

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780219

研究課題名（和文） In vitro プリオン増殖機構解析：PrP 遺伝子欠損細胞を用いた改良 PMCA 法

研究課題名（英文） In vitro analysis of prion proliferation: Modified PMCA method using PrP-gene deficient cell line

研究代表者

作道 章一 (Sakudo Akikazu)

琉球大学・医学部・准教授

研究者番号：10397672

研究成果の概要（和文）：

本研究では、プリオン蛋白質(PrP)遺伝子欠損マウス神経細胞株(HpL)にマウス PrP 遺伝子もしくは異種 PrP(ハムスター、ウシ)を導入した細胞のライゼートを正常型 PrP(PrP<sup>C</sup>)供給源として protein misfolding cyclic amplification (PMCA)を行うとともに、マウススクレイピープリオンもしくは異種プリオン(それぞれハムスタースクレイピープリオン、Bovine spongiform encephalopathy (BSE)プリオン)存在下で、異常型 PrP(PrP<sup>Sc</sup>)増幅の有無から PrP<sup>Sc</sup>増幅に必要な条件についての基礎的データを得ることを目的とした。PMCA法によるハムスター263K株、マウス Obihiro 株、マウス Chandler 株の試験管内増幅による比較を行った結果、263K株と Chandler 株は脳ホモジネートを PrP<sup>C</sup>供給源とした場合、既存の条件(1% TritonX-100, 4mM EDTA 含 PBS, 40 cycle)で PrP<sup>res</sup>(蛋白質分解酵素抵抗性 PrP)の増幅が可能であったが、Obihiro 株では同条件では増幅がされなかった。さらに、HpLにマウス PrP 遺伝子やハムスターPrPを導入した細胞の細胞ライゼートを PrP<sup>C</sup>供給源として試験管内増幅を行ったところ、同条件では 263K株と chandler 株のいずれも増幅がされなかった。これらのことから、プリオン株ごとに条件設定が必要であるとともに、細胞ライゼートを用いた場合、脳ホモジネートの条件とは異なる増幅条件が必要であることが明らかとなった。本研究の結果から、PMCA法による PrP<sup>res</sup>の増幅条件はプリオン株やPrP<sup>C</sup>供給源の性状ごとに最適化する必要があることが明らかになったとともに、動物を用いないプリオン検出系として、広範なプリオン株に適応可能な PMCA 条件の構築が必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, protein misfolding cyclic amplification (PMCA) was performed using prion protein (PrP)-gene deficient cell line as the source of cellular PrP. Mouse and hamster scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE) prion were used for seed. In 2008, cell lysate was prepared from prion protein (PrP)-gene deficient cell re-introduced with mouse, hamster, and bovine PrP-gene. In 2009, we compared the in vitro amplification efficiency in PMCA among hamster scrapie 263K, mouse scrapie Obihiro, mouse Chandler scrapie prions. As the results, PrP<sup>res</sup> could be amplified from brain homogenates infected with 263K and Chandler prion under the condition of PBS containing 1% TritonX-100, 4mM EDTA (40 cycles), whereas Obihiro prion could not be amplified. In addition, PMCA using cell lysate required different conditions for PrP<sup>res</sup> amplification compared to brain homogenate. Therefore, we concluded that the adaptation of PMCA conditions were required for efficient PrP<sup>res</sup> proliferation depending on prion strains and PrP<sup>C</sup> sources.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：応用獣医学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：微生物、獣医学、感染症、ウイルス、神経科学、プリオン、人獣共通感染症

1. 研究開始当初の背景

最近、PMCA と呼ばれる新しい技術が開発され、*in vitro* 系での PrP<sup>Sc</sup> の増幅が可能になった (Saborio et al., Nature, 2001, 411:810-3)。この方法は、PrP<sup>C</sup> の供給源として脳ホモジネートを使用し、PrP<sup>Sc</sup> とインキュベーションしながら超音波破碎を繰り返すことで PrP<sup>Sc</sup> を増幅する方法である。本研究では、プリオン増殖機構の核である PrP<sup>C</sup>→PrP<sup>Sc</sup> の転換機構に関与する PrP<sup>C</sup> 側の要因を解明するための技術的ツールとして PrP 遺伝子欠損マウス神経細胞株 (HpL) を用いた PMCA 法の改良を進める。

2. 研究の目的

本研究では、HpL にマウス PrP 遺伝子もしくは異種 PrP (ハムスター、ウシ) を導入した細胞のライゼートを PrP<sup>C</sup> 供給源として PMCA を行うために、マウススクレイピープリオンもしくは異種プリオン (それぞれハムスタースクレイピープリオン、BSE プリオン) 存在下での異種 PrP<sup>Sc</sup> の増幅系の構築へ向けての基礎的データを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

