

新技術紹介

PMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification) 法

MURAYAMA Yuichi

プリオン病研究センター 上席研究員 村山 裕一

プリオン病の病原体の本体は異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) であると考えられています。PrP^{Sc} は、基本的に蛋白質だけで感染性と病原性を発現する点が、他の病原体と大きく異なっています。PrP^{Sc} に感染すると、正常プリオン蛋白質 (PrP^C) の高次構造が変化し、PrP^{Sc} へと変換されます。生体内では PrP^{Sc} の蓄積に時間を要するため、プリオン病では神経症状が現れるまで潜伏期が長いという特徴があります。PrP^C から PrP^{Sc} への変換機序については、PrP^{Sc} モノマーが鋳型となって PrP^C モノマーの構造変換をもたらすという考え方 (ヘテロダイマー説) があります。また PrP^{Sc} は整然とした立体構造をもつポリマーであり、これがシード (種) として働くことによって PrP^C モノマーを重合していき、より大きな PrP^{Sc} ポリマーを形成する、という考え方 (シード説) もあります。プリオン蛋白質の構造変換は、プリオンの感染・複製機構に関わる重要な問題ですが、その詳細は不明のままです。

プリオン病の解明には人工的に PrP^{Sc} を増幅させることがぜひとも必要です。現在では、超音波処理により PrP^{Sc} を増幅する PMCA 法が開発され、試験管内で PrP^{Sc} を短時間に増幅できるようになりました。PMCA 法では、健常動物の脳乳剤と極少量の感染動物由来の脳乳剤を混合し、培養します (図)。シード説によれば、PrP^{Sc} ポリマーが核になって PrP^C が異常型へと変換していきます。次に超音波処理によってこの核を物理的に細片に壊すと、次の培養時には、これら細片が新たな核となり異常型への変換効率が高まります。PMCA では通常、培養—超音波処理を数十回繰り返して PrP^{Sc} を増幅します。この方法が画期的なのは、増幅産物を希釈し、新たに増幅反応を繰り返すと、極微量の PrP^{Sc} でも検出できる点にあります。PMCA の検出感度は従来法に比べて 10 万倍から 1 億倍にもなります。また増幅された PrP^{Sc} に病原性があることが、実験動物を使って証明されています。

2001 年に PMCA 法が報告されて以来 10 年になります。この技術はハムスタースクレイパー株を用いて開発された方法ですが、

原理的に他の動物、あるいは他のプリオン株にも応用できると考えられ、当初はプリオン病の早期診断法として大いに注目を集めました。しかしながら、この方法の実用化は一筋縄ではいかないことがやがて判明します。他の動物由来の PrP^{Sc} はハムスターほど増えないのです。この事実は、試験管内増幅に必要な条件が動物により、あるいはプリオンの種類により異なっていることを示しています。超音波条件や、増幅用脳乳剤の選別、RNA や硫酸化多糖体の効果などが検討された結果、2007 年以降、ようやくマウス、ヒツジ、シカ、ウシ、ヒト由来の PrP^{Sc} の超高感度検出例が報告されるようになりました。

プリオン病研究センターでは、牛海綿状脳症 (BSE) に由来する PrP^{Sc} の PMCA 増幅法を開発し、実験感染牛の唾液から PrP^{Sc} が検出されたことを報告しました。現在、唾液を用いた生前診断の可能性を検討しています。また PMCA 法はバイオアッセイに比べてはるかに短時間に結果が得られるため、BSE プリオンの不活化評価法や安全性評価法としての応用も試みています。そのほか、感染時 (腸管) から発症 (中枢神経) に至るまでの PrP^{Sc} の体内感染経路の解明、人工的な PrP^{Sc} の生成や PrP^{Sc} の多様性の研究などに取り組んでいます。PMCA 法は実用的であるばかりでなく、プリオンの謎を明らかにするための有用なツールでもあるのです。

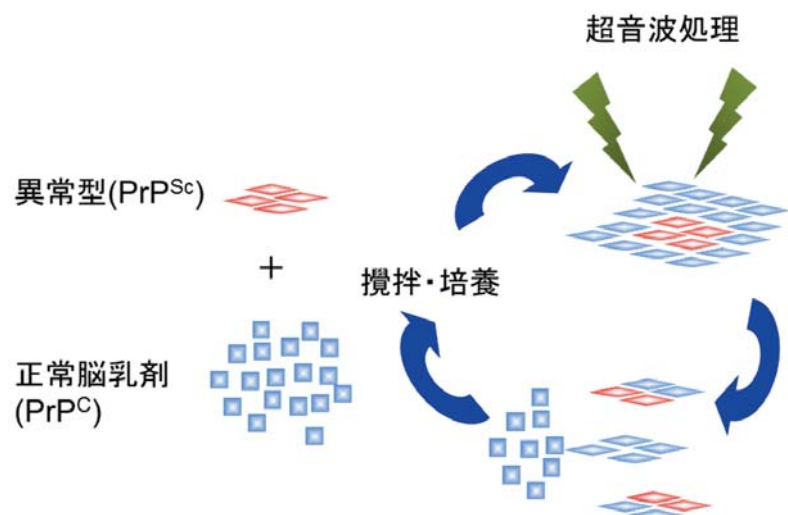


図. PMCA法の増幅原理