

國立臺灣大學生命科學院生化科學研究所
博士論文



Graduate Institute of Biochemical Sciences

College of Life Science

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

研究普立昂感染屏障與胺基酸序列的關係

Exploring the relationship of prion transmission barrier
and amino acid sequence

莊琦珍

Chi-Chen Chuang

指導教授：陳佩燁 博士

Advisor: Rita Pei-Yeh Chen, Ph.D.

中華民國102年7月

July, 2013

謝誌



譬如為山，未成一簣，止，吾止也；譬如平地，雖覆一簣，進，吾往也。

漫長又辛苦的博士班生涯終於告一段落，感謝美麗與智慧兼具的陳佩燁老師這些年來對我的耐心指導與不放棄，因為您的支持才有今天的成果，您對研究的熱誠、自信以及對學生的保護，讓我很慶幸能遇見這麼好的老師。還要感謝調查局國家安全維護處蕭蜀陽處長，自從進入調查局後您就對我照顧有加，謝謝您的鼓勵與疼愛，也謝謝您對我的信心，讓我有勇氣堅持下去，更感謝您在我公開演講與口試結束後第一時間關心我，讓我非常感動。另外感謝王勝仕老師、徐駿森老師、黃人則老師以及李政怡老師在百忙之中撥空前來參加我的博士論文口試，並對論文提出指正與建議，讓這篇論文更具完整性。也感謝調查局鑑識科學處的所有長官，感謝您們的支持讓我順利完成博士學位。

這些年來，如飲冷水冷暖自知，感謝實驗室的成員對我的包容，謝謝苔言學妹，耐心的教會我實驗室儀器的操作技巧、實驗小撇步更擔任我的心靈導師，開導我許多生活上想不透的人事物，由衷的謝謝妳。還要謝謝信良學長，謝謝您教會我有關分析數據的軟體應用，讓我數據整理起來備感輕鬆。謝謝遠在美國的Lily學妹，感謝妳百忙之中還要回答我的問題。感謝忠諭學弟，除了協助我實驗能順利進行外還幫我打理瑣事。感謝桑傑學弟，假日跟我一起去搬氮氣(想起那段日子真想落淚)，口試那天也很早就到實驗室幫我準備一切，你真是個好孩子。感謝楊哲學弟，辛苦你了，跟我同一天口試所以很多事情也得麻煩你幫忙。謝謝惠玲學妹總是很有耐心的跟我聊天。謝謝柏廷學弟教我許多寫論文的小技巧。還有，感謝我在調查局的學長們，懷瑞學長，您真是大好人，好心的載我下班、聽我說些工作上或生活上的大小事，謝謝馬爺，謝謝您在我摔車住院時第一時間趕到醫院照顧我還買食物給我和妹妹吃，周老師，一起跑步的風趣學長，跟您跑步的時間總是短暫、紀清、進議、文昇、億隆等學長，謝謝您們照顧我，把我當

小兄弟一樣，好吃好玩的事總會約我一起參與(我摔車的時候你們一定很驚嚇吧!!)，讓我的假日生活多采多姿，謝謝正彬學長，謝謝您對我的照顧，讓我在異鄉仍能感受到溫暖。謝謝同期同學玉堂，忍耐我的壞脾氣(雖然你很愛碎念)，並且在我最無助的時候陪在我身邊伴我度過難關。還要感謝鑑識科學處的學長姊們，謝謝您們這段時間的包容。

最後我要感謝我最親愛的家人:爸爸、媽媽、哥哥與妹妹，因為爸爸的鼓勵我才報考調查局，也因此遇到這麼好的長官與學長們，謝謝媽媽當初強迫我念臺大，我才能遇到這麼好的老師，格，你一直是我的榜樣，我一直看著你的背影往前進(但是你可不可以不要每次騙我後，還跟麻說我很笨居然相信你的話)，我親愛的咩咩，雖然我們常吵架，但我知道妳是為我好(姊妹是吵不散滴)。從大學起我就一直在臺北求學與工作，回家的時候總是來去匆匆，錯過家裡許多大小事(kulo 姐姐對不起你)，而且我也常常暴走，但你們永遠支持我、鼓勵我、陪伴我，對我無限的包容與體諒，謝謝。也謝謝所有關心、支持我的朋友們。最最後我要感謝老天爺保佑，讓我在臺北無論是學業或工作都一切順利，謝謝。

莊琦珍 2013.07.25



摘要

傳播性海綿樣腦病是一種致死性的神經退化疾病會影響許多哺乳類動物，造成此病的原因是由非傳統性的感染病原普立昂（prion）所引起。Prion 的傳播在同物種間比較容易發生，然而在不同物種之間則受限於「種族屏障」，也就是當外來的普立昂胺基酸序列若是與宿主的胺基酸序列相似度差異大的話就會影響對 prion 的形成並且不容易跨種傳染。為研究普立昂感染屏障與胺基酸序列的關係，我們截取普遍認為普立昂蛋白最重要的一段胺基酸序列 108-144 為模型，合成數條普立昂胜肽比較其類澱粉形成的特性，此外更利用晶種滴定方法量化出不同物種間普立昂疾病的感染屏障並檢測不同之胺基酸序列如何影響感染效率。

實驗結果顯示，PrP 第 112 號殘基若為甲硫胺酸，會促進類澱粉纖維形成時的成核作用，若第 139 號殘基是甲硫胺酸、第 143 號殘基為絲胺酸則會延遲成核作用，但若同一條胜肽存在上述條件時，類澱粉纖維形成的效果會被中和。此外，若是以已經形成類澱粉纖維的牛（bPrP）為晶種進行引晶實驗會發現，第 129 號殘基若是白胺酸、第 135 號殘基為天門冬胺酸、第 139 號殘基是甲硫胺酸、第 143 號殘基為絲胺酸皆會使引晶屏障變高，但若 138 號殘基為甲硫胺酸則會降低引晶屏障，若是增加引晶屏障與降低引晶屏障兩者影響因子同時出現在一條普立昂胜肽上，則兩者的影響會相互抵銷。整體而言，bPrP 對於 catPrP、mPrP 與 bvPrP 屬於低度引晶屏障，對於 huPrP、haPrP 與 lionPrP 則屬於中度引晶屏障，而對於 mdPrP、dogPrP 與 pigPrP 屬於高度引晶屏障。

若是以已經形成類澱粉纖維的北美大角鹿（mdPrP）為晶種進行引晶實驗，對bvPrP來說屬於低度種族屏障，而對於catPrP、lionPrP與mPrP則屬於中度引晶屏障，而對於bPrP、pigPrP、dogPrP、haPrP以及huPrP則屬於高度引晶屏障。

關鍵詞：普立昂、類澱粉纖維、引晶、種族屏障、胺基酸序列

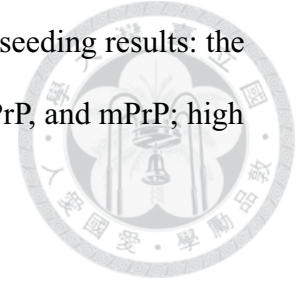
Abstract



Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are a group of fatal neurodegenerative diseases of mammals, caused by unconventional infectious agents known as “prion”. Transmission of prion between species is limited by a so called “species barrier”. Prion formation could be affected dramatically if the amino acid sequences between the host PrP^C (cellular prion protein) and the inoculated prion are different, which results in the resistance of cross-species TSE transmission. In order to explore the correlation between the prion transmission barrier and the amino acid sequence, several prion peptides (sequences 108-144) were synthesized (the sequence 108-144 based on the numbering of human prion protein sequence) and the amyloidogenic properties of these peptides were compared. We used seeding titration method to quantify the seeding barrier and to examine how sequence difference affected the seeding efficiency. Our results showed that while residue 112 with methionine accelerated nucleation, residues 139 with methionine or 143 with serine retarded the nucleation process. But these effects could be neutralized when the substitutions with opposite effects had shown on the same peptide. Moreover, using the amyloid fibrils prepared from bPrP as seed, residues 129 with leucine, 135 with asparagine, 139 with methionine or 143 with serine substitution could increase seeding barrier, but residue 138 with methionine decreased seeding barrier. When both decreased and increased factors were appeared in the same peptide, their effects tended to cancel each other out. Overall, the relative seeding barrier is low for catPrP, mPrP, and bvPrP; moderate for huPrP, haPrP, and lionPrP; high for mdPrP, dogPrP, and pigPrP.

When the amyloid fibrils prepared from mdPrP were used as seed, the relative

seeding barriers for all these peptides were different from the bPrP seeding results: the relative seeding barrier is low for bvPrP; moderate for catPrP, lionPrP, and mPrP; high for bPrP, pigPrP, dogPrP, haPrP, and huPrP.



Keyword

Prion, amyloid fiber, seeding, species barrier, amino acid sequence

目錄



摘要	I
Abstract.....	II
目錄	IV
圖目錄.....	VI
表目錄.....	VIII
縮寫表 Abbreviations.....	IX
1.1 蛋白質錯誤折疊與普立昂疾病.....	1
1.2 單一蛋白學說 (protein only hypothesis)	6
1.3 普立昂蛋白結構.....	7
1.4 類澱粉纖維的形成.....	11
1.5 普立昂蛋白之構形轉變.....	14
1.6 普立昂之跨物種傳染.....	15
1.6.1 小鼠與敘利亞倉鼠間的種族屏障.....	17
1.6.2 人類與牛之間的種族屏障.....	19
1.6.3 人類與鹿之間的種族屏障.....	20
1.7 其他物種之種族屏障的研究.....	22
1.8 其他普立昂種族屏障的相關研究.....	22
1.9 本論文動機.....	23
第二章 材料與方法.....	25
2.1 材料.....	25
2.1.1 水.....	25
2.1.2 化學藥品.....	25
2.2 儀器.....	27

2.2.1	純化、分析用管柱.....	27
2.2.2	大型儀器.....	27
2.3	方法.....	28
2.3.1	普立昂胜肽的合成、純化與鑑定.....	28
2.3.2	以圓二色光譜紀錄普立昂胜肽之類澱粉纖維形成.....	36
2.3.3	以高效液相層析儀進行熱力學溶解度的分析.....	42
2.3.4	以穿透式電子顯微鏡觀測普立昂蛋白類澱粉纖維纖維形態.....	42
2.3.5	細胞存活檢測 (MTT cell viability assay)	43
第三章	結果與討論.....	45
3.1	胺基酸殘基在類澱粉纖維形成中所扮演的重要角色.....	45
3.2	物種間種族屏障及普立昂疾病跨種傳染的評估.....	54
3.2.1	引晶對類澱粉纖維形成的影響.....	54
3.2.2	觀察牛 (bPrP) 與不同物種間之種族屏障.....	55
3.3	胺基酸的結構、化學特性與位置對普立昂胜肽的影響.....	59
3.3.1	將 Met 置換成 Val 或 Leu.....	59
3.3.2	將 Val、Leu 或 Ile 置換成 Met	60
3.3.3	Ser 與 Asn 互相置換.....	61
3.4	普立昂胜肽的熱力學溶解度 (thermodynamic solubility) 觀察	63
3.5	普立昂胜肽形成之類澱粉纖維型態.....	65
3.5.1	以穿透式電子顯微鏡觀測各物種普立昂胜肽片段序列 108-144. 類澱粉纖維之形態.....	66
3.6	觀察北美大角鹿 (mdPrP) 與不同物種間之種族屏障.....	72
3.7	類澱粉纖維的前驅物 (precursor) 對細胞毒性的影響	77
第四章	結果與討論.....	82
	參考文獻.....	86
	附錄	98

圖目錄



圖 1.1	修正後之蛋白質摺疊與堆疊之能量圖.....	2
圖 1.2	自 1988 年至 2005 年間發生於全球牛隻之 BSE 案例數目與人類罹患 vCJD 病例數目之比較圖.....	5
圖 1.3	普立昂蛋白之結構.....	9
圖 1.4	普立昂立昂疾病發生時所產生的 PrP 構形轉換.....	10
圖 1.5	普立昂蛋白之類澱粉纖維形成模型.....	12
圖 1.6	成核聚合模型之特徵.....	13
圖 1.7	普立昂跨種傳染.....	16
圖 2.1	本研究中所使用之合成普立昂胜肽片段序列 108-144.....	29
圖 2.2	以 MALDI-TOF MS 分析合成之各普立昂胜肽片段 108-144 之圖譜.....	35
圖 2.3	利用 CD 光譜觀測 bPrP 形成類澱粉纖維的過程.....	37
圖 2.4	利用 CD 觀測不同物種之普立昂胜肽類澱粉纖維形成之生長遲滯期....	39
圖 2.5	分別以 bPrP 與 mdPrP 為晶種進行引晶.....	41
圖 2.6	電子顯微鏡底下顯示化學合成之人類普立昂胜肽 (huPrP) 片段序列..	43
圖 2.7	MTT 作用機制.....	43
圖 3.1	普立昂胜肽在自然情況下形成類澱粉纖維的情形.....	46
圖 3.2	與 bPrP 相差一個胺基酸之物種,其普立昂胜肽形成類澱粉過程之圓二極光遠紫外光光譜.....	49
圖 3.3	與 bPrP 相差二個胺基酸之物種,其普立昂胜肽形成類澱粉過程之圓二極光遠紫外光光譜.....	50
圖 3.4	與 bPrP 相差三個胺基酸之物種,其普立昂胜肽形成類澱粉過程之圓二極光遠紫外光光譜.....	51
圖 3.5	利用 CD 光譜觀察 bPrP 之類澱粉纖維對各普立昂胜肽之引晶作用.....	57
圖 3.6	普立昂胜肽熱力學溶解度之觀察.....	64

圖 3.7	各物種普立昂胜肽片段 108-144 形成類澱粉纖維在 TEM 下之形態.....	70
圖 3.8	利用 CD 光譜觀察 mdPrP 之類澱粉纖維對各普立昂胜肽之引晶作用 ...	75
圖 3.9	綜觀新合成的多胜肽可能的路徑.....	78
圖 3.10	化學合成的普立昂胜肽對細胞毒性的影響.....	80
圖 4.1	以 bPrP 或 mdPrP 為晶種對各物種普立昂胜肽之引晶屏障.....	85