PrP 遺伝子を再導入した PrP 遺伝子欠損マウス神経細胞株由来の細胞ライゼートや脳ホモジネートを PrP<sup>C</sup> 供給源として、プリオン存在下で PMCA を行い、その増幅の有無をウェスタンブロッティングによるプロテイナーゼ K 抵抗性 PrP の検出で確認する。

4. 研究成果

平成 20 年度は、PrP 遺伝子欠損マウス神経細胞株に欠損変異マウス PrP 遺伝子欠損変異 PrP 遺伝子 (PrP Δ#1, PrP Δ#2, PrP Δ#3) を導入した細胞、ハムスター PrP 遺伝子を導入した細胞、ウシ PrP 遺伝子を導入した細胞を樹立した。さらに、これらの樹立した細胞より細胞ライゼートを調整し、抗 PrP 抗体を用いたウェスタンブロッティングによる PrP の検出を行った。その結果、PMCA に利用するに

十分な量の PrP<sup>C</sup> 供給が可能な PrP 発現細胞の樹立と細胞ライゼートの調整ができていたことがわかった。加えて、異種および同種 PrP 遺伝子発現細胞のアポトーシス感受性を血清除去誘導アポトーシスにより比較したところ、同種 (マウス) PrP の場合のみ PrP がアポトーシス抑制に働き、ハムスターやウシ PrP にはアポトーシス抑制効果が見られないことが明らかとなった。平成 21 年度には PMCA 法によるハムスター 263K 株、マウス Obihiro 株、マウス Chandler 株の試験管内増幅による比較を行った。その結果、263K 株と Chandler 株は脳ホモジネートを PrP<sup>C</sup> 供給源とした場合、既存の条件 (1% TritonX-100, 4mM EDTA 含 PBS, 40 cycle) で PrP<sup>res</sup> (蛋白質分解酵素抵抗性 PrP) の増幅が可能であったが、Obihiro 株では同条件では増幅がされなかった。さらに、HpL にマウス PrP 遺伝子やハムスター PrP を導入した細胞の細胞ライゼートを PrP<sup>C</sup> 供給源として試験管内増幅を行ったところ、同条件では 263K 株と chandler 株のいずれも増幅がされなかった。これらのことから、プリオン株ごとに条件設定が必要であるとともに、細胞ライゼートを用いた場合、脳ホモジネートの条件とは異なる増幅条件が必要であることが明らかとなった。本研究の結果から、PMCA 法による PrP<sup>res</sup> の増幅条件はプリオン株や PrP<sup>C</sup> 供給源の性状ごとに最適化する必要があることが明らかになったとともに、動物を用いないプリオン検出系として、広範なプリオン株に適応可能な PMCA 条件の構築が必要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 21 件)

