

# 抗 PrP モノクローナル抗体パネルの作製と ヒツジスクレイピーおよび BSE 病原体の性状解析

## 研究室

特定疾病研究分野

Emerging and Re-emerging Disease Research Unit

## 事業推進 担当者

堀内 基広 (Motohiro Horiuchi), 前田 秋彦 (Akihiko Maeda)

## 異動先 (異動先ポジション)

北海道大学大学院獣医学研究科プリオン病学講座  
(教授, 助教授)

## 研究要旨

プリオン病の病原体であるプリオンの主要構成要素は異常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) である。PrP 分子上の様々なエピトープを認識する抗体はプリオンの性状解析およびプリオン病の診断に有用である。そこで、まず、PrP 分子の様々なエピトープに対するモノクローナル抗体 (mAb) パネルの作製を行った。得られた mAb パネルは少なくとも10種の異なるエピトープを認識する mAb から構成されており、これまでに作製したポリクローナル抗体と合わせると、PrP 分子上の大部分をカバーできる抗体パネルが出来上がった。これらの mAb は PrP 分子の生化学性状の解析に威力を発揮するだけでなく、ヒツジスクレイピーや BSE の識別などにも応用可能であった。また、今回得られた mAb のうち BSE 由来 PrP<sup>Sc</sup> を高感度に検出可能な mAb は、BSE の確認検査等にも使用される等、我が国の BSE 対策にも貢献している。

## プリオン蛋白質に対する 抗体パネルの作製

プリオン蛋白質 (PrP) に対する抗体は、動物プリオン病の高精度・高感度診断法の開発、病原因子の解析、およびプリオン病の病態解析に不可欠な道具である。そこで、PrP の種々のエピトープを認識するモノクローナル抗体 (mAb) パネルの作製を行った。組換え PrP (rPrP) およびプリオン感染マウス脳から精製した異常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) およびを免疫原として mAb を作製した。rPrP 変異体および Pepspot 膜を用いた詳細なエピトープ解析から、作製した mAb は少なくとも10のグループに分類可能であった (表1)。これまでに作製してきたポリクローナル抗体をあわせると、PrP 分子のほぼ全域をカバーする抗体パネルが得られたことになる。これらの抗体は PrP の性状解析の有用なツールとなることが期待される。また、PrP これら mAb のうち、BSE 由来 PrP<sup>Sc</sup> と反応性が高い抗体は、我が国の BSE 確認検査および BSE 迅速検査用 ELISA にも使用されており、我が国の BSE 対策に貢献している。

## 抗 PrP 抗体パネルによるスクレイピー および BSE 由来 PrP<sup>Sc</sup> の性状比較

我が国では、1970年代にヒツジの輸入に伴いスクレイピーが侵入したと考えられている。しかし、侵入後25年程度の間、我が国では複数の野外スクレイピー株が存在することが明らかとなった。我が国でも BSE が発生したことから、我が国に存在する野外スクレイピー株の性状を知ることは、BSE との鑑別を含め、重要である。そこで、PrP<sup>Sc</sup> に対するパネル抗体の反応性を指標に、ヒツジスクレイピー野外株および BSE の識別を試みた。PrP の C 末端側を認識する抗体と、蛋白分解酵素で消化を受ける部位の近傍を認識する抗体を組み合わせることで、スクレイピー野外例と BSE を区別することが可能であった (図1)。この結果から、我が国で発生した BSE (7例目まで)、同一の病原体によるものと考えられた。一方、ヒツジスクレイピーには複数の株が存在し、抗体の反応性は BSE と同等のスクレイピーが一例存在した。しかしこのスクレイピー株は、PrP<sup>Sc</sup> の分子量などの生化学性状から、BSE と異なることも判明した。プリオン病では、病原体に対する免疫応答がないことから、血清学的な診断は応用できない。また、プリオンは診断等の標的となる病原体特異的な核酸を持たないことから PCR による病原体ゲノムの増幅による診断法が適用できない。今回作製したパネル抗体の反応性によるプリオン株の識別は、プリオン株の迅速な識別に有用と考えられる。

## 各種の新興・再興輸入ウイルス感染症に対する類症鑑別法の 開発 —Padlock-probe を用いた高感度 PCR 法の応用—

近年、流行した多くの感染症は人獣共通感染症 (動物由来感染症) であり、獣医学や医学においても各種感染症の診断体制を確立することが急務である。本研究では、我が国に存在しないが、将来的に輸入される危険性のある新興・再興の輸入ウイルス感染症について簡便で迅速な検査法を確立することを目指した。そこで、Padlock probe を用いた RT-PCR 法による、病原ウイルスの検出について検討した。Padlock probe は、その両末端に相補的な遺伝子配列を有するウイルス核酸が存在する場合、環状化する。次に、環状化された部位をはさむ様に設計したプライマーを用いて PCR を行うことで、当該遺伝子を増幅し、高感度に検出することが出来るものと