表目錄



表 1.1	目前為止已被報導之 16 種普立昂疾病.....	3
表 3.1	與牛普立昂胜肽片段相比較之其他物種胺基酸序列.....	45
表 3.2	比較 mPrP、haPrP、bvPrP、bPrPrM109V 與 bPrPI139M 之 108-144 胺基 酸序列與生長遲滯時間.....	52
表 3.3	比較 catPrP、lionPrP 與 mdPrP 之 108-144 胺基酸序列與生長遲滯時間	53
表 3.4	化學合成之普立昂胜肽之生長遲滯時間.....	54
表 3.5	比較 Met、Val、Leu、Ile、Asn 與 Ser 之結構與化學特性.....	62
表 3.6	比較各普立昂胜肽熱力學溶解度.....	65
表 3.7	普立昂胜肽形成類澱粉纖維後於 TEM 下觀察整理	71
表 3.8	比較 CWD 可感染之鹿群之普立昂胜肽 108-144 區間之序列.....	76
表 3.9	各個普立昂胜肽其生長遲滯期與對細胞毒性的影響.....	81
表 4.1	普立昂胜肽其自發性形成類澱粉動力學、熱力學溶解度以及引晶屏障	84

縮寫表 Abbreviations



bPrP	chemically synthesized bovine prion peptide ,sequence 108-144
BSE	bovine spongiform encephalopathy
bvPrP	chemically synthesized bank vole prion peptide,sequence108-144
CD	circular dichroism
CJD	Creutzfeldt-Jakob disease
CWD	Chronic wasting disease
DCM	dichloromethane
DMF	N,N-Dimethylformamide
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDT	1,2-ethanedithiol
FBS	fetal bovine serum
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GPI	glycosyl phosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Straussler-Scheinker
haPrP	chemically synthesized hamster prion peptide,sequence108-144
HPLC	high performance liquid chromatography
huPrP	chemically synthesized human prion peptide,sequence108-144
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization
mdPrP	chemically synthesized mule deer prion peptide,sequence108-144
mPrP	chemically synthesized mouse prion peptide,sequence108-144
MTBE	t-Butyl methyl ether
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

NaOAc	sodium acetate
NMM	N-methylmorpholine
NMR	nuclear magnetic resonance
PK	proteinase K
PrP	prion protein/peptide
PrP27-30	N-terminally truncated PrP ^{Sc}
PrP ^C	cellular prion protein
PrP-res	protease resistant form of prion protein
PrP ^{Sc}	disease-causing isoform of prion protein
PrP-sen	protease sensitive form of prion protein
PyBOP	benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosohonium hexafluorophosphate
rPrP	recombinant prion protein
sCJD	sporadic Creutzfeldt-Jakob disease
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEM	transmission electron microscope
TFA	trifluoroacetic acid
TFE	trifluoroethanol
TSE	transmissible spongiform encephalopathy
ThT	Thioflavin T
TIS	Triisopropylsilane
UV	ultraviolet
vCJD	variant Creutzfeldt-Jakob disease
A (Ala)	alanine
C (Cys)	cysteine
D (Asp)	aspartic acid
E (Glu)	glutamic acid
F (Phe)	phenylalanine



G (Gly)	glycine
H (His)	histidine
I (Ile)	isoleucine
K (Lys)	lysine
L (Leu)	leucine
M (Met)	methionine
N (Asn)	asparagine
P (Pro)	proline
R (Arg)	arginine
S (Ser)	serine
T (Thr)	threonine
V (Val)	valine
W (Trp)	tryptophan
Y (Tyr)	tyrosine



第一章 緒論



1.1 蛋白質錯誤折疊與普立昂疾病

根據分子生物學的核心教條，蛋白質的三級結構（tertiary structure）是由一級結構（primary structure，即胺基酸序列）所決定。蛋白質摺疊（folding）過程中有些本身具有可自行摺疊的能力，有些則需要伴隨蛋白（chaperone）的協助才能完成摺疊，這些伴隨蛋白可以幫助蛋白質有效率地摺疊但卻不決定蛋白質的自然結構（native structure），摺疊完成後具有功能的蛋白質其結構便為自然結構。「energy landscape」是用來描述蛋白質的自由能和其構形之間的關係，一般認為蛋白質的自然結構即是它們最低能量之穩定狀態，也就是在funnel shape最底部，然而蛋白質摺疊的過程必然產生許多錯誤摺疊（misfolding）及部分摺疊的中間物（intermediate），這些錯誤摺疊及部分摺疊中間物可能聚集而形成寡聚合物(oligomers)，如果這些寡聚合物沒有被分解它們將形成基原纖維（protofibrils）並持續堆疊聚集（aggregates），進而形成類澱粉蛋白纖維(amyloid fibrils)。以能量觀點來看，類澱粉纖維結構具有高度穩定性，一旦形成則不易被破壞或溶解，此現象與energy landscape理論相違，因此在新的蛋白質摺疊能量模型中加入了蛋白質摺疊、聚集等複雜能量圖，而類澱粉纖維則坐落在比自然結構能量更低的能量點上（圖1.1）^{1; 2; 3; 4}。類澱粉蛋白質有不同的來源，然而它們的聚集體卻擁有共同的特徵⁵：類澱粉蛋白的沉積物可以剛果紅（congo red）染色，在偏極光（polarized light）照射下會呈現蘋果綠的雙折射現象（birefringence）。此外類澱粉蛋白纖維在x-ray的照射下則呈現“cross-β”的散射圖樣，顯示“cross-β”結構可能是類澱粉蛋白纖維的共通結構。

蛋白質摺疊過程會受到外界擾動而造成錯誤摺疊（misfolding），導致蛋白質的聚集。聚集之蛋白質會在細胞組織中產生組織堆積（tissue deposition）並以類澱粉蛋白纖維（amyloid fibrils）的形態出現，進而引發神經退化性疾病，主

要包括阿茲海默氏症 (alzheimer's disease, AD)、帕金森氏症 (parkinson's disease, PD) 及普立昂疾病 (prion disease)⁶。這一類由蛋白質構形變異所引發的疾病一般稱為蛋白質構形變異疾病 (conformational diseases)，如果伴隨著類澱粉蛋白纖維的出現也稱為類澱粉蛋白疾病 (amyloid diseases)。

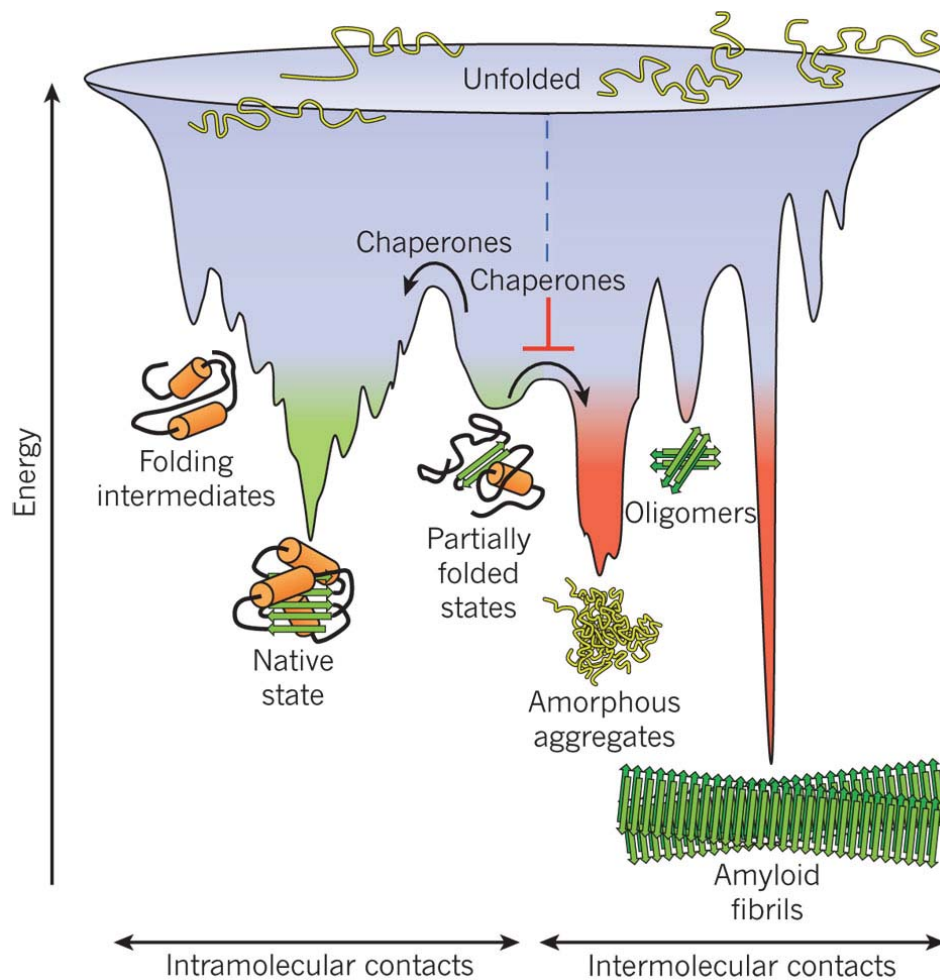


圖1.1 修正後之蛋白質摺疊與堆疊之能量圖⁷。寬度表示熵(entropy)，深度表示能量，類澱粉纖維坐落於能量之最低點。

普立昂疾病 (prion disease) 又稱傳染性海綿狀腦病 (transmissible spongiform encephalopathy; TSE) 是一種致死性的神經退化疾病 (neurodegenerative disease)

也是人與動物共通的疾病，因其會造成人類或動物腦組織海綿狀病變而被命名。此種病症在型態學與病理生理學上的特徵和其他漸進式腦病，如阿茲海默氏症、或是帕金森氏症類似，唯一不同的是普立昂疾病是會傳染的^{8; 9}。在不同哺乳類動物間普立昂疾病具有不同的名稱（表 1.1），如在山羊與綿羊間的羊搔癢症（scrapie）；在牛身上發現的為牛海綿樣腦病變（bovine spongiform encephalopathy, BSE）又稱狂牛症（mad cow disease）；在鹿與麋鹿間的鹿慢性消耗疾病（chronic wasting disease, CWD）以及發生在人類身上的庫賈氏症（creutzfeldt-Jakob disease, CJD）、庫魯症（kuru）、致命性家族失眠症（fatal familial insomnia, FFI）和格斯特曼氏綜合症候群（gerstmann-sträussler-scheinker syndrome, GSS）等。這些普立昂疾病患者的大腦外表看起來稍微萎縮，大腦組織切片在顯微鏡下可觀察到腦部呈現海綿狀般的空洞亦發現神經細胞大量死亡、星狀膠質細胞增生（astrogliosis）以及具有蛋白酶抵抗力（protease-resistant）的普立昂蛋白 PrP^{Sc} 在腦部累積形成類澱粉纖維（amyloid-like fiber）及類澱粉斑（amyloid plaques）等病徵¹⁰。

Animal prion diseases			
Disease	Host	Etiology	Year of Description
Scrapie	Sheep, Goats	Infection with Prions of unknown origin	1732
TME	Mink	Infection with Prions of either sheep or cattle origin	1947
CWD	Cervids	Infection with Prions of unknown origin	1967
BSE	Cattle	Infection with Prions of unknown origin	1986
EUE	Nyala, Kudu	Infection with Prions of BSE origin	1986
FSE	Cats	Infection with prions of BSE origin	1990
NHP	Lemurs	Infection with Prions of BSE origin	1996
Human prion diseases			
Disease	Host	Etiology	Year of Description
Kuru	Human	Ritualistic Cannibalism or "Transumption"	1900s
sCJD	Human	Spontaneous PrP ^C → PrP ^{Sc} conversion or somatic mutation	1920
fCJD	Human	Mutations in <i>PRNP</i>	1924
GSS	Human	Mutations in <i>PRNP</i>	1936
iCJD	Human	Infection with Prions of human origin by cadaveric corneal grafts, hGH or dura mater	1974
FFI	Human	<i>PRNP</i> haplotype 178N-129M	1986
vCJD	Human	Infection with Prions of BSE origin	1996
sFI	Human	Spontaneous PrP ^C → PrP ^{Sc} conversion or somatic mutation	1999
VPSPr	Human	Spontaneous PrP ^C → PrP ^{Sc} conversion or somatic mutation	2008

表 1.1 目前為止已被報導之 16 種普立昂疾病。表列為疾病名稱與感染動物種類

與首次報告時間¹¹。



最早在1730年就已經有羊搔癢症的紀錄，當時是在英國綿羊身上發現，此病最大的特徵就是發病的羊隻會身體發癢不斷的磨蹭牆壁、樹幹、籬笆因而得名，此外病羊還會呈現步履不穩、顫抖、瞎眼、摔倒、最終死亡等症狀。當時對於羊搔癢症的病原並不清楚，然而因為在中歐流傳已久所以當地人相信羊搔癢症是一種遺傳性疾病並不會傳染給人類，直到1930年左右，法國獸醫證實羊搔癢症是一種傳染病，羊搔癢症可以從綿羊傳染到山羊，再從山羊傳染給綿羊。羊搔癢症最大的病徵就是腦部出現空泡且星狀神經膠細胞有不正常增生的現象；而在1950年於巴布亞新幾內亞出現了一種叫做「庫魯」的疾病，Gajdusek及其他研究者在患者的頭部發現有澱粉樣蛋白斑（amyloid）存在，從患者生活習慣中得知他們有食用死去親人屍體的習俗，因此推測染病原因與此有關，此外比較羊搔癢症與庫魯症患者發現兩者病理相似，雖然未分離出任何病原體，但證實庫魯症亦是一種傳染性疾病。發生在人類最早的普立昂疾病是在1920年由Creutzfeldt和Jakob分別發現的病症，病發初期記憶力會衰退、步履不穩等類似痴呆的症狀，隨著病程進展，患者的四肢與軀幹會不停的劇烈抽動，死後解剖屍體發現患者腦部嚴重受損卻沒有發炎的情況，而這種病就被命名為庫賈氏症。庫賈氏症的病因有三種模式：(1) 偶發性 (sporadic, ~85%)：根據文獻，偶發性的庫賈氏症 (sporadic CJD, sCJD) 發生率約百萬分之一，病例零星出現在全球各地，病因目前不明，大多數患者發病年齡層廣泛，病程屬亞急性 (subacute)，患者初期意志不清而後演變成失智 (dementia)、運動神經失調 (ataxia) 等病徵，進程迅速，嚴重者常於發病後1年內死亡，病理切片發現患者除小腦被嚴重破壞外，大腦皮質處亦有海綿樣的空洞；(2) 遺傳性 (inherited, ~15%)：遺傳性的庫賈氏症 (familial CJD, fCJD) 為家族性顯性遺傳，主要是因為普立昂蛋白的基因PRNP發生突變所造成，此外致命性家族失眠症 (FFI) 和格斯特曼氏綜合症候群 (GSS) 等皆屬於遺傳性普立昂疾病；(3) 感染性 (infectious, <1%)：又稱為醫源性庫賈氏症 (iatrogenic

