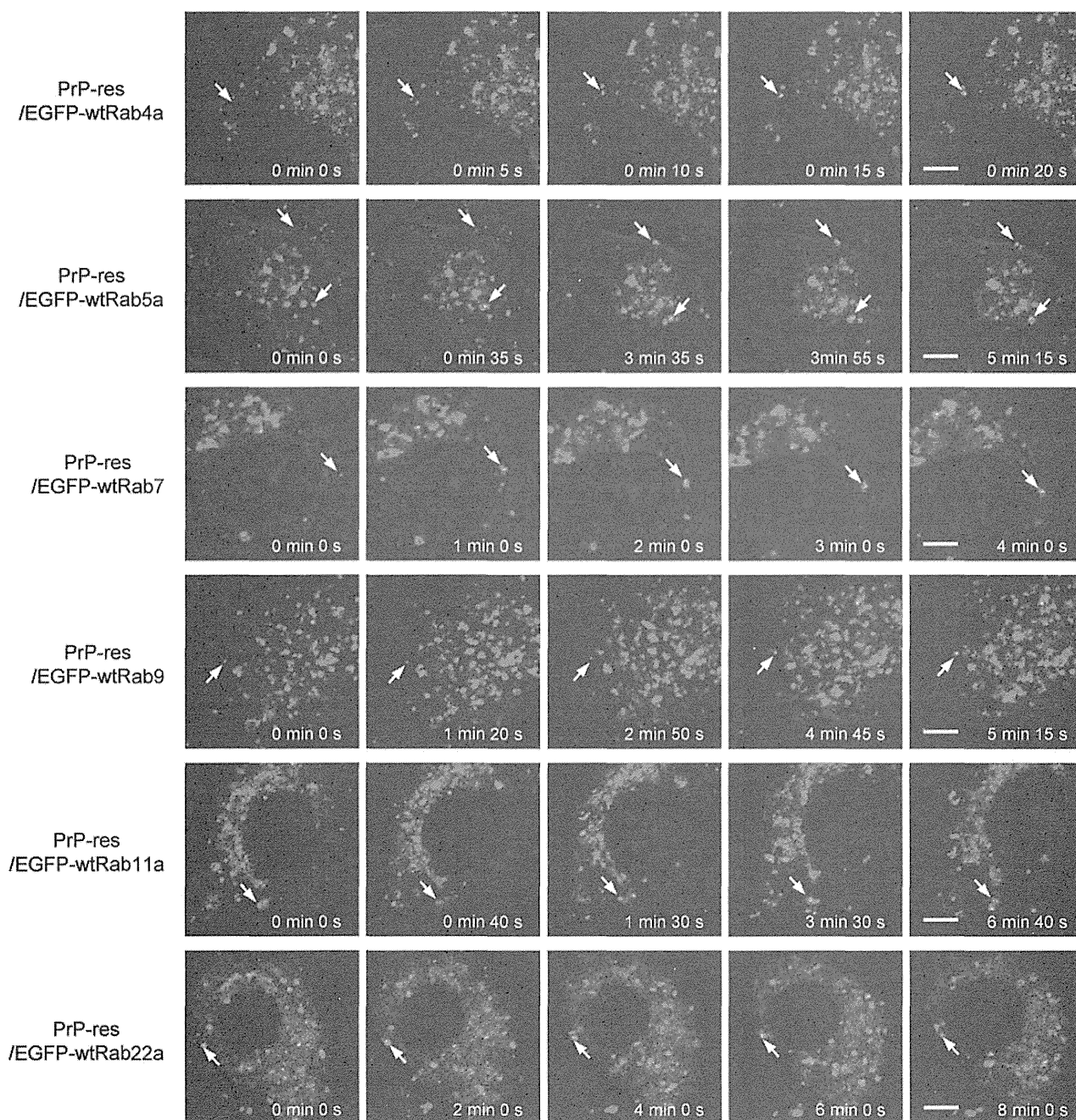


Fig. 2. Intracellular localization of fluorescent-dye-labeled, purified-PrP-res. N2a-3 cells grown on chambered coverglass were transfected with expression plasmids of EGFP-tagged wild-type of Rab4a, 5a, 7, 9, 11a or 22a. Medium (200 μ l) containing 10 ng of Af555-22-L-PrP-res was added to cells 72 h after transfection. Time series of images were acquired any of 15 min-duration (images were acquired every 5 s within 2 h after the initiation of incubation with Af555-22-L-PrP-res. Each image in a row shows a merged image of Af555-22-L-PrP-res (red) and EGFP-Rab GTPase (green) with differential interference contrast (DIC) at the indicated time point. Arrows indicate examples of Af555-22-L-PrP-res that became co-localized with EGFP-Rab GTPases during the period of observation. Scale bar: 5 μ m.

number of newly generated PrP^{Sc} granules and their fluorescent intensities increased thereafter. In contrast to the increase of newly generated PrP^{Sc}, the inoculated PrP-res decreased with time (Fig. 4c, arrowheads).

