

# 学位論文の要旨

氏 名

久保田 俊也

学位論文題目

ファージディスプレイ法によるβ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

## 要約

本研究ではJ. Collingeらの報告に従い、遺伝子組み換え型のβ-sheet-rich recombinant full-length prion protein (β-form PrP) を作製した。このβ-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、私はβ-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、細胞破碎物を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β-form PrPが、α-form PrPをβ-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β-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つの別個の分子機構である」というNatureの報告結果を支持する。PRB7はβ-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 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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Vl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。

## 論文審査の要旨

報告番号	理工研 第371号	氏名	久保田 俊也
審査委員	主査	杉村 和久	
	副査	隅田 泰生	伊東 祐二
<p>学位論文題目 ファージディスプレイ法によるβ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 β-form prion protein-specific human IgG by phage displaying technology and molecular mechanism of prion amplification)</p> <p>審査要旨</p> <p>提出された学位論文及び論文目録等を基に学位論文審査を実施した。プリオン病は、プリオン分子の正常な立体構造が変化し、β-sheet構造を多く有するβ型プリオン分子になることにより、発症すると考えられている。本論文では、ファージディスプレイ法を用いて、これまで達成されていなかったβ型プリオン分子に特異的なヒト抗体を確立し、この抗体を用いることでβ型プリオン分子のみを、プリオン感染細胞の中で、実際の生理的条件下で生成し、蓄積している事を国際的に初めて可視化することに成功したことを報告している。</p> <p>第1章はプリオン病とプリオンの特徴について説明し、プリオン特異的抗体の単離の重要性について述べ、本論文の全体構造を示す序文となっている。</p> <p>第2章は、プリオンに対していままでに単離されている抗体について記述している。いままでに単離されている抗体は抗PrP<sup>Sc</sup>/PrP<sup>C</sup>抗体もしくは抗PrP<sup>C</sup>抗体が確立されている。抗PrP<sup>Sc</sup>抗体は確立されておらず、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と述べている。</p> <p>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述べている。β型プリオン分子 (β-form PrP) はCollingeらによるプロトコールに従って作製し、円偏光二色性 (circular dichroism, CD)、原子間力顕微鏡、proteinase K処理、ELISAによって解析を行っている。作製したβ型プリオン分子は、β-シート構造を持ち、均一な粒子であり、PK耐性を持つタンパク質であると説明している。</p> <p>第4章はファージディスプレイ法を用いたβ型プリオン分子特異的一本鎖抗体 (single chain Fv, scFv) の単離とその特異性について述べている。ヒトscFvを提示したファージライブラリを用いてβ型プリオン分子に対して特異的なヒトscFv (PRB7とPRB30) を確立し、ELISA、遺伝子配列解析など、様々な生化学的解析を用いて特異性を確認した。その結果、PRB7とPRB30はβ型プリオン分子に対して特異的に結合することが示された。</p> <p>第5章はPRB7 scFvの分子を安定にするためβ型プリオン分子特異的IgG抗体の作製したものと作製したPRB7 IgG抗体の生化学的特性について述べている。作製したPRB7 IgG抗体は、ELISA、ペプチドファージライブラリを用いたエピトープマッピングにより、ヒト、マウス、ヒツジのβ型プリオン分子に対して特異的に結合し(ウシはβ型プリオン分子に強く結合するが、α型プリオン分子に対して非常に弱い結合性を示す)、エピトープはヒトプリオンのaa128-132を認識していることが示された。</p> <p>第6章では、PRB7 IgGが、細胞内β型プリオン分子の産生と蓄積に及ぼす影響について述べている。ScN2a細胞は3日間PRB7 IgGの存在下で共培養し、細胞でPRB7 IgGが結合する粒子が共焦点顕微鏡によって観察された。また、PRB7 IgG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の蓄積を阻害しなかったが、抗プリオン抗体 (N末端認識で、α/β型を認識する抗体) SAF32は強く阻害した。</p> <p>第7章で、本研究の結果を総括している。本研究では、β型プリオン分子に特異的なヒト抗体を確立した。この成果を踏まえて、羊のプリオンであるスクレイピーが感染した神経芽腫細胞を用いて、この細胞が増殖している生理的条件下で、この抗体を共存させ、β型プリオン分子のみを可視化することに国際的に初めて成功した。</p> <p>以上本論文は、ファージディスプレイ法を用い、国際的に初めてβ型プリオン分子に特異的なヒト抗体を確立し、プリオンの分子生物学的基盤の一端を明らかにすることを達成した。よって、審査委員会は博士 (工学) の学位論文として合格と判定した。</p>			

## 最 終 試 験 結 果 の 要 旨

報 告 番 号	理工研 第371号	氏 名	久保田 俊也
審 査 委 員	主 査	杉村 和久	
	副 査	隅田 泰生	伊東 祐二

平成24年7月26日11時から行われた学位論文発表会において、審査委員を含む約15名の前で学位論文の内容が説明され、その後、以下に示すような質疑応答が行われた。説明不足の部分は8月17日に改めて質疑応答を実施し、発表が適格になされたことを審査委員会は承認した。20を越す質疑の内、主な質疑応答を以下に示す。