CJD, iCJD) 主要是因為各種醫療行為所造成的感染，除受污染的醫療器材或廢棄物、藥物等感染外，最多是在注射萃取來自人類屍體之腦下垂體荷爾蒙後以及器官移植發病的個案。

在二十世紀末歐洲爆發的狂牛症，被懷疑與時間相差不久的變異性庫賈氏症 (variant CJD, vCJD) 有關；狂牛症的病因可能是因為餵食牛隻的飼料裡摻有羊搔癢症的羊做成的骨粉所導致，原先飼料摻骨粉的目的在於讓牛直接吸收蛋白質讓牛長得更壯，結果造成 BSE 爆發的疫情。變異性庫賈氏症 (variant CJD, vCJD) 之病例是在 1995 年首度在英國被發現，與過往庫賈氏症病例不同處在於，新類型的庫賈氏症發病年齡層普遍偏低 (平均年齡約 28 歲左右)¹² 猜測患者可能是由於食用或接觸 BSE 病牛之組織所導致^{13; 14}。

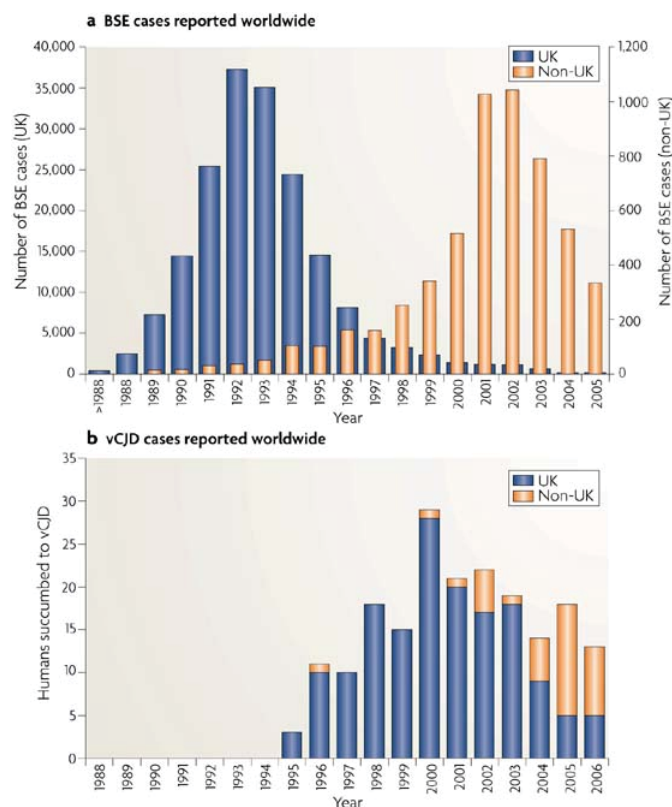


圖1.2 自1988年至2005年間發生於全球牛隻之BSE案例數目與人類罹患vCJD病

例數目之比較圖¹⁴。



狂鹿症 (CWD) 亦是一種可傳播的海綿樣腦病，本病經自然感染的鹿科有洛磯山麋鹿 (rocky mountain elk)、北美大角鹿 (mule deer)、白尾鹿 (white-tailed deer) 以及黑尾鹿等，影響所及不僅是野地鹿隻，甚至是人類畜養的蹄類動物亦發現有慢性消耗性病的存在。最早在1967年於美國西部發現，一隻北美大角鹿出現消耗性症候群，特徵是體重漸漸減輕最後衰弱致死，直到1978年才被確認為傳播性海綿狀腦病並且已經散播到北美、加拿大、德國與南韓等地^{15; 16; 17}。CWD 大多發生在成年動物，臨床症狀為體重不斷減少、與同欄間的動物互動減少、流涎、飲水量與排尿量遽增等，麋鹿則有過度興奮及神經質等症狀，雖然會嗜吃穀類但對草料的興趣大大降低^{18; 19}。CWD的傳播模式並不清楚但從流行病學角度觀察或許垂直感染及水平感染皆有可能，雖然CWD容易在鹿科動物間傳播但對與之同居的牛、綿羊、山羊等動物卻不會出現CWD或是TSE之症狀，此外感染源是否來自唾液、尿液或糞便污染之食用水或飼料並無直接證據²⁰；雖然目前並沒有CWD病原會傳染給人的證據，但普立昂疾病潛伏期很長，食用鹿肉或麋鹿肉可能需經過很長時間才會致病²¹，若真有死於此種傳染病的患者很有可能被歸類為不明原因，而不會聯想與狂鹿症有關，所以目前不排除會侵害人體。

1.2 單一蛋白學說 (protein only hypothesis)

1982年，Prusiner S.B對引起羊搔癢病的感染病原下了一個定義：「prion (中譯為普立昂)是一種不含核酸的蛋白質感染粒子(**proteinaceous infectious particles without nucleic acid**)」²²。Prusiner之所以提出此說法是由於最初一開始對於罹患羊搔癢病的病原並不清楚，當時的學者指稱是由慢性病毒 (slow virus) 或是非傳統性病毒 (nonconventional virus) 所導致之傳染病^{23; 24}，然而Alper等人發現羊搔癢病的病原對於電離輻射與紫外線等具有破壞核酸能力的高能量射能具有抵

抗力²³，因而引發學術界對於引起羊搔癢病的病原熱烈討論。病原主要成分說法分歧，有的假設是小型DNA病毒（small DNA virus）、多醣體或是蛋白質等⁹，然而在1967年Griffith提出羊搔癢病的病原可能是某種不需要經過遺傳物質（例如DNA或RNA）的複製與擴散即具有自我複製能力（self replicating）的蛋白質²⁵，因此有了「單一蛋白質學說（protein only hypothesis）」產生，1982年Bolton從受到羊搔癢症感染的敘利亞倉鼠（syrian hamster）的腦組織中分離出一種對蛋白酶K（protease K）有抵抗力（resistance）且分子量介於27~30 kDa之蛋白質²⁶，證實普立昂蛋白的主要成分為此，之後研究發現，經過純化得到的PrP具有羊搔癢症的感染力而且其感染力可藉由某些破壞蛋白質的處理或是使用PrP抗體使之減弱^{26; 27}；而在PrP的基因PRNP被發現以後，發現此基因本來就存在於人類還有許多動物的染色體中，而造成普立昂蛋白致命的因素在於PRNP基因產生突變^{10; 28}，若是大量表現PRNP突變的轉殖小鼠，則小鼠所產生的可傳染性神經退化疾病症狀和罹患普立昂疾病類似²⁹，此外若是PRNP基因剔除（PRNP^{-/-} knocked out mice）的小鼠則對羊搔癢症具有抵抗力³⁰，這些實驗結果皆是支持Prusiner的單一蛋白質學說。

1.3 普立昂蛋白結構

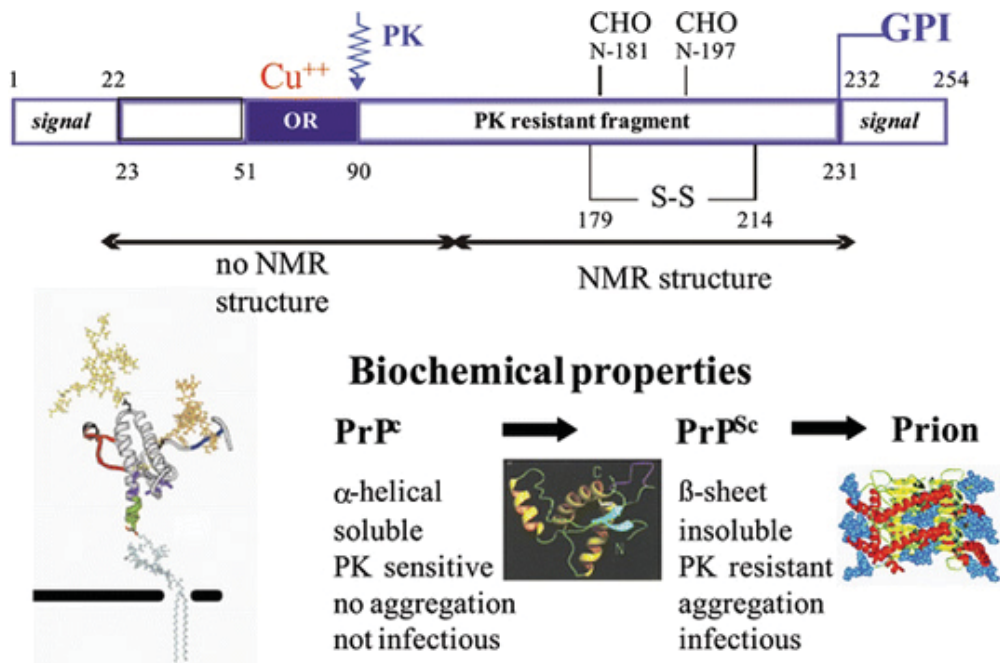
普立昂蛋白（prion protein，PrP）是由PRNP基因所轉譯，轉譯後的PrP含有254個胺基酸殘基（amino acid residue），其胺基端（N-terminal）與羧基端（C-terminal）各含有一個約20個胺基酸殘基的信號胜肽（signal peptide），在轉錄過程中信號胜肽會被切除然後成為含有209個胺基酸殘基（序列23-231）之成熟的PrP，成熟的PrP是一種能和細胞膜上之GPI（glycosylphosphatidylinositol）產生共價鍵結的蛋白質（GPI-anchored），PrP利用其Ser231與GPI分子結合並附著於細胞膜外側³¹，此外PrP在Cys179與Cys214間含有一雙硫鍵（disulfide bond），而序列上之Asn181與Asn197能與氮鏈鍵結產生醣化作用（N-linked glycosylation）

(圖1.3A)³²。



PrP的胺基端含有5個8重複的胜肽 (octapeptide repeats)，其功能推測能與銅離子結合並調節其恆定、抗氧化壓力、細胞固著以及訊息傳遞有關^{10; 33}。PrP存在於各物種間包括哺乳動物、魚類以及鳥類等，其保守性高且在體內許多組織如心臟、骨骼肌以及腎臟也有PrP存在，其中以神經細胞表現量最高³⁴，利用核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 光譜已成功解析人類 (human, *Homo sapiens*)、敘利亞倉鼠、小鼠 (mouse, *Mus musculus*) 以及牛亞科動物 (bovine) 等物種之全長PrP重組蛋白 (recombinant protein)^{35; 36; 37; 38}。以人類PrP為例，NMR解出之結構顯示其胺基端處富彈性，含有約100個胺基酸殘基未具特定之二級結構，羧酸端處則具較固定的球狀結構 (globular)，其中包括3條helix、2股β-sheet以及1對連接第二條及第三條α-helix的雙硫鍵 (圖1.3B)³⁸。

(A)



(B)

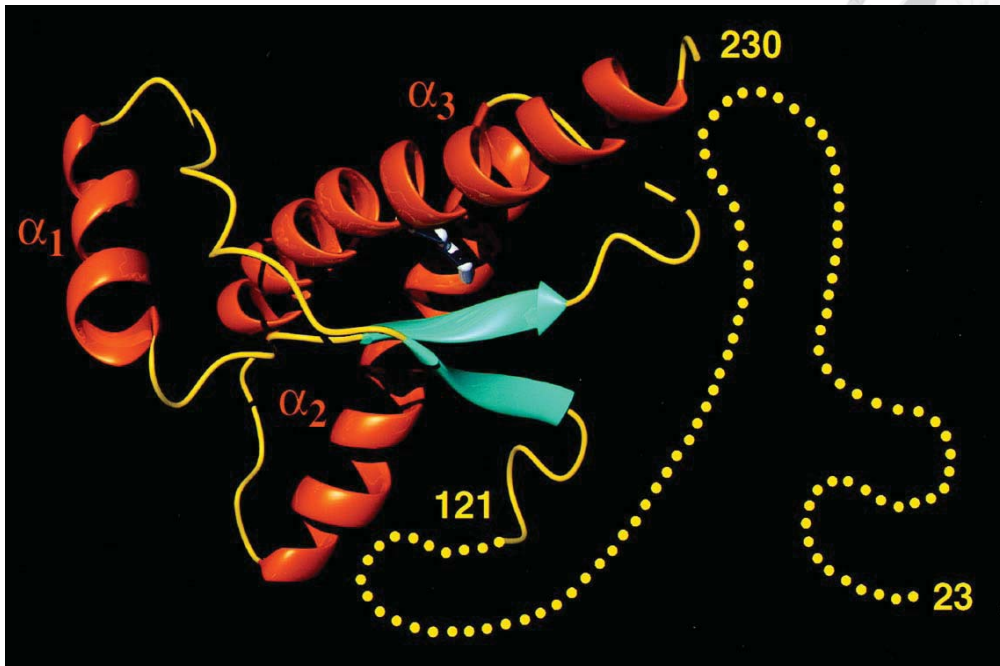


圖1.3 普立昂蛋白之結構。(A) 正常之普立昂蛋白質一級結構，序列1-254為轉譯後未經修飾之長度，切去前後的信號胜肽便可成為成熟的PrP（序列23-231），N端的5重複octarepeat可和銅離子結合，C端則是具有二級結構（3 α -helix、2 β -sheet）與特殊修飾（醣化、雙硫鍵）處。(B) 人類PrP23-230重組蛋白之NMR結構³⁸，胺基端為黃色虛線處，顯示為序列23-121，因富有彈性因此無法解出確切結構；羧基端有顯示3條橘色的 α -helix（序列144-154、173-194、200-228）、藍色2股相互反向平行之 β -sheet（序列128-131、161-164）以及無固定黃色實線之二級結構。

