



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on methods for specific detection of abnormal isoform of prion protein and its application [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	鈴木, 章夫
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(感染症学)
Dissertation Number	乙第7149号
Issue Date	2021-12-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83873
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Akio_Suzuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（感染症学）

氏名：鈴木 章夫

学位論文題名

Studies on methods for specific detection of abnormal isoform of prion protein and its application

(異常型プリオンタンパク質の特異的検出法とその応用に関する研究)

プリオン病の病原体であるプリオンは、異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) から構成される。 PrP^{Sc} は、宿主由来正常型プリオンタンパク質 (PrP^{C}) から構造転換を含む翻訳後修飾により産生される。 PrP^{C} と PrP^{Sc} の結合、および、その後の α -ヘリックスに富む PrP^{C} から β 構造に富む PrP^{Sc} への構造転換は、プリオン増殖において鍵となる事象であると考えられている。プリオン感染後、 PrP^{Sc} の産生が始まり、長い潜伏期間の間に中枢神経系に徐々に蓄積する。最終的に、 PrP^{Sc} の産生自体、または PrP^{Sc} の形成や蓄積に対する応答による神経組織環境の変化により神経細胞死が引き起こされる。 PrP^{Sc} はプリオンの主要構成要素であり、 PrP^{Sc} の産生過程はプリオンの増殖とみなされているため、 PrP^{Sc} の特異的な検出は、プリオン増殖やプリオン病の神経病態機序の解析に重要である。さらに、 PrP^{Sc} 特異的検出は、プリオン病の診断やサーベイランスにも重要である。そこで本学位論文では、 PrP^{Sc} 特異的染色に非常に有用であるモノクローナル抗体 (mAb) 132 による PrP^{Sc} 特異的検出のメカニズムと、組換えシカ PrP (rCerPrP) を基質として用いた Real-Time Quaking-Induced Conversion (RT-QuIC) による PrP^{Sc} 検出の有用性について研究した。

第一章では、mAb 132 による PrP^{Sc} 特異的検出のメカニズムを解明するため、一価および二価の mAb 132 の組換えマウス PrP (rMoPrP) に対する反応性を ELISA, 表面

プラズモン共鳴法 (SPR) により解析した。ELISA 法では, mAb 132 の一価での結合は二価型での結合に比べ有意に弱いことから, 二価での結合が mAb 132 に高い結合安定性を与えていることが示唆された。また, 他の抗 PrP 抗体に比べ mAb 132 の二価結合は, 抗原濃度の減少により容易に影響を受けることが明らかとなった。SPR 法では, mAb 132 の反応速度論は ELISA による結果と一致しており, 一価結合の解離速度定数は二価結合より 260 倍大きかった。これは一価結合は二価結合より安定性が低い事を示唆している。さらに, 抗原密度が低く抗体が二価結合できない場合, rMoPrP に結合した mAb 132 の量は減少した。一方, 2 つの PrP^C が二価結合が可能な距離内に存在する場合, mAb 132 は PrP^C に結合した。これらの結果は, 単量体 PrP^C への弱い一価結合が PrP^C のシグナルをバックグラウンドレベルに減少させるのに対し, mAb 132 は PrP^{Sc} のエピトープ露出後に二価結合により PrP^{Sc} に安定して結合する事を示している。

第二章では, rCerPrP を含む様々な組換え PrP (rPrP) を用いて, 脳乳剤濃度が高い場合でも低レベルの慢性消耗病 (CWD), 牛海綿状脳症 (BSE) プリオンを検出可能な RT-QuIC の反応条件について検討した。試した rPrP のうち, rCerPrP のみが, CWD, 非定型 BSE プリオンに対する反応性が高濃度の非感染脳乳剤による影響を受けにくいという特徴的な反応性を示した。この rCerPrP 特有の反応性は, N 末端領域アミノ酸 25-93 を除去することにより消失した。また, MoPrP のアミノ酸 23-149 を CerPrP の対応する領域と置換することで, RT-QuIC 反応での CerPrP 特有の反応性が部分的に回復した。さらに, MoPrP の C 末端領域アミノ酸 219-231 を CerPrP の対応する領域と置換すると rCerPrP 特有の反応性が rMoPrP に付与されたことから, N 末端, C 末端領域の両方が rCerPrP 特有の反応性に関与することが示唆された。加えて, CerPrP のアミノ酸 25-153, MoPrP のアミノ酸 150-218, および CerPrP のアミノ酸 223-233 から構成される rCer^N-Mo-Cer^CPrP は, この N 末端, C 末端領域の相加効果を示した。これらの結果は, CWD および非定型 BSE

を検出する際の rCerPrP の作用機序を示すとともに、RT-QuIC の更なる改善に役立つと思われる。

第三章では、日本における CWD の状態を明らかにするために、全長 rCerPrP を使用した RT-QuIC による CWD モニタリングを行った。北海道、本州で捕獲または狩猟された合計 690 個のニホンシカ、ジャワマメジカの延髄門部サンプルを RT-QuIC により検査した。CWD 陽性例は認められなかったことから、CWD は日本で発生していない可能性が高いと考えられる。さらに、ニホンシカの PrP 遺伝子の塩基配列の解析により、日本の広い地域に生息するニホンシカが CWD 感受性の個体群により構成されていることが示唆された。従って、より広い地域のシカについての継続的なモニタリングは、CWD の発生時における早期の検出及び対応やシカ由来製品の安全性を確保するために必要と思われる。

本学位論文では、抗 PrP 抗体 mAb 132 による PrP^{Sc} 特異的染色のメカニズムを解明した。これらの知見は、プリオンの増殖およびプリオン病の神経病態機序を明らかにするための mAb 132 の使用に対する論理的根拠を提供しうる。また、RT-QuIC 反応において CWD と BSE を検出する際の rCerPrP の有用性について示した。これらの結果は、RT-QuIC の実用性を示すとともに、RT-QuIC の更なる改善にも役立つと思われる。PrP^{Sc} 特異的検出及びその応用についての知見は、プリオン病の神経病態学の解明や、プリオン病の診断、サーベイランスの更なる改善に貢献するものである。