

# 博士論文

ファージディスプレイ法による $\beta$ 型プリオンタンパク質特異  
的ヒト抗体の確立とプリオン増幅の分子機構の研究

**(Establishment of  $\beta$ -form prion protein-specific human IgG by phage displaying  
technology and molecular mechanism of prion amplification.)**

鹿児島大学 大学院理工学研究科

博士後期課程 物質生産工学専攻

久保田 俊也



## 目 次

	Page
要旨	1
第1章 プリオン病とプリオンの特徴	
1-1 小序論	5
1-2 プリオン病	5
1-3 プリオン	7
1-4 PrP <sup>Sc</sup> の構造	10
1-5 プリオン仮説	11
1-6 感染性と毒性	12
1-7 プリオン病治療・予防法開発	12
第2章 プリオンに対する抗体	
2-1 小序論	15
2-2 抗体	15
2-3 プリオンに対する抗体	17
2-4 ファージディスプレイ法	22
第3章 遺伝子組み換えプリオンタンパク質の作製とその生化学的解析	
3-1 小序論	25
3-2 材料と方法	25
3-3 結果	30
3-4 小括	34
第4章 ファージディスプレイ法を用いた $\beta$ -form PrP特異的一本鎖抗体(single chain Fv, scFv)の単離とその特異性	
4-1 小序論	35
4-2 材料と方法	35
4-3 結果	38
4-5 小括	44

第5章	$\beta$ -form PrP特異的IgG抗体の作製とその生化学的特性	
5-1	小序論	45
5-2	材料と方法	45
5-3	結果	52
5-4	小括	61
第6章	PRB7 IgGが、細胞内 $\beta$ -form PrPの産生と蓄積に及ぼす影響	
6-1	小序論	63
6-2	材料と方法	63
6-3	結果	66
6-4	小括	77
第7章	総括	78
	参考文献	80
	謝辞	92

## 要 旨

プリオン分子は正常な組織細胞に広範囲に発現しているが、この分子の立体構造が変化した異常型プリオンは伝達性神経変性疾患の原因分子であり、ウシでは牛海綿状脳症を発症させる。しかし異常型プリオンの分子論的基盤はほとんど明らかになっていない。本研究ではJ. Collingeらの報告に従い、遺伝子組み換え型の $\beta$ -sheet-rich recombinant full-length prion protein ( $\beta$ -form PrP) を作製した。この $\beta$ -form PrPとヒト一本鎖抗体を提示したファージライブラリを用いて、私達は $\beta$ -form PrP特異的ヒトIgG1抗体 (PRB7 IgG) を確立した。この抗体がプリオンの感染している神経芽腫細胞、ScN2a細胞の増殖に如何なる影響を与えるかを検討するため、ScN2a細胞にこの抗体を添加し共培養した。その結果、添加されたPRB7IgGは、ScN2a細胞の細胞質中に取り込まれ、細胞質中のプリオン分子と複合体を形成し凝集体となって蓄積した。また、Annexin V を用いた染色により、この細胞はアポトーシスを起こしていることが明らかとなった。全長PrPのN末端のオクタリピート領域を認識している抗体であるSAF32とPRB7 IgGを用いた共焦点顕微鏡の多重染色実験では、SAF32が結合する凝集体にはPRB7 IgG は結合しないことが示された。さらに、ScN2a細胞中のPrP<sup>res</sup>凝集体の蓄積に及ぼすSAF32とPRB7IgG抗体の影響を、4日間共培養し、細胞破砕物をSDS-PAGEにより解析したところ、SAF32はPrP<sup>res</sup>凝集体の蓄積を強く阻害したが、PRB7 IgGはまったく阻害しなかった。これらの結果は1) PRB7 が結合する $\beta$ -form PrPが、 $\alpha$ -form PrPを $\beta$ -form PrPに変換蓄積するのではないこと、2) prion感染による最終産物として生成した $\beta$ -form PrPが、凝集体を形成蓄積することでアポトーシスを引き起こすこと、を示唆した。この結果は、最近J. Collinge 等が示唆した「プリオンの感染増幅と神経細胞への毒性とは、2つの

別個分子機構である」というNatureの報告結果を支持する。PRB7は $\beta$ -form PrPに特異的な最初のヒト抗体であり、生化学的、病理学的なプリオンを特徴付けるための強力なツールとなると考えられる。

本論文は以下に示した7章から成り立っている。

第1章はプリオン病とプリオンの特徴についてまとめた。プリオン病はヒトではクロイツフェルトヤコブ病、ウシでは牛海綿状脳症があり伝達性神経変性疾患である。それはプリオンタンパク質のミスフォールドがプリオン病の感染性に関与することが議論され、プリオン病の病因はPrP<sup>C</sup>からPrP<sup>Sc</sup>へのプリオンタンパク質の構造変化を必要とする。PrP<sup>C</sup>はモノマーであり、 $\alpha$ ヘリックス構造であり、proteinase Kによって分解される。対照的に、PrP<sup>Sc</sup>は、proteinase K分解に高い抵抗性を示すことによってPrP<sup>res</sup>として特徴づけられる多量体である。しかしながら、プリオン若しくはPrP<sup>Sc</sup>が $\beta$ シートリッチな構造をもっているかどうかの直接証拠が無いが、遠心によって精製したプリオン感染した脳の抽出物の凝集体を用いたFTIRの示唆的な証拠が報告されている。

第2章は、プリオンに対する抗体についてまとめた。いままでにすべての抗体が抗PrP<sup>Sc</sup>/PrP<sup>C</sup>抗体もしくは抗PrP<sup>C</sup>抗体が確立された。抗PrP<sup>Sc</sup>抗体は確立されていない。PrP<sup>Sc</sup>に対する抗体はプリオンの問題を解決するために強力なツールとなる。

第3章は遺伝子組み換えプリオンタンパク質の作製とその生化学的解析についてまとめた。私たちはCollingeらによるプロトコールに従って $\beta$ 型プリオンタンパク質を準備した。円偏光二色性 (circular dichroism, CD) 解析は $\beta$ -form PrPは特徴的な $\alpha$ ヘリックス構造を示し、 $\beta$ -form PrPは特徴的な $\beta$ シート構造を示した。

それはまた原子間力顕微鏡、proteinase K処理、ELISAによって一般的な特徴を解析した。

第4章はファージディスプレイ方を用いた $\beta$ -form PrP特異的一本鎖抗体 (single chain Fv, scFv) の単離とその特異性についてまとめた。私たちはヒトscFvを提示したファージライブラリを用いて $\beta$ -form PrPに対して特異的なヒトscFv (PRB7とPRB30) を確立した。これらのクローンはELISAによって $\beta$ -form PrPに特異的であり、 $\beta$ -form PrPに結合しなかった。これらのクローンはそれぞれVhとVI遺伝子は特徴的な配列を持っている。さらに、様々な生化学的解析を用いて特異性を確認した。

第5章は $\beta$ -form PrP特異的IgG抗体の作製とその生化学的特性についてまとめた。PRB7 scFvの分子を安定にするため、PRB7 scFvをIgGに変換した。PRB7 IgGは、 $\beta$ -form PrPと $\alpha$ -form PrPに対する結合はPRB7 scFvの特徴と同一であることを示した。さらにPRB7 IgGはA $\beta$ 42の可溶性型、プレフィブリルオリゴマー、ファイバーに対して結合しなかった。そして、PRB7 IgGはヒト、ウシ、マウス、ヒツジに共通の $\beta$ 構造のプリオンタンパク質を認識した。エピトープマッピングは線状ペプチドを提示したファージライブラリ (PhD.12) を用いて行った。PRB7 IgGが結合したクローン (pepPRB7-14) は、70クローンの中から単離した。pepPRB7-14クローンはPRB7 IgGに特異的だった。Clustal W ver.3.1を用いたアミノ酸配列ホモロジーは、pepPRB7-14ペプチドモチーフは部分的に $\beta$ 構造を含んだヒト全長プリオンタンパク質の#128-132にホモロジーを、#124-136に弱くホモロジーを示した。

第6章では、PRB7 IgGが、細胞内 $\beta$ -form PrPの産生と蓄積に及ぼす影響についてまとめた。ScN2a細胞は3日間PRB7 IgGの存在下で共培養し、細胞でPRB7が結合する粒子が共焦点顕微鏡によって観察された。4200個の細胞を数えることによって、細胞の28%が陽性だった。PRB7が結合する粒子はまた、プリオンタンパク質に特異的なSAF32によって確認された。この陽性反応はN2a細胞やnormal IgGを用いたコントロール実験では観察されなかった。また、PRB7が結合している粒子の蓄積は、ScN2a細胞でアポトーシスを起こした。さらに、PRB7 IgGはproteinase K抵抗性PrPの蓄積を阻害し無かったが、抗プリオン抗体（N末端認識で、 $\alpha/\beta$ 型を認識する抗体）SAF32は強く阻害した。

第7章で、以上の結果を総括し、PRB7によるプリオンの生化学的な機構について考察した。



## 第1章

### プリオン病とプリオンの特徴

#### 1-1 小序論

プリオンは、“proteinaceous infectious particles”（感染性を持つ蛋白質粒子）と言う意味の造語であり、1982年Prusinerによって提唱された。彼はマウスなどの脳に感染材料を接種した際の潜伏期間によって定量的に感染力価が定量できることを利用して、感染性が核酸画分ではなくプロテアーゼ抵抗性の蛋白質画分に認められること、核酸の不活化条件では感染力価は失われず蛋白質の不活化条件では消失することを示し、感染脳乳剤から物理化学的方法で感染性の高い画分を精製した。以上の事実から、本疾患群の病因には蛋白質のみが関与していると結論付け、その病原因子をプリオン蛋白質 (PrP) と命名した<sup>1</sup>。

#### 1-2 プリオン病

プリオン病は、ヒトにおけるクロイツフェルトヤコブ病 (CJD: Creutzfeldt–Jakob disease)、Gerstmann症候群 (GSS: Gerstmann–Straussler–Scheinker disease)、致死性家族性不眠症 (FFI: Fatal Familial Insomnia)、クールー、ヒツジにおけるスクレイピー、ウシにおけるウシ海綿状脳症 (BSE: Bovine Spongiform Encephalopathy) (Table.1) といった致死性の神経変性疾患の総称である。いずれも長い潜伏期間のあとに発症し、著明な海綿状脳病変をきたす特徴がある(Fig.1)<sup>2</sup>。CJD は初老期に発症し、痴呆や小脳機能障害等を主症状とする。ほとんどのCJD (85～90%) は、病因は不明で散発性に発症する（散発性CJD : sporadic CJD）。10～15%のCJD は、PrP 遺伝子に変異を有し、優性遺伝を呈する（家族性CJD : familial CJD）。さらに、感染が原因であ

ると明らかに特定できる感染性CJD がある。その代表は、狂牛病から感染したと考えられる異型 (variant) CJD と、CJD 汚染成長ホルモン投与や汚染脳硬膜移植等による医原性 (iatrogenic) CJD がある。またクールーは、パプア・ニューギニアのフォア (Fore) 族の子供と成人女性に主にみられた小脳失調症を呈する疾患で、食人慣習による経口感染が病因と考えられている。GSS と FFI は、遺伝性プリオン病で、PrP 遺伝子に変異を有する。

Table.1 プリオン病

Disease	Host	Mechanism of pathogenesis
Kuru	Fore people	Infection through ritualistic cannibalism
iCJD	Humans	Infection from prion-contaminated HGH, dura mater grafts, etc.
vCJD	Humans	Infection from bovine prions?
fCJD	Humans	Germ-line mutations in PrP gene
GSS	Humans	Germ-line mutations in PrP gene
FFI	Humans	Germ-line mutation in PrP gene (D178N, M129)
sCJD	Humans	Somatic mutation or spontaneous conversion of PrP <sup>C</sup> into PrP <sup>Sc</sup> ?
FSI	Humans	Somatic mutation or spontaneous conversion of PrP <sup>C</sup> into PrP <sup>Sc</sup> ?
Scrapie	Sheep	Infection in genetically susceptible sheep
BSE	Cattle	Infection with prion-contaminated MBM
TME	Mink	Infection with prions from sheep or cattle
CWD	Mule deer, elk	Unknown
FSE	Cats	Infection with prion-contaminated bovine tissues or MBM
Exotic ungulate encephalopathy	Greater kudu, nyala, oryx	Infection with prion-contaminated MBM

iCJD, iatrogenic CJD; vCJD, variant CJD; fCJD, familial CJD; sCJD, sporadic CJD; GSS, Gerstmann-Sträussler-Sheinker disease; FFI, fatal familial insomnia; FSI, fatal sporadic insomnia; BSE, bovine spongiform encephalopathy; TME, transmissible mink encephalopathy; CWD, chronic wasting disease; FSE, feline spongiform encephalopathy; HGH, human growth hormone; MBM, meat and bone meal.

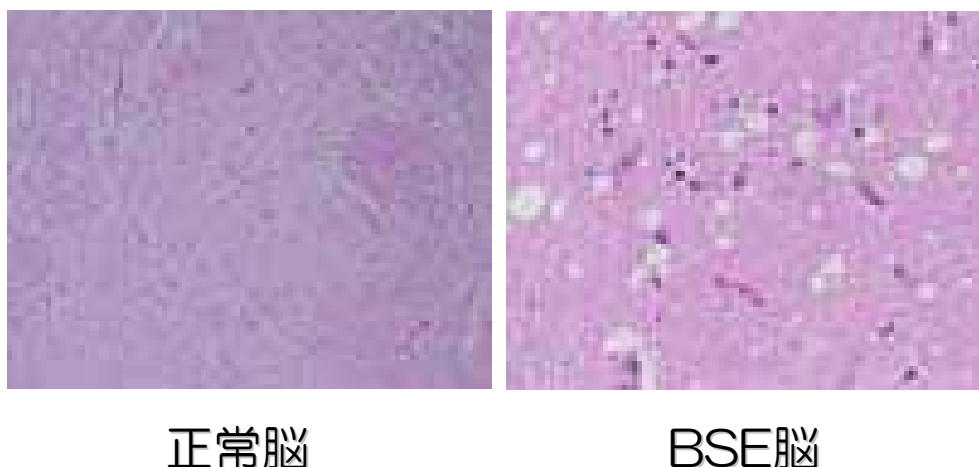


Fig.1 ウシの海綿状脳症

CJDは認知機能障害や運動機能障害で発症し、数ヶ月で無動無言状態になり約1～2年で死の転帰をとる。他の神経変性疾患群との大きな相違点は、弧発性、遺伝性という側面のほかに、患者の脳や脊髄などの神経組織やリンパ組織に感染性（伝播性）を有する点である。

### 1-3 プリオン

プリオンタンパク質 (PrP) は宿主遺伝子にコードされた糖タンパク質である。ヒト及びマウスPrP 遺伝子はそれぞれ第20番染色体と第2番染色体上に存在する。ヒト PrP 遺伝子は二つのエクソンからなり、マウスPrP 遺伝子は三つのエクソンからなる。タンパク質翻訳領域は単一のエクソン内に存在し、ヒトでは2番目、マウスでは3番目のエクソン内にある<sup>3</sup>。PrP のアミノ酸配列は動物種を超えて非常によく保存されている<sup>4</sup>。遺伝子発現は、脳、心、肺、肝、脾、膵、腎など多くの組織または臓器に認められるが、特に脳において最も高い<sup>5</sup>。脳内では、神経細胞に高く発現しているが、アストロサイトやミクログリアなどの

グリア細胞にも発現している<sup>6,7</sup>。

Prnpは254個のアミノ酸をコードし、膜結合型糖蛋白質であるPrP<sup>C</sup>が合成される。小胞体への移送のためのシグナルペプチドであるN末端側の22残基は翻訳後に脱落し、ゴルジ装置ではC末端側のコドン231以降がglycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー付着後に除去され、コドン181, 197のアスパラギン酸 (Asp) が糖鎖で修飾されて、最終的に208残基の蛋白質に成熟する。179番目と214番目のシステイン (Cys) 間にはジスルフィド結合が存在し、51～91番にはグリシン (Gly) に富む8つのアミノ酸の5回繰り返し構造 (octarepeat sequence) を、C末端側には4つの疎水性領域を有している。正常型のプリオンタンパク質はNMRにより立体構造が決定されており、C末端側にβシート構造領域 (β1とβ2) とαヘリックス構造領域 (α1, α2とα3) を持つ (Fig.2、Fig.3)。生合成の過程を経た後、PrP<sup>C</sup> は分子量33—37kDa の GPI アンカー糖タンパク質として細胞膜上（主にラフト上）に発現する。細胞膜上に発現した PrP<sup>C</sup> は、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、リソソームのタンパク質分解酵素により分解される。一部は、分解されることなくリサイクルされ、再び細胞膜に搬送される。PrP<sup>C</sup> の半減期は約5時間程度である。

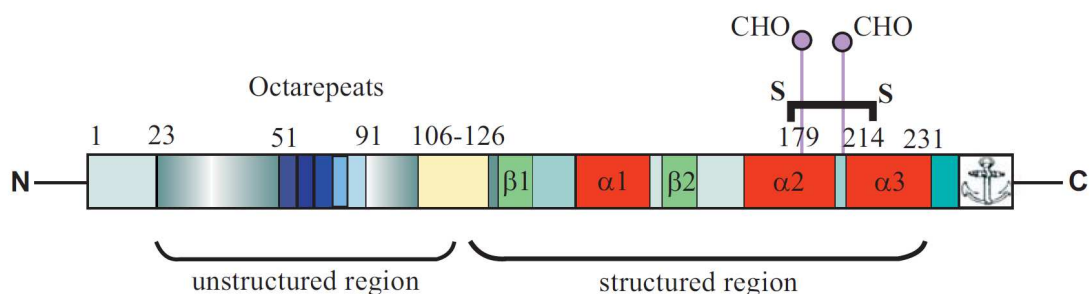


Fig.2 プリオン蛋白の2次構造

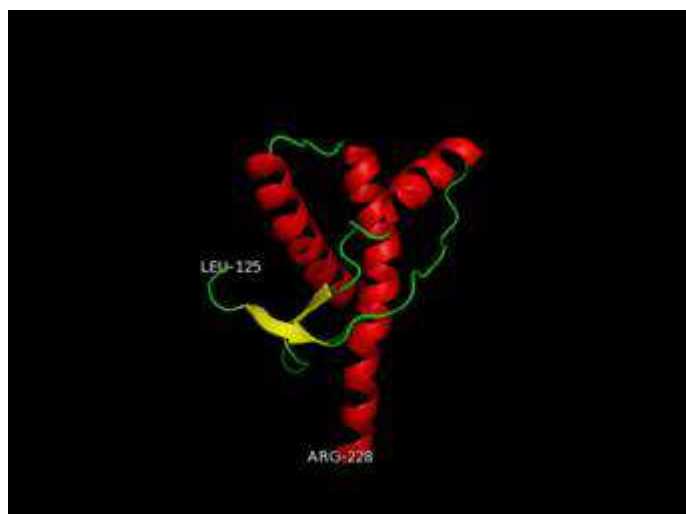


Fig.3 プリオンタンパク質の3次構造 (aa125-228, PDB. 1QM0)

*in vitro*, *in vivo*の両方で粒子状プリオン (soluble oligomer) と繊維状プリオン (amyloid fibril, fiber) が観察されている (Fig.4)。感染性のプリオンの大きさを調べたとき、17 – 27 nmの粒子 (300 – 600 kDa : 14 – 28 分子)であるということが報告された。これより、粒子状のプリオンは感染に重要であることが示唆される<sup>8</sup>。また、繊維状のプリオンは*in vitro*の実験で作製したマウスのプリオン蛋白質のファイバーが、培養した神経細胞に対して毒性があることが、報告された。また、このとき作製した粒子状のプリオン蛋白も毒性があることが示された<sup>9</sup>。

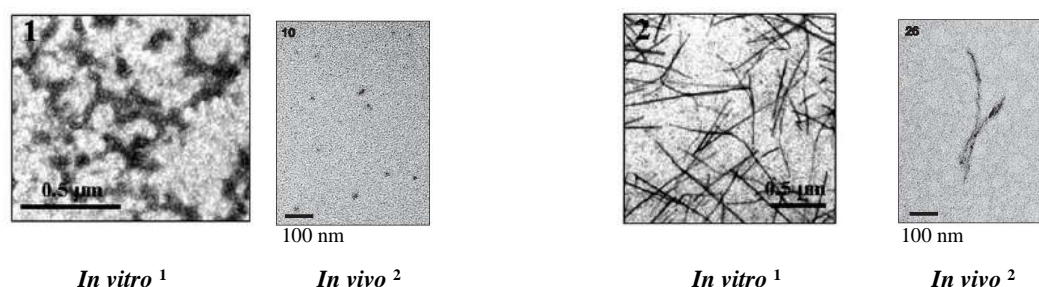


Fig.4 *in vitro*と*in vivo*で観察される粒子状と繊維状プリオン  
*in vitro*と*in vivo*の $\beta$ -oligomerとPrP fiberの電子顕微鏡写真

#### 1-4 PrP<sup>Sc</sup>の構造

一般的にアミロイド(凝集体)は $\beta$ シート構造を持つことが知られている。プリオンは凝集体になることが知られており、そのため $\beta$ シート構造を持った構造体であるという事が考えられていた。現在までにコンピュータシミュレーション<sup>10</sup> (Fig.5) やPrP<sup>Sc</sup>を単離し、生化学的に解析することでPrP<sup>Sc</sup>の構造を解析することが行われてきた。特に生化学的解析では、抗体を用いたPrP<sup>Sc</sup>の精製が行われたが、精製に用いる抗体が正常型、異常型どちらにも反応する抗体しか得られていなかったためこの方法は用いることが出来なかった。一方で、ポリエチレングリコール (PEG) やリンタングステン酸 (PTA) を用いた凝集体を精製する方法が行われた<sup>11-16</sup>。精製は不十分とはなるが、FTIRを用いてPrP<sup>Sc</sup>は $\beta$ シート構造がPrP<sup>C</sup>に比べて非常に多い構造体であることが示された (Table2)。しかしながら、これまでのプリオン研究においてPrP<sup>Sc</sup>が $\beta$ シート構造を持つという直接の証拠が無いのが現状である。

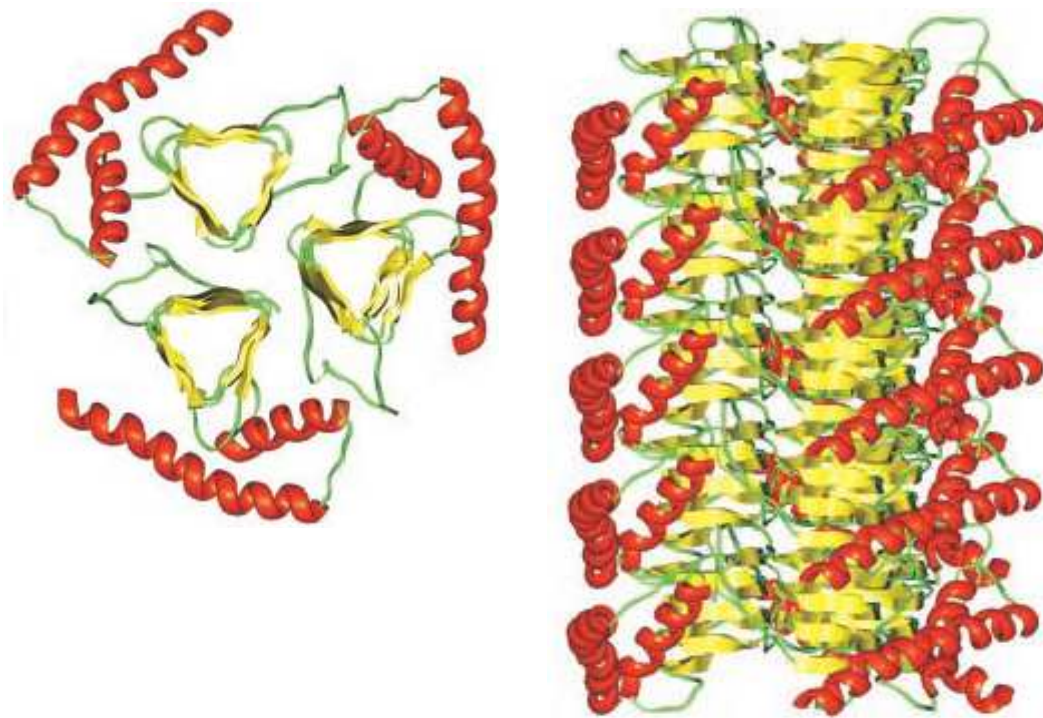


Fig.5 コンピュータシミュレーションされたPrP<sup>Sc</sup>の立体構造

Table.2 FTIRによって測定解析されたプリオンの2次構造の割合

Structure	Content of secondary structure, %	
	PrP <sup>C</sup>	PrP <sup>Sc</sup>
$\alpha$ -Helix	42	30
$\beta$ -Sheet	3	43
Turn	32	11
Coil	23	16

### 1-5 プリオン仮説

ある動物種の感染脳乳剤を異なる動物種に接種した場合、同種間に接種した場合に比べて疾患の潜伏期間が延長し伝播しにくくなることは、“species barrier (種の壁)”として経験的に知られていた。シマリアンハムスター (SHa) の感染脳乳剤 (Sc237) をマウス (Mo) に接種してもプリオン病を発症しないが、SHa のPrPを発現させたTgマウスで [Tg(SHaPrP)] では伝播が成立し、その発現量が多いほど潜伏期間の短縮が見られた<sup>17</sup>。また、マウスの感染脳乳剤をPrPノックアウトマウスに接種しても発症しなかった<sup>18,19</sup>。これらの事実は、PrP<sup>Sc</sup>の複製にPrP<sup>C</sup>が不可欠であることを示している。