1. 作道章一, プリオン病とプリオン不活化

- 法の一般知識, 防菌防黴, 2010; 38:149-153.
2. 作道章一, ウイルス不活化の一般知識と滅菌・消毒技術, 防菌防黴, 2010; 38:81-88.
3. Sakudo A, Xue G, Kawashita N, Ano Y, Takagi T, Shintani H, Tanaka Y, Onodera T, Ikuta K, Structure of the prion protein and its gene: an analysis using bioinformatics and computer simulation, *Curr Protein Peptide Sci* 2010; 11:166-179.
4. Ano Y, Sakudo A, Kimata T, Uraki R, Sugiura K, Onodera T, Oxidative damage to neurons caused by the induction of microglial NADPH oxidase in encephalomyocarditis virus infection, *Neurosci Lett*, 2010; 469:39-43.
5. Hirata Y, Ito I, Furuta T, Ikuta K, Sakudo A, Degradation and destabilization of abnormal prion protein using alkaline detergents and proteases, *Int J Mol Med*, 2010; 25:267-270.
6. Kobayashi SI, Ano Y, Sakudo A, Yukawa M, Sugiura K, Manabe N, Nakayama H, Onodera T, Quantification of PrPC in bovine peripheral tissues: Analysis in wild-type and PrPC-deficient cattle, *Mol Med Report*, 2009; 2:561-567.
7. Sakudo A, Ikuta K. Prion protein functions and dysfunction in prion diseases. *Curr Med Chem*. 2009; 16:380-9.
8. Sakudo A, New and emerging approaches to prion diseases. *Protein Pept Lett*. 2009; 16:216.
9. Sakudo A, Ikuta K. Fundamentals of prion diseases and their involvement in the loss of function of cellular prion protein. *Protein Peptide Lett*. 2009; 16:217-29.
10. Nitta K, Sakudo A, Masuyama J, Xue G, Sugiura K, Onodera T. Role of cellular prion proteins in the function of macrophages and dendritic cells. *Protein Peptide Lett*. 2009; 16:239-46.
11. Ano Y, Sakudo A, Nakayama H, Onodera T. Uptake and dynamics of infectious prion protein in the intestine. *Protein Peptide Lett*. 2009; 16:247-55.
12. Nishimura T, Sakudo A, Xue G, Ikuta K, Yukawa M, Sugiura K, Onodera T. Establishment of a new glial cell line from hippocampus of prion protein gene-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 377:1047-50.
13. Wu G, Nakajima K, Takeyama N, Yukawa M, Taniuchi Y, Sakudo A, Onodera T. Species-specific anti-apoptotic activity of cellular prion protein in a mouse PrP-deficient neuronal cell line transfected with mouse, hamster, and bovine Prnp. *Neurosci Lett*. 2008; 446: 11-15.
14. Xue G, Sakudo A, Kim CK, Onodera T. Coordinate regulation of bovine prion protein gene promoter activity by two Spl binding site polymorphisms. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 372: 530-535.
15. Hosokawa T, Ono F, Tsuchiya K, Sato I, Takeyama N, Ueda S, Zanusso G, Takahashi H, Sata T, Sakudo A, Sugiura K, Baj A, Toniolo A, Yoshikawa Y, Onodera T. Distinct immunohistochemical localization in Kuru plaques using novel anti-prion protein antibodies. *Microbiol Immunol*. 2008; 52: 25-29.
16. Hosokawa T, Tsuchiya K, Sato I, Takeyama N, Ueda S, Tagawa Y, Kimura KM, Nakamura I, Wu G, Sakudo A, Casalone C, Mazza M, Caramelli M, Takahashi H, Sata T, Sugiura K, Baj A, Toniolo A, Onodera T. A monoclonal antibody (1D12) defines novel distribution patterns of prion protein (PrP) as granules in nucleus, *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366: 657-663.
17. Sakudo A, Wu G, Onodera T, Ikuta K, Octapeptide repeat region of prion protein (PrP) is required at an early stage for production of abnormal prion protein in PrP-deficient neuronal cell line, *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 365, 164-169.
18. Sakudo A, Taniuchi Y, Kobayashi T, Onodera T, Ikuta K, Normal cytochrome c oxidase activity in prion protein gene-deficient mice, *Protein Peptide Lett* 2008; 15: 250-254.
19. Nasu-Nishimura Y, Taniuchi Y, Nishimura T, Sakudo A, Nakajima K, Ano Y, Sugiura K, Sakaguchi S, Itohara S, Onodera

T, Cellular prion protein prevents brain damage after encephalomyocarditis virus infection in mice, Arch Virol 2008; 153: 1007-1012.

20. Sakudo A, Nakamura I, Tsuji S, Ikuta K. GPI-anchor-less human prion protein is secreted and glycosylated but lacks SOD activity, Int J Mol Med 2008; 21: 217-222.

21. Sakudo A, Onodera T, Ikuta K, PrPSc level and incubation time in a transgenic mouse model expressing Borna disease virus phosphoprotein after intracerebral prion infection, Neurosci Lett 2008; 431: 81-85.

〔学会発表〕（計 6 件）

1. 作道章一, 正常型プリオン蛋白質の機能解析（プレナリーセッション）, 第 149 回日本獣医学会学術集会, 東京, 平成 22 年 3 月 26 日

2. 作道章一, 可視・近赤外分光法のウイルス学領域への利用：インフルエンザ・プリオンを中心に, 第 30 回日本レーザー医学会総会, 東京, 平成 21 年 12 月 2 日

3. 阿野泰久, 作道章一, 梶村佳史, 生田和良, 小野寺節 スクレーパー感染マウス脳における酸化ストレス障害, 第 147 回日本獣医学会学術集会, 栃木, 平成 21 年 4 月 2 日～4 日

4. Ano Y, Nakayama H, Sato Y, Sakudo A, Manabe N, Yukawa M, Onodera T, Uptake of amyloid protein in the murine and bovine intestines before and after weaning: a model for the enteric invasion of infectious prion protein, Prion 2008, Madrid, Oct 8-10, 2008

5. 作道章一, 阿野泰久, 小林孝徳, 小野寺節, 生田和良, 可視・近赤外分光法によるマウススクレーパー感染病態解析, 第 146 回日本獣医学会学術集会, 宮崎, 平成 20 年 9 月 24 日～26 日

6. Ano Y, Sakudo A, He XJ, Sato Y, Yukawa M, Ikuta K, Yokoyama T, Nakayama H, Onodera T, DNA damage through oxidative stresses in the prion-infected mouse brain, The 14th International Congress of Virology, Istanbul, Aug 10-15, 2008

〔図書〕（計 1 件）

1. Onodera T, Xue G, Sakudo A, Zanusso G, Sugiura K, Chapter 9: Slow viral disease, in Molecular detection of Foodborne pathogens (Edited by Liu D), Taylor and Francis Group, 2009; 111-123.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

作道 章一 (Sakudo Akikazu)

琉球大学・医学部・准教授

研究者番号：10397672

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし