

マウス神経芽細胞腫細胞由来の Proteinase K 耐性プリオン蛋白質 (PrPres) の検出

東北大学大学院・医学系研究科・神経化学分野

倉橋 洋史、逆瀬川 裕二、堂浦 克美

Detection of Proteinase K-resistant prion protein (PrPres) in mouse neuroblastoma cells

Department of Neurochemistry, Tohoku University Graduate School of Medicine
Hiroshi Kurahashi, Yuji Sakasegawa, Katsumi Doh-ura

(投稿日 2014/2/4、再投稿日 2014/4/4、受理日 2014/4/11)

キーワード : prion、PrPres、Proteinase K、neuroblastoma cell

概要

狂牛病の原因として知られているプリオンは、核酸を必要としない特異な感染体である。プリオンの感染性はプリオン蛋白質の立体構造が変化（異常化）することが原因と考えられている。正常型のプリオン蛋白質も異常型のプリオン蛋白質も一次構造が同じために SDS-PAGE とウエスタンブロット法を用いた通常の蛋白質の検出では、両者を区別することはできない。そこで、異常型プリオン蛋白質のみを検出するために、異常型プリオン蛋白質が Proteinase K の分解に対して部分的に抵抗性を持つことと、その抵抗性蛋白質が易沈殿性であることを利用する。本稿では、プリオンが持続的に感染している神経芽細胞腫細胞由来の Proteinase K 耐性プリオン蛋白質(PrPres)を検出する一連の手法を紹介する。この手法では培養細胞から蛋白質の抽出後、1 日で PrPres を検出することができる。

イントロダクション

プリオンは牛海綿状脳症 (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE) に代表されるプリオン病、伝達性 (伝染性) 海綿状脳症 (Transmissible Spongiform Encephalopathy, TSE) を引き起こす(1)。プリオン病はウシの他、ヒト、ヒツジ、マウス、ハムスター、ネコ、シカ、ミンクなどの哺乳類で発症することが知られており、致死性の脳神経疾患である。(1)。代表的なヒトプリオン病のクロイツフェルト・ヤコブ病(Creutzfeldt-Jakob disease: CJD)には3つの病因があり、原因不明の孤発性 CJD、プリオン蛋白質をコードする遺伝子に変異があることで発症しやすくなる家族性 CJD、プリオンの感染により発症する獲得性 CJD に分類される(1)。動物種や病因のタイプに限らず、いずれのプリオン病も原因はプリオン蛋白質のコンフォメーションの変化によるものと考えられている。プリオン蛋白質は神経細胞で常に産生されているが、正常型ではプリオン病を引き起こさず、異常型になることでプリオン病を引き起こす。一次構造が同じプリオン蛋白質の正常型と異常型を見分ける方法として、Proteinase K の分解に対する抵抗性の違いを利用する方法がある(1)。異常型プリオン蛋白質 (つまり、プリオン) は Proteinase K に対して部分

的に抵抗性を持つ。そして脳組織から Proteinase K 耐性の PrP を検出することが、プリオン病の診断基準の1つになっている。一方、マウス神経芽細胞腫 Neuro2A (N2a)細胞にプリオンを感染させ、細胞を継代しても持続的にプリオンを維持しているプリオン持続感染細胞が細胞研究で広く使われている(2,3)。例えば、プリオンに対する薬剤のスクリーニングや、プリオン増幅に関与する内在性因子の解析で利用されている(4-8)。動物実験を行うよりも安価で短時間で解析できる点、そして動物愛護の観点において、使用する実験動物数の数を減らせる点で、プリオン持続感染細胞を使用するメリットは大きい。本稿では、このプリオン持続感染細胞の PrPres を検出する一連の手法を紹介する(7,8)。

用語の説明

プリオンがつく単語には「プリオン」、「プリオン蛋白質」、「正常型プリオン蛋白質」、「異常型プリオン蛋白質」、「Proteinase K 耐性プリオン蛋白質」と様々あり、混乱を生じやすいので、この欄で紹介する。「プリオン蛋白質」は遺伝子 *PRNP* がコードする蛋白質の名前であり、一般的に PrP と表記される。プリオン蛋白質は、特に脳で強く発現しているが様々な組織の細胞でも発現している。名前にプリオンがつくために誤解されやすいのだが、「プリオン蛋白質」自身は、病原性や感染性を意味するものではない。病原性や感染性をもつ意味で使用される「プリオン」はプリオン蛋白質の立体構造が異常型になって、正常型のプリオン蛋白質を異常型に変換する能力を持つ。ヒツジのプリオン病名、スクレイピー(scrapie) から、動物種に関係なく、プリオンは PrPsc と表記され、正常型プリオン蛋白質は PrPc (cellular prion protein)と表記される。一方、プリオン持続感染細胞の異常型プリオン蛋白質は Proteinase K に対して抵抗性を持つことから PrPres (protease-resistant prion protein)と表記される。PrPsc も PrPres も「異常型プリオン蛋白質」ではあるが、PrPsc は感染性を持つ意味で使われ、PrPres は Proteinase K 耐性を持つ意味で使われており、PrPres は必ずしも感染性を意味するわけではない。Proteinase K に感受性がありながら感染性を示すプリオンが存在するという報告や、in vitro で増幅した異常型蛋白質は Proteinase K 耐性だが、必ずしも感染性を持たないという報告がある(9,10)。

実験の原理

プリオン持続感染細胞の細胞内にある PrP は全てが PrPres というのではなく、PrPc も含まれる。この両者は一次構造が同じために、SDS-PAGE で区別することはできない。そこで、PrPres のみを検出するためには、SDS-PAGE を行う前に全 PrP に含まれる PrPc を取り除かなければならない。そのために、本実験では検体の Proteinase K (PK) 処理と遠心分離を行う。PrPres は PK 処理によって N 末端が切断されるが、おおよそ 90 アミノ酸残基以降の C 末端は部分的に PK 抵抗性を持つために、N 末端を欠いた PrP が残る。この N 末端欠損型 PrP は特定の界面活性剤存在中の試験管内で（アミロイドを形成しているかは不明であるが、）容易に沈殿する性質を持つようになる。従って、超遠心機を用いなくても N 末端欠損型 PrP は遠心分離で沈殿し、(PK 処理は PrPc が完全に消化される条件ではあるが、)PrPc が PK 処理で完全に切断しきれなかったとしても PrPc は上清画分に分離されて取り除かれる。そして、沈殿画分を SDS-PAGE とウエスタンブロットを行うことで、PrPres を検出することができる。以上のことから、本実験の PK 処理はアミロイドにみられる PK 耐性の蛋白質を検出するという単純なものではない。本実験の PK

処理は PrPc を分解させるだけではなく、PrPres の沈殿性を高めるための処理でもあるという点で、他のアミロイド蛋白質の検出とは異なる。

装置・器具・試薬

CO₂インキュベーター

安全キャビネット

アスピレーター

細胞培養用(6 well) plate

冷却遠心機 (最大遠心力 20,000 x g)

SDS-PAGE を行うにあたり必要な機器 (電気泳動槽、泳動プレート、パワーサプライ)

セミドライトランスファー装置

イメージング装置、あるいは X 線フィルムと現像機

PVDF 膜

3MM 紙

セーフロックチューブ

PBS(-)

細胞溶解液(PBS(-), 0.5% NP40, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム)

1 mg/mL Proteinase K

0.1 M フッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)

SDS-PAGE 用サンプルバッファー (25 mM Tris-HCl pH6.8, 1% SDS, 0.05% ブロモフェノールブルー, 4% グリセロール, 140 mM 2-メルカプトエタノール)

SDS-PAGE 用泳動バッファー (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS)

トランスファーバッファー (陽極液 1 300 mM Tris, 20% メタノール; 陽極液 2 25 mM Tris, 20% メタノール; 陰極液 25 mM Tris, 40 mM 6-アミノカプロン酸, 20% メタノール)

TTBS (25 mM Tris-HCl pH7.6, 0.5 M NaCl, 0.05% Tween-20)

ブロッキングバッファー (5% スkimミルク in TTBS)

抗体(一次抗体 anti-PrP antibody、二次抗体)

ウエスタンブロット用検出試薬

実験の手順

1. 細胞から細胞溶解液作製
2. Proteinase K 処理と遠心分離
3. SDS-PAGE とウエスタンブロット

実験の詳細

1. 細胞から細胞溶解液作製

6 well プレートでプリオン持続感染細胞をコンフルエントの状態まで培養する。安全キャビネット内で培養液をアスピレーターで取り除く。冷 PBS をプレートの縁から 1 mL 加え、軽く攪拌、アスピレーターで PBS を取り除く。冷抽出バッファーを 500 μ L 加え、細胞全体に行き渡るように軽く攪拌して細胞を溶解させる。1 分後、1.5 mL チューブに細胞溶解液を回収する。3,000 x g、10 分、4°C で遠心する。沈渣を取らないように上清を 1.5 mL チューブに回収する。

2. Proteinase K (PK) 処理

回収した細胞溶解液 200 μ L をセーフロックチューブに用意して 1 mg/mL の Proteinase K を 100 倍希釈して終濃度 10 μ g/mL になるように加え、37°C、30 分で蛋白質分解反応を行う。チューブを氷上で冷却し、その後 0.1 M PMSF を 2 μ L 加えて蛋白質分解反応を止める。その後、チューブを混和装置にセットして室温で 5 分間、溶液を混和する。そして 20,000 x g、20 分、4°C で遠心後、上清を取り除く。SDS-PAGE 用サンプルバッファーを 20 μ L 添加して激しく攪拌する。5 分間煮沸して蛋白質を変性させる。

3. SDS-PAGE とウエスタンブロット

15% ポリアクリルアミドゲルを作製（または、プレキャストゲルを使用）し、10 μ L のサンプルを注入して通常の SDS-PAGE を行う。

電気泳動後、セミドライトランスファー装置を用いて PVDF 膜に転写する。予め、PVDF 膜をメタノールに染み込ませ、その後、10 分以上精製水で浸透して、水に馴染ませる。また、3MM