またMo PrPの95～170番のアミノ酸残基の領域をSHaのアミノ酸配列と置換したキメラPrPを発現するTgマウスが、Sc237に対してSHaと同様の感受性を示した<sup>20</sup>。PrP<sup>C</sup>の95～170番目のアミノ酸一次構造はPrP<sup>Sc</sup>への構造変換に重要でcentral regionと呼ばれ、その領域のアミノ酸配列の相違が“species barrier”を規定すると考えられている。Prusinerらは遺伝子改変動物を用いた多くの伝播実験から、「PrP<sup>C</sup>はPrP<sup>Sc</sup>を鋳型としてその高次構造をPrP<sup>Sc</sup>に変換する」というPrP<sup>Sc</sup>複製機構の仮説を提唱した<sup>17</sup>。現在ではこの仮説が広く受け入れられている。



このプリオン病の病因となると考えられているPrP<sup>Sc</sup>は一般的には経口感染することが多く、消化管でも分解されないため、小腸上皮から腸管のリンパ組織を経て、腹腔神経節に到達することが報告された<sup>21</sup>。現在ではここを経由で脊髄に到達すると考えられている。しかし、その実態については未だ不明な点が多いというのが現状である。

### 1-6 感染性と毒性

プリオン感染には、数年あるいは数十年も続くことがある、臨床的に無症状の潜伏期があり、急速に進行する短い臨床段階がこれに続く。2011年にCollingeらによって、プリオン病のRMLマウスモデルを用いた実験で、脳におけるプリオン増殖が2つのはっきり区別できる段階、すなわちプリオンタンパク質の濃度によって速度が制限されない、比較的短い指数関数的な増殖相と、これに続く平坦相を経て進行することが明らかにされた。意外にも、きわめて長く続くことがある潜伏期の大部分を占めるのは、後者の平坦相である。第1相と第2相の末期の感染性が同程度であることは、プリオンの感染性と毒性は別物であることを示唆している。著者たちは、プリオン自体には神経毒性がないが、宿主細胞がコードする細胞プリオンタンパク質からの神経毒性種の生成を触媒するのかもしれないと現在議論されている<sup>22</sup>。

### 1-7 プリオン病治療・予防法開発

従来、抗真菌剤であるアムホテリシン<sup>23</sup>や、アミノグリカンであるコンゴーレッド<sup>24,25</sup>などがプリオン病の治療に有効である可能性が示唆されていたが、現在までその有用性は確立されておらず、プリオン病に対する有効な治療法は存在しない。現在のプリオン病治療・予防法開発は、大きく2つのアプローチに分けられる。1. 基礎実験の積み重ねから理論的に導かれてきたアプローチとしては、



(1) 感染プリオン ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) の鋳型となる正常プリオン ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) を分解する方法、(2) ドミナントネガティブ効果を持つ防御型プリオン蛋白を利用する方法、(3) 抗プリオン抗体を用いる方法などがある。2. 理論はともかく現在医薬品として承認されている薬を幅広くスクリーニングすることにより、治療効果のある薬剤を見つけ出そうとするアプローチである。

(1) に関しては、 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の材料となる  $\text{PrP}^{\text{C}}$  を分解しても異常が現れないことは、 $\text{PrP}$  ノックアウトマウスの実験がすでに知られている<sup>26</sup>。しかし、この実験結果はヒトで副作用が現れないことを保証するものではない。しかしながら、CJD、ヤコブ病といったプリオン病は、治療を行わなければ現時点では100%致死性を示し、脳機能に不具合をきたす可能性があるため、「とにかく救命する」という選択肢は無視できないと考えられている。(2) の防御型プリオン蛋白質による、自らのみならず共存する変異を持たない野生型正常プリオンにも防御効果が発揮される現象は、ドミナントネガティブ効果と呼称されている。際に、この防御型プリオン蛋白を発現させたトランスジェニックマウスを用いた実験では、プリオン病の発症予防が可能であることがすでに確認されている。今後の問題は、これらの防御型プリオン蛋白を、いかにして体細胞レベル、すなわち小児や成人の成熟脳に大量に発現させるかといった点である。(3) は、 $\text{PrP}^{\text{C}}$  を認識する抗プリオン抗体を先に  $\text{PrP}^{\text{C}}$  と反応させることで、 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  と  $\text{PrP}^{\text{C}}$  との反応を阻害し、結果的に  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の増殖を抑制しようとするアプローチである。実際に培養細胞を用いた実験では、抗プリオン抗体によって  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の増殖が抑えられ、最終的には  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  が消滅してしまうことが確認された。また *in vivo* においても、すでに抗プリオン抗体を発現するリンパ球を増殖させることでの感染予防効果が確認されている。

現在、これらの治療法を組み合わせたカクテル療法の有効性が検討されている。

20世紀において、医学の前に大きく立ちのぼった疾患、例えばガンや AIDS に関わる HIV 感染における治療法開発の歴史を振り返ってみると、長年にわたる膨大な努力の結果、複数の治療法の組み合わせによる相乗効果に加え、副作用の少ない治療法が開発されてきた経緯がある。がんにおける手術療法、抗がん剤による化学療法、放射線療法、免疫療法の組み合わせ、HIV 感染におけるカクテル療法などである。プリオン病のみならず、21世紀における医学研究の最も重要な標的としての神経疾患の治療法開発を考えた場合には、がんや HIV 感染症と同じ取り組みが有効ではないかと考えられている。

## 第2章

### プリオンに対する抗体

#### 2-1 小序論

抗体は生命が作り出す最高の防御分子であり、細菌といった体内に侵入してきた外来抗原に結合する生体防御機構の中核となるタンパク質である。他にも抗体は、検出や診断といった領域でも非常に高い有用性を持っている。プリオンの研究でも様々な抗体が作製され報告されてきた。

#### 2-2 抗体

抗体は、生体においてウイルス、細菌といった体内に侵入してきた外来抗原に結合する生体防御機構の中核となる糖タンパク質である。抗体が抗原に結合すると、その抗原・抗体の複合体を白血球やマクロファージといった食細胞が認識し貪食することで体内から除去するように働き、リンパ球などの免疫細胞と結合し免疫反応を誘導する。このような働きを通じて抗体は生体の感染防御機構において重要な役割を担っている。

抗体は免疫グロブリン (Ig) と呼ばれ、IgA, IgD, IgE, IgG, IgMの5つのクラスに分けられる。その構造はIgGを例にすると基本構造としてY字型を有しており、各2本の重鎖 (H鎖)、軽鎖 (L鎖) が分子間ジスルフィド結合により安定な構造を取っている。Y字型の上半分をFab領域、下半分をFc領域と呼ばれている。抗原と結合する領域を可変領域 (V領域) といい、軽鎖の可変領域をVL領域、重鎖の可変領域をVH領域と呼ばれている。可変領域以外の部分は比較的变化の少ない部分であることから定常領域 (C領域) といい、軽鎖の定常領域をCL領域、

重鎖の定常領域をCH領域と呼び、さらにCH領域はCH1、CH2、CH3の3つの領域に分かれている (Fig.6)。

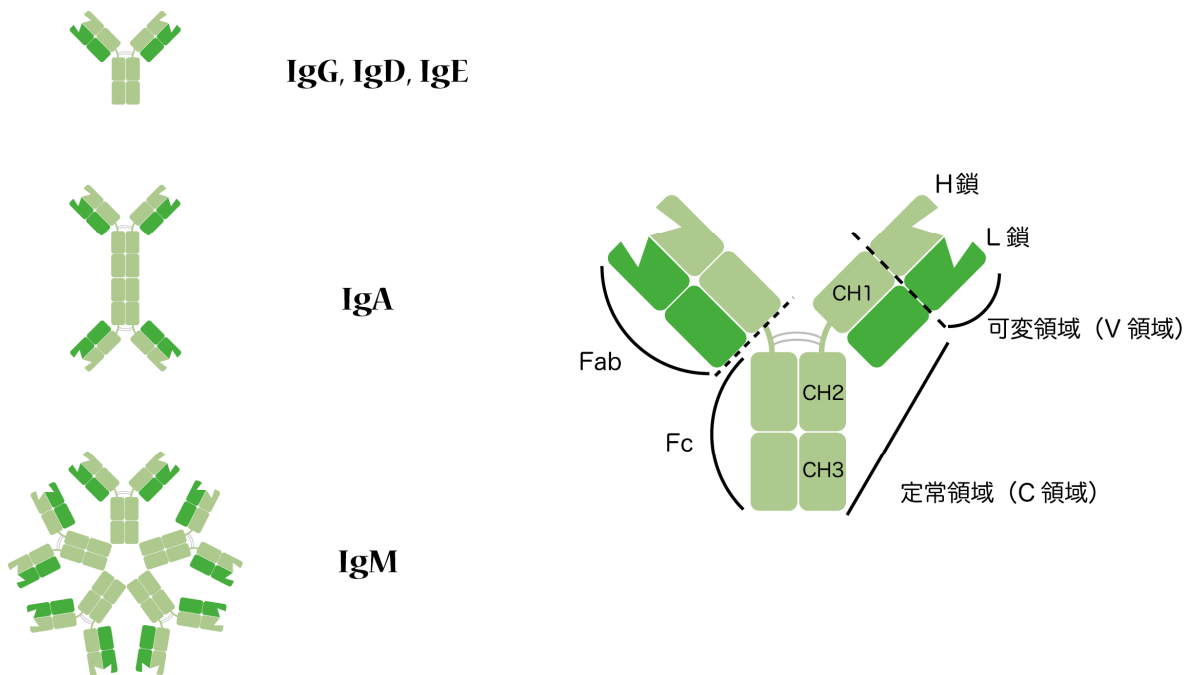


Fig.6 抗体のクラスとIgG抗体領域

抗体が抗原と結合する際に、抗原の一部 (エピトープ) を認識して結合しており、エピトープと結合する抗体側の部分はパラトープと呼ばれている。エピトープとパラトープの間には様々な分子間相互作用が働いており、その結合力を親和性 (アフィニティ) と呼ばれている。

抗体は抗原の立体構造を厳密に認識していることから、そのエピトープは必ずしも抗原の1次配列上に存在するとは限らず、リガンドの2次、3次構造といった高次構造によって出現するコンフォメーションエピトープを認識する場合もある。このような抗体は、同じアミノ酸配列でも立体構造によって機能が異なるリガンド (例えば、プリオンタンパク質の正常型と異常型など) の形を見分けることが可能となる。このような構造依存的抗体のエピトープ解析をラ

ンダムペプチドライブラリを用いて決定すると、リガンドの1次配列上に存在しない（相同性の低い）配列が得られてくる場合がある。このようなペプチドはリガンドの立体構造を模倣したアフィニティペプチドとなる可能性がある。このうなりリガンドとの相同性が低いコンフォメーションナルエピトープを一般的に『ミモトープ』と呼び、その合成ペプチドを『ミモトープペプチド』または『ミミックペプチド』と呼んでいる。

### 2-3 プリオンに対する抗体

プリオンに対する抗体は様々なものが報告されてきた<sup>27-38</sup>。一般的にはハイブリドーマ法で作成された抗体がほとんどであるが、全てに共通していることは正常型、異常型どちらにも反応をする抗体であることである（W261 (mouse IgG1, エピトープはC末端) は異常型プリオンを免疫沈降できる異常型プリオン特異的抗体として報告されているが、特異性や組織染色等に関する報告がまだされていない<sup>39</sup>）。以下に報告された抗体の一部を紹介する。

1998年にWilliamsonらによってプリオンに対するFab抗体が報告された<sup>40</sup>。*Prnp*ノックアウトマウスに対してプリオン感染脳から精製したPrP<sup>27-30</sup>もしくはPrP<sup>rods</sup>を免疫したマウスからハイブリドーマ法により作製した抗体が5種類。さらに同様の免疫後に、Spleenとbone marrowとlymph node tissueからtotal RNAを回収し、そこからFab library (IgG1k, IgG2ak, IgG2bk, IgG3k) を作製し、バイオパンニングにより特異的Fab抗体を単離した。下記にH鎖のFR3, CDR3, FR4の配列とエピトープをまとめたテーブルとプリオンの対する反応性をまとめたテーブルの論文からの抜粋を示す (Table.3)。

Table.3 Williamsonらによって報告されたFab抗体

Clone <sup>a</sup>	FR3 region sequence	CDR3 region sequence	FR4 region sequence	Epitope reactivity <sup>b</sup>
Immunization with MoPrP 27-30 rods				
PrP28	KATLTADKSSSTAYLDLRLTSEDSAVYFCAR	HDGYPFAY	WGQGTLLTVSA	DC
PrP3 <sup>recPrP</sup>	KATLTADKTSSTAHQLSSLTSEDSAVYFCAR	GFYYGSRYPMDY	WGQGTSLIVSS	DC
PrP28 <sup>DLPC</sup>	KATLTADKSSSTAYMDLRLTSEDSAAVFCAR	VPISVY	WGQGTTLTVSS	DC
PrP1 <sup>blocked</sup>	KATLTVDKSSSTAYIQPSLTSEDSAVYYCAR	WGPFFYYGSRPSYYAMDS	WGQGGSVTVFS	DC
PrP34 <sup>blocked</sup>	RATLTADKSSSTTAHLQLFSLSEDSAVYFCAR	SRSTNYFDY	WGQGTTLAVSS	DC
Immunization with dispersed SHaPrP 27-30 incorporated into liposomes				
R1	KATLTVDTSSSTAYVDLSSLTSEDSAVYYCAR	EGHFPPDY	WGQGTTLTVSS	III
R2	KATLTVDKSSSTAYIQLRLTSEDSAVYYCAR	EGDAYPFGH	WVQGTLLTVSS	III
R5	KATLTVDTSSSTAYVDLSSLTSEDSAVYYCTR	EDSSYPFAY	WGQGTTLTVSS	III
R10	KATITADTSSNTVYLQLRLTSEDTAIYYCGR	FDGNGWYFDV	WGAGTTTVSS	I
R23	KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	GGYYGAMDY	WGQGTSLTVSS	DC
R25	RATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSVYFCAR	RRLITLTVDSWSFDV	WGQGTTLTVSS	DC
R40	KATLTADKSSSTAYMELRLTSEDSAVYFCAR	DYVKGYFDV	WGTGTTTVSS	DC
R72	EATLTVDKSSSTAYMELRLTSEDTAVYYCVR	RGIYHYAMDY	WGQGTSLTVSS	II
D2	KATLTVDKSSSTAYMQLRLTSEDSAVYYCAR	EGDYYPFGH	WGQGTLLTVSS	III
D4	KATITADTSSNTVYLQLRLTSEDTAIYYCGR	FDGNGWYLDV	WGAGTTTVSS	I
D7	RFAFSLETSASTAYLQINNLQNETATYFCVS	RGGDYGSSAFDY	WGQGTTLTVSS	III
D13	RFTISRDNKNTLYLQMSSLSKSDDTAMYVCGR	LGGDYGGSYLDY	WGQGTTLTVSS	I
D14	KATLTVDKSSSTAYMELRLTSEDSAVYYCAA	YFYAMDY	WGQGTSLTVSS	DC
D18	KATLTVDKSSSTAYMELRLTSEDSAVYYCAG	FYYGMDY	WGQGTSLTVSS	DC

<sup>a</sup> Clones R1, R2, R5, R10, R23, R25, R40, and R72 were panned against recombinant SHaPrP(90-231) and clones D2, D4, D7, D13, D14, and D18 were panned against dispersed SHaPrP 27-30.

<sup>b</sup> DC, discontinuous. I, II, and III are designations of linear epitope regions as described in the text.

2005年にGrassiらによってプリオンの様々なエピトープに対する抗体を集めて、PrP<sup>res</sup>増幅阻害実験の結果について報告した<sup>28</sup>。どのエピトープに対しても阻害率が高い低いはあるものの全ての正常型、異常型どちらにも反応する抗体で阻害が観察された。下記に用いられた抗体をまとめたテーブルの論文からの抜粋を示す (Table.4)。

Table.4 Grassiらによって集められた様々なプリオンのエピトープに対する抗体

A. Monoclonal anti-PrP antibodies directed against PrP or SAFs were used for the screening. Antibodies of the Pri series were raised against synthetic peptides of human PrP (38). Antibodies of the DFZ series (11C6, 3B5, 12P10, 4P2, 9C35) were raised against human recombinant PrP (52, 53). Antibodies of the SAF series were raised against proteinase K-treated and formic acid-denatured scrapie-associated fibrils from Syrian hamster-infected brain (263K) (38). Antibodies of the BAR series were raised against ovine recombinant PrP. Antibodies of the  $\beta$ S series were raised against a mutated form of murine PrP (23-231), obtained by heterologous expression in bacteria (54). The far UV CD analysis of this mutated protein (pH 7.0, no added denaturants) revealed an extensive  $\beta$ -sheet conformation, with little or no  $\alpha$ -helix present. Antibodies of the  $\beta$ H series were raised against a recombinant  $\beta$ -folded human PrP. Antibodies of the Sha series were raised against proteinase K-treated and non-denatured scrapie-associated fibrils from Syrian hamster-infected brain (263K). Linear epitopes recognized by the different mAbs were identified as described under "Materials and Methods." mAbs for which no linear epitope was identified were categorized as "conformational" or "unidentified," indicating that they bind a conformational epitope of PrP or another unknown antigen. Species specificity of the different mAbs was determined by Western blot, two-site immunometric assay, solid phase immobilized epitope immunoassay (SPE-IA), and/or immunoprecipitation experiments.

B. Monoclonal antibodies of specificity unrelated to PrP. Antibodies of the  $\alpha$ L1 series were raised against  $\alpha$ -interleukin. Antibodies of the NSP series were raised against the N-terminal part of the substance P peptide coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH) (55). Antibodies of the GI family were raised against the monomer of acetylcholinesterase from Bungarus snake.

A	Monoclonal antibody	Immunogen	Linear epitope on PrP (when identified)	Species recognized	
				Murine PrP	Ovine PrP
A	BAR19	Recombinant ovine PrP	29-RPKPQGGG-34	-	++
	BAR231	Recombinant human PrP	30-PGGWNTGG-38	-	+
	SH1, 4P2	Recombinant human PrP	-	++	++
B	SAF15, SAF31, SAF32, SAF33, SAF34, SAF35, SAF37	PK-treated, acid-formic denatured SAF from Syrian Hamster	59-QPHGGGW(x4)-89	++	++
	BAR238	Recombinant ovine PrP	-	-	+/
C	1C6	Recombinant human PrP	97-SQWNKP-102	++	++
D	Pn308	Synthetic peptide Pn3, human PrP	111-HAAGAAA-118	-	-
	BAR215	KTNMKHMAGAAAGAVVGLG	138-MSRPLIFGN-147	+/	+/
	BAR221, BAR224, BAR233	Recombinant ovine PrP	141-FGSDYEDRYR-151	++	++
E	BAR234	Recombinant ovine PrP	141-FGSDYEDRYR-151	++	++
	Sha31	Proteinase-K treated, non-denatured SAF from Syrian Hamster	156-RYPNQVYRPM-166	++	++
	12P10	Recombinant human PrP	224-RESQAYYGR-228	++	++
	SAF45	Recombinant human PrP	145-YEDRYRE-152	++	++
	SAF51	Recombinant human PrP	144-DYEDRYRE-152	++	++
	SAF75, SAF76	Recombinant human PrP	143-SQYEDRYREN-153	++	++
	SAF54	Recombinant human PrP	142-SQYEDRYREN-153	++	++
	SAF60	Recombinant human PrP	144-DYEDRY-149	-	+
	SAF69	Recombinant human PrP	157-YPNQV-161	++	++
	SAF70	Recombinant human PrP	157-YPNQV-161	++	++
	SAF68	Recombinant human PrP	156-RYPNQV-162	++	++
	SAF4, SAF8, SAF9, SAF10, SAF13, SAF14, SAF22, SAF24, SAF62, SAF65	Recombinant human PrP	Bind peptide 142-160	+/	+
F	SAF84	Recombinant human PrP	Recognize solid-phase immobilized peptide 126-164 but fail to bind peptide 142-160	-	+
	SAF83	Recombinant human PrP	216-TQYERE-221	++	+
	Pn917	Synthetic peptide Pn9, human PrP	CITQYERESQAYYGRGS	++	+
G	11C6	Recombinant human PrP	-	++	+
	SAF1, SAF5, SAF7, SAF11, SAF21, SAF23, SAF67, SAF73, SAF77, SAF80	PK-treated, acid-formic denatured SAF from Syrian Hamster	-	-	+
	BAR201, BAR202, BAR203, BAR205, BAR206, BAR213, BAR216, BAR217, BAR219, BAR220, BAR229, BAR234, BAR235, BAR236, BAR239, BAR240, BAR257, BAR258, BAR259, BAR261, BAR264, BAR265, BAR266, BAR267, BAR268, BAR269, BAR270, BAR271, BAR272, BAR273, BAR274, BAR275, BAR276, BAR277, BAR278, BAR279, BAR280, BAR281, BAR282, BAR283, BAR284, BAR285, BAR286, BAR287, BAR288, BAR289, BAR290, BAR291, BAR292, BAR293, BAR294, BAR295, BAR296, BAR297, BAR298, BAR299, BAR300, BAR301, BAR302, BAR303, BAR304, BAR305, BAR306, BAR307, BAR308, BAR309, BAR310, BAR311, BAR312, BAR313, BAR314, BAR315, BAR316, BAR317, BAR318, BAR319, BAR320, BAR321, BAR322, BAR323, BAR324, BAR325, BAR326, BAR327, BAR328, BAR329, BAR330, BAR331, BAR332, BAR333, BAR334, BAR335, BAR336, BAR337, BAR338, BAR339, BAR340, BAR341, BAR342, BAR343, BAR344, BAR345, BAR346, BAR347, BAR348, BAR349, BAR350, BAR351, BAR352	Recombinant ovine PrP	-	-	+
	5S9	Recombinant 5-folded murine PrP	unidentified	+	+
	6S16, 6S18, 6S26, 6S29, 6S31, 6S36, 6S37, 6S39, 6S41, 6S43	Recombinant 5-folded human PrP	unidentified	+	+
	6S11, 6P2, 6P3	Recombinant 5-folded human PrP	unidentified	+	+
	Sha4, Sha5, Sha6, Sha7, Sha8, Sha9, Sha11, Sha12, Sha13, Sha14, Sha15, Sha16, Sha17, Sha18, Sha19, Sha20, Sha22, Sha23, Sha24, Sha27, Sha28, Sha29, Sha30, Sha32, Sha33, Sha34, Sha35, Sha36, Sha39, Sha40, Sha42, Sha44, Sha45, Sha46, Sha36, Sha37, Sha38, Sha49, Sha50, Sha51, Sha52	Proteinase-K treated, non-denatured SAF from Syrian Hamster	unidentified	+	+
	Not identified as anti-PrP			+	+/
	Not identified as anti-PrP			+	+/
	Not identified as anti-PrP			+	+/
B	Monoclonal antibody	Isotype	Immunogen		
	$\alpha$ L1-101	IgG1	$\alpha$ -interleukin		
	NSP-11	IgG2a	N-terminal part of substance P : RPKPQGGG-KLH		
	NSP-20	Ig3	N-terminal part of substance P : RPKPQGGG-KLH		
	NSP-48	IgM	N-terminal part of substance P : RPKPQGGG-KLH		
G1-5		IgG2b	G monomer of acetylcholinesterase from Bungarus snake		

2004年にCollingeらによってPrnpノックアウトマウスにリフォールディングした組み換え体ヒトプリオンタンパク質の正常型もしくは異常型を免疫したマウスからハイブリドーマ法により作製した抗体、ICSM抗体が報告された<sup>32</sup>。下に報告されたICSM抗体の種類とエピトープ、プリオンに対するアフィニティ、阻害に対してまとめたテーブルの論文からの抜粋を示す (Table.5)。

Table.5 Collingeらによって報告された抗体

–, no inhibition; +,  $<10\times$  decrease of  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  levels; ++,  $\sim 10\times$  decrease; +++++,  $>500\times$  decrease; ++++++,  $>1000\times$  decrease.

ICSM	Immunogen <sup>a</sup>	Epitope <sup>b</sup>	Immunoreactivity <sup>d</sup>		Inhibition <sup>e</sup>
			PrP <sup>c</sup>	PrP <sup>Sc</sup>	
% ± S.D.					
4	α	C	37 ± 8	0	—
6	α	C	27 ± 14	0	—
7	α	C	26 ± 17	0	—
17	α	140–159	26 ± 11	0	—
18	α	146–159	183 ± 8	4 ± 1	+
19	α	C	91 ± 26	0	++
41	α	C	162 ± 44	4	—
44	α	C	58 ± 37	3	—
35	β	96–109	100	100	+++++
37	β	96–109	109 ± 8	190 ± 7	+++++
42	β	96–109	94 ± 22	90 ± 4	+++++

<sup>a</sup>  $\alpha$  and  $\beta$  refer to human recombinant  $\alpha$ - and  $\beta$ - $\text{PrP}^{91-231}$ .

<sup>b</sup> Residue numbering refers to mouse prion protein sequence.

<sup>c</sup> C, conformational epitope.

<sup>d</sup> Estimated by at least three independent immunoprecipitation experiments and compared with the affinity obtained with ICSM 35.

<sup>e</sup> Observed at the  $10 \mu\text{g/ml}$  dose after 3 weeks of treatment.

この中のICSM35とICSM18、特にICSM18はfully humanized ICSM18 IgG1とIgG4が作製され、さらにマウス脳で抗体により神経細胞へのアポトーシスを起こさないことが示され、臨床応用へ期待がされている<sup>41</sup>。

その他、今までに報告されている抗体の一部を下記に示す (Table.6)<sup>27,30,31,33-38</sup>。



Table.6 2011年までに報告された抗体

antibody	immunogen	epitope	isotype
V5B2	peptide214-226	214-226	-
6H10	PrP <sup>Sc</sup>	C-terminal	IgG2b
IgM antibody	peptide106-126	106-126	IgM
15B3	recombinant bovine PrP	142-148, 162-170, 214-226	IgM
YYR	peptide162-164	162-164	IgM
8B4	recombinant mouse prion protein	34-52	IgG1
8H4	recombinant mouse prion protein	175-185	IgG1
8F9	recombinant mouse prion protein	205-233	IgG1
MA3.B4	recombinant hamster prion protein (panning)	-	scFv
MA3.G3	recombinant hamster prion protein (panning)	-	scFv

様々なプリオン抗体が報告されてきたが、全てanti PrP<sup>Sc</sup> / PrP<sup>C</sup>抗体、anti PrP<sup>C</sup>抗体、変性プリオンを検出する抗体であった（前述で述べたようにW261抗体は例外である）。ここからわかることはanti PrP<sup>Sc</sup>もしくはanti  $\beta$ -form PrP抗体はいまだに確立されていないということが分かる。また、これらの報告からノックアウトマウスへ免疫して抗体を作製する手法が多く取られているが、anti PrP<sup>Sc</sup>もしくはanti  $\beta$ -form PrP抗体を得るのは非常に困難なことも予想でき、別の抗体単離

法（ファージディスプレイ法など）を用いることが必要であると考えられる。

#### 2-4 ファージディスプレイ法

ファージとは大腸菌に感染することで増殖・複製を行うウイルスのことである。ファージの増殖サイクルは、ファージ上にあるgIIIタンパクを介して吸着し感染を成立させる。Smithらは、ファージのminor coat proteinであるgIIIタンパクをコードしている遺伝子内に外来タンパクをコードする遺伝子を挿入し、ファージ表面上にgIIIタンパクとの融合タンパクとして発現させ、この融合タンパクはgIIIタンパクの機能に影響がないことを見出した<sup>42</sup>。そこで彼らは、このgIIIタンパク部位にランダムなペプチドを発現させ、ファージディスプレイライブラリを作製した。Smithらはこのファージディスプレイライブラリを用いることでモノクローナル抗体の抗原決定基の同定に成功している。この他にも、同様にしてエラスターゼに対するインヒビターや、糖識別部位に結合するペプチドなどが得られている。当研究室でも、ファージディスプレイライブラリによるレセプターとリガンドとの結合を特異的に阻害するミミックモチーフの同定を行ってきた<sup>43</sup>。当研究室の福元らは、抗CTLA4抗体に結合するペプチドファージの単離を行い、そのファージのモチーフはCTLA4の構造をミミックしており、CD80/CD86との結合を阻害し、T細胞抑制のシグナルを阻害することを明らかにした<sup>43,44</sup>。今回用いることにした抗体ファージライブラリの利点として、以下が挙げられる。1)クローン化、スクリーニングの簡略化：細胞融合や大規模なスクリーニングは時間もかかり、面倒な作業が続く。単離されたファージクローンからの抗体遺伝子のクローニングが用意である。2) 抗体ファージの多様性：同じ抗原特異性を示す多種類のファージクローンが単離できる<sup>45</sup>。3)完全なヒト抗体の単離が可能である。4)ネガティブセレクション：生体内では自己抗原に対す

る抗体はトランスを起しているが、抗体ファージでは自己分子に対する抗体も単離できる。抗体に標識をつけたりすることで、プリオン病の生前診断法の開発など利用可能になる。

当研究室では、化学及血清療法研究所によって開発されたM13ファージの抗体ライブラリを用いて、標的とする蛋白質と結合する抗体の単離を行っている。

M13ファージの抗体ライブラリは、 $VH(\gamma) - VL(\lambda)$ ,  $VH(\gamma) - VL(\kappa)$ ,  $VH(\mu) - VL(\lambda)$ ,  $VH(\mu) - VL(\kappa)$ の組み合わせで、VHとVLをリンカーでつないで、pCANTAB-5Eベクターに組み込んで作製したライブラリである (Fig.7) 。抗原結合部位は、scFv (single-chain variable fragment) 断片の形で、ファージのg3pとの融合タンパク質としてファージ表面上に提示される。そのため、パンニングやアフィニティカラムによりファージを直接スクリーニングできるうえに、スクリーニングとファージの増殖のサイクルを繰り返すことで、特定の抗体を発現したファージを選択的に濃縮することができる。

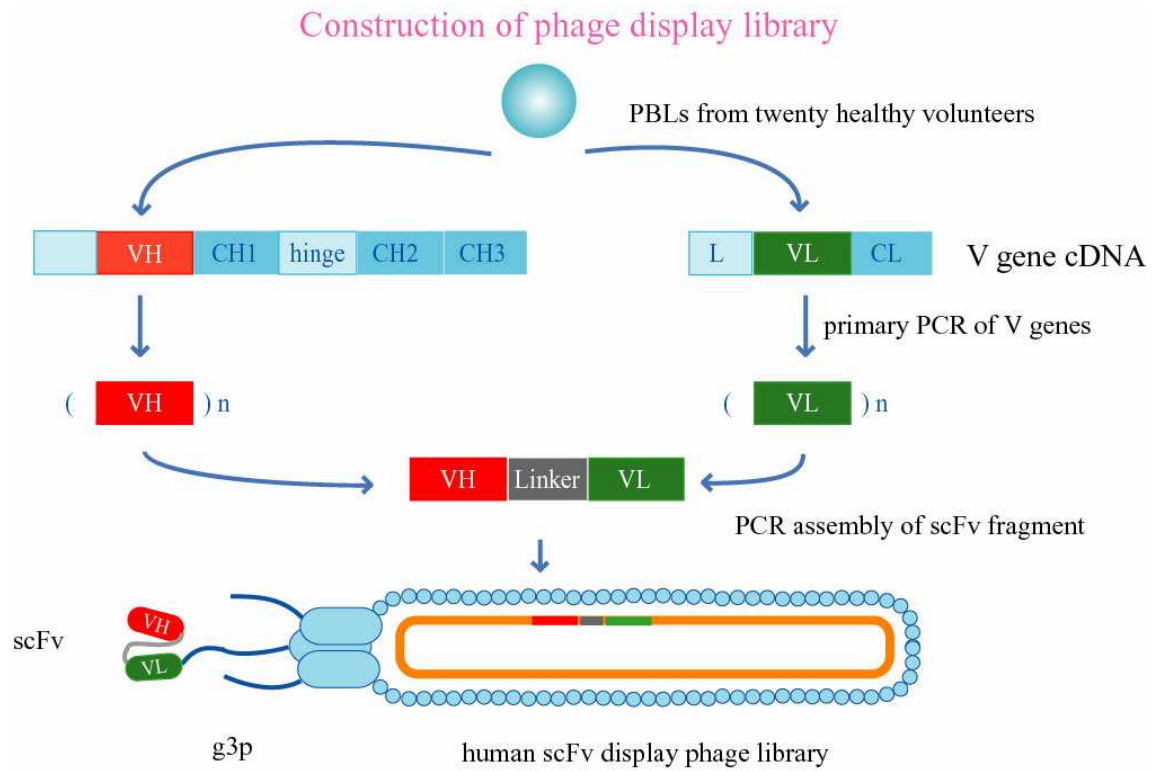


Fig.7 ファージディスプレイライブラリの作製の流れ

## 第3章

### 遺伝子組み換えプリオンタンパク質の作製とその生化学的解析

#### 3-1 小序論

遺伝子組み換えプリオンタンパク質の精製法と精製したプリオンタンパク質のリフォールディングは論文で報告された方法に準じて行った<sup>9,46</sup>。また、リフォールディングをした $\alpha$ -form PrPと $\beta$ -form PrPの生化学的特徴を解析するためにCDスペクトラム、AFM、PK抵抗性、ELISAを用いて解析を行った。これらの結果より、 $\alpha$ -form PrPは2次構造が $\alpha$ ヘリックスを持った構造体であり、 $\beta$ -form PrPは $\beta$ シート構造を持った構造体でありかつPKに対して抵抗性を持つものであった。

#### 3-2 材料と方法

##### ・プリオン発現ベクターとプリオン発現大腸菌株

PrP発現ベクターは以前に報告したものを用いた<sup>47</sup>。簡単に説明すると、ヒトPrP23-231のDNAフラグメントはHEK293T細胞のgenomic DNAからforward primer (5'-gcggatccaagaagcgcccgaaagcctgga-3') と back primer (5'-ccaagcttctatcagctcgatcctctctggaata-3') を用いてPCRにより伸ばした。DNAフラグメントはBamHIとHindIIIを用いて切断後、His-tag配列を持つpQE30ベクターに挿入した。その後、pQE30ベクターはM-15大腸菌に形質転換をし、human PrP (23-231) / pQE30 / M-15大腸菌を作製した。Bovine PrP (25-242)、mouse PrP(23-231) と sheep PrP(25-234) に関しても同様の手法を用いて作製した。

### ・プリオンの発現と精製

PrP (23-231)/pQE30/M-15大腸菌をLB/ampicillin, kanamycin plate ( LB/AK, 100 µg/ml ampicillin, 50 µg/ml kanamycin) にプレーティングし、37°Cでインキュベートした。シングルコロニーを10 mlのLB/AK mediumで37°C、6時間から10時間培養した。この10 mlの培養液を90 mlのLB/AK mediumに移し、37°C、一晩培養した。100 mlのovernight cultureを700 mlのLB/AK mediumに移し、37°C、1時間培養した。その後1 M IPTGを800 µl加え (final 1 mM)、37°C、6時間培養した。遠心 (6000 rpm、10 min、4°C) で大腸菌を取り、大腸菌ペレットを40 mlのLysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 200 mM NaCl, 0.1% Triton X, 100 µg/ml lysozyme, 50 µg/ml Dnase I, 5 mM MgCl<sub>2</sub>)で溶かした。その後、超音波破碎 (OUT PUT 4, 2min x 5回)をし、氷上で30分間インキュベートした。その後、遠心 (15000 rpm, 30 min, 4°C) でPrPが入っている不溶性各分のペレットを回収した。ペレットを20 mlのSolubilizing buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM 2ME, 0.5 mM PMSF, 8 M urea)で溶かし、常温で30分間振った。その後、遠心 (15000 rpm, 20 min, 25°C) により不溶性物質を取り除き、さらに0.45 µmのフィルターを通した。次に、完全にDNAを取り除くために陽イオン交換カラムであるCM-TOYOPEARL (TSKgel TOSOH) を用いた。サンプルは20 mlを通し、20 mlのSolubilizing buffer 2 (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 8 M urea)を通し、20 mlのElution buffer ( 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 300 mM NaCl, 8 M urea)を通した。(CM-TOYOPEARLはPBS/0.02% N<sub>3</sub>Nで保存した。) huPrPにはHis tagがついているために、アフィニティーカラムであるNi Column (Amersham Bioscience)を用いた。カラムにNiイオンを充填するために、ddwを5 ml通し、500 µlの0.1 M NiSO<sub>4</sub>を通し、ddwを5 mlを通した。カラムに10 mlのbinding buffer ( 10 mM Imidazole, phosphate buffer (pH7.4), 8 M urea) を通し、20 mlのサンプルを通し、10 mlのbinding bufferを通した。その後、6 mlのElution buffer

(10 mM Imidazole, phosphate buffer (pH7.4), 8 M urea) を通した。フラクションは1 mlずつ回収した。サンプルは、10 mMになるように2MEを加え、一晩、常温でインキュベートした。その後、9 M urea / 0.1 M Tris-HCl (pH8.0)に2日間、常温で透析をした。(buffer交換はその間5回以上行った。) その後、0.45  $\mu$ Mのフィルターを通した。ジスルフィドボンドを形成しているPrPだけを分取するために、逆相カラムであるC4 HPLCカラムを通し分取した。Running bufferは、0.1% TFA/20 % acetonitrile (A line) と0.1% TFA/80 % acetonitrile (B line)を用いた。プログラムは下記に示す通り (Table.7)。

Table.7 C4 HPLC Program

Time (min)	Flow ( ml / min)	A line	B line
0	2	100%	0%
10	2	100%	0%
55	2	35%	65%
65	2	100%	0%
70	2	100%	0%

C4 HPLCカラムより分取したサンプルは、約2日間かけて凍結乾燥を行った。その後、エッペンチューブに分けて、-20℃で保存した。

#### ・ $\alpha$ -PrPと $\beta$ -PrPのリフォールディング

リフォールディングの方法は、1999年にCollingeらによって報告されたリフォールディング方法に準じた形で行った<sup>46</sup>。

$\alpha$ -form PrPを作製するため、6 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH8.0)/10 mM

Tris acetate (pH8.0)/100 mM DTTに透析されているサンプルを2週間かけて下記の  
ように10 mM Sodium acetate (pH8.0)/10 mM Tris acetate (pH8.0)になるように4℃  
で透析した。

※ GndHCl の濃度が 1 M 付近になると凝集を起こしやすいのでその時間帯の濃  
度変化をゆっくりと行くと高濃度の $\alpha$  form PrP を作ることが出来た。

1 days : 6 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH8.0)/10 mM Tris acetate (pH8.0)

2 days : 3 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH8.0)/10 mM Tris acetate (pH8.0)

3 days : 1.5 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH8.0)/10 mM Tris acetate (pH8.0)

4 days : 1.0 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH8.0)/10 mM Tris acetate (pH8.0)

5 days : 0.75 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH8.0)/10 mM Tris acetate (pH8.0)

6 days : 0.5 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH8.0)/10 mM Tris acetate (pH8.0)

7 days : 0.25 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH8.0)/10 mM Tris acetate (pH8.0)

8 days : 0.125 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH8.0)/10 mM Tris acetate (pH8.0)

9 days : 0.06 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH8.0)/10 mM Tris acetate (pH8.0)

10days : 0.03 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH8.0)/10 mM Tris acetate (pH8.0)

11,12 daysは10 mM Sodium acetate (pH8.0)/10 mM Tris acetate (pH8.0) に透析をす  
る。(buffer交換は5回以上行った。)

$\beta$ -form PrPを作製するため、6 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH8.0)/10 mM  
Tris acetate (pH8.0)/100 mM DTTに透析されているサンプルを2週間かけて下記の  
ように10 mM Sodium acetate (pH4.0)/10 mM Tris acetate (pH4.0) になるように4℃  
で透析した。

1 days : 6 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH4.0)/10 mM Tris acetate (pH4.0)

2 days : 3 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH4.0)/10 mM Tris acetate (pH4.0)



3 days : 1.5 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH4.0)/10 mM Tris acetate (pH4.0)  
4 days : 1.0 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH4.0)/10 mM Tris acetate (pH4.0)  
5 days : 0.75 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH4.0)/10 mM Tris acetate (pH4.0)  
6 days : 0.5 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH4.0)/10 mM Tris acetate (pH4.0)  
7 days : 0.25 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH4.0)/10 mM Tris acetate (pH4.0)  
8 days : 0.125 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH4.0)/10 mM Tris acetate (pH4.0)  
9 days : 0.06 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH4.0)/10 mM Tris acetate (pH4.0)  
10days : 0.03 M GndHCl/10 mM Sodium acetate (pH4.0)/10 mM Tris acetate (pH4.0)  
11,12 daysは10 mM Sodium acetate (pH4.0)/10 mM Tris acetate (pH4.0) に透析をする。  
(buffer交換は5回以上行った。)

#### • CDスペクトラム

CD (Circular dichroism) スペクトラムはJ-820 spectrometer (Jasco) で0.1 cmキューベットを用いて測定した。測定条件はscanning: 20 nm/min, bandwidth: 1 nm, data spacing: 0.5 nmで行った。それぞれのスペクトラムの積算回数は3回行い、バックグラウンドスペクトラムを引いたものをデータとした<sup>9</sup>。

#### • AFM

AFM (Atomic force microscopy) はSPI-3800 (Seiko Instruments, Chiba, Japan) を用いて測定した。プリオンは5.4 mg/mlの溶液を希釈後数具にfresh micaの表面に静置後すぐに測定をした<sup>48</sup>。

#### • PK抵抗性

リコンビナントPrP (100 µg/ml) はそれぞれのPK (proteinase K) で1時間、37℃

で処理した。その後、最終濃度が2 mM になるようにPMDFを加えた。サンプルは2 x sample bufferを加えた後、Tris-tricine gelに流し、CBBにより染色を行った<sup>9</sup>。

#### ・様々なエпитープに対するプリオン抗体とELISAを用いたプリオンタンパク質の構造的特徴

ELISAは以前に報告した方法に準じて行った<sup>49-54</sup>。Microtiter plate (Nuc, Denmark) はPrP (100 ng/50 ml/well) をコートした。その後0.25% BSA/PBSを用いて1時間ブロック後、Anti-PrP Fab (HuM-P (epitop: 96-105), HuM-D18 (epitope: 133-157), HuM-D13 (epitope: 96-106), HuM-R72 (epitope:152-163) ; 1:500) <sup>29,40,55</sup>を1時間反応させた。その後、検出のためビオチン化したanti-Fab antibody (1:1000; 50 ml/well) と alkaline phosphatase (AP) をコンジュゲートしたstreptavidinを反応させた。その後、50  $\mu$  lの基質溶液 (パラニトロフェニルリン酸[2mg/ml]/10% 2,2-イミノジエタノール/PBS) を加え時間依存的な発色 (405nmにおける吸光度) をマイクロプレートリーダーで計時的に測定した。

### 3-3 結果

#### ・C4カラムによるジスルフィド結合を持ったプリオンタンパク質の精製

最終精製である、C4カラムによる精製を行うための分析を行った。還元剤である2MEを用いた場合は34分付近 (アセトニトリル濃度40%) にピークが観察されたが、2MEなしのジスルフィド結合が存在する場合は37分付近 (アセトニトリル濃度45%) にピークが観察された。実際、分取の際は45%付近のピークが分取できるようにプログラムを組んで行った。

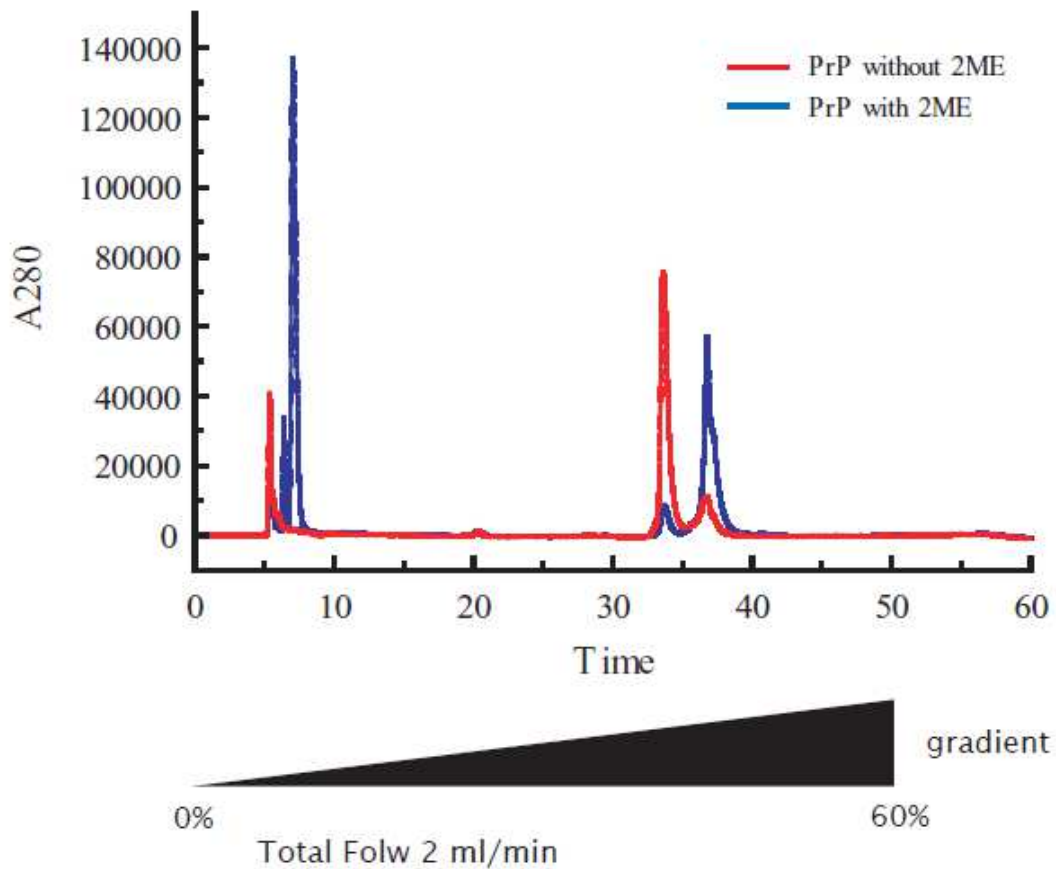


Fig.8 CH4カラムを用いた酸化プリオンと還元プリオンのピーク

#### ・CDスペクトラム

リフォールディングしたプリオンタンパク質の2次構造を調べるためにCDスペクトラムを測定した (Fig.9)。結果として、 $\beta$ -form PrPは $\beta$ シート構造の特徴的なピークである、215 nm付近に負のピークを示した。また、 $\alpha$ -form PrPは $\alpha$ ヘリックスの特徴的なピークである、210 nmと220 nmに負のピークを示した。よって、リフォールディングした $\beta$ -form PrPは $\beta$ シート構造を、 $\alpha$ -form PrPは $\alpha$ ヘリックス構造を持つタンパク質であることが示された。

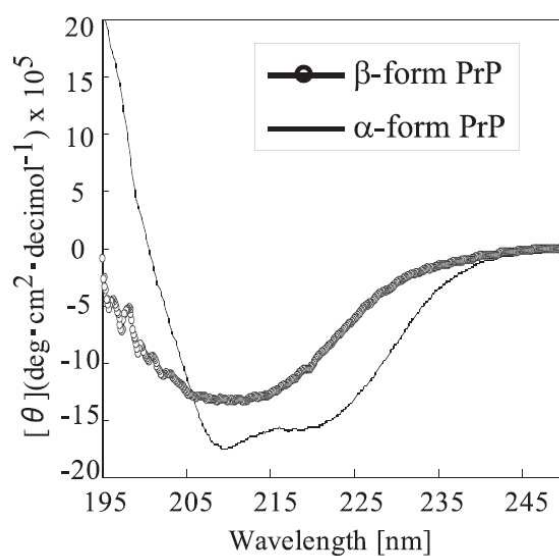


Fig.9 リフォールディングしたプリオンタンパク質のCDスペクトラム

#### • AFM

AFMは近畿大学の赤坂先生に頼んで行っていただいた (Fig.10) 。結果としては非常に均一な球形粒子であり、サイズは直径が~47 nm、高さが~1.6 nmであった。

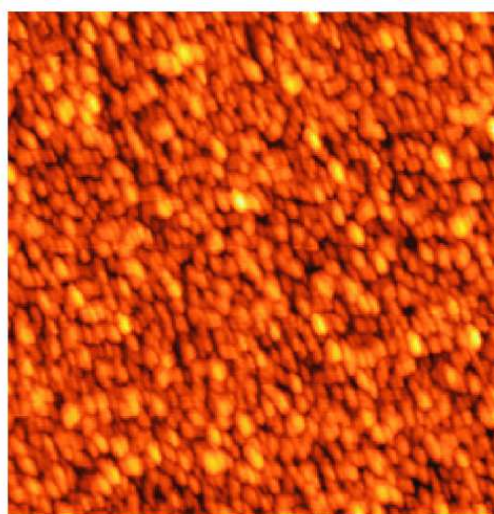


Fig.10 β-form PrPのAFM

### ・PK抵抗性

リフォールディングしたプリオンタンパク質のPK抵抗性を調べた (Fig.11) 。  
その結果、 $\alpha$ -form PrPは2  $\mu\text{g/ml}$ のPK濃度で抵抗性が消失したが、 $\beta$ -form PrPは8  
 $\mu\text{g/ml}$ の濃度までPKの濃度を上げたがPK抵抗性を維持し続けた。

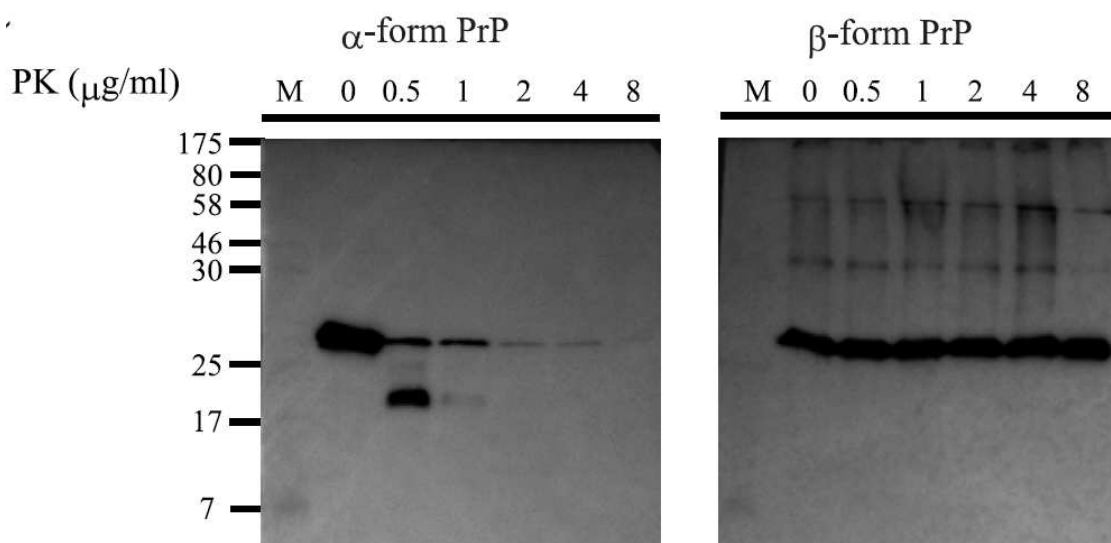


Fig.11 リフォールディングしたプリオンタンパク質のPK抵抗性

### ・様々なエピトープに対するプリオン抗体とELISAを用いたプリオンタンパク質の構造的特徴

Inpro社のFab抗体を用いて、プリオンの構造的特徴を調べた (Fig.12) 。その結果、133－157を認識するD18抗体は、 $\alpha$ -form PrPには結合活性があるが、 $\beta$ -form PrPに対する結合活性が減少した。しかしながら、その他のエピトープを認識する抗体 (HuM-P (epitope: 96-105), HuM-D13 (epitope: 96-106), HuM-R72 (epitope:152-163)) は $\alpha$ -form PrPと $\beta$ -form PrPの構造の違いを見分けることは無かった。

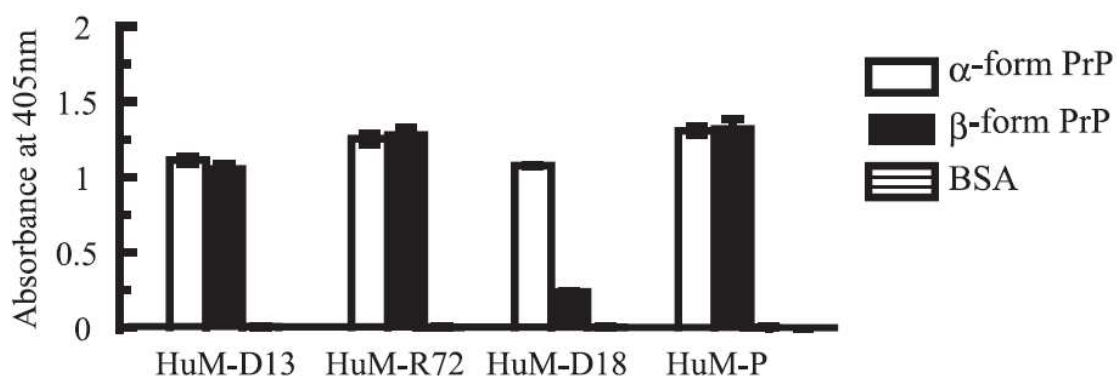


Fig.12 ELISAを用いたリフォールディングしたプリオンタンパク質の構造的特徴の解析

### 3-4 小括

これらの結果より、 $\alpha$ -form PrPは2次構造が $\alpha$ ヘリックスを持った構造体であり、 $\beta$ -form PrPは $\beta$ シート構造を持った構造体でありかつPKに対して抵抗性を持つものであった。また、D18抗体は、 $\alpha$ -form PrPには結合活性があるが、 $\beta$ -form PrPに対する結合活性が減少した論文の報告通りであった<sup>29,40,55</sup>。

## 第4章

### ファージディスプレイ法を用いた $\beta$ -form PrP特異的一本鎖抗体

#### (single chain Fv, scFv)の単離とその特異性

##### 4-1 小序論

バイオパンニングによりPRB7 scFvとPRB30 scFvの二つの抗体を単離し、この二つのscFvは $\beta$ -form PrPに対して特異的に結合することを示した。さらに、プリオンタンパク質のゲル濾過クロマトグラフィーをすることで回収されたフラクションに対しての二つの抗体の結合活性は、 $\beta$ シート構造を持っているプリオンタンパク質に対して特異的であることを示した。

##### 4-2 材料と方法

###### ・ファージライブラリ

pCANTAB5Eベクターを用いたヒト一本鎖抗体を提示したファージライブラリは以前からこの研究で用いられていた<sup>49,51,52</sup>。M13 ファージの抗体ライブラリは、 $VH(\gamma) - VL(\lambda)$ ,  $VH(\gamma) - VL(\kappa)$ ,  $VH(\mu) - VL(\lambda)$ ,  $VH(\mu) - VL(\kappa)$ の組み合わせで、VH とVL をリンカーでつないで、pCANTAB-5Eベクターに組み込んで作製したライブラリである。抗原結合部位は、scFv (single-chain variable fragment) 断片の形で、ファージのg3pとの融合タンパク質としてファージ表面上に提示される。

###### ・バイオパンニング

バイオパンニングは論文に準じて行った<sup>49,51-53</sup>。方法としては、b-form PrPに特異的に結合する抗体ファージを単離するために、まず、 $\alpha$ -form PrPに結合する抗体ファージを取り除くため、folding buffer (pH8.0) の条件下でイムノチューブに

$\alpha$ -form PrP (5 mg) をコートし、コートしたチューブにscFvを提示したファージライブラリ ( $1 \times 10^{12}$  pfu/50  $\mu$ l) を反応させた。1時間後に、 $\alpha$ -form PrPに結合していない抗体ファージを回収し、folding buffer (pH4.0) の条件下でイムノチューブにb-form PrP (5  $\mu$ g) をコートし、コートしているチューブに回収した抗体ファージを反応させた。1時間後に、結合していない抗体ファージを0.1% tween20/folding buffer (pH4.0) で洗浄することで取り除き、結合している抗体ファージを0.1 M glycine-HCl (pH2.2) で外し、回収後、すぐに1M Tris-HCl (pH9.1) で中和した。回収した抗体ファージはTG1に感染させることで増幅し、次ラウンドでも同様の操作を繰り返すことで抗体ファージの濃縮を行った。

・ **ELISAによるPRB7 scFv, PRB30 scFvファージクローンとscFvの特異性**

96 穴プレートにプリオンタンパク質 (50 ng/40  $\mu$ l/well) を4°C、16 時間それぞれのfolding bufferでコートし、0.5% gelatin/PBSで2時間室温でブロックした。0.1% Tween20/PBS で3回洗浄後、クローン化したファージ ( $5 \times 10^{11}$  TU/40  $\mu$ l/well) もしくはscFv (200 ng/40  $\mu$ l/well) をそれぞれ1ウェルに40 $\mu$ l加えて室温で1時間反応させた。0.1% Tween20/PBS で3 回洗浄後、ビオチン化したファージに対する抗体 (anti-M13 mAb-biotin, pharmacia より購入したものをビオチン化した) を加えて室温で1時間反応させた。アルカリフォスファターゼ標識したstreptavidin (SA-AP) を加えて (40  $\mu$ l/well) 、室温で30分間反応させた後、基質であるp - ニトロフェニルリン酸溶液を加えて405 nmの吸光度を測定して結合したファージを検出した。

・ **pHによる影響を確認するためのELISA**

上記のELISAの方法と同様だが、scFvを反応させる際、pH4.0の条件下とpH8.0の条件下で行った。scFvと反応させた後は、PBSの条件下で検出を行った。



• scFvのDNAシーケンス解析

TG1に感染したファージから、ファージDNAを抽出し、scFv抗体遺伝子をBig dye terminator version 3.1 (PE Applied Biosystems)、抗体分子に特異的なプライマーS7 (pUC19 reverse in the pUC backbone: 5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGC-3') とS8 (the fg gene 3: 5'-GTCGTCTTTCCAGCAGTTAGT-3') を用いてPCR法により遺伝子を増幅して配列を決定した。

• scFv配列のgene usage

IMGT databaseを用いてscFv配列のgene usageを解析した。

• プリオンタンパク質のゲル濾過クロマトグラフィー

$\alpha$ -form PrPのsec-HPLCによる解析は、150mM NaCl, 1M urea, 0.02% azide, 20mM sodiumu acetate buffer pH5.5のバッファーで流速1ml/minでTSK-Gel SWXL G3000 (Tosho Corporation, Tokyo, Japan)を用いて行った。 $\beta$ -form PrPのsec-HPLCによる解析は、200mM NaCl, 1M urea, 0.02% azide, 20mM sodiumu acetate buffer pH4.0のバッファーで流速1 ml/minでTSK-Gel SWXL G3000 (Tosho Corporation, Tokyo, Japan) を用いて行った。ピークの出たところは回収をし、前述で述べた同様の手法でCDスペクトル解析を行った。

• A $\beta$ 42コンフォーマーの作製

A $\beta$ 42コンフォーマーは論文に従って作製した<sup>52,54</sup>。人工合成A $\beta$ 42ペプチド (purity90-95% by mass spectrum; Peptide Institute Inc., Osaka, Japan) は1 mg/ml (222  $\mu$ M) になるように1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (Wako, Tokyo, Japan) で溶かした。すぐに用いるために、1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanolで処理したA $\beta$ 42は4

mg/ml (888 mM) になるようにdimethyl sulfoxide (Wako) で溶かし、40 mMになる  
まで20 mM phosphate buffer (pH7.4) で希釈した。

### 4-3 結果

#### ・ELISAによるPRB7 scFv, PRB30 scFvファージクローンの特異性

ELISAによって単離したPRB7 scFvとPRB30 scFvファージクローンの特異性を  
調べた。どちらのクローンともpH8.0の条件下で $\alpha$ -form PrPに対する結合活性は  
示されなかった。そして、pH4.0の条件下で $\beta$ -form PrPに対して特異的結合活性  
が示された。また、プリオンタンパク質はHis-tagを持っているが、His-tagを有し  
ているTIM-3に対しての結合活性は示されなかった (Fig.13)。

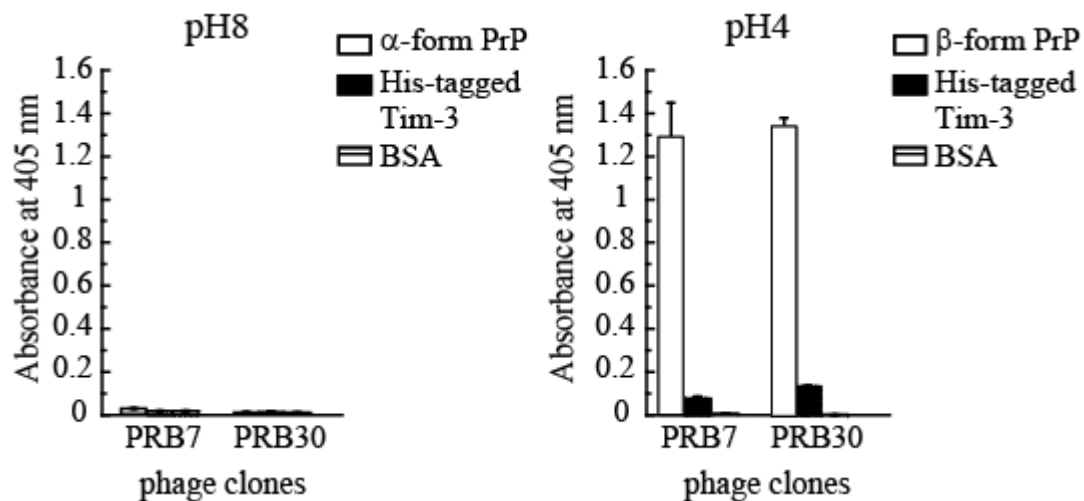


Fig.13 scFvファージクローンの特異性

#### ・ELISAによるPRB7 scFv, PRB30 scFvの特異性

上記のELISA同様にscFvの特異性を調べた。結果は上記と同様であり、PRB7  
scFvとPRB30 scFvは $\beta$ -form PrPに対して特異的な結合活性を示し、 $\alpha$ -form PrPに  
対しては結合活性を示さなかった (Fig.14)。

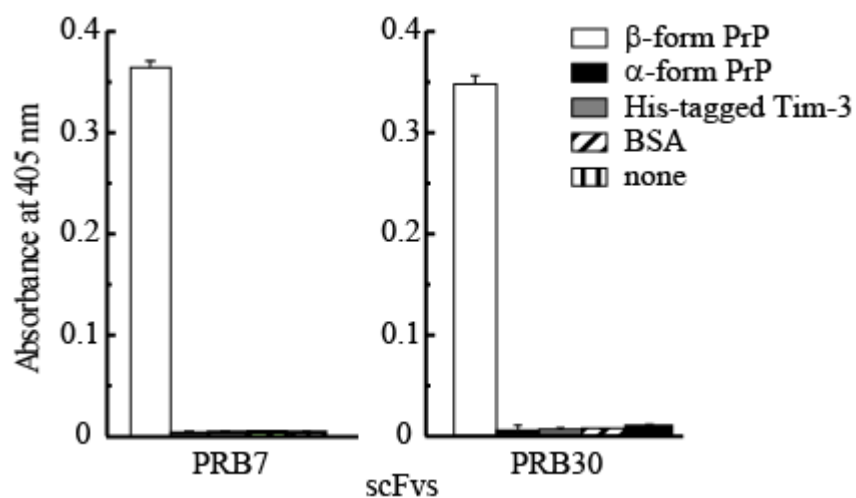


Fig.14 scFvの特異性

#### ・pHによる影響を確認するためのELISA

ELISAの際に、コートしているプリオンタンパク質の構造を保つためにpHを限定しているが、pH8.0の条件下では $\beta$ -form PrPに影響があり、pH4.0の条件下では抗体の安定性と $\alpha$ -form PrPに影響があることが示唆される。よって、それぞれのpH環境下で抗体反応をした際の影響を検討した。その結果、どのpH環境下でもPRB7 scFvとPRB30 scFvは $\beta$ -form PrPに対して特異的に結合することが示された。

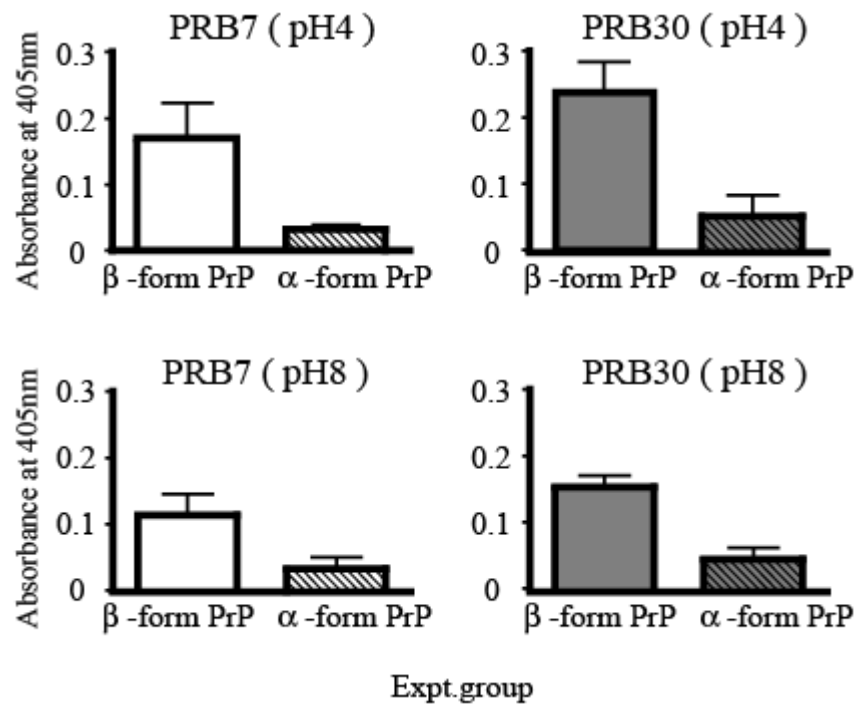


Fig.15 scFvの特異性はpHによって影響を受けない

( )内のpHはscFvを反応させた条件を示している。

#### • scFvのDNA配列とgene usage

PRB7, PRB30ともにヒトの抗体配列を有していた。また、IMGT databaseを用いてgene usageを調べた結果は下記に示す通りとなった (Fig.16)。

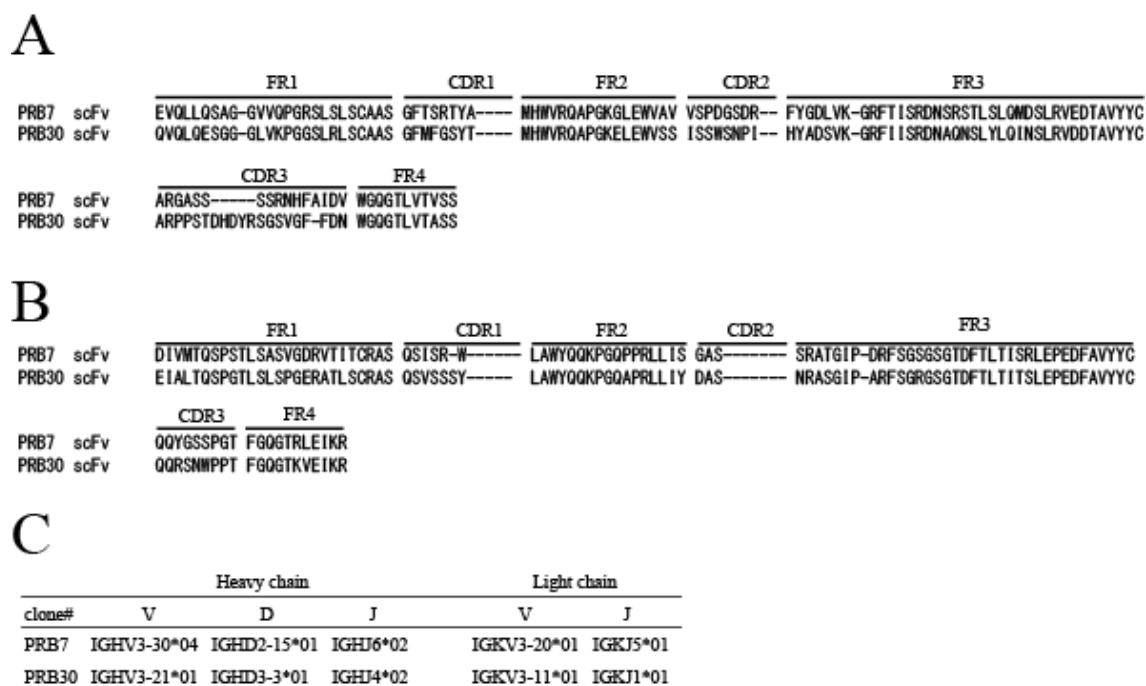


Fig.16 scFvの配列 (A: VH配列、B: VL配列) と gene usage (C)

# ・ゲル濾過クロマトグラフィーによって回収されたピークフラクションに対するscFvの反応性

論文で報告されていたプリオンタンパク質のゲル濾過クロマトグラフィーを行い<sup>9</sup>、回収したピークフラクションに対してのscFvの反応性を調べた。私たちが作製した $\alpha$ -form PrPはシングルピーク (11.8 min) が観察され (Fig.17 A)、回収したピークフラクション ( $\alpha$ -form PrP Fr-1) をCDスペクトラム解析したところ $\alpha$ ヘリックスを持った構造体であることが示された (Fig.17 B)。次に、 $\beta$ -form PrPはダブルピーク(7.5 min, 12.6 min) が観察され (Fig.17 A)、7.5 minのピーク ( $\beta$ -form PrP Fr-1) はオリゴマーであることがマーカより示唆され、12.6 minのピーク ( $\beta$ -form PrP Fr-2) はモノマーであることがマーカより示唆された。どちらのピークフラクションもCDスペクトラム解析したところ $\beta$ シート構造を持った構造体であることが示された (Fig.17 B)。これらの回収したピークフラク

ションをELISAプレートにコートし、scFvとの結合活性を調べたところ、scFvは $\beta$ シート構造を持った構造体である、 $\beta$ -form PrP-Fr1, Fr2に対してのみ結合活性を示した (Fig.17C)。

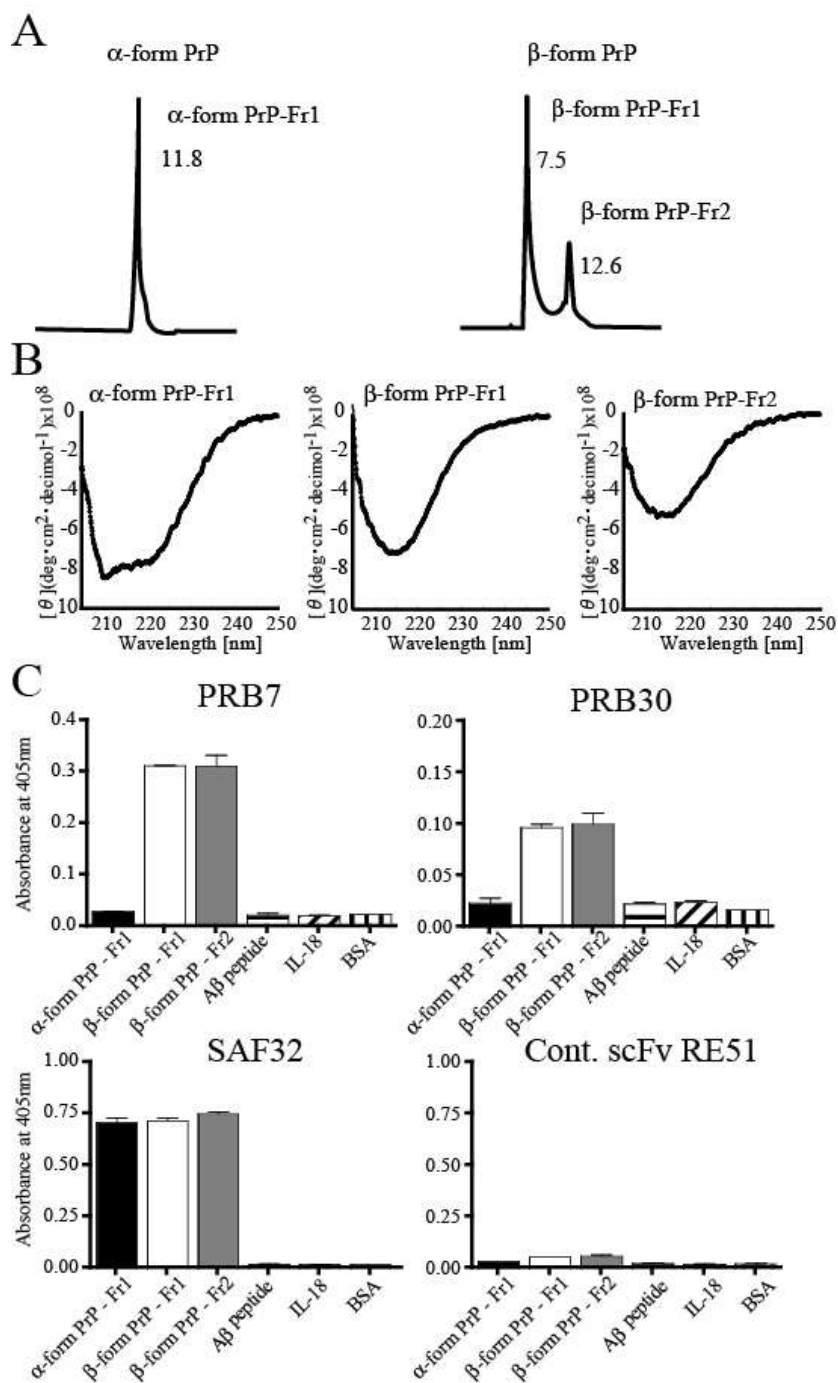


Fig.17 ゲル濾過クロマトグラフィーによって回収されたピークに対するscFvの  
反応性

A. プリオンタンパク質のゲル濾過クロマトグラフィー、B. 回収したピークフラ  
クションのCDスペクトラム、C. 回収したピークフラクションに対するscFvの  
結合活性

#### 4-5 小括

バイオパンニングによりPRB7 scFvとPRB30 scFvの二つの抗体を単離した。この二つのscFvは $\beta$ -form PrPに対して特異的に結合し、それはELISAによって示された。また、それぞれのクローンはヒトの配列を持っていることがDNA解析から示された。プリオンタンパク質のゲル濾過クロマトグラフィーでは、 $\beta$ -form PrPはオリゴマーとモノマーの混ざった構造体であることが示されたが、どちらも $\beta$ シート構造を持っていた。さらにPRB7 scFvとPRB30 scFvはオリゴマーとモノマーにも結合活性を有する抗体であり、この二つの構造体は抗体が反応するどのようなエピトープを持っていることが考えられる。さらに $\beta$ シート構造を持っているA $\beta$ 42ペプチドに対して結合活性が観察されなかったことより、これらの抗体はプリオンタンパク質の立体構造を認識していることが示唆される。



## 第5章

### $\beta$ -form PrP特異的IgG抗体の作製とその生化学的特性

#### 5-1 小序論

PRB7 scFvから抗体の構造的安定性を高め、プリオンタンパク質の微妙な構造変化を解析するためPRB7 IgG1を作製した。作製したPRB7 IgG1は、SDS-PAGEから完全なIgGであることが示され、特異性に関してもscFvとほぼ同等の結合活性を示していた。また、PRB7 IgG1はエピトープ解析よりヒトプリオンタンパク質のaa128-132を強く認識していることが示された。そして、種に対する特異性を調べたところヒト、ウシ、マウス、ヒツジの $\beta$ -form PrPに対して非常に強い結合活性を示した（ウシ $\alpha$ -form PrPに対しては非常に弱い結合活性を示した）。

#### 5-2 材料と方法

##### ・ PRB7 IgG1の発現ベクター

DNAプライマーは北海道システムサイエンス (Sapporo, Japan) に合成を依頼した。PRB7 IgG1の発現ベクターの詳細な構築手順は下の図に示した。