普立昂蛋白分子量約在33-35 kDa並且存在兩種結構異構物（isoform）（圖1.4）：一種是正常構形的PrP^C（C表示cellular），另一種則是與TSE相關的構形PrP^{Sc}（Sc表示scrapie），當普立昂疾病發生時，普立昂蛋白結構會由PrP^C轉變成PrP^{Sc}。造成兩種PrP構形存在的原因有兩種假設：一是認為由於轉譯後修飾作用（post-translational modification）所導致，但最後卻沒有得到任何結果³⁹；另一種

假設則認為PrP僅發生構形上之改變並無任何序列或轉譯之修飾²⁵，然而此概念卻與蛋白質建構理論「one sequence, one structure」相違背⁴⁰。同序列的PrP^C與PrP^{Sc}不僅在結構上有所差異，其生化特性與致病力亦有所不同；當發生PrP^C→PrP^{Sc}構形改變時，其二級結構含量發生改變，PrP原本以 α -helix為主轉變成以 β -sheet為主³⁹，此外PrP^C能被蛋白酶K水解、能溶於非離子性清潔劑且不具形成類澱粉纖維的傾向；而PrP^{Sc}則對蛋白酶K具有部份抵抗力（大約142個胺基酸殘基，分子量27-30 kDa左右）、無法溶解於非離子性清潔劑但具有形成類澱粉纖維的傾向^{9;41}。

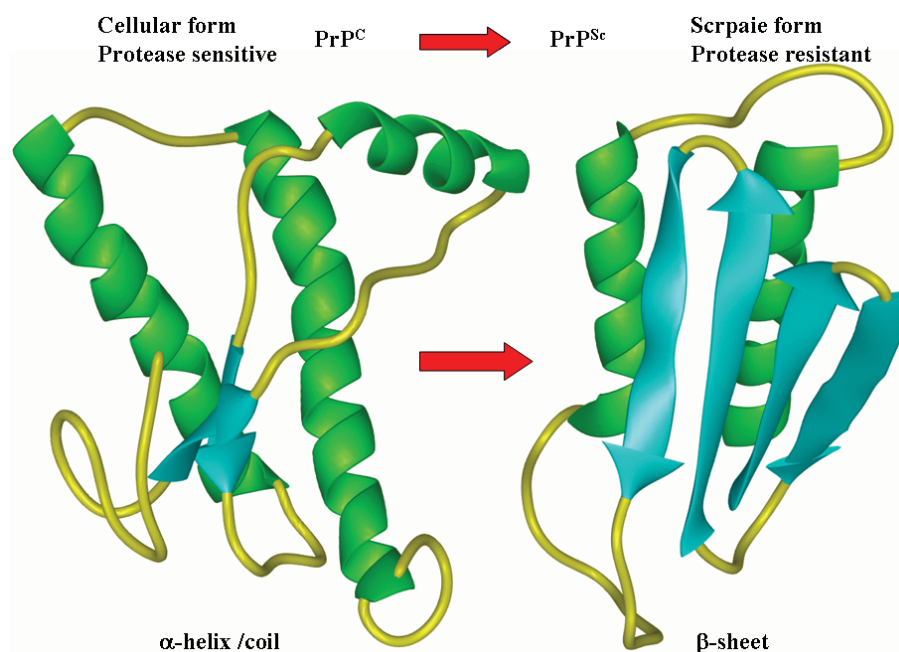


圖1.4 普立昂立昂疾病發生時所產生的PrP構形轉換。原本構形正常之PrP^C（ α -helix與 β -sheet的含量分別為40%與3%）轉換成構形不正常且具感染力之PrP^{Sc}（圖中結構為推測結構， α -helix與 β -sheet的含量分別為30%與45%）。

1.4 類澱粉纖維的形成

Prusiner認為當PrP^C轉變形成PrP^{Sc}時，構形不正常的PrP^{Sc}可「感染」腦部內健康的PrP^C造成其結構的改變，使的結構異常的PrP^{Sc}在腦部聚集形成類澱粉纖維進而影響正常的腦部功能，最後會形成像海綿體狀的結構。儘管對於構形轉換的機制並不清楚，但目前主要有兩種類澱粉纖維形成之模型較廣泛被接受：模板引導再折疊模型（template-directed refolding model）與成核聚合模型（nucleation-polymerization model）：

（1） 模板引導再折疊模型

在此模型中，PrP^{Sc}分子的形成不易且緩慢，因為由PrP^C轉換成PrP^{Sc}的過程中必須跨越相當高的能量屏障（energy barrier），因此，此過程成為類澱粉形成之速率決定步驟（rate-determining step），不過若是已經有PrP^{Sc}是存在，則可當作模板協助並加快PrP^C轉換成結構穩定的PrP^{Sc}，使類澱粉纖維快速延長直到達平衡為止（圖1.5a），雖然此模型看似有理但並未有實驗證據顯示有穩定的PrP^{Sc}單體（monomer）存在⁴²。

（2） 成核聚合模型

PrP^C與PrP^{Sc}間的轉換處於熱力學上的平衡狀態（thermodynamic equilibrium），並且傾向以PrP^C構形存在，熱力學上不穩定的PrP^{Sc}需彼此結合形成特定大小的寡聚體才能穩定存在，而此寡聚體即為形成類澱粉纖維時所稱的晶核（nucleus），由於晶核形成不易，因此，此步驟為類澱粉纖維形成時之速率決定步驟。當晶核形成後，PrP^{Sc}就可以有效的添加在晶核上而延長類澱粉纖維直到達平衡為止（圖1.5b）⁴³。

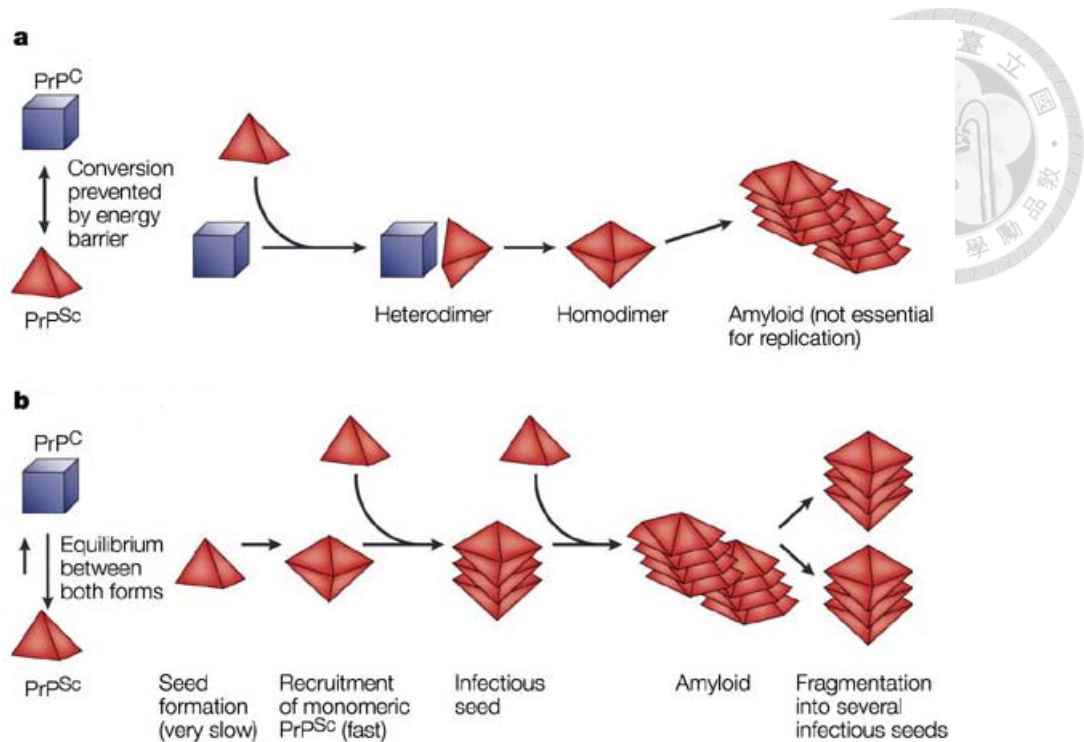


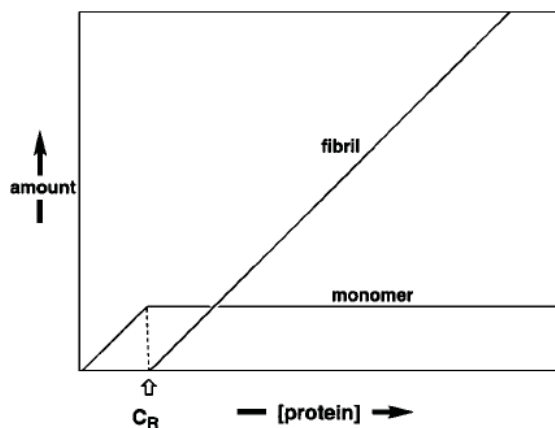
圖 1.5 普立昂蛋白之類澱粉纖維形成模型⁴⁴。(a) 模板引導再折疊模型：假設 PrP^{Sc} 單體比 PrP^C 更穩定，但實際上是不可能達到的；PrP^{Sc} 單體的出現是偶發的或是外來所提供，它可以當作模板引導其他正常構形之 PrP^C 轉變成不正常構形之 PrP^{Sc}。(b) 成核聚合模型：晶核的形成是此模型的速率決定步驟，一旦晶核形成後便可穩定存在，此時 PrP^{Sc} 單體便可快速添加其上進而延長類澱粉纖維的長度。

在成核聚合模型中，PrP^{Sc} 單體的濃度需高於所謂的臨界濃度 (critical concentration) 才能看到類澱粉纖維的形成，低於臨界濃度主要是以 PrP^{Sc} 單體為主，若是蛋白質濃度遠超過臨界濃度，則類澱粉纖維濃度會持續增加，但 PrP^{Sc} 單體的濃度則維持不變 (圖 1.6A)；此外類澱粉纖維形成分為三階段，依序為晶核形成時的遲滯期 (lag phase)、PrP^{Sc} 單體快速添加於晶核上之延長期 (elongation phase) 以及類澱粉纖維與 PrP^{Sc} 單體處於平衡不再增長的平衡期 (equilibrium phase) (圖 1.6B)；若遲滯期時外加晶種 (seed) 則類澱粉纖維的形成可立即開

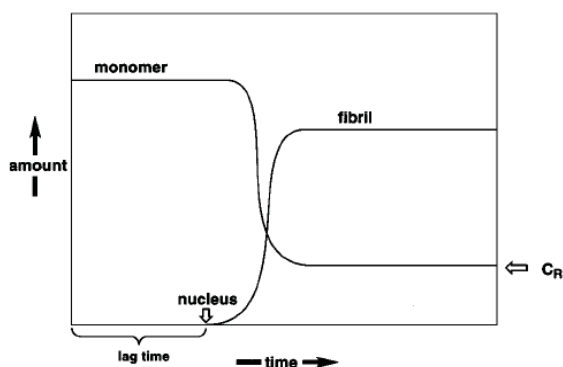
始 (圖1.6C) ⁴⁵。



(A)



(B)



(C)

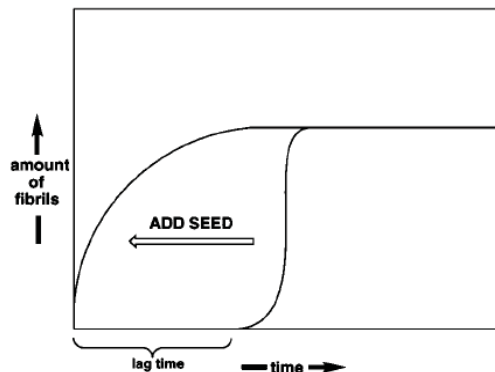


圖1.6 成核聚合模型之特徵⁴⁵ (A) 類澱粉纖維的形成是依照蛋白質濃度決定，PrP^{Sc}單體濃度需高於臨界濃度 (C_R) 才能形成類澱粉纖維；(B) 類澱粉纖維形成前後時期為緩慢的成核反應，一旦晶核形成類澱粉纖維便可快速成長直達平衡，此時單體的濃度會急速下降甚至低於臨界濃度；(C) 外加晶種可以使類澱粉纖維的形成跳過遲滯期而直接形成。

1.5 普立昂蛋白之構形轉變

為了進一步瞭解普立昂蛋白的轉換機制，許多研究以化學合成方式或是重組技術產生普立昂胜肽作為單體分子，以形成類澱粉纖維，目的在探討普立昂蛋白哪個區域對構形轉變以及感染能力之重要性：先前研究顯示，移除普立昂蛋白胺基端序列23-88之片段後，並不會影響患有 scrapie 之小鼠神經母細胞瘤 N2a (neuroblastoma, ScN2a) 之 PrP^{Sc} 形成⁴⁶；此外，若是將小鼠之 PrP 基因剔除，之後轉染入 (transfect) 移去 PrP 胺基端 49 個胺基酸之 PrP 突變基因，此基因轉殖小鼠仍可被 scrapie 感染；又，PrP 移除 23-88 與 141-176 兩片段之截短蛋白 PrP106 (truncated PrP106) 能在基因轉殖小鼠中形成類似 PrP^{Sc} 之結構⁴⁷；在 N2a 細胞中，若 PrP 缺乏 114-121 片段則無法轉變成 PrP-res⁴⁸，由以上研究結果得知普立昂蛋白構形產生變異的區域約自序列 106-147 開始。

早前研究利用化學合成之普立昂胜肽目的是為找出造成普立昂蛋白構形發生轉變的關鍵區域。目前為止認為普立昂胜肽片段 108-144 是扮演構形轉換重要角色：人類普立昂胜肽 (human prion peptide, huPrP) 片段 106-126 以及 127-147 能自發性形成具有類澱粉纖維性質之構造⁴⁹；又外加敘利亞倉鼠普立昂胜肽 (syrian hamster prion peptide, SHaPrP) 片段 106-141 能夠抑制由 PrP^{sen} → PrP^{res} (protease-sensitive PrP, PrP-sen; protease-resistant PrP, PrP-res) 之構形轉變⁵⁰，顯示普立昂片段 106-141 參與了 PrP^C 與 PrP^{Sc} 間之作用⁴⁸；將 SHaPrP109-141 溶於生理濃度之水溶液中並以 FTIR 分析，發現其結構由無規則扭曲 (random coil) 轉變為 β -sheet，且形成 β -sheet 結構後能夠聚集形成纖維並對蛋白酶具有抗性⁵¹；而 SHaPrP109-141 與 PrP^C 交互作用後，能使 PrP^C 獲得類似 PrP^{Sc} 之性質⁵²，這些研究結果顯示普立昂蛋白中序列 106-147 可能涉及構形轉變時主要變異區域。