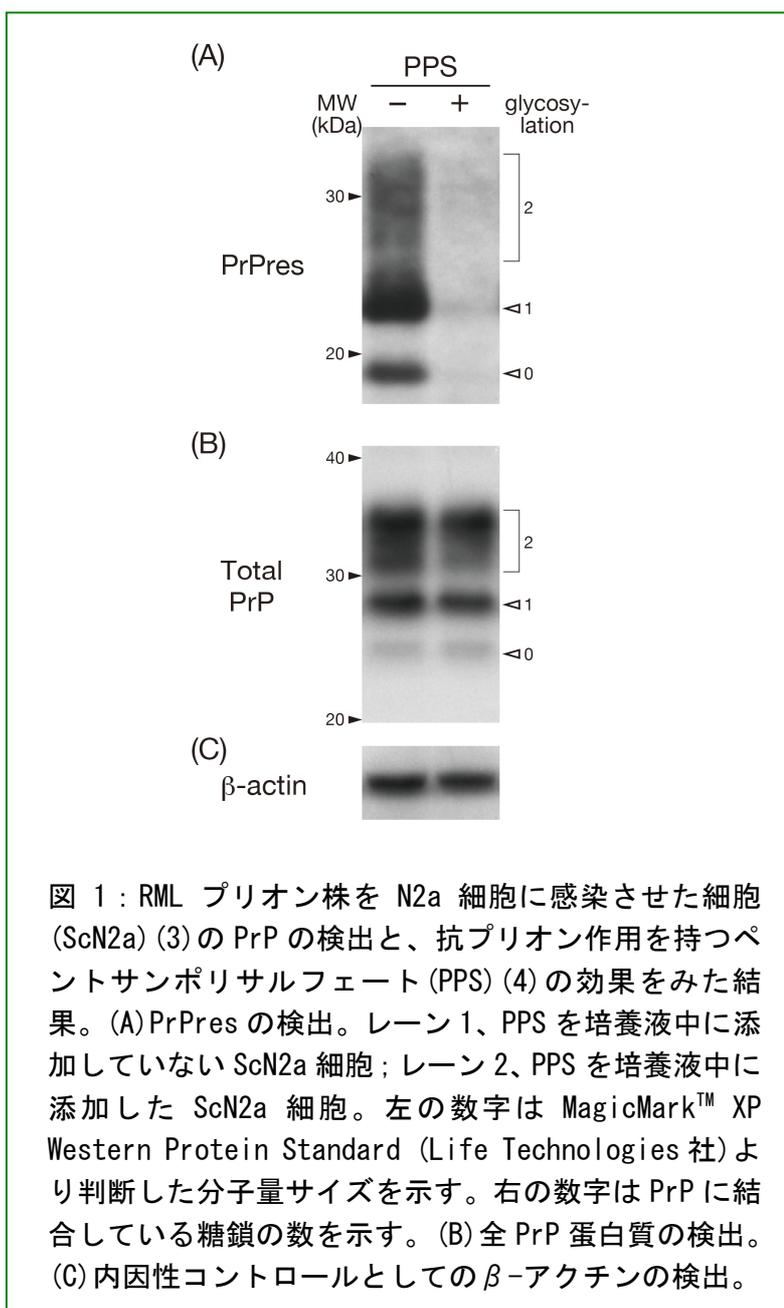


図 1 : RML プリオン株を N2a 細胞に感染させた細胞 (ScN2a) (3) の PrP の検出と、抗プリオン作用を持つペントサンポリサルフェート (PPS) (4) の効果をみた結果。(A) PrPres の検出。レーン 1、PPS を培養液中に添加していない ScN2a 細胞；レーン 2、PPS を培養液中に添加した ScN2a 細胞。左の数字は MagicMark™ XP Western Protein Standard (Life Technologies 社) より判断した分子量サイズを示す。右の数字は PrP に結合している糖鎖の数を示す。(B) 全 PrP 蛋白質の検出。(C) 内因性コントロールとしての β -アクトチンの検出。

紙 2 枚を陽極液 1 に、1 枚を陽極液 2 に、3 枚を陰極液に浸す。(下面が陽極のセミドライトランスファー装置では) 陽極液 1 を浸した 3MM 紙 2 枚をトランスファー装置の上に置く。その上に陽極液 2 を浸した 3MM 紙 1 枚を置く。さらに、精製水で平衡状態にさせた PVDF 膜を置く。そして、SDS-PAGE を行ったゲルを置く。最後に、陰極液を浸した 3MM 紙 3 枚を重ねる。3MM 紙や PVDF 膜、ゲルを重ねる際には、気泡が入らないように注意する。装置の準備が完了後、 $2\text{mA}/\text{cm}^2$ の定電流で 40 分から 60 分、転写を行う。

蛋白質を転写した PVDF 膜は、ブロッキングバッファー中で 1 時間のブロッキングを行う。TTBS で 3 回洗浄したあと、1 次抗体 anti-PrP antibody を 1 時間反応させる。そして、TTBS で 3 回洗浄し、2 次抗体を 1 時間反応させる。その後、TTBS で 3 回洗浄し、検出試薬を用いて PrPres のシグナルを検出する (図 1A)。PrP は糖鎖結合部位が 2 箇所あるため、無糖鎖型 PrP、一糖鎖型 PrP、ブロードな二糖鎖型 PrP の 3 本のバンドが検出される。無糖鎖型 PrP は 20 kDa より少し小さく、一糖鎖型は 22 kDa、二糖鎖型は 28 kDa 付近にバンドが検出される。PK 処理をすると PrP の N 末端側は分解を受けて PK 耐性の C 末端が残るために、PK 未処理の PrP 全長に比べ小さい分子量になる (図 1A,B)。

工夫とコツ

細胞培養

当研究室では OPTI-MEM に 10% FBS を加えた溶液 (6 well plate の場合 3mL) を培養液として使用している。プリオン持続感染細胞の倍加時間は、細胞株の種類によって異なるが、おおよそ 24 時間である。細胞を 3 日間培養して蛋白質を回収する場合は、コンフルエントの細胞を 8-10 倍に希釈して約 2×10^5 cells/well を播いて培養する。3 日後にはコンフルエントの状態に達し、約 2×10^6 個の細胞が得られる。

細胞溶解液

PK 処理を行うため、PK を阻害するようなセリンプロテアーゼインヒビターを加えてはならない。

蛋白質の定量

蛋白質の定量を行う場合は、細胞溶解液に界面活性剤が入っているために Bradford 法は使用できない。当研究室では Lowry 法を採用している。本条件では、1 ウェル当たりコンフルエント状態の細胞からおおよそ 1 mg の総蛋白質量が得られる。後の SDS-PAGE では、1 レーンあたり 200 μ g の総蛋白質を使用して PK 処理した量相当を添加すれば、PrPres の検出が可能である。

PrPres の遠心分離

組織から PrPres を検出する目的で組織溶解液に陰イオン性界面活性剤のサルコシルを使用するプロトコールがあるが、細胞溶解液にサルコシルを使用すると高分子の核酸がゲル状となり、PK 処理を行った後の PrPres の分離が困難となる。本実験では、陰イオン性界面活性剤にデオキシコール酸ナトリウムを使用している。この界面活性剤を使用することで、高分子の核酸は糸くず状のまま除くことができる。また、PK 処理後の PrP が容易に沈殿しやすくなり、一般的な遠心機で可能な 20,000 x g の遠心力で PrPres を沈殿させることができる。

実験の詳細 2 では、遠心後の沈殿物が見えないので、上清を取り除く際に誤って沈殿物も取り除いてしまう可能性がある。そこで、遠心前の溶液に 100 倍希釈した glass milk を 5 μ L 加えてから遠心することで、沈殿物を見やすくすることができる。

SDS-PAGE 用サンプルバッファー

プリオン株によっては還元剤の 2-メルカプトエタノールを加えないほうが検出しやすいことがあるので、PrPres の検出が弱い場合には、2-メルカプトエタノールのないサンプルバッファーを試してみるのも良い。

PVDF 膜への転写

ポリアクリルアミドゲルの厚さによって転写時間を調節する。当研究室では、厚さが 1.0 mm の場合は 40 分、1.5 mm の場合は 60 分で行っている。

ウェスタンブロット

当研究室では一次抗体に anti-PrP monoclonal antibody SAF83 (SPI-Bio 社) を 5,000 倍希釈で使用している。また、二次抗体は Anti-Mouse IgG (H+L), AP Conjugate (Promega 社) を 20,000 倍希釈で使用している。検出は CDP-Star detection reagent (GE Healthcare 社) を使用し、イメージアナライザー又は X 線フィルムで検出を行っている。

全 PrP と内因性コントロールの定量

PrPres の定量を行う際には全 PrP とインターナルコントロールを検出して、全 PrP の増減変化の確認とサンプル間の標準化を行うと良い。プリオン持続感染細胞の全 PrP に含まれる PrPres の割合は 100%ではなく、感染細胞の種類によるが、5-50%程度であるので、全 PrP を検出するためには、PrPres の検出で使用した細胞溶解液より少なくても良い。実験の詳細 1 で得られた細胞抽出液 40 μ L に、5x サンプルバッファーを 10 μ L 加え、5 分間煮沸して蛋白質を変性させる。その後は、実験の詳細 3 と同様に全 PrP を検出する(図 1B)。検出したメンブレンをストリッピングバッファー (2 M glycine, pH2.8[HCl で調整]) に浸して、室温、30 分の処理で抗体をはがす。新たにインターナルコントロール用の抗体を反応させて、検出を行う。当研究室では一次抗体に Anti- β -Actin monoclonal antibody (SIGMA 社) を 10,000 倍希釈で使用している。

PrP の糖鎖除去

プリオン蛋白質をアスパラギン型糖鎖を切断する酵素、ペプチド:N-グリカナーゼ (PNGase) で消化することがある。無糖鎖型、1 糖鎖型、2 糖鎖型のブロードな 3 本のプリオン蛋白質のバンドが、PNGase で糖鎖を切断することで無糖鎖型の 1 本のバンドになるため、より正確にプリオン蛋白質の量をサンプル間で比較検討できる。

プリオン持続感染細胞の入手と継代培養

日本や海外でプリオン持続感染細胞を使用している研究室から入手可能である。ただし、後述する安全対策を施す必要がある。また、入手直後に大量に細胞を増殖させて多数のチューブに細胞を凍結保存することを推奨する。プリオン持続感染細胞がプリオン (PrPres) を維持できる世代は無限ではなく、継代数が増えると細胞が PrPres を失う傾向にある。PrPres が何世代で消失するかは培養条件や細胞の種類によるが、細胞を解凍してから約 20 回以内の継代に留めるのが良い。プリオンが持続感染状態にあるかどうかは、本稿で紹介した方法で PrPres の存在を確認すると良い。また、細胞の形態を観察して異常が起きていないことを確認することも重要である。

脳組織の PrPres の検出

基本的には今回紹介した方法と同じような過程で脳内の PrPres を検出することができる。しかし、組織溶解液の組成は異なり、一般的に PK 濃度は高い。培養細胞に比べ、脳組織の PrPres の濃度は高いので、遠心して PrPres を濃縮しなくてもウェスタンブロットで検出が可能である。

実験の安全

動物に由来するプリオンの実験は、農林水産省公表の実験指針に従って、安全対策をとる。スクレイピープリオンはバイオセーフティレベル2に相当するので、本実験を行うには、そのレベルに対応できる実験室を使用し、安全キャビネットの中で実験を行う。プリオンに接触したチップ、チューブ等のプラスチック類は、135°C、30分のオートクレーブ処理を行う。廃液については、SDSの濃度が3%以上になるようにしてから、150°C、30分のオートクレーブ処理を行う。詳細は「動物の伝達性海綿状脳症の実験指針（改正後）」に記載されている。

また SDS-PAGE のためのサンプルの加熱中に、誤ってチューブが開くのを阻止するために、チューブはセーフロックチューブを使用するのが望ましい。

参考文献

- 1) Prusiner, S.B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 13363-83 (1998)
- 2) Butler, D.A. et al., *J. Virol.*, **62**, 1558-64 (1988)
- 3) Race, R.E. et al., *J. Virol.*, **62** 2845-9 (1988)
- 4) Caughey, B. & Raymond, G.J., *J. Virol.*, **67** 643-50 (1993)
- 5) Kawasaki, Y. et al., *J. Virol.*, **81** 12889-98 (2007)
- 6) Hamanaka, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **405**, 285-90 (2011)
- 7) Nishizawa, K. et al., *J. Virol.*, **88**, 4083-99 (2014)
- 8) Kimura, T. et al., *FEBS Lett.*, **584**, 1193-8 (2010)
- 9) Safar, J. et al., *Nat. Med.*, **4**, 1157-65 (1998)
- 10) Timmes, A.G. et al., *PLoS One*, **8**, e71081 (2013)