The heavy-chain leader sequence (Vhls; HAVT20)<sup>30</sup>、heavy-chain variable gene (Vh)、light-chain leader sequence (Vlls)<sup>51</sup>と light-chain variable gene (Vl) of PRB7はPCRによって増幅した<sup>53</sup>。使用したプライマーは、

Vhls forward primer 1

(5'-AAAAATCTAGAGCTAGCGATGGCATGCCCTGGCTTCCTGTGGGCACTGTGATCTCC-3')

Vhls back primer

(5'-AAAAAGCAACAGCTGCACCTCAGCCATGGAAAATTCAAGACAGGTGGAGATCACAAGTGCC-3'),

Vh forward primer

(5'-GAGGTGCAGCTGTTGCAG-3')

Vh back primer

(5'-AAAAAGGGCCCTTGGTGGATGAGGAGACGGTGAC-3')

Vlls forward primer

(5'-AAAAAGCTAGCGATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCC-3')

Vlls back primer

(5'-AAAAATCCGGTGGTTGGGAGCCAGAGTAGCAGGAGGAAGAGAAGCTGC  
GC-3')

VI forward primer

(5'-AAAAAACC GGAGACATCGTGATGACCCAG-3')

VI back primer

(5'-AAAAAGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTAATCTCCAGTCGGT  
-3')

を用いた。

human immunoglobulin heavy chain 1 (IGHC1) と human immunoglobulin  $\kappa$ -chain (IGKC)の定常領域はPCRによってリンパ球のcDNAから増幅した。その際に用いたプライマーは

IGHC1 forward primer (5'-TCCACCAAGGGCCC-3')

IGHC1 back primer (5'-AAGCTTCGGAGACAGGGAGAG-3')

IGKC forward primer (5'-ACTGTGGCTGCACCATC-3')

IGKC back primer (5'-AAGCTTCTAACACTCTCCCCTGTTG-3')

を用いた。

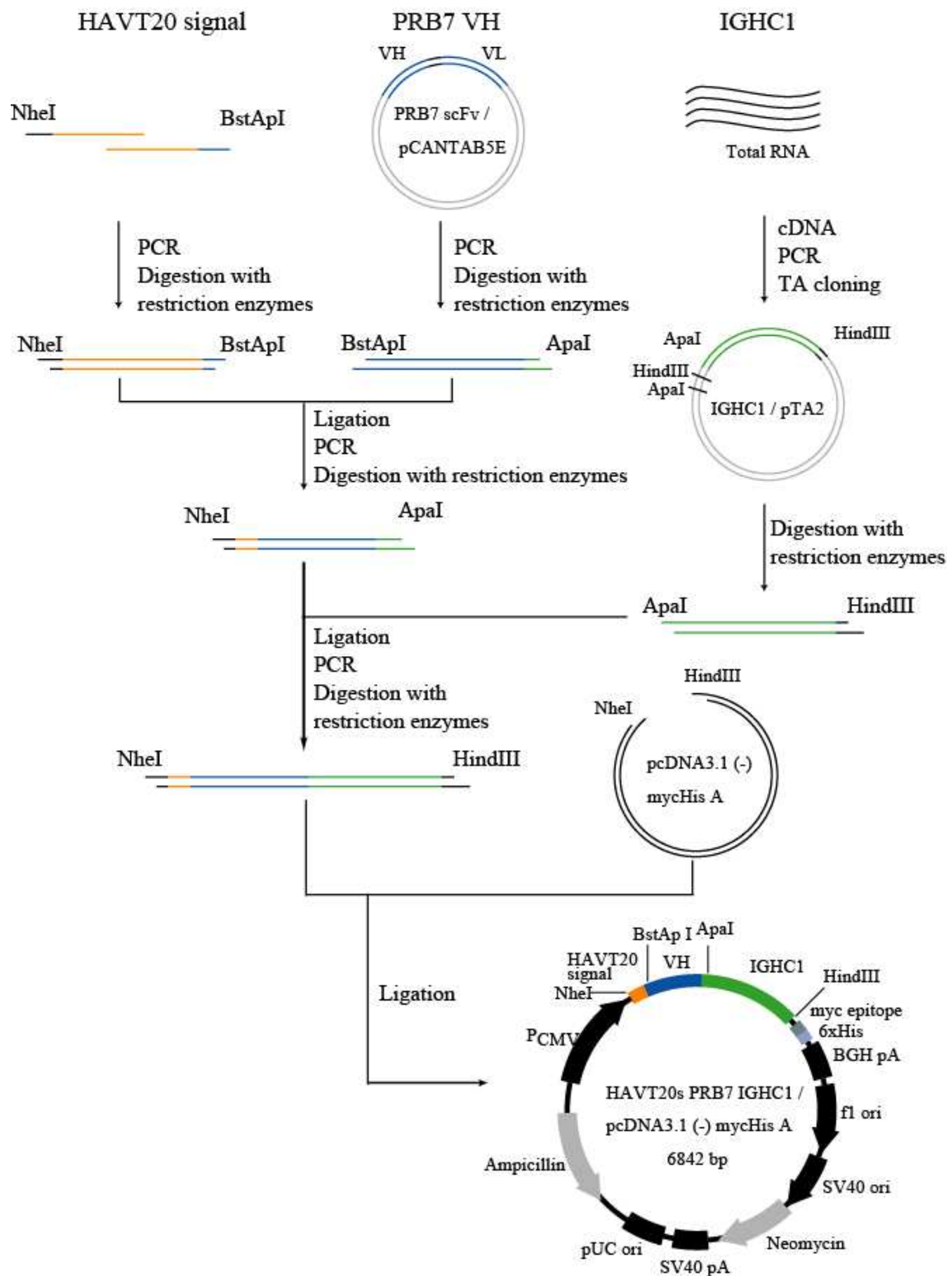


Fig.18 PRB7 IGHC1発現ベクターの構築手順とベクターマップ

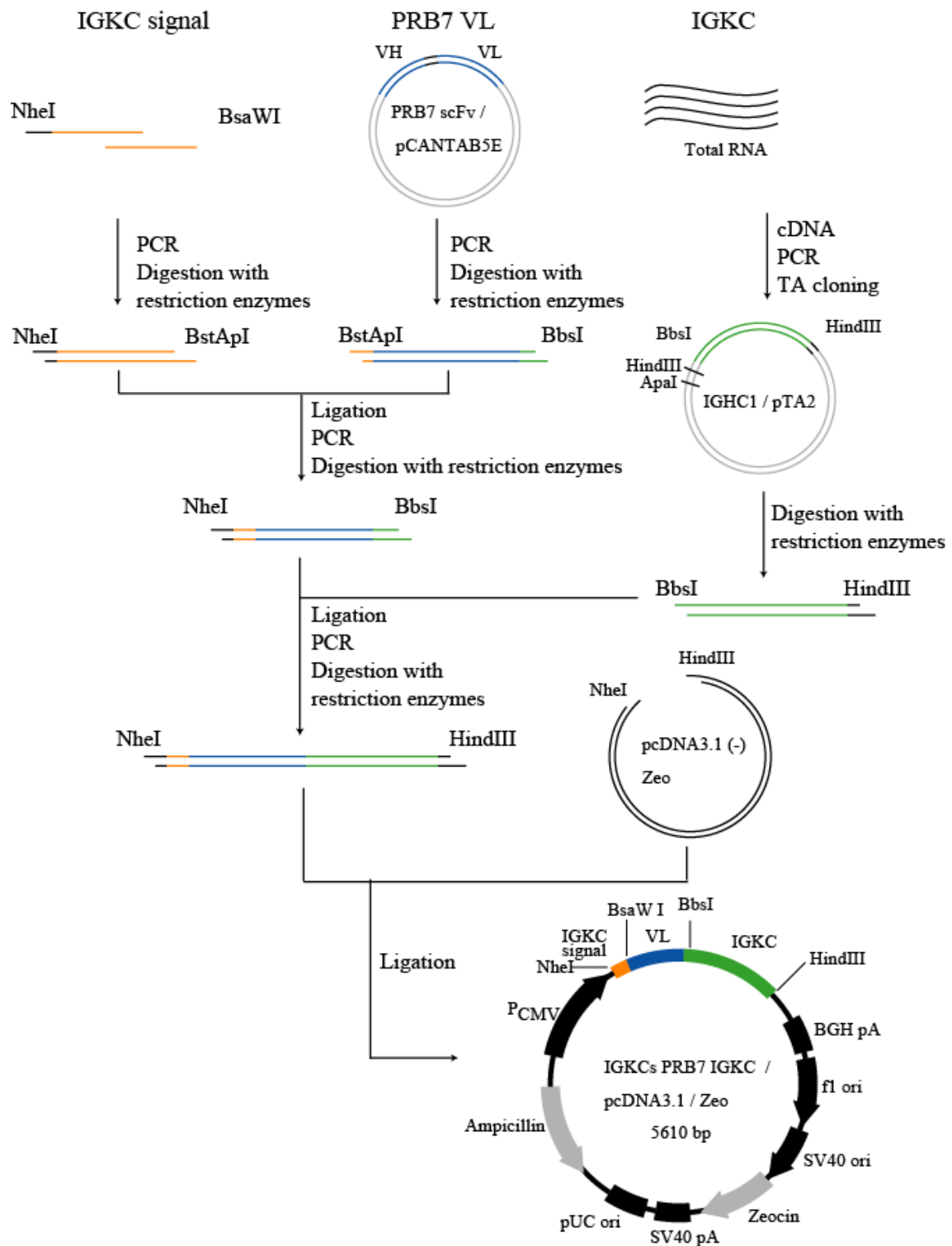


Fig.19 PRB7 IGKC発現ベクターの構築手順とベクターマップ

### ・ PRB7 IgG1の発現と精製

PRB7 IgG1の発現と精製は論文に従って行った<sup>50,56</sup>。FreeStyle 293F細胞は37°C、8% CO<sub>2</sub>の条件下でスピナーフラスコを用いて攪拌培養を行った。トランスフェクション (volume 500 ml) は、500  $\mu$ g/10mlのDNA (H鎖発現ベクターとL鎖発現ベクターのmol比、1:1)/OptiPro SFMと500  $\mu$ l/10mlのFreeStyle MAX reagent/OptiPro SFM を混ぜ、10分間静置した。その後、その溶液を1 x 10<sup>6</sup> cells/ml, 500 mlにまで増やしたFreeStyle 293F細胞に加え、37°C、8% CO<sub>2</sub>の条件下でスピナーフラスコを用いて攪拌培養を7日間行った。PRB7 IgG1の精製は、培養液を回収後、遠心により細胞を取り除き、protein Aカラムを用いて精製をした。

### ・ PRB7 scFvとPRB7 IgG1のコンピューターシュミレーションモデル

PRB7 scFvの分子モデルは2GHWD (anti SARS spike proteinreceptor antibody) をテンプレートとしてMolecular Operating Environment<sup>TM</sup> (MOE, Version 2009.10) を用いてシュミレーションを行った。PRB7 IgG1のFab domainの分子モデルも同様にして行った。それぞれのテンプレートとPDBコードは、PRB7 H鎖のフレームワーク領域とCDR領域: flanking region; 1HEZ.B, CDR1; 1NLO.H, CDR2; 2GHW.DH, CDR3; 4FAB.H、 PRB7 L鎖のフレームワーク領域とCDR領域; 1HEZ.A, CDR1; 1ZLS.L, CDR2; 1U6A.L, CDR3; 1DNO.C.を用いてシュミレーションを行った。

### ・ SDS-PAGE

Protein Aによって精製したPRB7 IgG1は、2 MEで処理したサンプルと処理しないサンプルを作製し、10% SDS-PAGEに流した。その後、ゲルはCBBにより染色を行った。

・ELISAを用いた様々なタンパク質に対するPRB7 IgG1の特異性

96穴プレートにプリオンタンパク質、A $\beta$ 42コンフォーマー (50 ng/50  $\mu$ l/well) を室温、1時間それぞれのfolding bufferでコートし、0.25% BSA/PBS で1時間、室温でブロックした。0.1% Tween20/PBS で洗浄後、PRB7 IgG1 (50 ng/50  $\mu$ l/well) を加えて室温で1 時間反応させた。0.1%Tween20/PBS で洗浄後、検出のため、HRPをコンジュゲートしたanti human IgG (1:5000) を加え、1時間室温で反応させた。プレートを洗浄後、50 mlの3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solutionを加え、室温で3~5 分後、50 mlの1 N HClを加えて反応を止めた。その後、450nmの吸光度を測定し結合した抗体を検出した。

・PRB7 IgG1のエピトープ解析のための、ペプチドファージを用いたバイオパニング

Control human IgG (300 ng/50  $\mu$ l/well) とPRB7 IgG1 (300 ng/50  $\mu$ l/well) を96穴プレートにコートした後、0.25% BSA/PBSで一晩ブロックを行った。その後、コントロールscFvをコートしたwellに4 x 10<sup>11</sup> pfu/wellのPhD-12ライブラリを加え、1時間反応させることでコントロールIgGに対する非特異的なファージクローンを除いた。その後、PRB7 IgG1をコートしたwellに加え1時間反応させ、0.2% Tween/PBSで洗浄後、特異的に結合したファージクローンを0.1M Glycine-HCl (pH 2.2) で溶出し、直ぐに1.0 M Tris-HCl (pH 9.1) で中和した。その後、100  $\mu$ l のファージ溶液を20 mlの対数増殖期の大腸菌 (ER2738) に感染させ37℃で4.5時間培養することで、ファージを増幅後、同様の操作をさらに2回繰り返し行い、より特異的なファージクローンを単離した。

・ ELISAを用いたPRB7 IgG1に特異的に反応するペプチドファージ

96穴プレートにPRB7 IgG1 (50 ng/50  $\mu$ l/well) を室温、1時間それぞれのfolding bufferでコートし、0.25% BSA/PBS で1時間、室温でブロックした。0.1% Tween20/PBSで洗浄後、ペプチドファージクローン (50  $\mu$ l/well、 $1 \times 10^{11}$  virions/ml) を加えて室温で1 時間反応させた。0.1% Tween20/PBS で洗浄後、検出のため、ビオチンをコンジュゲートしたanti M13抗体 (1:2000)、HRPをコンジュゲートしたストレプトアビジンをそれぞれ1時間室温で反応させた。その後、プレートを洗浄後、50 mlの3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solutionを加え、室温で3~5 分後、50 mlの1 N HClを加えて反応を止めた。その後、450 nmの吸光度を測定し結合したファージクローンを検出した。

・ ペプチドファージクローンのシーケンス解析

PRB7 IgG1特異的ファージクローンのもチーフDNA配列は、KEB-108プライマー (5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3') を用いたDye Terminator法で解析した。得られたDNA配列をもとにアミノ酸配列を決定した。

・ ヒトプリオンタンパク質に対するホモロジー解析

上記シーケンス解析でファージモチーフのアミノ酸配列を決定後、ヒトプリオンタンパク質とのホモロジー解析をClustal W version 3.1ソフトウェアで解析した。

・ ヒトプリオンタンパク質のコンピューターシュミレーション

ヒト $\alpha$ -form PrPはPDB code, 1QM0をPyMolを用いてシュミレーションした。

・ **ELISAを用いたプリオンタンパク質の種に対するPRB7 IgG1の特異性**

96穴プレートにプリオンタンパク質 (100 ng/50  $\mu$ l/well) を室温、1時間それぞれのfolding bufferでコートし、0.25% BSA/PBS で1時間、室温でブロックした。0.1% Tween20/PBS で洗浄後、PRB7 IgG1 (50 ng/50  $\mu$ l/well) を加えて室温で1時間反応させた。0.1% Tween20/PBSで洗浄後、検出のため、HRPをコンジュゲートしたanti human IgG (1:5000) を加え、1時間室温で反応させた。プレートを洗浄後、50 mlの3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solutionを加え、室温で3~5 分後、50 mlの1 N HClを加えて反応を止めた。その後、450nmの吸光度を測定し結合した抗体を検出した。

**5-3 結果**

・ **PRB7 IgG1の発現と精製**

PRB7 IgG1の発現と精製は論文に従って行った<sup>50,56</sup>。その結果、回収量は約400 ug/Lであった。

・ **PRB7 scFvとPRB7 IgG1のコンピューターシュミレーションモデル**

MOEを用いてscFvとIgGの分子モデル作製し、抗体の立体的な構造を比較した。抗体のポケットの部分と比較するとIgG (Fig.20 B) がscFv (Fig.20 A) に比べてポケットが深くなり、CDR全体でポケットを包んでいるように示された。



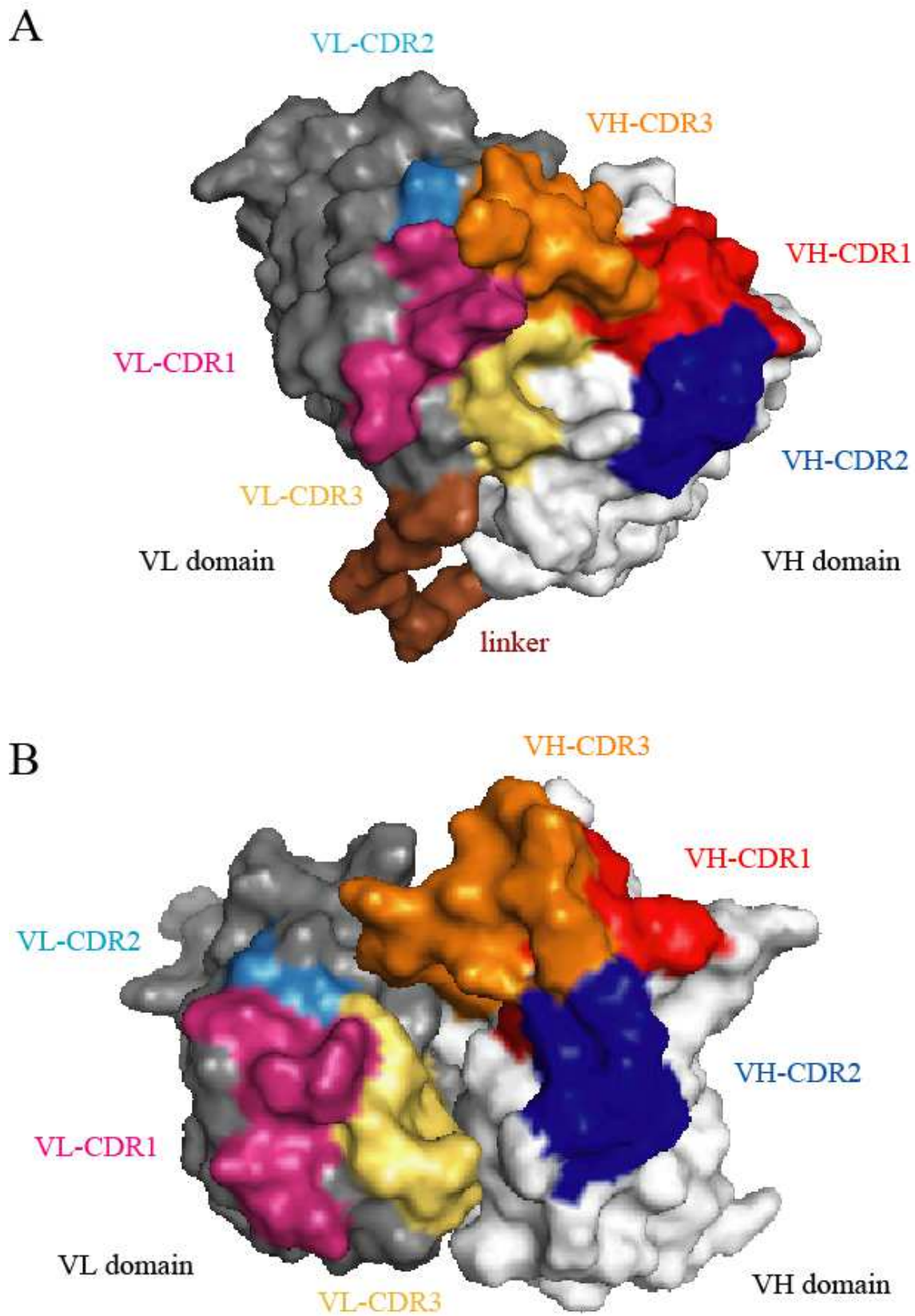


Fig.20 PRB7 scFvモデル (A) とPRB7 IgG1のFab領域モデル (B)

### ・ SDS-PAGE

作製したPRB7 IgG1が正常に構築されているかを確かめるためにSDS-PAGEを用いて確認した。非還元状態の結果より、作製した抗体はControl human IgGとほぼ同じ位置にバンドが観察されることから、IgGの形で存在していることが示唆される。還元状態の結果からは、作製した抗体はH鎖とL鎖を持ち、そのサイズはControl human IgGとほぼ同等であることが示された (Fig.21)。

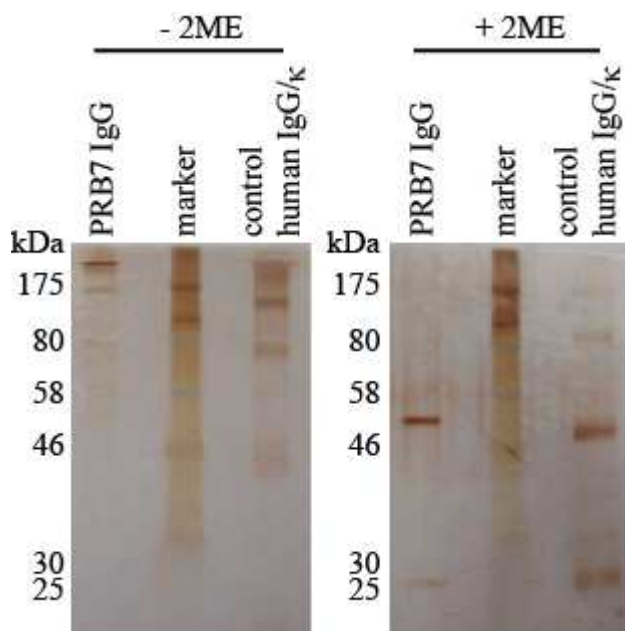


Fig.21 PRB7 IgG1の還元条件下と非還元条件下でのSDS-PAGE

### ・ ELISAを用いた様々なタンパク質に対するPRB7 IgG1の特異性

作製したPRB7 IgG1のリフォールディングしたプリオンタンパク質に対する特異性を確認した。その結果、PRB7 IgG1は $\beta$ -form PrPに対して特異的に結合していた。また、 $\beta$ シート構造を持っているsoluble A $\beta$ 42、A $\beta$ 42 prefibril oligomer、A $\beta$ 42 fiberと $\alpha$ -form PrPに対して結合活性を示さなかったことから、この抗体は $\beta$ -form PrPの立体構造を認識して結合していることが示唆された (Fig.22)。また、

プリオン特異的抗体であるSAF32、 $A\beta$ に対して特異的である6E10がどのコンフォーマーに対しても同程度の反応を示していることより、同程度のタンパク質がコートされていることが示されている (Fig.22)。

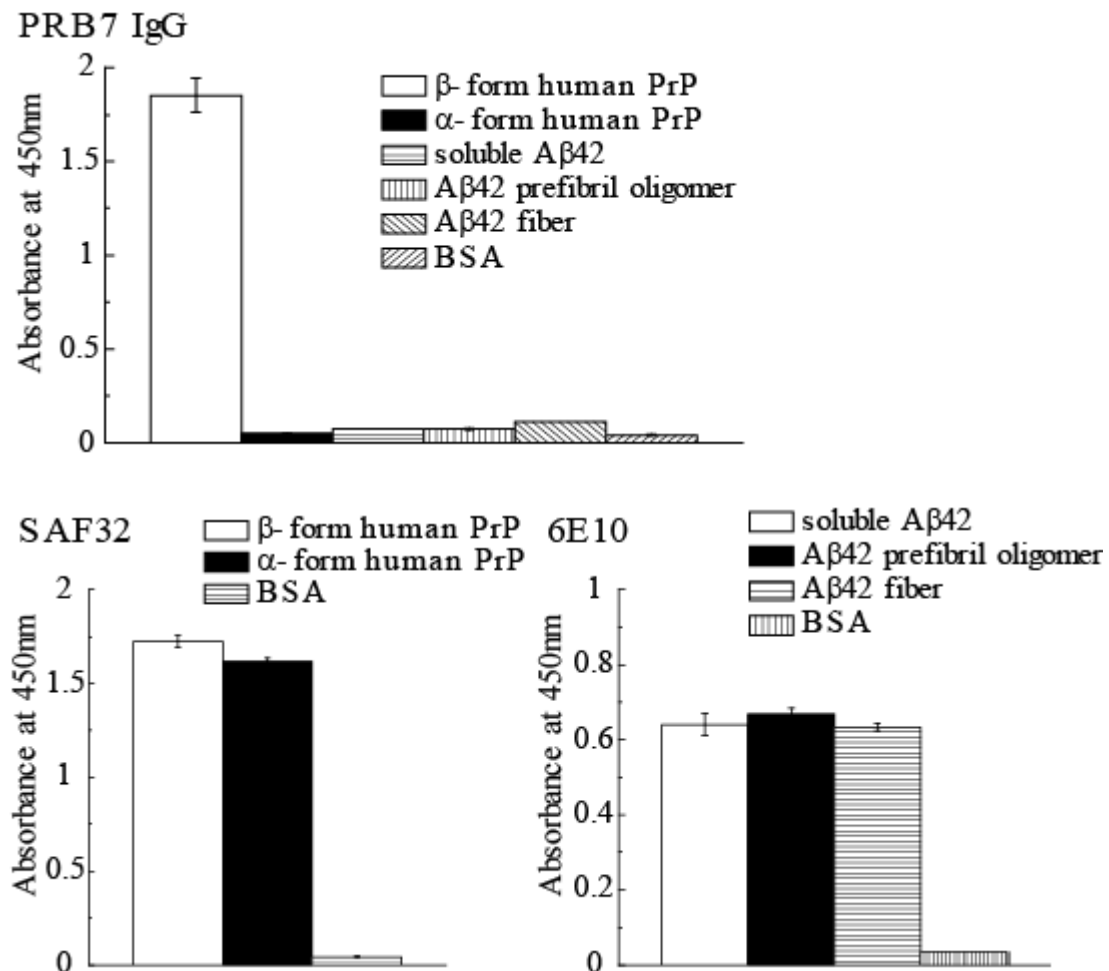


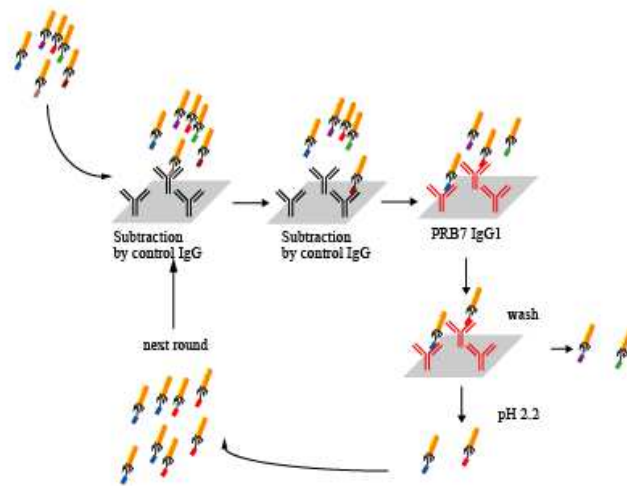
Fig.22 様々なタンパク質に対するPRB7 IgG1の特異性

・PRB7 IgG1のエピトープ解析のための、ペプチドファージを用いたバイオパニング

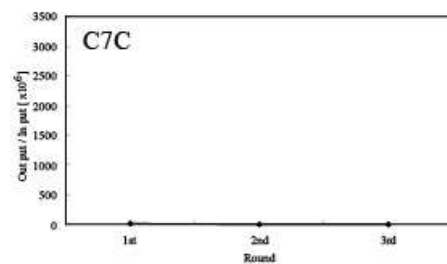
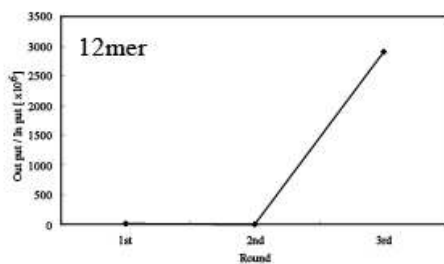
PRB7 IgG1のエピトープ解析のため、ペプチドファージを用いたバイオパニングを行った。パニングを簡単に説明すると、control human IgGに対して結合するファージを吸収した後、PRB7 IgG1に対して結合するファージを回収し、増

幅するというラウンドを3回繰り返した (Fig23 A)。ラウンドを重ねるごとに12merのペプチドを提示しているファージライブラリからは回収されるファージクローンの数が増加し、クローンの濃縮が示されたが、環状ペプチドを提示しているC7Cペプチドファージライブラリからはクローンの濃縮が示されなかった (Fig23 B, C)。

#### A. Procedure of panning



#### B.



#### C.

Titer of 12mer peptid phage

	Round		
	1st	2nd	3rd
In put phage titer	$4 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{11}$
Out put phage titer	$6.6 \times 10^5$	$5.0 \times 10^5$	$2900 \times 10^5$

Titer of C7C peptid phage

	Round		
	1st	2nd	3rd
In put phage titer	$4 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{11}$
Out put phage titer	$5.0 \times 10^5$	$0.7 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$

Fig.23 エピトープ解析のためのバイオパンニング手順 (A) とペプチドファージの濃縮 (B, C)

・ELISAを用いたPRB7 IgG1に特異的に反応するペプチドファージ

バイオパンニングによって得られたファージライブラリから90クローンをスクリーニングし、2つのPRB7 IgG1に特異的に結合するペプチドファージクローンは単離された (pepPRB7-14とpepPRB7-38)。2つのペプチドファージクローンはPRB7 IgG1に対して特異的に結合し、control human IgG/Kappaに対しては結合を示さなかった (Fig.24)。

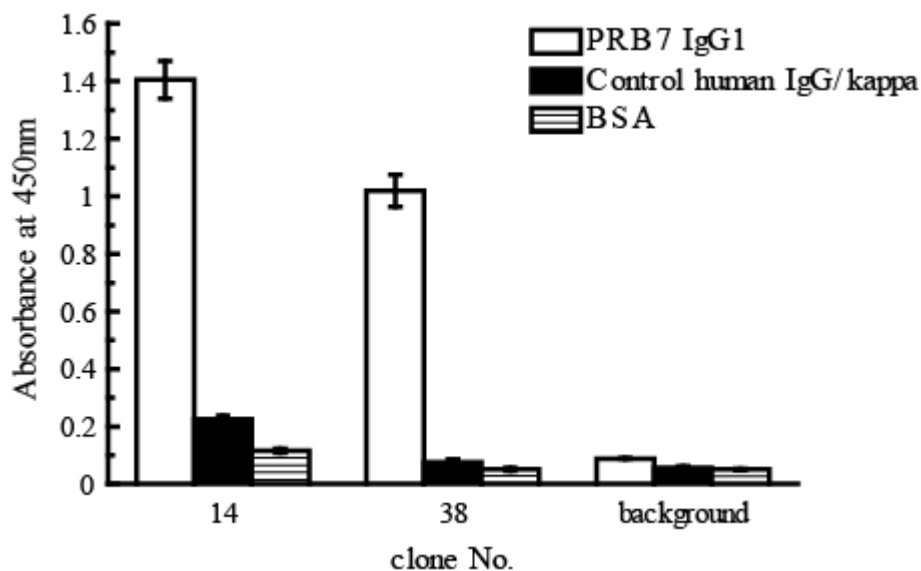


Fig.24 PRB7 IgG1に特異的に反応するペプチドファージ

・ペプチドファージクローンのシーケンス解析

pepPRB7-14とpepPRB7-31はシーケンス解析を行い、ペプチドの配列を決定した (Fig.25)。



Fig.25 PRB7 IgG1特異的ペプチドファージクロンのペプチド配列

### ・ヒトプリオンタンパク質に対するホモロジー解析

pepPRB7-14とヒトプリオンタンパク質のホモロジー解析を行った。pepPRB7-14はヒトプリオンタンパク質のaa124-136に対してホモロジーを持つことが示された。特にaa128-132の領域に配列相同性が高く、この領域は正常型プリオンタンパク質の $\beta$ 1領域である (Fig.26)。一方、pepPRB7-38はホモロジーを持つ配列が示されず、構造特異的もしくは不連続エピトープを認識していることが示唆される。

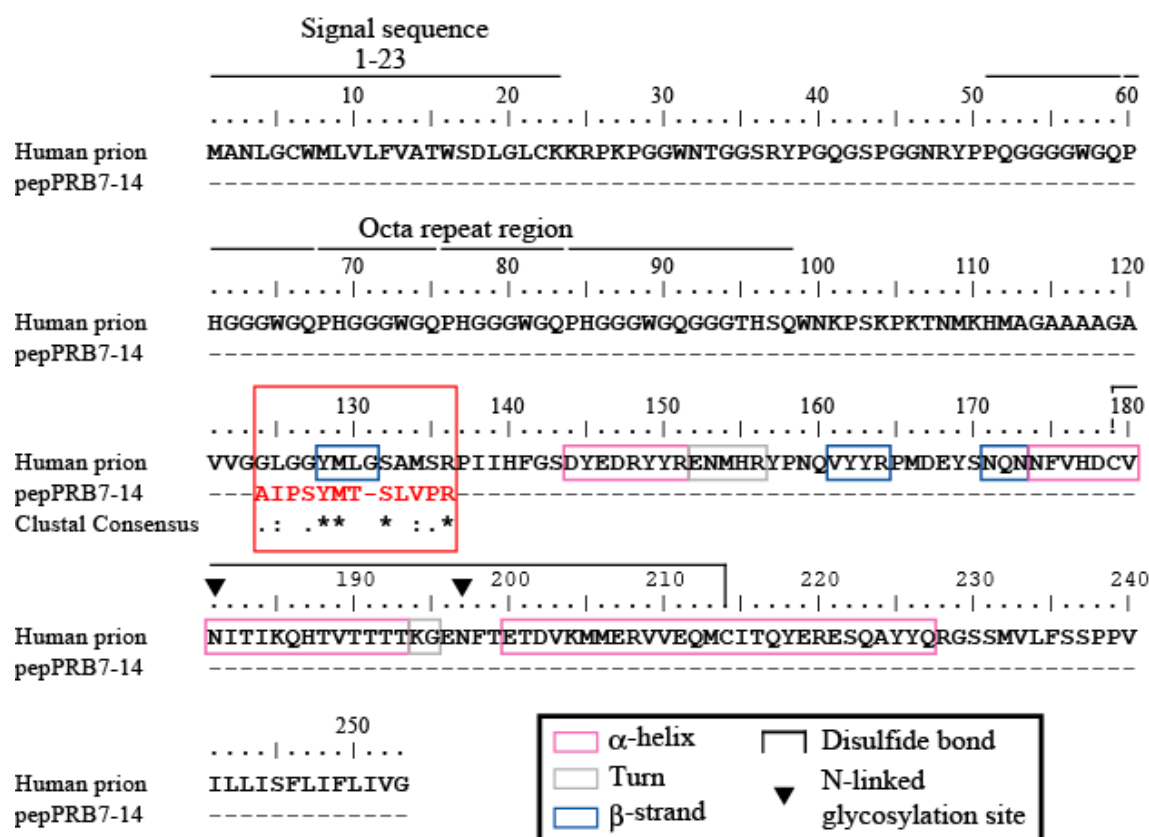


Fig.26 pepPRB7-14とヒトプリオンタンパク質とのホモロジー解析

・ヒトプリオンタンパク質のコンピューターシミュレーション

コンピューターシミュレーションを用いて正常型プリオンタンパク質と pepPRB7-14 のホモロジー部分の解析を行った。 pepPRB7-14 と正常型ヒトプリオンタンパク質の相同性が高い配列である aa124-136 を赤で示した (Fig.27)。ただし、PRB7 IgG1 は  $\beta$ -form PrP に対して特異的に結合する抗体であるため、ここに示す領域には結合しないことになる。よって  $\beta$ -form PrP はこの構造の部分が変化していることが示唆される。



Fig.27 正常型ヒトプリオンタンパク質のコンピューターシュミレーション

・ELISAを用いたプリオンタンパク質の種に対するPRB7 IgG1の特異性

PRB7 IgG1はヒト $\beta$ -form PrPに対して特異的に結合することが示されたが (Fig.22)、他の種に対する特異性を確認した。各種プリオンタンパク質はヒトと同様の手法によりリフォールディングを行った。リフォールディングを行ったプリオンタンパク質の2次構造はCDスペクトラム解析を行い、 $\beta$ -form PrPと $\alpha$ -form PrPが作製されていることが示された。PRB7 IgG1は、ヒト、ウシ、マウス、ヒツジの $\beta$ -form PrPに対して非常に高い結合活性を示し、 $\alpha$ -form PrPに対しては結合活性を示さなかった。ただし、ウシの $\alpha$ -form PrPに対しては、非常に弱い結合活性を示していた (Fig.28 B)。



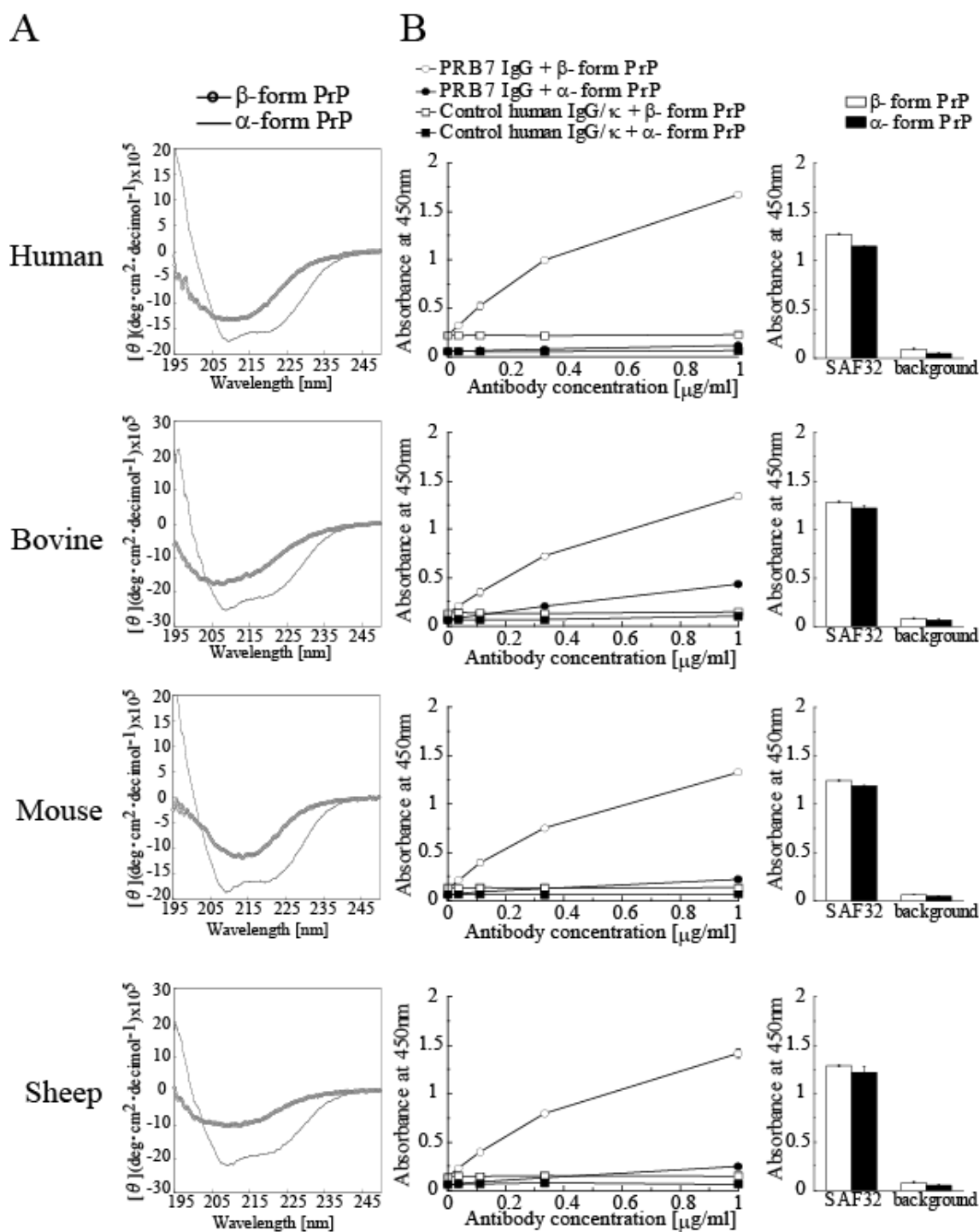


Fig.28 プリオンタンパク質の種に対するPRB7 IgG1の特異性

#### 5-4 小括

PRB7 scFvから抗体の構造的安定性を高め、プリオンタンパク質の微妙な構造

変化を解析するためPRB7 IgG1を作製した。作製したPRB7 IgG1は、SDS-PAGEから完全なIgG1であることが示され、特異性に関してもscFvとほぼ同等の結合活性を示していた。また、PRB7 IgG1はエピトープ解析よりヒトプリオンタンパク質のaa128-132を強く認識していることが示された。そして、種に対する特異性を調べたところヒト、ウシ、マウス、ヒツジの $\beta$ -form PrPに対して非常に強い結合活性を示した（ウシ $\alpha$ -form PrPに対しては非常に弱い結合活性を示した）。これらの結果から、PRB7 IgG1が認識している $\beta$ -form PrPのaa128-132の領域は $\alpha$ -form PrPの構造である $\beta$ 1構造とは異なった構造をしていることが考えられる。

## 第6章

### PRB7 IgGが、細胞内 $\beta$ -form PrPの産生と蓄積に及ぼす影響

#### 6-1 小序論

PRB7 IgG1とScN2a細胞を3日間共培養することによって3つの特徴的染色パターンが観察された。これらのPRB7 IgG1で染色される粒子は $\beta$ -form PrPであり、蓄積していき、これが蓄積することによってアポトーシスを起こすことが示された。しかしながら、この抗体を用いてPrP<sup>res</sup>増幅阻害実験を行ったところ、まったく阻害が出来なかった。この結果はCollingeらによる感染と毒性は別であるという説を支持するデータとなる<sup>22</sup>。

#### 6-2 材料と方法

##### ・細胞培養

ScN2a、N2a58、FF32、N2aL1は、Opti-MEM/10% FBS/penicillin/streptomycin 培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養を行った。

##### ・生細胞と固定化した細胞の免疫染色

免疫染色は論文の方法に準じて行った<sup>57-59</sup>。ScN2a細胞は $5 \times 10^4$  cells/mlをAdvanced TCTM glass bottom cell culture dish (Greiner Bio-One, Germany)上で2日間培養した。生細胞の染色は、ScN2a細胞は3% BSA/0.1% azide/PBSで室温、30分ブロックをした。固定化した細胞は、ScN2a細胞を4% paraformaldehydeで20分間、室温で固定後、3% BSA/PBSで30分間、室温でブロックした。その後、0.1% saponin/PBSで膜透過処理後、それぞれ、PRB7 IgG1, control human IgGもしくは

SAF32 (5  $\mu$ g/ml)を用いて染色をし、検出にはAlexa Fluor488-anti human IgG (1:2000)、Alexa Fluor546-anti mouse IgG, DAPIを用いて染色した。

#### ・ ScN2a細胞とPRB7 IgG1を共培養した免疫染色

免疫染色は論文の方法に準じて行った<sup>57-59</sup>。ScN2a細胞は $5 \times 10^4$  cells/mlとPRB7 IgG1, SAF32, control human IgG, control mouse IgG (5  $\mu$ g/ml)をAdvanced TCTM glass bottom cell culture dish (Greiner Bio-One, Germany)上で3日間、共培養した。その後、固定化、ブロック、膜透過処理後、Alexa Fluor488-anti human IgG (1:2000)、Alexa Fluor546-anti mouse IgG, DAPIを用いて染色した。プリオンの粒子の数に関しては、100枚程度の写真を取、目視によりカウントを行った。

#### ・ actinとtublinを用いた多重染色

ScN2a細胞は $5 \times 10^4$  cells/mlとPRB7 IgG1, SAF32, control human IgG, control mouse IgG (5  $\mu$ g/ml)をAdvanced TCTM glass bottom cell culture dish (Greiner Bio-One, Germany)上で3日間、共培養した。その後、 $-20^{\circ}\text{C}$ で冷却していたメタノールを加え、 $-20^{\circ}\text{C}$ で30分間固定化後、ブロック、膜透過処理後、Alexa Fluor488-anti human IgG (1:2000)、DAPIを用いて染色した。

#### ・ PRB7 IgG1とSAF32による多重染色

ScN2a細胞は $5 \times 10^4$  cells/mlとPRB7 IgG1 (5  $\mu$ g/ml) をAdvanced TCTM glass bottom cell culture dish (Greiner Bio-One, Germany) 上で3日間、共培養した。その後、固定化、ブロック、膜透過処理後、SAF32 (1 $\mu$ g/ml) を1時間、室温で反応させた。その後、検出のため Alexa Fluor488-anti human IgG (1:2000)、Alexa Fluor546-anti mouse IgG, DAPIを用いて染色した。

・ PRB7 IgG1とAnnexin Vによる多重染色

ScN2a細胞は $5 \times 10^4$  cells/mlとPRB7 IgG1 (5  $\mu$ g/ml) をAdvanced TCTM glass bottom cell culture dish (Greiner Bio-One, Germany) 上で3日間、共培養した。その後、固定化前にannexin binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH7.4) で溶かしてAnnexin V-Alexa Fluor 568を室温で反応させた。その後、固定化、ブロック、膜透過処理後、Alexa Fluor488-anti human IgG (1:2000)、DAPIを用いて染色した。

・ PRB7 IgG1とSAF32もしくは6 D11を用いたサンドイッチELISA

96 穴プレートにPRB7 IgG1 (100 ng/50  $\mu$ l/well) を室温、1時間コートし、0.25% BSA/PBS で1時間、室温でブロックした。0.1 % Tween20/PBS で洗浄後、SAF32もしくは6D11 (100 ng/50  $\mu$ l/well) を加えて室温で1 時間反応させた。0.1% Tween20/PBS で洗浄後、検出のため、HRPをコンジュゲートしたanti human IgG (1:5000) を加え、1時間室温で反応させた。プレートを洗浄後、50  $\mu$ lの3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solutionを加え、室温で3~5 分後、50  $\mu$ lの1 N HClを加えて反応を止めた。その後、450nmの吸光度を測定し結合した抗体を検出した。

・ Alexa488のPRB7 IgG1へのコンジュゲート

Alexa488のラベルはマニュアルに従って行った。

・ 変性条件下での染色

ScN2a細胞は $5 \times 10^4$  cells/mlとPRB7 IgG1 (5  $\mu$ g/ml) をAdvanced TCTM glass bottom cell culture dish (Greiner Bio-One, Germany) 上で3日間、共培養した。その

後、固定化、6 M GdnHClで20分間室温で変性処理後、ブロック、膜透過処理後、SAF32 もしくは6 D11 (1 $\mu$ g/ml) を1時間、室温で反応させた。その後、検出のため Alexa Fluor488-anti human IgG (1:2000)、Alexa Fluor546-anti mouse IgG, DAPI を用いて染色した。

#### ・共焦点顕微鏡

蛍光イメージはZeiss LSM 700 confocal laser microscope (Carl Zeiss, Tokyo, Japan) を用いて観察した。また、Orthogonal projectionとprofile projectionsはZeiss LSM software (Carl Zeiss) を用いて観察測定した。

#### ・PrPres増幅阻害実験

ScN2a細胞は $5 \times 10^4$  cells/mlとPRB7 IgG1、control human IgG、SAG32を24 well plateで4日間、共培養した。その後、well上の細胞をTriton lysis bufferで処理した後、回収し、遠心により細胞を取り除いた。その後、PK (20 mg/ml)で37°C、30分間処理し、PMSF(最終濃度 2mM) で酵素反応を止めた。このサンプルに2x tricine sample bufferを加え、16.5 % tricine gelに流した。ゲルはPVDFメンブレンに転写後、メンブレンをブロックし、6D11により検出をした。

### 6-3 結果

#### ・生細胞と固定化した細胞の免疫染色

常法の染色法を用いて、PRB7 IgG1とScN2a細胞の染色を行った。その結果、生細胞と固定化した細胞はPRB7 IgG1とcontrol human IgGによって染色されなかった。しかし、プリオンタンパク質特異的抗体であるSAF32によって染色された(Fig.29)。

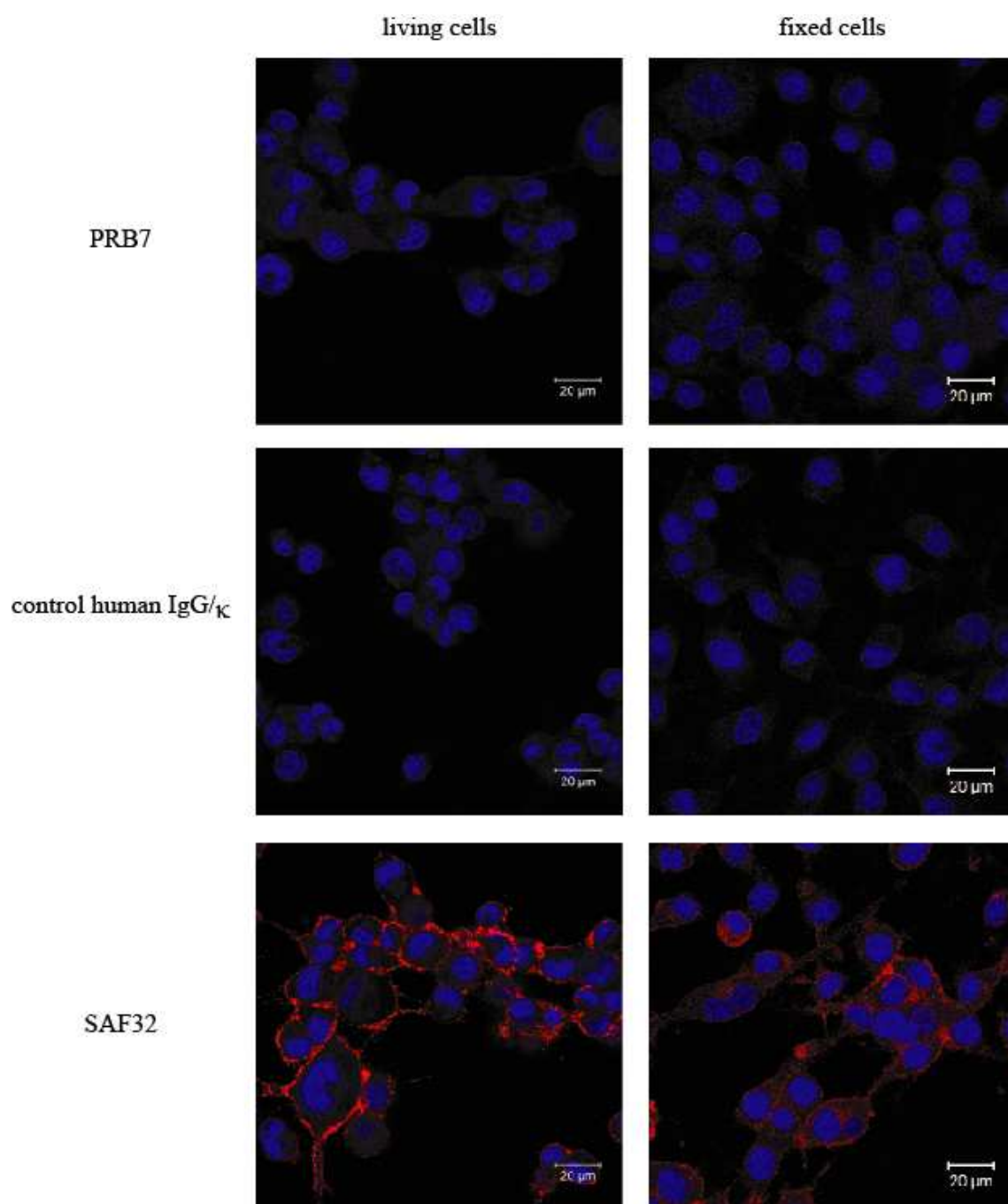


Fig.29 生細胞と固定化した細胞の免疫染色

・ ScN2a細胞とPRB7 IgG1を共培養した免疫染色

3日間、PRB7 IgG1とScN2a細胞を共培養して染色したところ、特徴的な染色パ

ターンが観察された (Fig.30)。Fig.30 Box-1のように細胞全体が緑の粒子(PRB7 IgG1)で染色され、核が観察されないパターン、Fig.30 Box-2のように細胞の一部が緑の粒子で染色され、核が観察されるパターン、Fig.30 Box-3のように緑の粒子で染色されず、核が観察されるパターンが観察された (Fig.30)。その他の抗体や正常型のプリオンを過剰発現しているN2a58ではこれらのパターンは観察されなかった(Fig.31)。