考えられた。実際に、野生げっ歯類からヒトに感染し腎症候性出血熱を引き起こすハンタウイルスや、蚊媒介性に脳炎を引き起こすウエストナイルウイルスの遺伝子RNAを、それぞれのウイルスに対する Padlock probe を用いて検出したところ、塩基配列特異的にウイルス核酸を増幅することが出来た。この結果は、Padlock probe

を用いる RT-PCR 法は、各種ウイルス感染症の臨床診断に応用できることを示している。また、各種のウイルス核酸に対する Padlock probe のカクテルを用いることにより、一度の反応で、多くのウイルスを multiplex に検査することが期待できる。

## 発表論文

著者名	論文タイトル	掲載雑誌	巻	ページ	発行年
Horiuchi, M., Nemoto, T., Ishiguro, N., Furuoka, H., Mohri, S. and Shinagawa, M.	Biological and biochemical characterization of sheep scrapie in Japan.	J. Clin. Microbiol.	40	3421-3426	2002
Gombojav, A., Ishiguro, N., Horiuchi, M., Serjmayadag, D., Byambaa, B., and Shinagawa, M.	Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep.	J. Vet. Med. Sci.	65	75-81	2003
Kim, C-L., Umetani, A., Matsui, T., Ishiguro, N., Shinagawa, M., and Horiuchi, M.	Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies.	Virology	320	41-52	2004

## 認識するエピトープによる抗 PrP モノクローナルの分類

MAb group	Epitope (aa in MoPrP)	Linear or discontinuous
I	56-90	L, WGQPHG, PHGGGWGQ, WGQ
II	119-127	L, AVVGGGLGGY
III	137-143	L, MIHFGND
IV	143-149	L, DWEDRY
V	147-151	L, RYYRE
VI	163-169	L, RPVDQYS
VII	219-229	L, KESQAYYDGRR
VIII	155-231	DC
IX	89-231	DC
X	89-231 (incl. 143-153)	DC

図1：作製した抗体が認識するエピトープを詳細に解析した結果、今回作製した抗体パネルは、少なくとも10異なるエピトープを認識する抗体から成ることが判明した。

## ヒツジスクレイピーと BSE 由来 PrPSc の性状解析

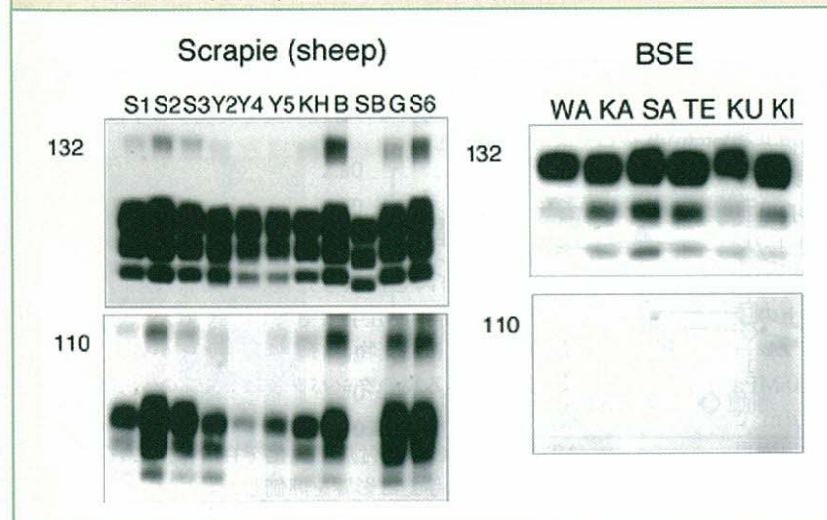


図2：mAbによるヒツジスクレイピーとBSE由来PrPScの検出。アミノ酸119-127を認識するmAb132は全てのスクレイピーおよびBSE由来PrPScと反応するが、アミノ酸56-90に存在する繰り返し配列を認識するmAb110はBSE由来PrPScとは反応しない。また、ヒツジスクレイピーSBもmAb110とは反応しない。このように、抗PrP抗体パネルを用いることで、野外に存在するスクレイピーやBSEの性状解析が可能になる。