先前研究顯示，化學合成的 PrP106-126 除了造成神經細胞死亡外還能促進星狀膠質細胞增生⁴⁹，PrP106-126 片段的胺基端具極性 (KTNMKHM)，緊接著是具非極性 (AGAAAAGAVVGLG) 的尾巴，其中 PrP113-120 (AGAAAAGA)

被認為是形成 β -sheet的重要片段⁵³，然而往前延伸至PrP106離胺酸（lysine, K）位置發現PrP106-122在生理狀態pH時，胜肽結構多以 α -helix/random coil形式存在⁵⁴，造成此現象的原因可能是因為帶正電的離胺酸降低了形成 β -sheet時分子間的作用力。此外，Blondelle *et al.*曾指出：富含丙胺酸（alanine-rich）的胜肽，如KYA₁₃K，具有可形成 β -sheet的能力⁵⁵，而從分子模型中亦顯示普立昂的變形（transformation）牽涉到AGAAAAGA區域⁵⁶，綜括而論，SHaPrP113-120在類澱粉纖維形成過程中扮演重要角色。

1.6 普立昂之跨物種傳染

從流行病學角度觀察，在英國，因為餵食牛群的飼料出了問題而導致普立昂蛋白從羊群中跨過屏障感染了牛群；人類則因為吃了生病的牛於是普立昂蛋白又跨過了人與牛間的種族屏障（species barrier）感染了人類。TSE中所指的種族屏障即是當A物種的TSE agent感染B物種時，B物種對TSE疾病具有抗性（resistance）⁵⁷。在這邊所指的抗性（亦稱屏障）即是在第一代（primary passage）普立昂病原由A物種傳染給B物種過程中，被感染的B物種與A物種相較下，需要較長或是不同的培養時間（incubation time）然後才會慢慢的死去，然而並非所有的B物種皆會感染普立昂病原而致病。如果進一步在B物種間第二代（second passage）感染的話，也就是B物種間的同種傳染，B物種致病的時間會縮短很多（圖1.7）。早期研究人類普立昂疾病大多以靈長類動物為實驗對象，特別是黑猩猩（chimpanzee）與鼠猴（squirrel monkey）為主⁵⁸，缺點是在第一代傳染中需要非常久的培養時間而且昂貴，因此改利用實驗室老鼠進行傳染實驗，但發現小鼠很難受人類普立昂蛋白感染，其培養時間相當於小鼠生命週期⁵⁹。

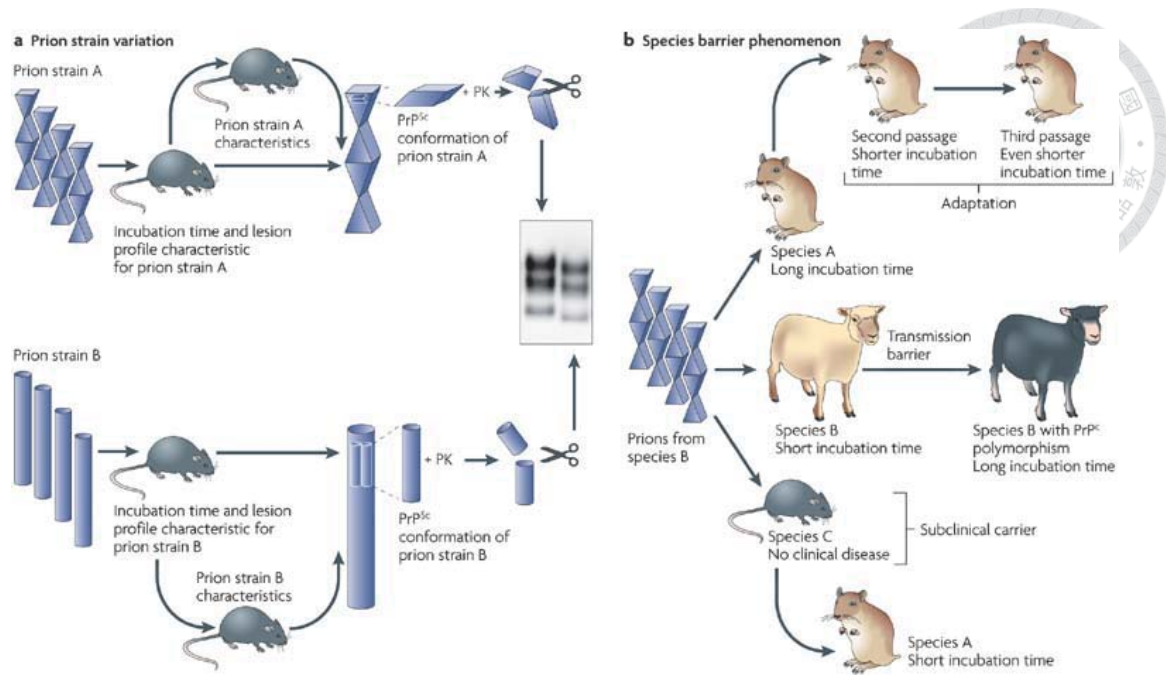


圖 1.7 普立昂跨種傳染。(a) 不同的 prion strain 感染相同物種，經過數代移種 (serial passages) 後最後會形成不同的致病型態與病徵 (例如培養時間與損害情況)，在電泳圖上可看到最後形成不同的 PrP^{Sc}，雖然皆具有蛋白酶 K 抗性，但其大小 (size) 卻不相同。(B) 從某一物種分離出之普立昂病原通常很難傳染給其他物種 (培養時間長)，這是因為捐贈者與接受者的普立昂蛋白序列不同有關，因此會阻礙 PrP 構形的轉變。然而在經過數代移種後，培養的時間會漸漸縮短，這種現象稱為適應性 (adaptation)。在某些物種中，種族屏障非常高，即使經過很長的培養時間仍不見有發病現象，然而在這些具有抗性的物種中將其腦部萃取出之普立昂感染其他物種卻具感染力。若是一開始，在相同的物種中在接種了相同的外來的普立昂卻出現長時間的培養時間，那就表示 *PRNP* 的多型性 (polymorphism) 造成這種現象，這也就是所謂的感染屏障 (transmission barrier) 60。

「種族屏障的出現與捐贈者 (donor) 及接受者 (recipient) 的 PrP 胺基酸序列有關」。會提出這個理論是因為比對哺乳類動物間 PrP 序列後所得的結論⁶¹，其

最主要的證據是因為發現小鼠與敘利亞倉鼠間有很高的種族屏障：小鼠原本不會受到敘利亞倉鼠PrP^{Sc}感染，但若將敘利亞倉鼠之PrP基因轉殖入小鼠體內，會使轉殖小鼠受敘利亞倉鼠PrP^{Sc}感染機會大增⁶²；此外Prusiner將敘利亞倉鼠PrP^{Sc}接種入共有表現敘利亞倉鼠與小鼠PrP之基因轉殖鼠體內後發現，此基因轉殖鼠只能產生敘利亞倉鼠PrP^{Sc}，同樣的，若將小鼠PrP^{Sc}接種入共有表現敘利亞倉鼠與小鼠PrP之基因轉殖鼠體內後發現，此基因轉殖鼠只能產生小鼠PrP^{Sc29}；⁶³。從感染scrapie的小鼠神經母細胞瘤（Sc⁺-MNB）細胞來探討普立昂蛋白構形轉變的關鍵區域實驗中亦發現PrP-sen轉變成PrP-res時涉及物種的專一性（species specificity）：在Sc⁺-MNB細胞中表現突變（將小鼠PrP108與111位置突變為Met）或是重組小鼠PrP（此小鼠帶有敘利亞倉鼠PrP之M111）會干擾小鼠內生性PrP-sen轉變為PrP-res，這表示在PrP-res與PrP-sen間的相容性（compatibility）與作用力對於PrP-res的形成以及TSE疾病的傳播扮演重要角色⁶⁴。

1.6.1 小鼠與敘利亞倉鼠間的種族屏障

雖然，敘利亞倉鼠與小鼠二者間普立昂蛋白胺基酸序列有94%的相似度（只有16個胺基酸不同），但從上述結果我們得知，敘利亞倉鼠與小鼠間在普立昂疾病傳染上存在種族屏障，因此小鼠不易感染敘利亞倉鼠PrP^{Sc}；然而從轉殖小鼠與細胞培養實驗中發現，位於PrP蛋白的中間區域（PrP112-187）其胺基酸序列相似程度對於PrP-sen轉變為PrP-res是重要的^{64; 65; 66}。

在缺乏活體內（*in vivo*）普立昂疾病傳染的實驗情況下，利用活體外（cell-free system）實驗來觀察TSE agent在不同物種間對於種族屏障感染的情形^{67; 68}。活體外實驗證實，若是將正常的PrP^C先和已存在的PrP^{Sc}培養在一起，會促使PrP^C轉變成PrP^{Sc}。這項結果不僅證實普立昂疾病的蔓延（propagation）存在於PrP^C與PrP^{Sc}之間，更再次驗證單一蛋白理論⁵⁸。Kocisko等人分別將細胞表達後以免疫沉澱法收集的³⁵S標誌的小鼠及敘利亞倉鼠之PrP^C與小鼠及敘利亞倉鼠之PrP^{Sc}於活體外

進行培養，發現小鼠的PrP^C只能被小鼠的PrP^{Sc}誘導造成結構改變，然而敘利亞倉鼠的PrP^C，兩物種之PrP^{Sc}皆可對其造成影響（值得注意的是作者因為以3F4單株抗體進行免疫沉澱，因此老鼠PrP^C的L109_{Ha}與V112_{Ha}被改為與敘利亞倉鼠相同的Met，先前我們實驗室研究以普立昂勝肽進行小鼠與敘利亞倉鼠引晶實驗的比較，結果發現當139位置為Met時，109與112位置的序列相似度對引晶效率很重要⁶⁹）。Kocisko等人並做了許多不同長度的普立昂蛋白，結果發現在138_{Mo}/139_{Ha}、154_{Mo}/155_{Ha}以及169_{Mo}/170_{Ha}位置之胺基酸種類會影響小鼠與敘利亞倉鼠的跨種感染⁷⁰。此外在小鼠神經母細胞瘤的實驗中更進一步證明，單一胺基酸的不同（Met138_{Mo}）就能抑制小鼠PrP-res的形成（作者在S_C⁺-MNB細胞中表現chimeric mouse-hamster PrP，先找出對PrP-sen轉變成PrP-res的重要區域在於PrP112-187，而在此之間小鼠與敘利亞倉鼠只有3個胺基酸不同，再利用突變的方法找出當I138→M時會使PrP-sen無法轉變成PrP-res）⁶⁴。的確在活體實驗中證實，兩物種間只要單一胺基酸不同就能影響普立昂疾病的傳染效率，舉例來說：牛的PrP^C在胺基酸142位置是Ile的話就很難將BSE傳染給敘利亞倉鼠（相當於胺基酸139位置的Met）；羊的PrP^C在胺基酸142位置若是Ile亦很難將scrapie傳染給山羊（胺基酸142位置是Met）^{71; 72}。普立昂蛋白之胺基酸138位置之所以重要是因為其位在PrP-sen119-140之中，可能是和PrP-res潛在的結合位置（binding site）⁷³；在PrP^C中，胺基酸138位置是坐落於β-strand（胺基酸128-131）與α-helix（胺基酸144-154）中的環狀（loop）結構內，因此鄰近PrP^C或PrP^{Sc}位置的胺基酸皆有可能是PrP^C轉換成PrP^{Sc}步驟的重要影響關鍵⁶³。

從轉殖小鼠實驗、羊搔癢症感染的細胞培養實驗、一直到活體外實驗皆證實，PrP序列的一致性對普立昂傳染效率扮演重要角色，然而對於PrP胺基酸序列如何控制種族屏障的機制仍然不清楚，近年來，已能在試管中進行普立昂的引晶（seeding）實驗，在此實驗中利用重組人類、老鼠以及敘利亞倉鼠的PrP23-144進行引晶，發現胺基酸138在以物種為依存（species-dependent）的引晶專一性實驗中扮演重要角色，同時亦證明在不同物種間的交錯引晶屏障（cross-seeding

barrier) 會因為逐漸的適應 (adaptation) 而被忽略, 並且會產生新的、不同二級結構與不同類澱粉纖維型態之類澱粉strain。然而在此實驗中小鼠與敘利亞倉鼠PrP23-144間的感染屏障實驗與活體內的實驗並不完全一致⁷⁴: 利用大腸桿菌表現重組小鼠之MoPrP23-144與敘利亞倉鼠之ShaPrP23-144, 發現已形成類澱粉纖維之小鼠PrP23-144 (2% w/w) 並無法使敘利亞倉鼠PrP23-144縮短生長遲滯期 (lag phase), 然而已形成類澱粉纖維之敘利亞倉鼠PrP23-144 (2% w/w) 對小鼠PrP23-144進行引晶時卻能縮短其生長遲滯期^{74; 75; 76}。

1.6.2 人類與牛之間的種族屏障

英國狂牛症的爆發讓我們相信BSE的PrP^{Sc}可以跨越種族屏障傳播給人類, 這是否表示透過BSE的PrP^{Sc}能使人類PrP^C轉變為PrP^{Sc}? 之前曾有實驗顯示若是把BSE的PrP^{Sc}接種至帶有人類PrP^C之基因轉殖鼠無法使此基因轉殖鼠發病⁷⁷。然而, 活體外實驗證實牛PrP-res能使人類PrP-sen轉變為人類PrP-res^{59; 68}。此外, 可以表現牛PrP^C基因缺失小鼠 (PRNP^{0/0}) 容易受到BSE感染並且表現出和牛感染BSE的同樣病徵⁷⁸, 相同的轉殖小鼠同樣容易受到人類vCJD以及scrapie感染: 受到人類vCJD感染的轉殖小鼠其潛伏期 (約250天左右)、神經病理以及PrP^{Sc}的型態與受到牛BSE感染的轉殖小鼠非常類似, 由此推測引發人類vCJD和牛BSE的感染物質類似^{68; 72}。

在人類普立昂基因密碼子129 (PRNP code 129) 位置存在甲硫胺酸 (methionine, Met) 與纈草氨酸 (valine, Val) 多型性 (polymorphism)⁷¹。至目前為止, 有四種人類PrP^{Sc}被認為與不同的CJD表現型有關: 典型的 (偶發性與感染性) CJD病患帶有PrP^{Sc}1-3型, 而vCJD病患則是存在PrP^{Sc}第4型; 第1、4型的PrP^{Sc}只存在人類Met¹²⁹同型結合子 (homozygote), 而第3型PrP^{Sc}存在至少含有一個Val¹²⁹對偶基因 (allele), 而第2型的PrP^{Sc}與密碼子129無關⁷⁹, 因此人類PrP129的多型性的特質會影響人類對普立昂疾病的敏感度且患者呈現截然不同

的致病表型⁸⁰。

單一胺基酸的改變在不同物種間不僅和感染屏障有關，在相同的物種內亦與是否容易受到TSE疾病感染相關。統計資料顯示，帶有密碼子129轉譯成Met/Met或是Val/Val同型結合子的基因型罹患偶發型CJD的機率較異型結合子（heterozygous）的基因型的機率高⁸¹。然而對vCJD病患來說，其基因型只存在Met/Met型式；相對於129MM，若129位置出現的是M/V或是V/V，較不易罹患vCJD並可能具有較長的潛伏期⁸²。

雖然129位置的多型性決定是否容易受到普立昂疾病感染，然而從生物物理學角度來看，對於重組PrP^C129位置之Met轉變成Val時，其動力學（kinetic）、摺疊（fold）以及熱動力學穩定度（thermokinetic stability）皆無重要影響^{68; 76; 83}。這表示改變普立昂的蔓延（propagation）並不是透過129M/V多型性對PrP^C的影響，而是透過對PrP^{Sc}的結構或是對類澱粉纖維形成動力學的影響。

正常PrP^C轉變為PrP^{Sc}，在同種不同部位、或不同種動物可能產生不同之影響，因而讓大家重新思考種族屏障的問題。因為種族屏障可以解釋為何一種動物的異常PrP較難引起另一種系動物之普立昂疾病。綜合以上所述，種族屏障與PrP之胺基酸序列有關，外來感染源之PrP^{Sc}胺基酸序列越像宿主之PrP^C胺基酸序列者，越易得到普立昂疾病，反之則較難。這也解釋了為何羊比較容易傳染牛（兩者胺基酸序列僅7處不同），牛要傳染給人則難得多（兩者胺基酸序列有22處不同）。

1.6.3 人類與鹿之間的種族屏障

數百萬居住在北美的獵人會在打獵後食用鹿（deer）與麋鹿（elk），而這些鹿肉中已被證實會存有CWD prion⁸⁴，因此我們懷疑CWD是否會像狂牛症一樣，跨物種傳染給人類？到現在我們並不清楚人類是否會感染CWD或新型態從動物而來的TSE疾病，但較感欣慰的是到目前為止曾經在爆發大規模CWD的區域（美

國科羅拉多州與威新康州)並未發現人類有類似患病的情況發生⁸⁵。先前基於生物安全考量,對於疑似罹患CJD的病人無法進行解剖確認,因此無法斷定這些因病死亡的患者是否真的是因為食用鹿肉而感染人類TSE,然而隨著時間進展,對於平時習慣食用鹿肉並且罹患CJD的患者在其死後進行解剖並未發現有任何不正常或是新型態普立昂蛋白的存在^{86; 87},其他間接證據亦顯示人類感染CWD的風險是低的:Raymond et al.指出,CWD能使人類重組PrP轉變成類澱粉纖維的效率並不高,如同BSE與scrapie一樣,因為分子的不相容性(incompatibility),使得人類PrP^C在跨物種(cross species)感染時不易轉變成PrP^{Sc67}。

為了解CWD與CJD患者其病理組織以及PrP^{Sc}的生化特性是否相似,因此Xie et al.比較密碼子129為同型結合子(Met/Met)的vCJD病患與感染CWD的鹿與麋鹿⁸⁸,發現無論是從病理組織或是攻擊目標(target organ)還是醴化的型式(glycoform pattern),prion strain在跨物種感染時並不會保留原本的型態^{89; 90; 91; 92}。而為了進一步研究麋鹿與人類(elk-human)之種族屏障,Kong et al.將麋鹿CWD(elk CWD)接種至可以表現人類PrP或是elk PrP之轉殖小鼠,可以表現elk PrP之轉殖小鼠在接種118-142天後會發病,然而表現人類PrP(129M)之轉殖小鼠直到657天或是更長的756天,皆未發展出任何TSE的病徵⁹³,此結果與Tamgüney et al.研究一致,可以表現人類PrP的轉殖小鼠並不容易感染從北美大角鹿(mule deer)或是白尾鹿(white-tail deer)亦或是麋鹿(elk)而來的CWD⁹⁴。

雖然間接證據證實人類與鹿之間的種族屏障很高,CWD很難感染人類,但曾有報導指出靈長類動物卻容易感染CWD,經由intracerebral inoculation的鼠猴(squirrel monkey)會被CWD感染⁹⁵,然而在靈長類動物中,新世界猴(new world monkey)其PRNP基因序列和人類相差甚多因此無法證實人類普立昂蛋白可以被CWD之PrP^{Sc}轉換⁹⁶。

1.7 其他物種之種族屏障的研究

傳播性貂腦病 (Transmissible mink encephalopathy, TME) 與貓海綿狀腦病 (Feline spongiform encephalopathy FSE) 亦是跨越種族屏障所導致的TSE疾病，TME的發生是因為攝食被scrapie污染或BSE污染的肉有關⁹⁷，而FSE的發生則是吃了遭BSE感染的寵物飼料相關⁹⁸，當爆發這些動物的傳染性海綿狀腦病時，我們不禁擔心是否還有其他吃了相同寵物飼料或是肉製品的動物亦有可能罹患TSE疾病，而這些患病的物種是否會成為感染人類的中繼者。然而從先前研究顯示兔子 (rabbit)、馬 (horse)、豬 (pig) 與狗 (dog) 這些家畜及寵物，屬於不容易被普立昂感染⁹⁹的動物。為何兔子、馬、豬與狗對於普立昂感染具有抗性？在PrP胺基酸序列中，人們最感興趣的位置位於PrP165-175這段區域，剛好是第二個 β -strain與第二個 α -helix產生loop (β 2- α 2 loop) 的地方，雖然哺乳類動物的PrP胺基酸序列有高達85%-95%的相似度，然而當PrP胺基酸發生改變時就會使整體結構改變，導致PrP-res不易產生因此提高種族屏障。 β 2- α 2 loop的位置可能是和protein X產生作用的地方，而protein X猜測是參與PrP^C轉變為PrP^{Sc}的輔因子 (co-factor)¹⁰⁰，因此，若 β 2- α 2 loop結構較為固定 (rigidity) 的話，就有可能會增加物種受PrP感染的機會¹⁰¹；兔子與豬在PrP173位置皆為Ser、馬之PrP167位置為Ser、而狗在PrP177位置是Arg，這些胺基酸除了會和其鄰近的胺基酸（如：兔子和狗之Asp177-Arg163）產生鹽橋 (salt bridges)、氫鍵 (hydrogen bonds) 或是疏水性的接觸 (hydrophobic contact) 外，胺基酸本身的生物物理特性亦會影響 β 2- α 2 loop的結構，因此兔子、馬、豬與狗不容易受普立昂感染^{102; 103; 104}。

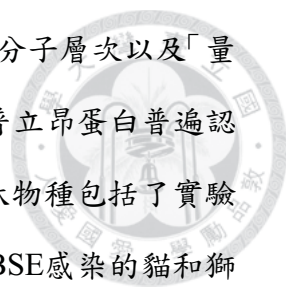
1.8 其他普立昂種族屏障的相關研究

蛋白錯誤摺疊循環放大 (Protein misfolding cyclic amplification, PMCA)，一種引用PCR概念所研發出的新技術，是在2001年由Claudio Soto發明，PMCA能在in vitro的情況下模擬PrP^{Sc}的複製過程，即利用少量的PrP^{Sc}誘導host的PrP^C構形轉

變，並產生新的大量PrP^{Sc105}：Soto將scrapie-infect的倉鼠腦組織液先以PK處理後再稀釋到幾乎以西方點墨（western blot）也無法偵測的量，然後再將此倉鼠腦組織液與正常倉鼠腦組織（PrP^C）培養在一起，經過一段時間後會產生新的PrP^{Sc}-like protein，分子量約27-30 kDa（PrP-res），此時再以超音波震碎儀（sonicator）將混合物震碎，然後發現PrP-res會遽增。在此情況下（in vitro）複製的prion具有prion的重要特性，例如仍有感染力並且保有strain的專一性。此外PMCA更能挑戰有關普立昂疾病物種屏障的問題，因為此項技術可以強迫PrP^C轉變成PrP^{Sc}，因此只要生物體內有極微量的PrP^{Sc}存在就能藉此技術有效的複製各種不同的prion strains/species，對於一些具prion-resistant的物種或許能藉由此方法打破，而且也能清楚知道這些具有prion-resistant的物種是否會成為使人類感染普立昂疾病的中繼者¹⁰⁶。Vidal E等人曾將兔子與狗的腦均質液與BSE的病腦均質液進行PMCA研究，結果發現BSE的病腦均質液中的PrP^{Sc}需要經過至少七次PMCA反應才可使兔子與狗的正常腦均質液中的PrP^C產生新的PrP^{Sc}，將此新的PrP^{Sc}接種至可以表現人類或是牛PrP^C之基因轉殖小鼠後發現，此新的PrP^{Sc}仍保有BSE prion的特性無法使基因轉殖鼠發病，因此對兔子與狗來說若是一開始受prion感染的來源來自BSE，那麼這些動物仍是無法成為BSE感染人類的中繼者¹⁰⁷。

1.9 本論文動機

蛋白質的一級結構決定其三級結構，然而對普立昂蛋白來說，其胺基酸序列對整體的蛋白質結構來說幾乎沒什麼重要影響，其影響的是PrP^C轉變成PrP^{Sc}時的轉換過程^{75; 76; 108}。在兩個不同物種之間，其普立昂蛋白上只要有一個胺基酸不同，就會產生種族屏障^{109; 110}。舉例來說，若是將小鼠神經母細胞瘤PrP上的一個胺基酸置換成在兔子PrP上相當位置的胺基酸（如:N173→S），則小鼠PrP^C在轉換成PrP^{Sc}過程中會有抵抗性¹¹¹。因此，單一胺基酸的影響在種族屏障以及是否容易受普立昂疾病感染上似乎是相同的機制。



本研究的目的是以化學合成方式，合成數條普立昂胜肽，從分子層次以及「量化」觀念探討普立昂蛋白序列與感染屏障間的關係。我們截取普立昂蛋白普遍認為最重要的一段胺基酸序列108-144為模型進行實驗。這些胜肽物種包括了實驗室常見的小鼠、錢鼠以及敘利亞倉鼠，以及曾經報導過可以被BSE感染的貓和獅子，還有對普立昂疾病有抗性的狗與豬，最後還有牛、鹿以及人類。這些物種在PrP¹⁰⁸⁻¹⁴⁴區間，分別於109、112、129、135、138、139以及143等位置之胺基酸殘基有所不同，而這些位置在先前研究中從PrP^C轉變為PrP^{Sc}時扮演重要角色，因此我們利用實驗室已發產出的系統，從成核聚合模型的概念出發，探討普立昂胺基酸序列如何影響類澱粉形成特性與引晶效率。

第二章 材料與方法



2.1 材料

2.1.1 水

經過 Milli-RO PLUS 60 and Milli-QSP reagent water system 過濾與去離子化而得。

2.1.2 化學藥品

<u>藥品</u>	<u>來源</u>
Acetic acid, glacial	J. T. Baker
Acetonitrile	J. T. Baker
Dichloromethane (DCM)	Mallinckrodt
N,N-Dimethylformamide (DMF)	Mallinckrodt
Dimethyl sulphoxide, sterile filtered	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
High Modified Dulbecco's Modified Eagle's Medium (1X)(With phenol red)	Hyclone
High Modified Dulbecco's Modified Eagle's Medium (1X)(Without phenol red)	Hyclone
Ethanol	Riedel-de Haën
Fmoc-Ala-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Arg (Pbf)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Asn (Trt)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Asp (OtBu)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Gly-OH	AnaSpec Inc.