7/26日の質疑応答

[質問1] PRB7 IgGが細胞内を染めるのはエンドサイトーシスによるものか？

[回答1] 他の抗体では起こらないことよりFcレセプターを介したエンドサイトーシスではない。

細胞表面上の非常に少ないβ型プリオン分子と結合することによりエンドサイトーシスを起こしているのではないかと考えている。

[質問2] 糖鎖の結合部位とPRB7 IgGのエピトープとの関係は問題ないか？

[回答2] N型糖鎖の結合部位はヒトの配列であれば181番目と197番目に存在する。立体構造的には正常型のプリオンタンパク質で、alpha2のC末端側とalpha3のN末端側に存在する。PRB7 IgGのエピトープはaa128-132です。

[質問3] 毒性と感染に関して、β型プリオン分子が蓄積して細胞死をおこすのか？

[回答3] 今回の研究で示した事は、1) PRB7 IgGはScN2a細胞の中に大きい凝集塊を染色する、2) その凝集塊を持っている細胞はアポトーシスを起こしているということです。すなわち「凝集塊を持っている」ということと「アポトーシスを起こしている」という事実がパラレル（一致）なので、PRB7 IgGが検出している凝集塊はアポトーシスの原因になっていると考えられます。酵素反応などでは、抗体が結合するとその活性を阻害することが観察されます。プリオンの増幅過程では、異常プリオンのベーターシート構造を含む分子表面が鋳型様活性を示し、正常プリオンを異常型プリオンに変換すると推定されていますが、PRB7 IgGはプリオン分子と比べ非常に大きい分子であり、エピトープ128-132の部分に結合した場合、プリオンのベーターシート構造部分をほぼ覆うと予想され、プリオンのPrP<sup>res</sup>の増幅活性にも影響が出ると考えられます。しかし、PRB7 IgGをScN2a細胞の培地に添加し、その影響を調べた実験では、PrP<sup>res</sup>のバンド形成に全く影響を及ぼさなかったことより、PrP<sup>res</sup>の形成を促進させているのは、PRB7 IgGが結合しているβ型プリオン分子やそのプリオン凝集塊ではないことが示唆されます。このことより細胞死を誘導するPRB7 IgG結合性のプリオン凝集塊とプリオンの感染性増幅を誘導するプリオン分子は別であると考えられます。この考えは2011年のCollingeらの毒性と感染性の分子メカニズムは異なっているという報告（Nature 470: 540-2. 2011）と一致するように思われます。

8/17日の再質疑応答

[質問4] PRB7 IgGがPrP<sup>res</sup>に結合するという証拠（実験）はどれか

[回答4] 1) PRB7抗体が、Western blotや、染色のために固定化した細胞標本を染めることができないこと、および 2) PrP<sup>res</sup>が、市販の抗体を用いて固定化した細胞標本を染めた時に見える染色像のどの部分がPrP<sup>res</sup>であるかが全く不明なことより、「PRB7 IgGがPrP<sup>res</sup>に結合するという直接証拠」は、Western blotでも細胞染色実験でも本研究では示していません。

[質問5] PRB7 IgGはβフォームのプリオンに結合することはわかるが、βシート部分に結合するという直接的証拠はどれか

[回答5] 本研究では1) ペプチドを提示したファージライブラリを用いて、PRB7抗体の結合するペプチド配列を決定して、この抗体のエピトープであることを示しました。2) 本研究では、CD測定で調べてβ-sheet-richなプリオン分子をβ型プリオン分子と呼んでいますが、PRB7抗体はこのβ型プリオン分子にしか結合しません。(1)この「β型を特徴づける構造に結合する」こと、および (2)エピトープ解析の結果を踏まえて、「PRB7抗体の結合部位は#128-132を含む」ことを考慮すると、#128-132はβシート構造の一部をなし、PRB7抗体はその部分に結合することが示唆されますが、直接証拠を提示している訳ではありません。

[質問6] 感染性増幅を誘導するのはプリオンとは関係ない分子であることを否定するデータはありますか？

[質問6] 本研究ではわかりません。これまでの膨大な研究成果からも解っていません。

本論文は1) 国際的に初めて、β型のプリオンのみを認識する抗体を作成した、こと、および2) この抗体を用いてプリオン感染細胞の中に、本当にbeta型のプリオンが生成し蓄積していることを国際的に初めて直接的に示して、プリオンの分子生物学的基盤の一端を明らかにする事を達成している。質疑応答は、不明な部分の多いプリオンの一般論の領域にまで及んだため、再度の質疑応答の機会を設けて審査を行い、その審査内容を反映させるために博士論文の記載内容の修正を行った。以上の結果を受け、審査委員会は、申請者が博士課程の修了者としての学力ならびに見識を有するものと認め、博士（工学）の学位を与えるに足る資格を有するものと判定した。