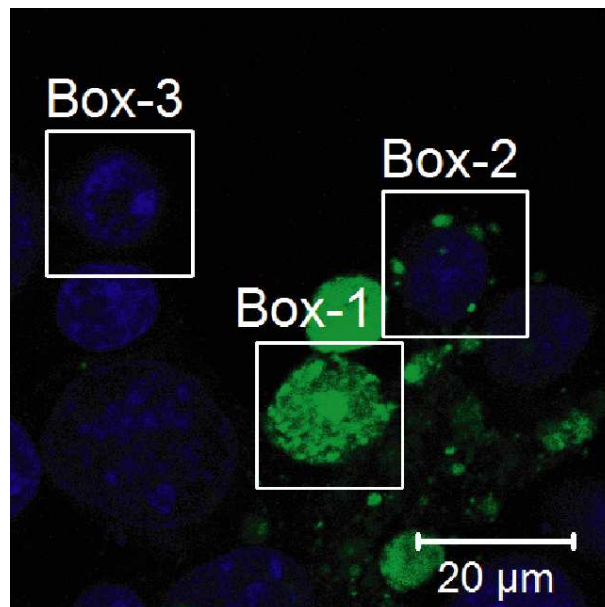


Fig.30 ScN2a細胞とPRB7 IgG1を共培養した免疫染色



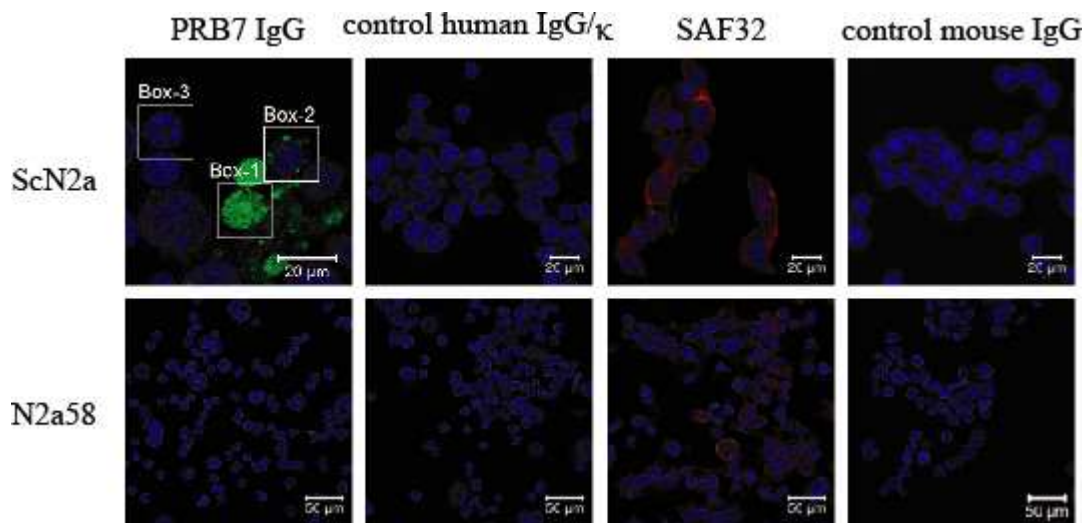


Fig.31 ScN2a細胞またはN2a58細胞と各種抗体を共培養した免疫染色

#### ・ actinとtubulinによるScN2a細胞の免疫染色

PRB7 IgG1によって染色されたScN2a細胞が細胞であるかどうかを確かめるために、細胞骨格マーカーであるactinとtubulinを用いて多重染色を行った。その結果、PRB7 IgG1で染色される細胞は、細胞骨格のマーカーであるactinやtubulinにより染色されることより、細胞骨格を持った細胞であることが示された (Fig.32)。

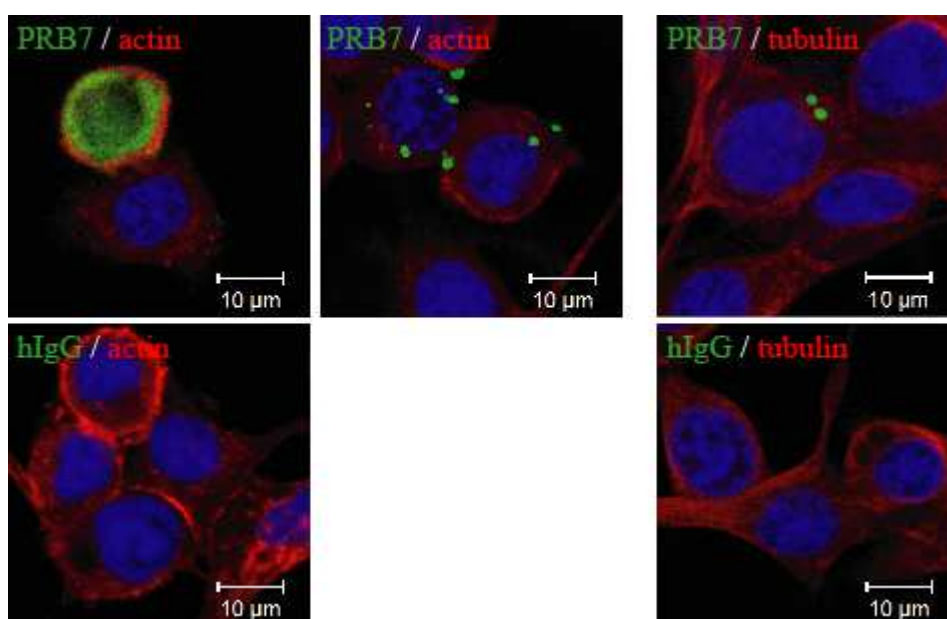


Fig.32 actinとtubulinによるScN2a細胞の免疫染色

・ PRB7 IgG1で染色されるScN2a細胞の分布

上記で観察された染色パターン (Fig.30) の分布を調べた。その結果、Fig.30 Box-3の緑の粒子で染色されず、核が観察されるパターンは、4203個の細胞中3008個の細胞で観察され、71.6%を占めていた。Fig.30 Box-2の細胞の一部が緑の粒子で染色され、核が観察されるパターンは28%を占めており、緑の粒子が1～3個観察されるものが主であった。Fig.30 Box-1の細胞全体が緑の粒子(PRB7 IgG1)で染色され、核が観察されないパターンは、0.4%と非常に少なかった。これらの結果より、PRB7 IgG1によって染色されるプリオンはプリオンが感染している細胞内に蓄積していくことが示された。

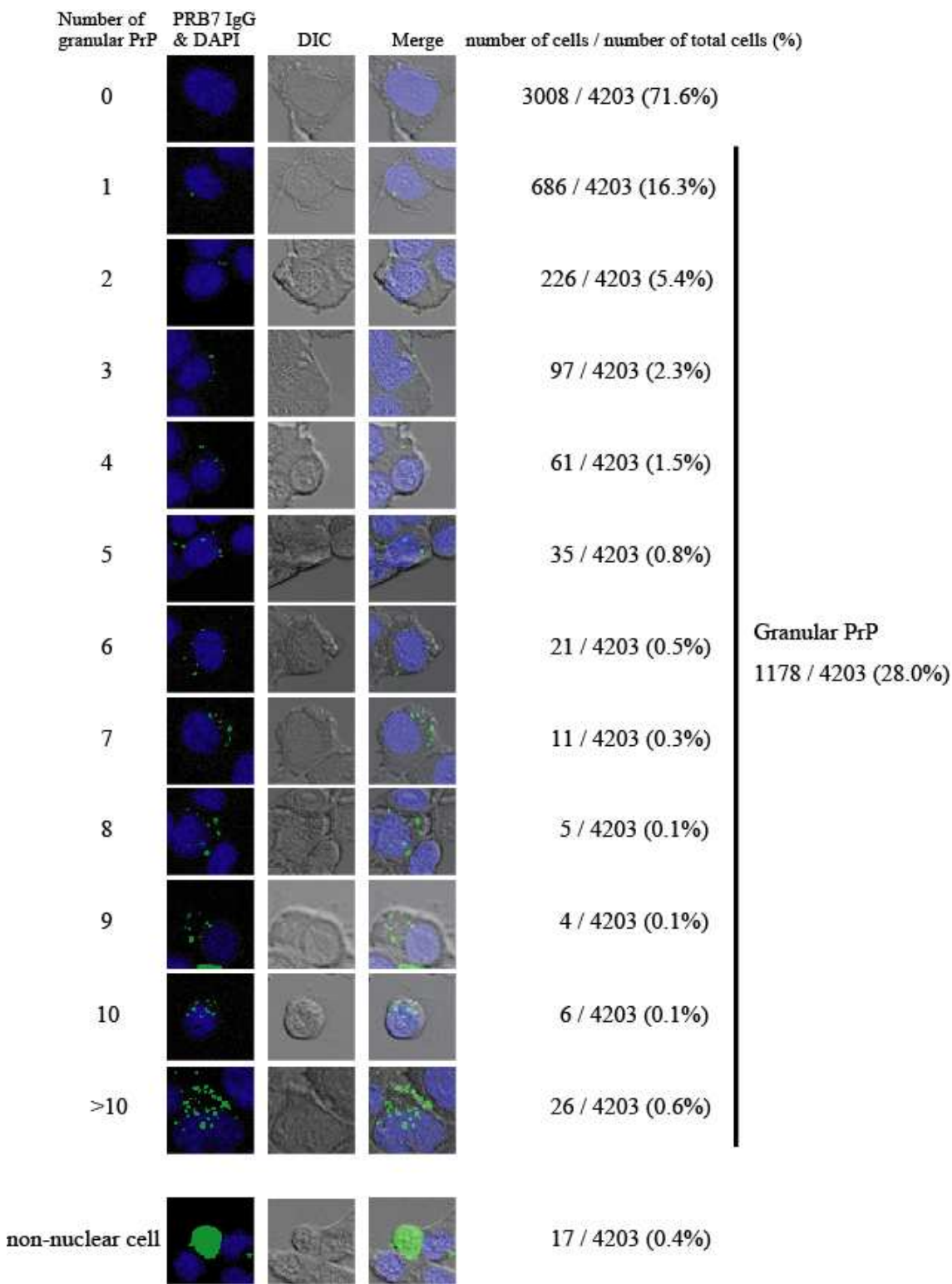


Fig.33 PRB7 IgG1で染色されるScN2a細胞の分布

・ β-form PrPの蓄積によるアポトーシス

orthogonal projectionと共焦点イメージを用いて $\beta$ -form PrPの蓄積によりScN2a細胞はアポトーシスを起こしているかどうかを調べた。その結果、orthogonal projectionを用いた詳細解析により、緑の粒子が非常に多い細胞では、アポトーシスのマーカーであるAnnexin Vのシグナルは非常に弱いが観察された (Fig.34 A, Annexin V, B line)。また、非常に弱い共焦点顕微鏡では観察されなかった核も、シグナルとして観察された(Fig.34 A, DAPI, B line)。また、多くの緑の粒子が観察される細胞でもアポトーシスを起こしていることが観察された (Fig.34 B)。これらの結果より、緑の粒子(PRB7 IgG1)が蓄積したScN2a細胞はアポトーシスを起こしていることが示された。

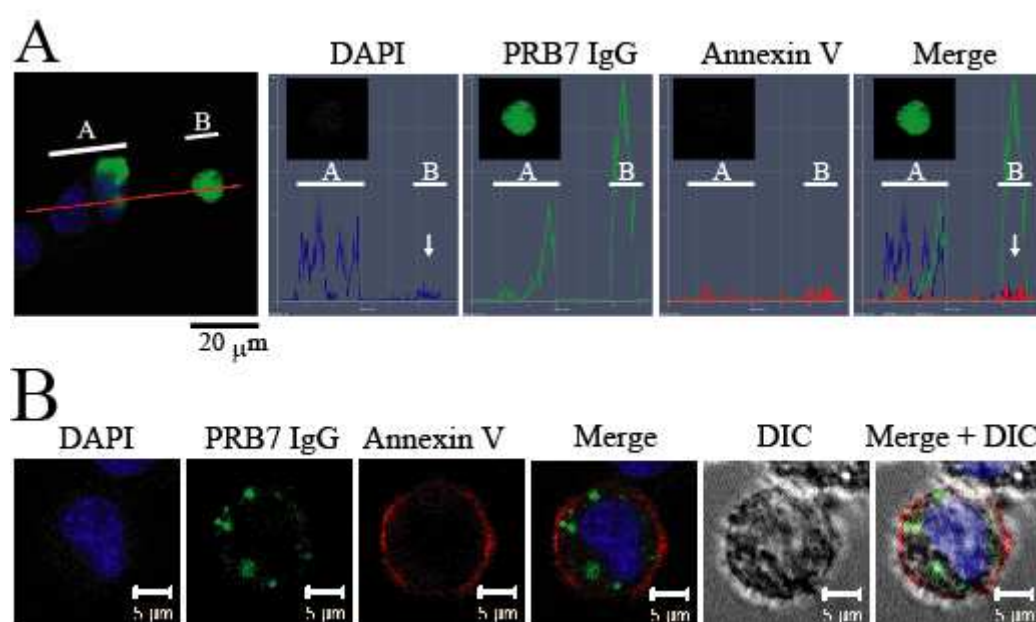


Fig.34  $\beta$ -form PrPの蓄積によるアポトーシスの詳細解析

#### ・ PRB7 IgG1とSAF32の多重染色

Fig.30 Box-1の細胞全体が緑の粒子 (PRB7 IgG1) で染色され、核が観察されないパターンは、0.4%と非常に少なかったが、これが本当にプリオンを染色して

いるかどうかをOrthogonal projectionを用いて詳細に調べた。その結果、SAF32とPRB7 IgG1はマージしないことが示された。また、核が共焦点イメージでは核が観察されていなかったが、非常に弱い核のシグナルが観察された。この結果より、PRB7 IgG1が染めるプリオンはSAF32が染めるエピトープを持たないことが示唆される。また、PRB7 IgG1のエピトープは128-132であり、SAF32のエピトープは51-91のocta repeat regionであること (Fig.36) から、PRB7 IgG1が染色している緑の粒子はN末端が無いことが示唆される。

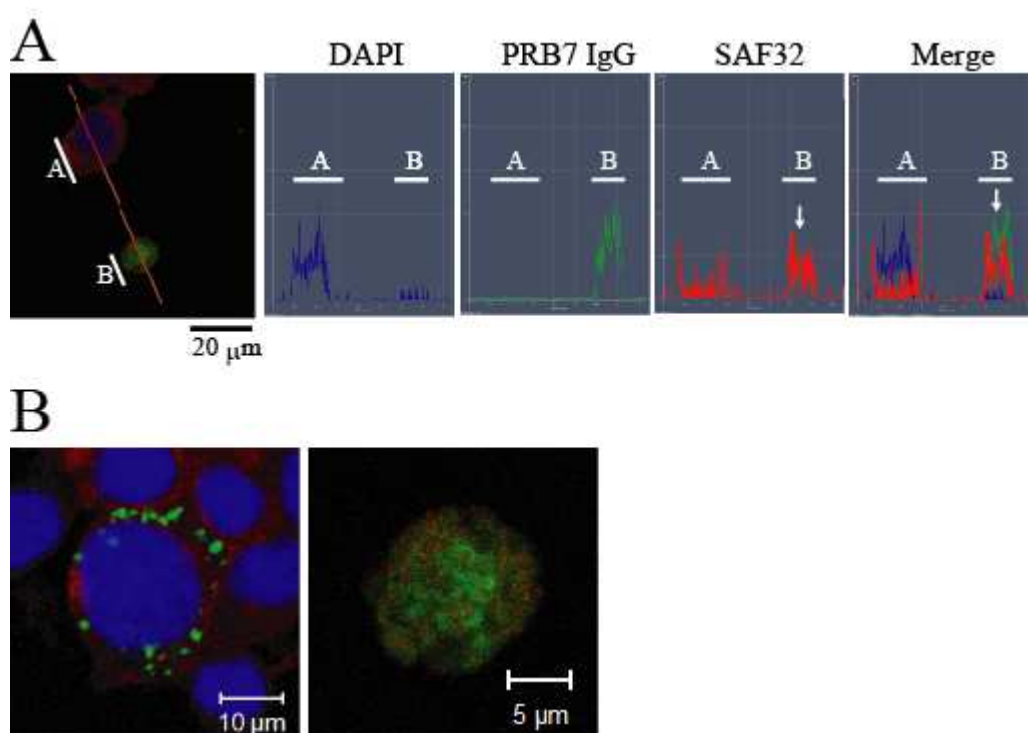


Fig.35 PRB7 IgG1とSAF32の多重染色の詳細解析

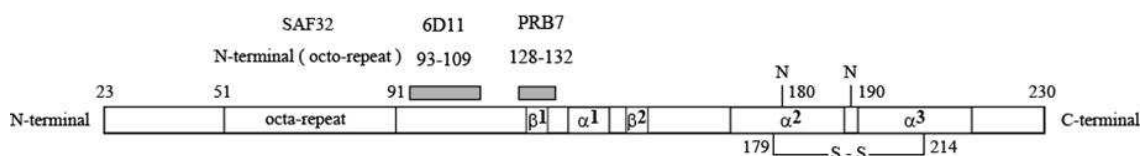


Fig.36 PRB7 IgG1、6D11とSAF32のエピトープ

・PRB7 IgG1とSAF32もしくは6 D11を用いたサンドイッチELISA

前述のPRB7 IgG1が染色している緑の粒子はN末端が無いことが示唆されたが、2つの抗体が拮抗することによって結合が阻害されている可能性があるため、サンドイッチELISA法（固層化抗体：PRB7 IgG1もしくはcontrol human IgG, 検出抗体：SAF32もしくは6D11）を用いて確認をした。その結果、N末端側の抗体であるSAF32もしくはC末端側の抗体である6D11 (Fig.36) を用いてもサンドイッチELISAによってプリオンタンパク質を検出することが出来た。よって、これらの抗体とPRB7 IgG1が拮抗していることが無いことが示された。

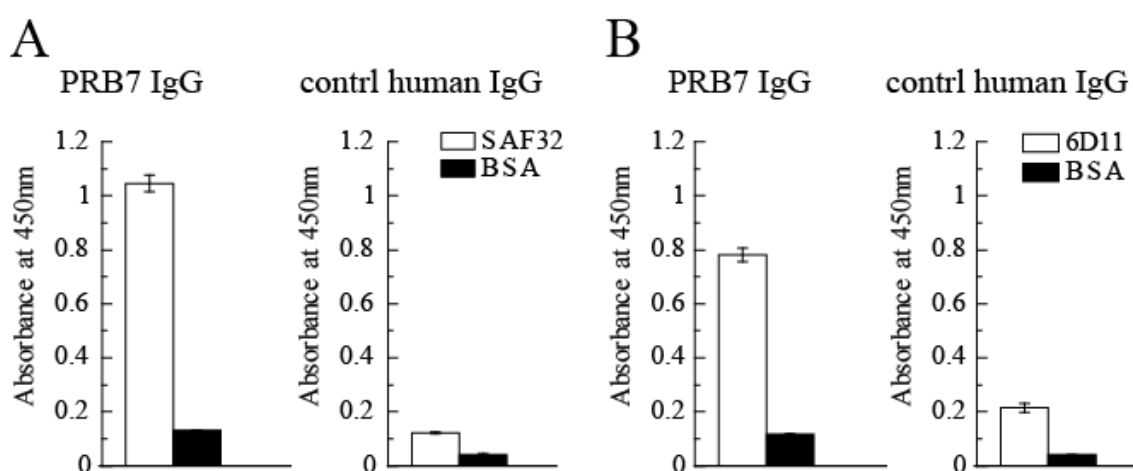


Fig.37 PRB7 IgG1とSAF32もしくは6 D11を用いたサンドイッチELISA

・Alexa488をコンジュゲートしたPRB7 IgGの特異性

Fig.37でC末端を認識する抗体とPRB7 IgG1は拮抗しないことが示されたので、Fig.35と同様の手法と一般的にプリオンの染色には変性処理をすることが報告されている<sup>58,59</sup>ので、この二つの手法を用いて染色を行った。しかし、変性処理を行うと、PRB7 IgG1は検出が出来なくなってしまった (data not shown)。そこ

で、化合物であるAlexa488をPRB7 IgG1にコンジュゲートすることで染色を行うこととした。そこでまず、Alexa488をコンジュゲートしたPRB7 IgG1がリフォールディングしたプリオンタンパク質に対して特異性が変化することなく特異的に結合することができるかを確かめた。その結果、Alexa488をコンジュゲートしたPRB7 IgG1は、 $\beta$ -form PrPに対して特異的に結合し、 $\alpha$ -form PrPに対する結合活性は示さなかった。

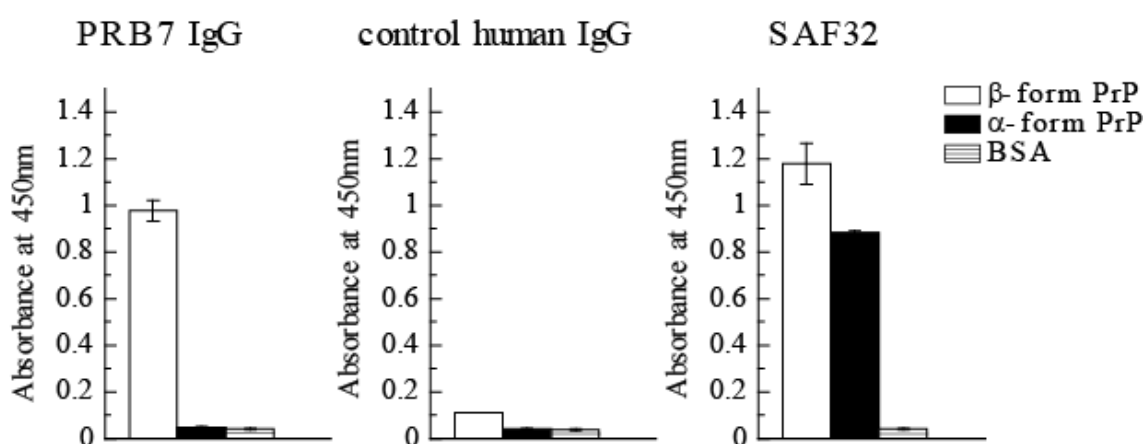


Fig.38 Alexa488をコンジュゲートしたPRB7 IgGの特異性

#### ・6D11とPRB7 IgG1の多重染色

SAF32とPRB7 IgG1はマージをしなかったが、その理由としてSAF32はN末端のオクタリピート領域（ヒトプリオンでaa51-91）を認識する抗体であり、PRB7 IgG1はC末端側の128-132を認識する抗体である。よって、PRB7 IgG1が染色している $\beta$ -form PrPはN末端を持っていない可能性が示唆される。そこで、私たちはC末端側の抗体である6D11 (epitop: aa93-109) の抗体とPRB7 IgG1との多重染色を行った。さらに、一般的に細胞内のプリオンを露出させた染色するために変性処理が必要なため、変性処理も合わせて行った。その結果、GdnHClによる変性



処理によりSAF32で染色されるパターンとPRB7 IgG1で染色されるパターンは異なることが示された。次に、6D11とPRB7 IgG1の染色パターンは一部がマージしていることが示された。これらの結果より、1. 従来のPrPres (赤) とPRB7 (緑) の染色パターンはほとんどが異なり、従来のPrP<sup>res</sup>は $\beta$ 型では無いことが示唆された。2. マージする染色パターンは $\beta$ -form PrPである。3. PRB7 IgGのみの染色パターンが少ないが観察される。よって、わずかだが6D11のエピトープが削られているプリオンタンパク質が存在する可能性がある。ということが示唆された。