Fmoc-His(Trt)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Leu-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Lys (Boc)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Met-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Phe-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Pro-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Ser (tBu)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Tyr (tBu)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Val-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Ile-OH	AnaSpec Inc.
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochemical Industries
Hydrochloric acid 37%	Riedel-de Haën
2-mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Mallinckrodt
Methyl tert-Butyl Ether (MTBE)	TEDIA
N-Methylmorpholine (NMM)	Acros
MTT power (Thiazoly blue Tetra-zolium Bromide)	Sigma
Piperidine	Merck
2-propanol	J.T.Baker
PyBOP	Novabiochem
Rink Amide AM resin	Novabiochem
Sodium Acetate anhydrous	Merck
Sodium Chloride	Merck
Sodium phosphate monobasic	Riedel-de Haën
Sodium phosphate dibasic dihydrate	Riedel-de Haën



Tris Hydrochloric acid 99.9% (TFA)

Ampesco

Triisopropylsilane (TIS)

Acros

Tris (hydrochloride) aminomethane (Tris)

Amresco

Trypsin-EDTA solution (1X)

Sigma



2.2 儀器

2.2.1 純化、分析用管柱

- (1) 逆相-高效液相層析 (RP-HPLC) : VydacC18 column (218TP1010, 25 cm × 10 mm).
- (2) 熱力學溶解度 (Thermodynamic solubility) 分析 : Agilent ZORBAX Eclipse column, 5 μm, 4.6 mm × 150 mm

2.2.2 大型儀器

- (1) 生物安全操作台 : NUAIRE biological safety cabinet AU-425-600
- (2) 蒸氣滅菌釜 : TOMY SX-700 high-pressure sterilizer
- (3) 離心機 : BECKMAN COULTER Allegra™ X-12R centrifuge
- (4) 微量離心機 : Eppendorf centrifuge 5415D
- (5) 高效液相層析儀 : Agilent 1100 series variable wavelength HPLC (G1379A degasser, G1311A QarPump, G1314A VWD UV detector)
- (6) 熱力學溶解度分析系統 : Agilent 1100series (G1379A degasser, G1311A QartPump, G1313A ALS autosampler, G1316A TCC column compartment)
- (7) 真空冷凍乾燥濃縮儀 : HETO MAXI dry lyo
- (8) 超音波打碎機 : Dr.Hielscher UP 100H ultraschallprozessor
- (9) 固相胜肽合成儀 : Automated solid phase peptide synthesizer PS3™

(10) 紫外光-可見光分光光譜儀：BECKMAN COULTER DU800 UV-Visible spectrophotometer

(11) 螢光光譜儀：JASCO FP-750 spectrofluorometer

(12) 圓二色光譜儀：JASCO J-715 spectropolarimeter

(13) 基質輔助雷射脫附游離-時間式飛行質譜儀：MALDI micro MX™

(14) 穿透式電子顯微鏡：Hitachi H-7000



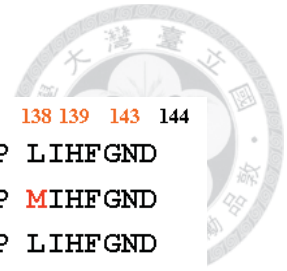
2.3 方法

2.3.1 普立昂胜肽的合成、純化與鑑定

(1) 固相胜肽合成法 (solid phase peptide synthesis)

本篇研究所使用的普立昂胜肽片段序列 108-144 (圖 2.1) 是利用 PS3™ 自動胜肽合成儀 (Rainin Instruments) 依據固相胜肽合成法 (9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)) 標準程序所合成；在胜肽合成過程中，以 0.1 mmole resin (Rink Amide AM resin) 作為支持物，連結並固定含 0.4 mmole 側鏈保護基的胺基酸進行胜肽加長的合成反應。Fmoc 在合成時當作胺基酸的 N 端保護基，目的是防止側鏈反應的形成；PyBOP 用來活化 N- α -protected 胺基酸衍生物之 C 端；N, N-dimethylformamide (DMF) 是合成過程中主要的溶劑，作用在將由 resin 及 Fmoc 保護的胺基酸衍生物去保護 (deprotection)、耦合 (coupling) 及沖洗 (washing)。去保護溶液 (deprotection reagent) 之配製是將 20% (v/v) piperidine 溶在 DMF，而活化溶液 (activation reagent) 則是將 4.45% (v/v) N-methylmorpholine (NMM) 溶在 DMF。耦合時間 (coupling time) 視 Fmoc 保護的胺基酸之序列長度與濃度來決定。

合成完畢後，resin 依序經過 DMF、ethanol 以及 DCM 沖洗，之後再將 resin 置於真空中 1-2 小時使其乾燥。



	108	109	112		129	135	138	139	143	144
bPrP	NMKHVAGAAA	AGAVVGG	LGG	YMLGSAMSRP	LIHFGND					
bvPrP	NMKHVAGAAA	AGAVVGG	LGG	YMLGSAMSRP	MIHFGND					
mdPrP	NMKHVAGAAA	AGAVVGG	LGG	YMLGSAMNRP	LIHFGND					
dogPrP	NMKHVAGAAA	AGAVVGG	LGG	YLLGSAMSRP	LIHFGND					
catPrP	NMKHMAGAAA	AGAVVGG	LGG	YMLGSAMSRP	LIHFGND					
pigPrP	NMKHVAGAAA	AGAVVGG	LGG	YMLGSAMSRP	LIHFGSD					
lionPrP	NMKHMAGAAA	AGAVVGG	LGG	YMLGSAMNRP	LIHFGND					
mPrP	NLKHVAGAAA	AGAVVGG	LGG	YMLGSAMSRP	MIHFGND					
huPrP	NMKHMAGAAA	AGAVVGG	LGG	YMLGSAMSRP	I IHFGSD					
haPrP	NMKHMAGAAA	AGAVVGG	LGG	YMLGSAMSRP	MMHFGND					

圖 2.1 本研究中所使用之各物種合成普立昂胜肽片段序列 108-144(序列數字是以人類普立昂為基準)。不同顏色所指為以牛普立昂蛋白 (bPrP) 為基準，與其對應之胺基酸殘基分別為 1 個、2 個與 3 個之不同 (錢鼠、北美大角鹿、小鼠、人類、倉鼠之普立昂胜肽序列分別命名為 bvPrP、mdPrP、mPrP、huPrP 與 haPrP)。

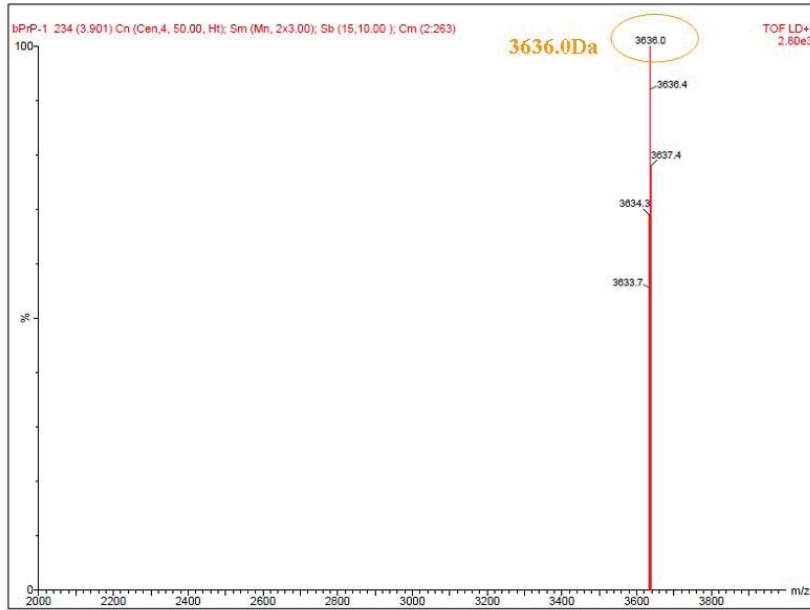
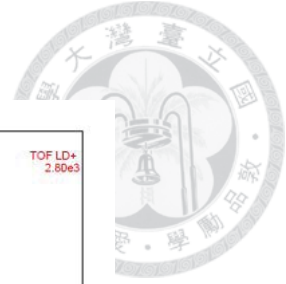
為了把合成好的胜肽從 resin 上切下 (cleavage)，將 resin 於室溫下用 trifluoroacetic acid (TFA) / water / 1,2-Ethanedithiol (EDT) / triisopropylsilane (TIS) 以 94 : 2.5 : 2.5 : 1 的比例攪動 2 小時。在反應過程中，胺基酸的側鏈保護基在此時會被沖洗下來，而在移除胺基酸側鏈保護基時會產生許多親核性的陽離子，此時需要 TIS、water 以及 EDT 來清除；除此之外，EDT 還可用來抑制經過酸催化之甲硫胺酸 (methionine) 所產生的氧化作用而造成的影響。當所有反應結束後，混合物會經由 G2 漏斗過濾，過濾後之液體直接加在 80 ml 預冷的 Methyl tert-Butyl Ether (MTBE) 中，G2 漏斗之孔徑大小為 10~15 μ m 能將 resin 留在漏斗，而胜肽於 MTBE 中沉澱出來。粗萃取的普立昂胜肽須再經過 10 $^{\circ}$ C、轉速 4750 rpm (約 3000 \times g) 離心 15 分鐘，此過程重複三次以移除 TIS、water、EDT、TFA 及其他雜質，將離心後之沉澱物置於真空中 1 小時使其乾燥，以備後續使用。

(2) 普立昂胜肽的純化與鑑定

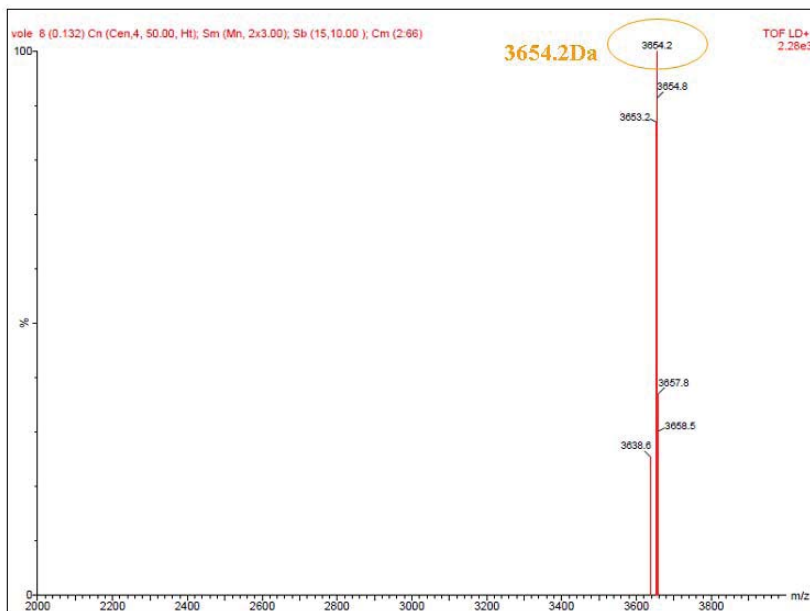
將乾燥的普立昂胜肽片段序列 108-144 溶在 50% 醋酸中並用 Millex-HV 0.45 μm (Cat. No. SLHV 013NL, 13 mm) 過濾，將粗過濾的普立昂胜肽再以逆相-高效液相層析 (reversed-phase high performance liquid chromatography, 簡稱 RP-HPLC) 進行純化。所使用的管柱為 VydacC18 column (218TP1010, 25 cm x 10 mm, Supelco, USA)。純化過程中，管柱進行梯度式 (gradient) 沖提，所使用的溶液分別為 Buffer A (含有 94.9% water / 5% acetonitrile / 0.1% TFA) 以及 Buffer B (99.9% acetonitrile / 0.1% TFA)，流速設定為 3 ml/min，層析過程以 UV_{275nm} 及 UV_{220nm} 之吸收值進行監測蛋白質。將被沖提出之普立昂胜肽溶液收集，再經由真空冷凍乾燥濃縮儀 (Heto, Denmark) 將其乾燥成粉末，即為純化完成的普立昂胜肽粉末，將之儲存於-20°C 冰箱，以利後續實驗使用。純化後之胜肽可利用基質輔助雷射脫附游離-時間式飛行質譜分析法 (matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry, 簡稱 MALDI-TOF MS) 偵測其分子量與純度。

先將純化後的普立昂胜肽粉末溶在 1% acetic acid、50% acetonitrile 水溶液中，之後再與 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) 基質水溶液 (10 mg/mL CHCA in 40 % acetonitrile and 0.1% TFA) 依等比例混合均勻，利用 TOF 測量出其分子量藉以鑑定普立昂胜肽之身分並評估純度。以下為質譜分析各合成之普立昂胜肽之結果：

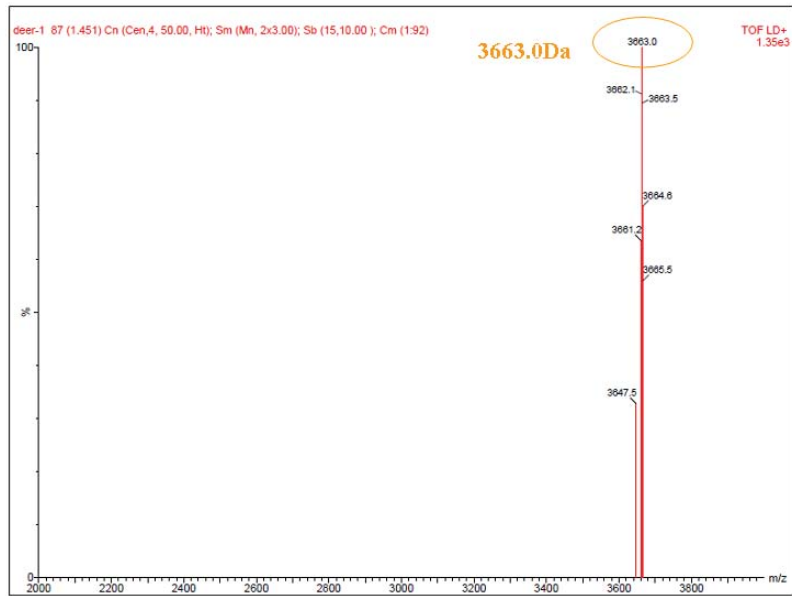
(a) bPrP



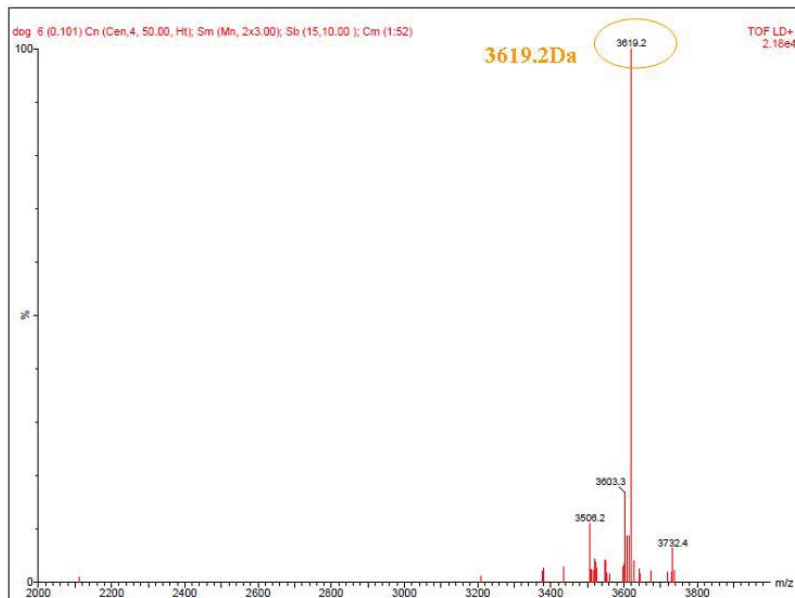
(b) bvPrP



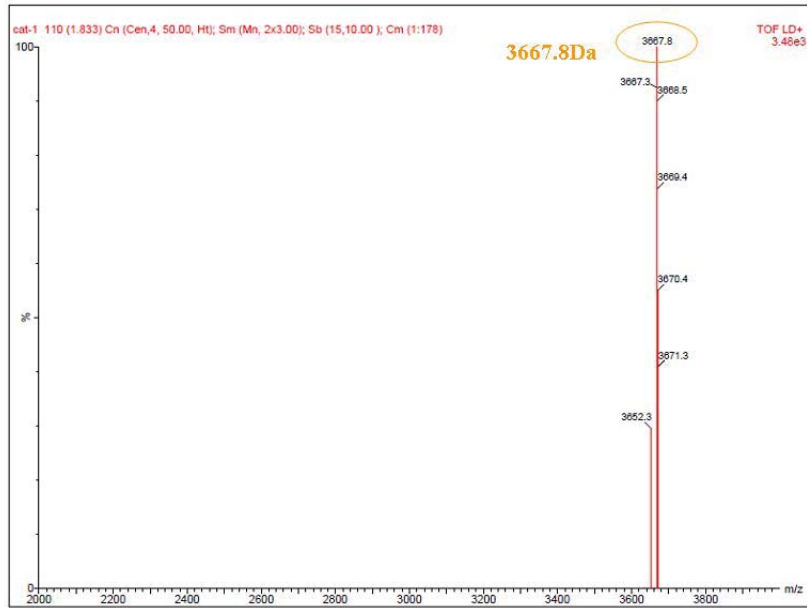
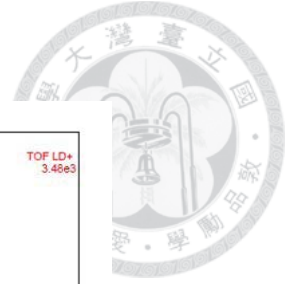
(c) mdPrP