Intracellular localization of inoculated PrP-res and newly generated PrP^{Sc}

To identify the site of *de novo* generation of PrP^{Sc}, we next analyzed the intracellular localization of inoculated Af555-22-L-PrP-res and newly generated PrP^{Sc} with markers for endocytic compartments. At 24 hpi, some fluorescent signals from the newly generated PrP^{Sc} co-localized well with EEA1 (early endosomes)

and Rab7 (late endosomes), but were poorly co-localized with Rab11a (recycling endosomes) or cathepsin D (lysosomes) (Fig. 5). Furthermore, faint signals from newly generated PrP^{Sc} could be detected at the cell surface at 24 hpi. The intensities of these PrP^{Sc} signals increased with time after inoculation (Fig. 5, from 24 to 72 hpi). In order to clarify the kinetics of distribution of the inoculated PrP-res and newly generated PrP^{Sc}, we quantitatively analyzed co-localization ratios of the inoculated PrP-res and newly generated PrP^{Sc} co-localized with markers (Fig. 6). Consistent with the data from the live-cell imaging (Fig. 3), a large proportion of the inoculated PrP-res localized to late endosomes (40%) while a smaller portion was detected at the cell surface (22%) at 0 hpi. The exogenous PrP-res at the cell surface almost disappeared

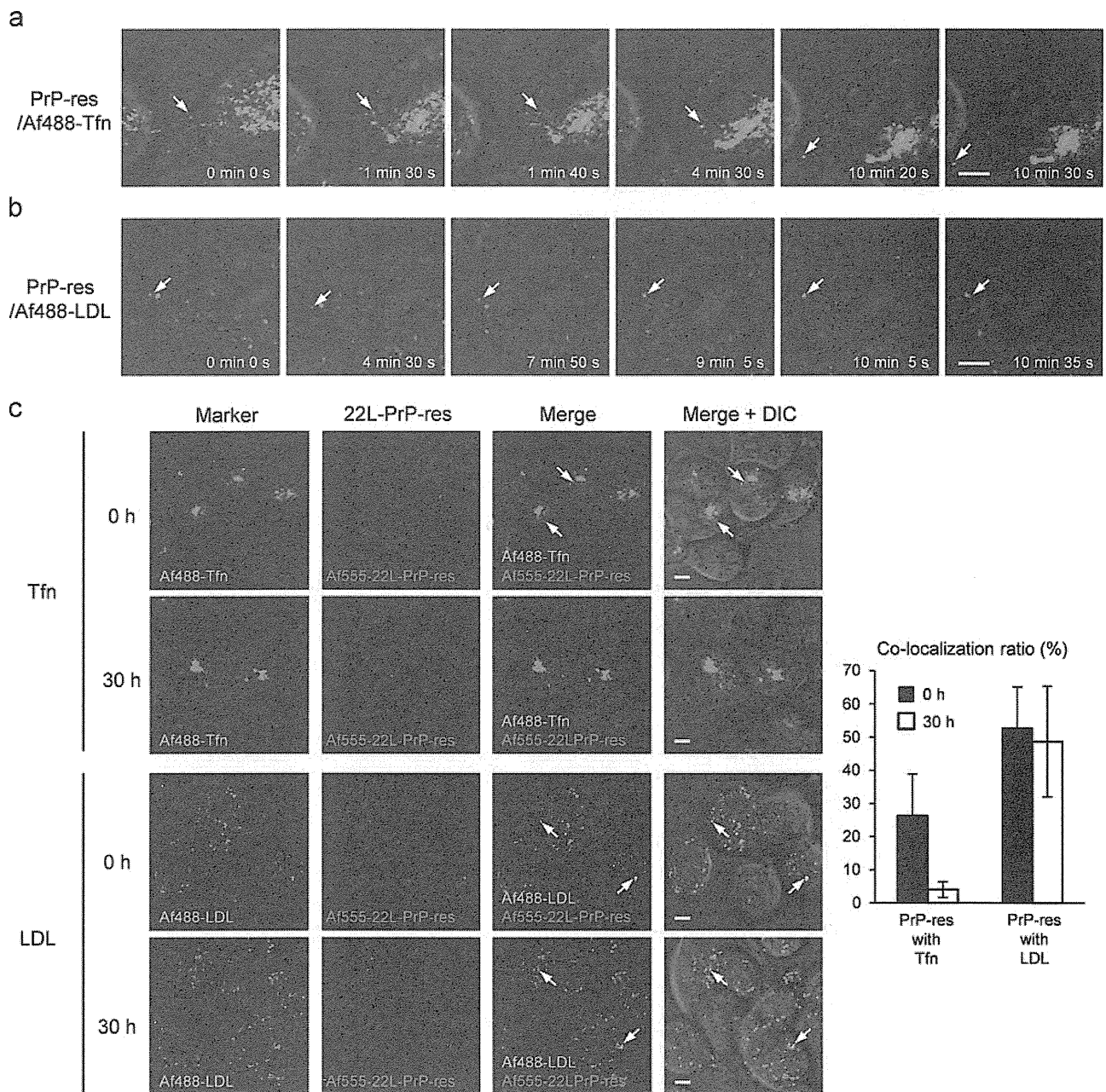


Fig. 3. Co-localization of Af555-22-L-PrP-res with Tfn or LDL. Time-lapse imaging of inoculated PrP-res and Af488-Tfn (a) or Af488-LDL (b). N2a-3 cells grown on chambered coverglass were incubated with Af555-22-L-PrP-res (red) and 10 μ g/ml of Af488-Tfn (green) as a marker of the endocytic-recycling pathway (a) or 4 μ g/ml of Af488-LDL (green) as a marker of the endo-lysosomal pathway (b). Time-lapse images were acquired any of 15 min-duration (images were acquired every 5 s) within 2 h after the initiation of incubation with PrP-res. Each image within a row shows a merged image of Af555-22-L-PrP-res (red) and Af488-Tfn or Af488-LDL (green) with the DIC at the indicated time point. Arrows indicate examples of Af555-22-L-PrP-res that became co-localized with Af488-Tfn (a) or Af488-LDL (b) in the period of observation. (c) Co-localization