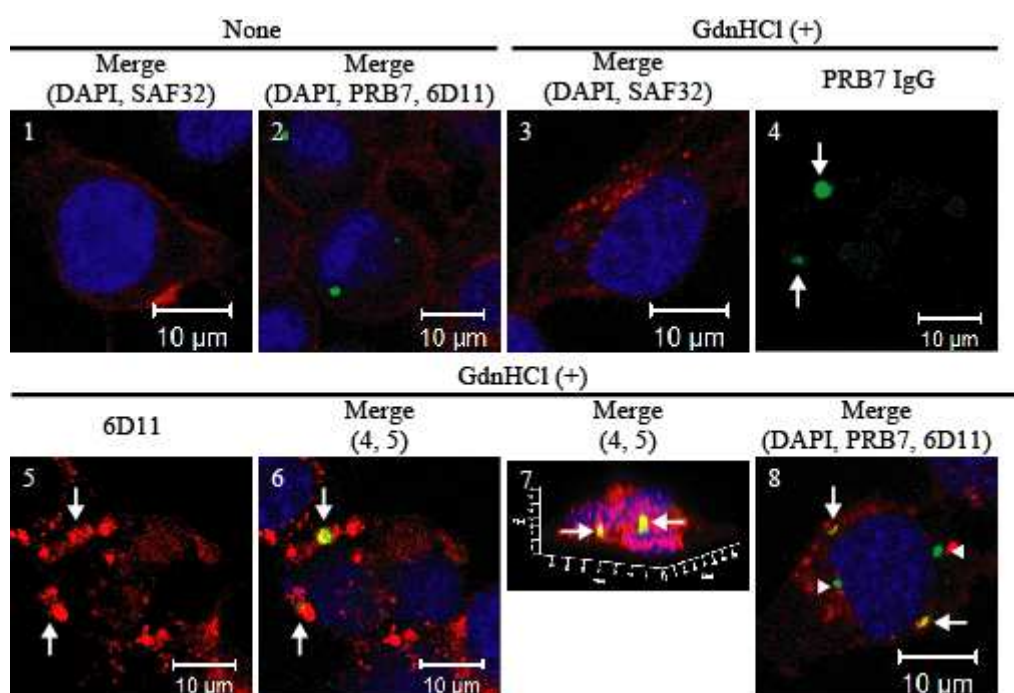


Fig.39 6D11とPRB7 IgG1の多重染色

#### ・PrP<sup>res</sup>増幅阻害実験

細胞内のプリオンを染色するPRB7 IgG1を用いて、PrP<sup>res</sup>の増幅を阻害する実験を行った。その結果、PRB7 IgG1によって、PrP<sup>res</sup>増幅は阻害することが出来なか



った。この結果は、細胞死を起こす $\beta$ -form PrPの増幅をPRB7 IgG1によって阻害できなかったことは、Colloingeらによる感染と毒性は別であるという説を支持するデータとなる<sup>22</sup>。

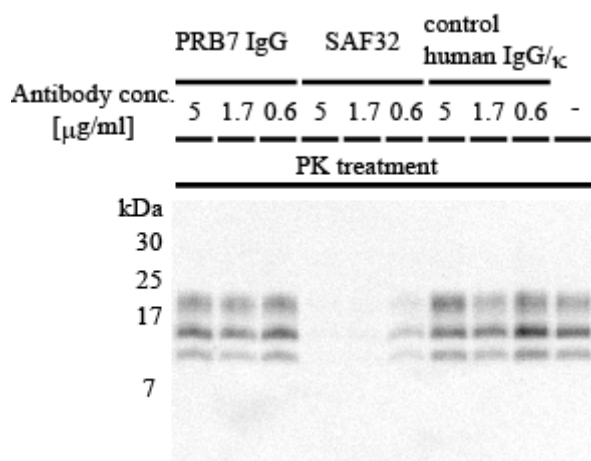


Fig.40 PrP<sup>res</sup>増幅阻害実験

#### 6-4 小括

PRB7 IgG1とScN2a細胞を3日間共培養することによって3つの特徴的染色パターンが観察された。（Fig.30 Box-1: 細胞全体が緑の粒子（PRB7 IgG1）で染色され、核が観察されないパターン、Fig.30 Box-2: 細胞の一部が緑の粒子で染色され、核が観察されるパターン、Fig.30 Box-3: 緑の粒子で染色されず、核が観察されるパターン。）これらのPRB7 IgG1で染色される粒子は $\beta$ -form PrPであり、蓄積していき、これが蓄積することによってアポトーシスを起こすことが示された。しかしながら、この抗体を用いてPrP<sup>res</sup>増幅阻害実験を行ったところ、まったく阻害が出来なかった。この結果はCollingeらによる感染と毒性は別であるという説を支持するデータとなる<sup>22</sup>。

## 第7章

## 総 括

従来の細胞融合法では $\alpha$ -formと $\beta$ -formを区別出来る抗体ができなかった (第2章 2-3)。しかし、本研究ではリフォールディングしたプリオンタンパク質 (第3章) とファージディスプレイ法を用いる事により、 $\beta$ -formに特異的な抗体を初めて作製する事に成功した (Fig.13、14と22)。このPRB7 IgG1は $\beta$ -form prionが細胞内で生成し、蓄積している事を、生理的条件下で初めて直接明らかにした (Fig. 31と33)。さらに $\beta$ -form prionの凝集体ができた細胞はapoptosisを起こす事を明らかにし、PRB7 IgGで染色された凝集体は6D11で染色される事よりprion proteinである (Fig.34と39)。しかし、 $\beta$ -form prionを蓄積しない細胞も多く存在し、この細胞はapoptosisを起こさず、増殖する (Fig.33)。このことは脳組織のスポンジ化との関連を説明できるかもしれない。さらに、GdnHClで変性させた細胞標品でPrP<sup>res</sup>と考えられているprion凝集体は、染色過程で凝集したものであり、細胞内に $\beta$ -form prion proteinとして存在したわけではないと考えられる (Fig.39)。

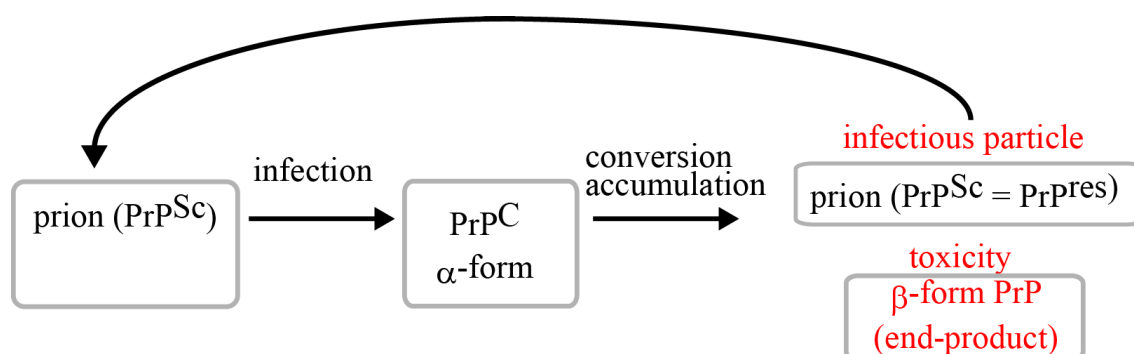


Fig.41 感染と毒性は別である

これらの結果をまとめると、細胞を殺すのは $\beta$ -form prion であるが、 $\alpha$ -form prion を $\beta$ -formにして増幅するのは $\beta$ -form prionではない、と考えられる。この考えはCollingeらの考えを支持するデータとなる<sup>22</sup> (Fig.41)。

したがって、PK-resistantという性質を示す、細胞内凝集体、およびSDS-PAGEでPrP<sup>res</sup>と評価されている分子は、細胞溶解物を作製する際に実験操作の過程で生成した分子の性状と考えられる。そして、Prionは $\alpha$ -formそのものでは無い可能性があるが、 $\beta$ -formではないと考えられる。

## 参考文献

1. Prusiner, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-44 (1982).
2. Prusiner, S. B. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13363-83 (1998).
3. Prusiner, S. B. Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**, 1515-22 (1991).
4. Schatzl, H. M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol* **245**, 362-74 (1995).
5. Oesch, B. et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**, 735-46 (1985).
6. Moser, M., Colello, R. J., Pott, U. & Oesch, B. Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* **14**, 509-17 (1995).
7. Brown, D. R., Besinger, A., Herms, J. W. & Kretzschmar, H. A. Microglial expression of the prion protein. *Neuroreport* **9**, 1425-9 (1998).
8. Silveira, J. R. et al. The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**, 257-61 (2005).
9. Bocharova, O. V., Breydo, L., Parfenov, A. S., Salnikov, V. V. & Baskakov, I. V. In vitro conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP(Sc). *J Mol Biol* **346**, 645-59 (2005).
10. Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B. & Cohen, F. E. Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8342-7 (2004).
11. Rogers, M., Yehiely, F., Scott, M. & Prusiner, S. B. Conversion of truncated and

- elongated prion proteins into the scrapie isoform in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3182-6 (1993).
12. Pan, K. M. et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10962-6 (1993).
  13. Prusiner, S. B. et al. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* **35**, 349-58 (1983).
  14. Turk, E., Teplow, D. B., Hood, L. E. & Prusiner, S. B. Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur J Biochem* **176**, 21-30 (1988).
  15. Biasini, E. et al. Immunopurification of pathological prion protein aggregates. *PLoS One* **4**, e7816 (2009).
  16. Wadsworth, J. D. et al. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* **358**, 171-80 (2001).
  17. Prusiner, S. B. et al. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* **63**, 673-86 (1990).
  18. Prusiner, S. B. et al. Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10608-12 (1993).
  19. Bueler, H. et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**, 1339-47 (1993).
  20. Scott, M. et al. Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell* **73**, 979-88 (1993).
  21. Kujala, P. et al. Prion uptake in the gut: identification of the first uptake and replication sites. *PLoS Pathog* **7**, e1002449.
  22. Sandberg, M. K., Al-Doujaily, H., Sharps, B., Clarke, A. R. & Collinge, J. Prion

- propagation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases. *Nature* **470**, 540-2.
23. Xi, Y. G., Ingrosso, L., Ladogana, A., Masullo, C. & Pocchiari, M. Amphotericin B treatment dissociates in vivo replication of the scrapie agent from PrP accumulation. *Nature* **356**, 598-601 (1992).
  24. Caughey, B. & Raymond, G. J. Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol* **67**, 643-50 (1993).
  25. Caughey, B., Ernst, D. & Race, R. E. Congo red inhibition of scrapie agent replication. *J Virol* **67**, 6270-2 (1993).
  26. Bueler, H. et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577-82 (1992).
  27. Khalili-Shirazi, A. et al. Beta-PrP form of human prion protein stimulates production of monoclonal antibodies to epitope 91-110 that recognise native PrP<sup>Sc</sup>. *Biochim Biophys Acta* **1774**, 1438-50 (2007).
  28. Feraudet, C. et al. Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrP<sup>Sc</sup> replication in infected cells. *J Biol Chem* **280**, 11247-58 (2005).
  29. Williamson, R. A. et al. Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7279-82 (1996).
  30. Boel, E. et al. Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments. *J Immunol Methods* **239**, 153-66 (2000).
  31. Korth, C. et al. Prion (PrP<sup>Sc</sup>)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* **390**, 74-7 (1997).
  32. Beringue, V. et al. PrP<sup>Sc</sup> binding antibodies are potent inhibitors of prion replication in

- cell lines. *J Biol Chem* **279**, 39671-6 (2004).
33. Stanker, L. H. et al. Conformation-dependent high-affinity monoclonal antibodies to prion proteins. *J Immunol* **185**, 729-37.
  34. Skrlj, N., Vranac, T., Popovic, M., Curin Serbec, V. & Dolinar, M. Specific binding of the pathogenic prion isoform: development and characterization of a humanized single-chain variable antibody fragment. *PLoS One* **6**, e15783.
  35. Kosmac, M. et al. Epitope mapping of a PrP(Sc)-specific monoclonal antibody: identification of a novel C-terminally truncated prion fragment. *Mol Immunol* **48**, 746-50.
  36. Sasamori, E., Suzuki, S., Kato, M., Tagawa, Y. & Hanyu, Y. Characterization of discontinuous epitope of prion protein recognized by the monoclonal antibody T2. *Arch Biochem Biophys* **501**, 232-8.
  37. Horiuchi, M. et al. Generation of monoclonal antibody that distinguishes PrPSc from PrPC and neutralizes prion infectivity. *Virology* **394**, 200-7 (2009).
  38. Biasini, E. et al. Non-infectious aggregates of the prion protein react with several PrPSc-directed antibodies. *J Neurochem* **105**, 2190-204 (2008).
  39. Petsch, B. et al. Biological effects and use of PrPSc- and PrP-specific antibodies generated by immunization with purified full-length native mouse prions. *J Virol* **85**, 4538-46.
  40. Williamson, R. A. et al. Mapping the prion protein using recombinant antibodies. *J Virol* **72**, 9413-8 (1998).
  41. Klohn, P. C. et al. PrP antibodies do not trigger mouse hippocampal neuron apoptosis. *Science* **335**, 52.
  42. Roberts, B. L. et al. Directed evolution of a protein: selection of potent neutrophil

- elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2429-33 (1992).
43. Fukumoto, T., Torigoe, N., Ito, Y., Kajiwara, Y. & Sugimura, K. T cell proliferation-augmenting activities of the gene 3 protein derived from a phage library clone with CD80-binding activity. *J Immunol* **161**, 6622-8 (1998).
  44. Fukumoto, T. et al. Peptide mimics of the CTLA4-binding domain stimulate T-cell proliferation. *Nat Biotechnol* **16**, 267-70 (1998).
  45. Marks, J. D. et al. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* **222**, 581-97 (1991).
  46. Jackson, G. S. et al. Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science* **283**, 1935-7 (1999).
  47. Ishibashi, D. et al. Immunization with recombinant bovine but not mouse prion protein delays the onset of disease in mice inoculated with a mouse-adapted prion. *Vaccine* **25**, 985-92 (2007).
  48. Sasaki, K. et al. Reversible monomer-oligomer transition in human prion protein. *Prion* **2**, 118-22 (2008).
  49. Hashiguchi, S. et al. Human Fc epsilon RIalpha-specific human single-chain Fv (scFv) antibody with antagonistic activity toward IgE/Fc epsilon RIalpha-binding. *J Biochem* **133**, 43-9 (2003).
  50. Hamasaki, T. et al. Human anti-human IL-18 antibody recognizing the IL-18-binding site 3 with IL-18 signaling blocking activity. *J Biochem* **138**, 433-42 (2005).
  51. Hamasaki, T. et al. Biopanning of antibody-phage clones using immunoplates coated with gel slices of electrophoresis: immunogel-biopanning. *Biol Pharm Bull* **30**, 1361-4 (2007).



52. Yoshihara, T. et al. Immunoreactivity of phage library-derived human single-chain antibodies to amyloid beta conformers in vitro. *J Biochem* **143**, 475-86 (2008).
53. Yoshinaga, K. et al. Ig L-chain shuffling for affinity maturation of phage library-derived human anti-human MCP-1 antibody blocking its chemotactic activity. *J Biochem* **143**, 593-601 (2008).
54. Tanaka, K. et al. A mimotope peptide of Abeta42 fibril-specific antibodies with Abeta42 fibrillation inhibitory activity induces anti-Abeta42 conformer antibody response by a displayed form on an M13 phage in mice. *J Neuroimmunol* **236**, 27-38.
55. Peretz, D. et al. A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform. *J Mol Biol* **273**, 614-22 (1997).
56. Liu, C., Dalby, B., Chen, W., Kilzer, J. M. & Chiou, H. C. Transient transfection factors for high-level recombinant protein production in suspension cultured mammalian cells. *Mol Biotechnol* **39**, 141-53 (2008).
57. Kristiansen, M. et al. Disease-related prion protein forms aggresomes in neuronal cells leading to caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* **280**, 38851-61 (2005).
58. Veith, N. M., Plattner, H., Stuermer, C. A., Schulz-Schaeffer, W. J. & Burkle, A. Immunolocalisation of PrPSc in scrapie-infected N2a mouse neuroblastoma cells by light and electron microscopy. *Eur J Cell Biol* **88**, 45-63 (2009).
59. Goold, R. et al. Rapid cell-surface prion protein conversion revealed using a novel cell system. *Nat Commun* **2**, 281.

## 本学位論文に関する主論文

**Kubota, T.**, Hamazoe, Y., Hashiguchi, S., Ishibashi, D., Akasaka, K., Nishida, N., Katamine, S., Sakaguchi, S., Kuroki, R., Nakashima, T., Sugimura, K.. Direct evidence of generation and accumulation of beta-sheet-rich prion protein in scrapie-infected neuroblastoma cells with human IgG1 antibody specific for beta-form prion protein. *J Biol Chem* **287**, 14023-39.

## 本学位論文に関する参考論文

Sasaki, K., Gaikwad, J., Hashiguchi, S., **Kubota, T.**, Sugimura, K., Kremer, W., Kalbitzer, H. R., Akasaka, K.. Reversible monomer-oligomer transition in human prion protein. *Prion* **2**, 118-22 (2008).

## 出版物

杉村和久、吉永圭介、久保田俊也、北本祥、橋口周平，薬学研究最前線 “**Beyond Antibody** という研究領域”，日本薬学会、薬学研究ビジョン部会 Pharma VISION NEWS NO.12 (Nov. 2008)., 2-7

## 学会報告

1. 橋口周平，北本祥，**久保田俊也**，今泉智之，中島敏博，坂口末廣，片峰茂，佐々木健，JyotiU.Gaikwad，赤坂一之，伊東祐二，杉村和久，コンフォメーション特異的抗体によるプリオンの構造変異の追跡，プリオン研究会，2005年，9月，山形県天童市
2. 橋口周平，北本祥，**久保田俊也**，中島敏博，伊東祐二，杉村和久，プリオンのコンフォメーション変化を識別する抗体プローブの作製，日本免疫学会，2005年，12月13日，横浜
3. **久保田俊也**，今泉智之，西田教行，片峰茂，佐々木健，Jyoti U. Gaikwad，赤坂一之，橋口周平，中島敏博，伊東祐二，杉村和久，異常型プリオンのコンフォメーションを識別する抗体プローブ作製の試み，平成19年度日本生化学会九州支部例会，5月，福岡

4. **Toshiya Kubota**, Shuhei Hashiguchi, Tomoyuki Imaizumi, Megumi Kurokawa, Sho Kitamoto, Ken Sasaki, Jyoti\_U. Gaikwad, Kazuyuki Akasaka, Noriyuki Nishida, Shigeru Katamine, Yuji Ito, Toshihiro Nakashima, Kazuhisa Sugimura  
Direct cloning of phage library antibodies detecting various prion species under conformational conversion., 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006年、6月、京都
5. 久保田俊也、橋口周平、今泉智之、黒川恵、中島敏博、伊東祐二、杉村和久、繊維型及びオリゴマープリオンに対するヒト抗体ファージクローン、2006年、9月、岩手
6. Shuhei Hashiguchi, **Toshiya Kubota**, Megumi Kurokawa, Toshihiro Nakashima, Kazuhisa Sugimura, In vitro selection and characterization of scFvs and Fab fragments specific for the conformational structure of prion proteins using phage libraries, 日本免疫学会, 2006年, 11月, 東京
7. 橋口周平, 久保田俊也, 黒川恵, 赤坂一之, 片峰茂, 中島敏博, 伊東祐二, 杉村和久, ファージディスプレイ法によるプリオン蛋白 $\beta$ オリゴマー中間体のスナップショット, プリオン研究会, 2007年, 8月, 新潟
8. 久保田俊也, 黒川恵, 橋口周平, 佐々木健, 赤坂一之, 西田教行, 片峰茂, 中島敏博, 伊東祐二, 杉村和久, ヒト一本鎖抗体ファージライブラリーを用いた $\beta$ シート型オリゴマープリオン特異的抗体単離の試み, 平成19年度日本生化学会九州支部例会, 2007年, 5月, 宮崎

9. 黒川恵, **久保田俊也**, 橋口周平, 佐々木健, 赤坂一之, 西田教行, 片峰茂, 中島敏博, 伊東祐二, 杉村和久, フェージディスプレイ法を用いたプリオン蛋白フィブリル特異的抗体の作製, 平成19年度日本生化学会九州支部例会, 2007年, 5月, 宮崎
10. 橋口周平, 濱添勇太, 田原春菜, 朝田俊秀, **久保田俊也**, 黒木良太, 片峰茂, 赤坂一之, 中島敏博, 伊東祐二, 杉村和久, ヒト $\beta$ プリオン蛋白特異的なヒト抗体と直接検出法, 2008年, 8月, 北海道
11. **久保田俊也**, 朝田俊秀, 濱添勇太, 田原春菜, 橋口周平, 玉田太郎, 正山祥生, 黒木良太, 片峰茂, 赤坂一之, 中島敏博, 伊東祐二, 杉村和久<sup>1</sup> ヒト $\beta$ プリオン蛋白特異的なヒト抗体の確立の試み, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学大会合同大会 講演要旨集 p325 2008年12月 神戸
12. 濱添勇太, 田原春菜, 朝田俊秀, **久保田俊也**, 橋口周平, 赤坂一之, 片峰茂, 中島敏博, 伊東祐二, 杉村和久, 全長プリオン遺伝子発現で作製した $\alpha$ 型と $\beta$ 型プリオンの電気泳動分離条件検討, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学大会合同大会 講演要旨集 p325 2008年12月 神戸
13. 橋口周平, **久保田俊也**, 朝田俊秀, 濱添勇太, 黒川恵, 杉村和久  $\beta$ 型プリオン蛋白質特異的scFv抗体(#7)のヒトIgGへの抗体エンジニアリング 厚生労働科学研究費(こころの健康科学研究)片峰・堂浦合同班会議 2009年1月宮城

14. 久保田俊也, 谷村優一, 朝田俊秀, 濱添勇太, 田原春菜, 橋口周平, 中島敏博, 伊東祐二, 杉村和久,  $\beta$ 型プリオン特異的ヒト抗体の特異性に及ぼすIgG定常領域の影響の検討 (Influence of IgG constant region on the fine specificity of beta-prion-specific human antibody.), 第82回日本生化学会大会, 10月21-24日, 2009, 兵庫, 神戸ポートアイランド
15. 久保田俊也, 甲斐聡美, 谷村優一, 濱添勇太, 黒木良太, 橋口周平, 中島敏博, 杉村和久,  $\beta$ 型ヒトプリオン蛋白特異的IgG抗体の確立, 日本生化学会九州支部例会 5月, 2010, 鹿児島
16. 濱添勇太, 久保田俊也, 橋口周平, 中島敏博, 杉村和久, 遺伝子組み換え体 $\beta$ 型プリオンと感染性プリオンの性状解析, 日本生化学会九州支部例会 5月, 2010, 鹿児島
17. **Toshiya Kubota**, Yuichi Tanimura, Satomi Kai, Yuta Hamazoe, Ryota Komure, Toshihiro Nakashima, Ryota Kuroki, Shuhei Hashiguchi, Kazuhisa Sugimura, Generation of human monoclonal conformational antibodies recognizing beta structure of human prion protein. 14th international congress of immunology, 2010年, 8月, 神戸
18. **Toshiya Kubota**, Yuta Hamazoe, Yuichi Tanimura, Satomi Kai, Ryota Komure, Toshihiro Nakashima, Ryota Kuroki, Shuhei Hashiguchi, Noriyuki Nishida, Suehiro Sakaguchi, Shigeru katmine, Kazuhisa Sugimura, Establishment of human monoclonal conformational antibodies recognizing beta-form human

prion protein. 2010年, 7月, 北海道

19. **Toshiya Kubota**, Yuta Hamazoe, Ryota Komure, Toshihiro Nakashima, Shuhei Hashiguchi, Kazuhisa Sugimura, Binding epitopes of human IgG antibody specifically binding to the beta-form but not alpha-form of human prion protein, 第5回国際ペプチドシンポジウム, 12月, 2010, 京都
20. 小牟禮亮太, 久保田俊也, 濱添勇太, 橋口周平, 杉村和久, 大腸菌由来NusAタンパク質を融合させた抗 $\beta$ プリオン特異的ヒト一本鎖抗体の作製とその特異性, 第83回日本生化学会大会, 12月, 2010, 神戸

## 謝 辞

本研究は、鹿児島大学大学院理工学研究科物質生産工学専攻分子生物学講座（杉村研究室）にて行われ、私が本研究室にてまとめた研究成果であります。

私が研究室に配属された学部4年生から現在に至る約8年の間、終始親切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました主指導教官である杉村和久教授に心より感謝を申し上げます。学位論文審査にあたり貴重な時間を割いて頂いた伊東祐二教授、隅田泰生教授に心より感謝を申し上げます。研究に関して多大なるご助言を頂いた、橋口周平助教に心より感謝を申し上げます。また、この研究をまとめるにあたり原子間力顕微鏡の測定をしていただいた近畿大学、赤坂一之教授、scFv関係の発現に協力を頂いた独立行政法人日本原子力研究開発機構の黒木良太先生、様々なご助言をいただいた長崎大学の片峰茂先生、西田敏行先生、佐藤克也先生、石橋大輔先生、新竜一郎先生、徳島大学の坂口末廣先生、化学及血清療法研究所の中島敏博先生方に心より感謝を申し上げます。そして、この抗体の単離を行っていた山本真由美さん、佐藤悠子さんにも心より感謝を申し上げます。実験の実施にあたり、杉村研究室卒業生、在学生の熱心な協力を得たことを記すとともに心より感謝を申し上げます。また、学位取得まで心配をか



けました、両親、妻ともどもにも深く感謝を致します。

最後に、この研究論文は本当に多くの方の協力を得て出来上がった論文です。皆様に深く感謝を致します。そして、これからは大学で培った知識、研究力を日々精進していく所存です。

平成24年7月 久保田 俊也