of Af555-22-L-PrP-res with Af488-Tfn or Af488-LDL. N2a-3 cells were incubated with Af555-22-L-PrP-res and Af488-Tfn or Af488-LDL for 6 h at 37 $^{\circ}$ C. After the removal of excess Af555-22-L-PrP-res, the cells were subjected to live-cell imaging (0 h). To monitor co-localization of PrP-res one day after inoculation, N2a-3 cells were incubated with Af555-22-L-PrP-res for 6 h. After the removal of excess Af555-22-L-PrP-res, the cells were further incubated for 24 h at 37 $^{\circ}$ C. The cells were then incubated for an additional 6 h in the presence of Af488-Tfn or Af488-LDL before imaging (30 h). The right-most column shows the merged images of Af488-Tfn (green) or Af488-LDL (green), Af555-22-L-PrP-res (red), and DIC. Arrows indicate examples of Af555-22-L-PrP-res co-localized with Af488-Tfn or Af488-LDL. Scale bar: 5 μ m. The graph on the right shows ratios of Af555-22-L-PrP-res signals co-localized with Af488-Tfn or Af488-LDL signals relative to sum of the Af555-22-L-PrP-res signals (methods for the calculation of the co-localization ratio are described in the Supplementary information). Mean and SD of the values acquired from 15 fields of view are depicted. Total numbers of foci and cells used for co-localization statistics from the 15 view fields were listed in Table S4.

during the subsequent 48 h and the remaining PrP-res localized to late endosomes (from 16% to 14%) and lysosomes (from 11% to 9%). In contrast, at 24 hpi newly generated PrP^{Sc} localized mainly at the cell surface (27%), in early endosomes (15%), and late endosomes (30%), but a minor portion localized to lysosomes (3%). Interestingly, the proportion of newly generated PrP^{Sc} localized to early endosomes or recycling endosomes increased (from 15% to 30%

and from 5% to 33%, respectively); in contrast, the amount of PrP^{Sc} at the cell surface decreased from 27% to 3% with time after inoculation. These data suggested that even though newly generated PrP^{Sc} was detected in late endosomes and lysosomes at 24 hpi, newly generated PrP^{Sc} remarkably appeared in the intracellular organelles on the endocytic-recycling pathway thereafter.