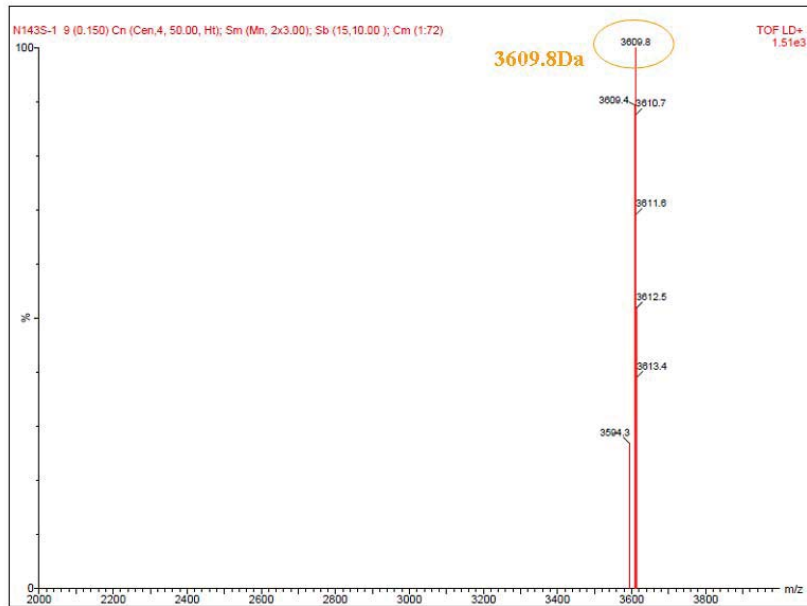
(d) dogPrP



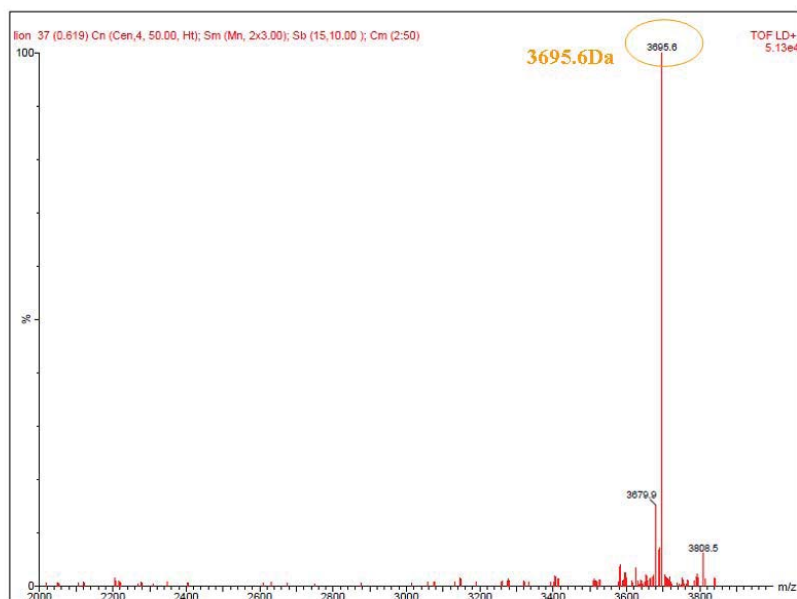
(e) catPrP



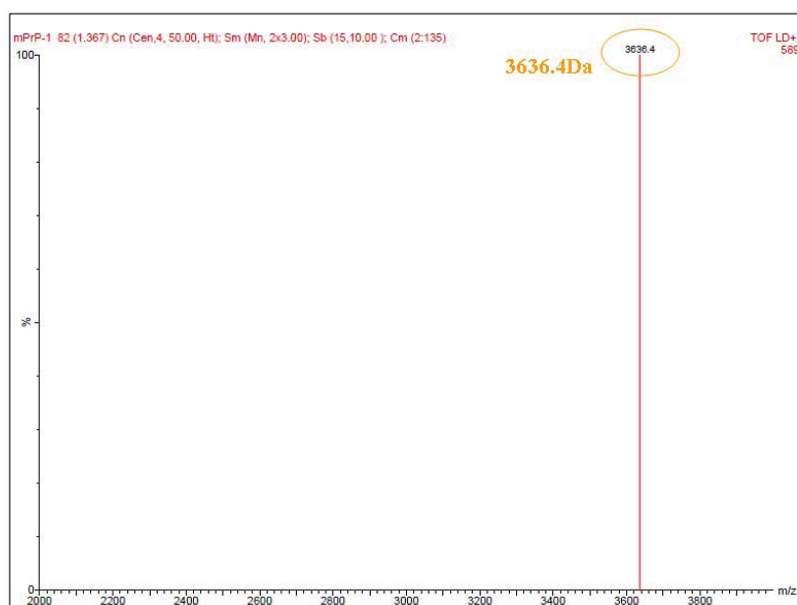
(f) pigPrP



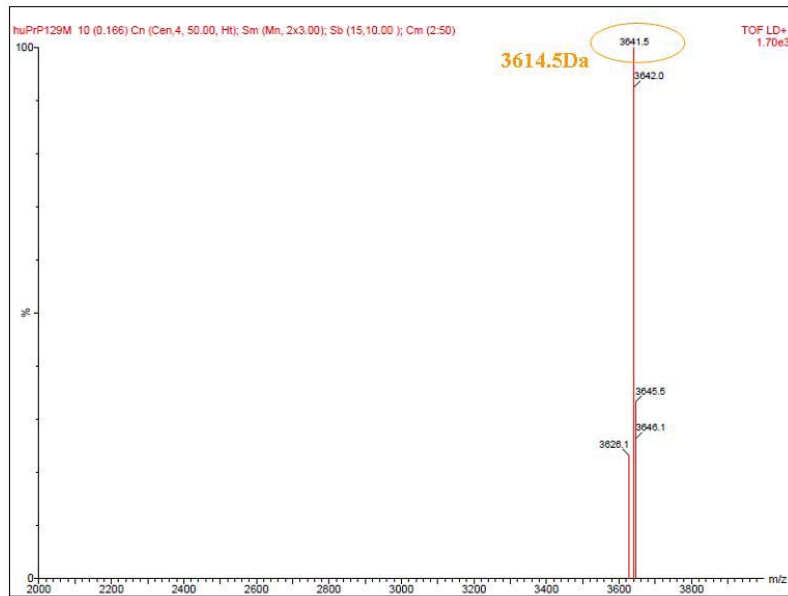
(g) lionPrP



(h) mPrP



(i) huPrP



(j) haPrP

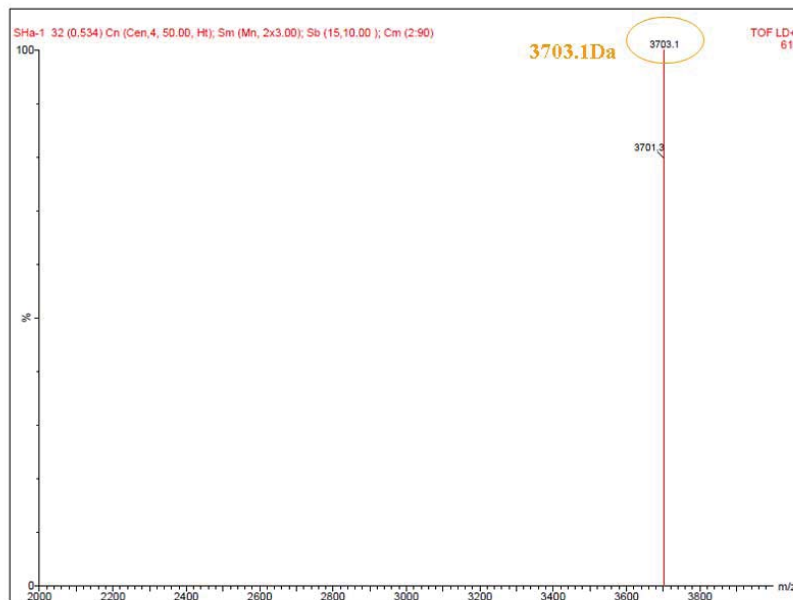


圖 2.2 以 MALDI-TOF MS 分析合成之各普立昂胜肽片段 108-144 之圖譜。圖譜中最高峰即為合成之各普立昂胜肽分子量，其理想分子量為：(a) bPrP 分子量

為 3638.791 Da (b) bvPrP 分子量為 3656.747 Da (c) mdPrP 分子量為 3665.802 Da (d) dogPrP 分子量為 3620.837 Da (e) catPrP 分子量為 3670.763 Da (f) pigPrP 分子量為 3611.78 Da (g) lionPrP 分子量為 3697.774 Da (h) mPrP 分子量為 3638.791 Da (i) huPrP 分子量為 3643.752 Da (j) haPrP 分子量為 3706.676 Da。

2.3.2 以圓二色光譜紀錄普立昂胜肽之類澱粉纖維形成

(1) 普立昂胜肽形成類澱粉纖維之時間進展 (time course)

為了觀察是否因為普立昂胜肽序列的差異而有不同的結構能量屏障 (conformational energy barrier)，使的普立昂單體無法順利進行構形轉變，進而導致不同的感染效率，因此觀察不同物種之普立昂胜肽自發性類澱粉 (amyloid fibril) 形成過程。由於普立昂胜肽形成類澱粉纖維的過程涉及蛋白質二級結構 (secondary structure) 的改變，因此可以使用圓二色光譜儀 (circular dichroism, CD) 來觀測類澱粉纖維的形成情形。將化學合成的普立昂胜肽培養在纖維培養液時，一開始結構會呈現無規則捲曲，而在類澱粉纖維形成時，結構會逐漸轉為 β -structure，此一現象可利用觀察 218 nm 附近光譜訊號。

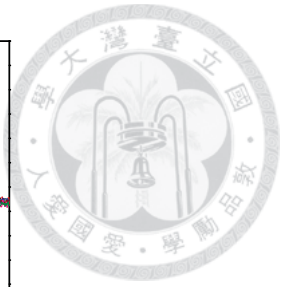
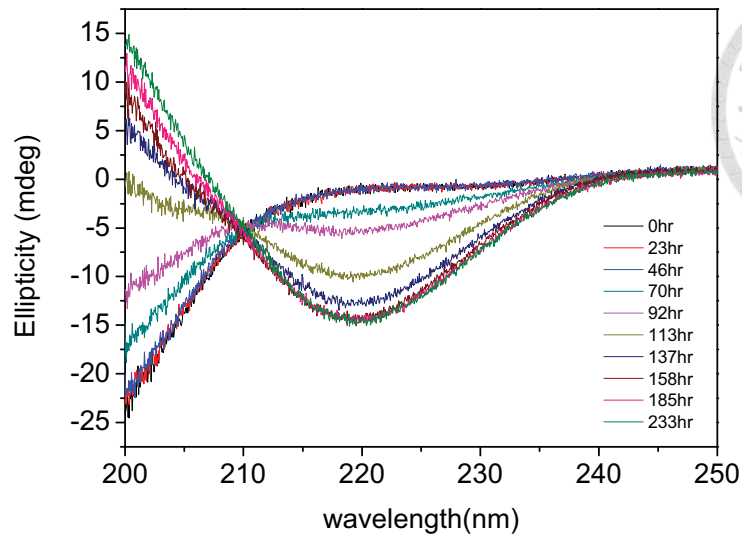


圖 2.3 利用 CD 光譜觀測 bPrP 形成類澱粉纖維的過程。普立昂胜肽在形成類澱粉過程時，結構會由原本的 random coil 轉變成 β -sheet 構形，而 CD 光譜訊號也會由最低點的 200 nm 轉移到 218 nm 的現象，特別針對 β -sheet 結構進行觀察，因此 218 nm 附近的訊號亦成為重要依據。

圓二色光譜 (CD) 主要是利用一個平面偏極光 (plane polarized light) 通過具有旋光性的物質，而此平面偏極光又可分解成右旋圓偏極光 (right circularly polarizes light) 及左旋圓偏極光 (left circularly polarized light)，當左右旋圓偏極光通過旋光性物質時其前進速度並不會相等因此造成不相等的吸收。圓二極光依據電子能階躍遷的不同可區分成遠紫外光範圍 (far-UV, 170-250 nm) 及近紫外光範圍 (near-UV, 250-350 nm)。遠紫外光主要係因蛋白質或胜肽醯胺 (amide) 為主要發色團，其波長範圍屬於 $n \rightarrow \pi^*$ 及 $\pi \rightarrow \pi^*$ ，可鑑定蛋白質二級結構，如 α -helix、 β -sheet 和 random coil 等， α -helix 結構的特徵是在波長 192 nm 附近會有一正吸收峰 (positive peak, 由 $(\pi \rightarrow \pi^*)$ perpendicular transition 造成)，而在波長 208 nm、222 nm 二處附近會有負吸收峰 (negative peak, 由 $n \rightarrow \pi^*$ transition 造成)； β -sheet 結構特徵是在波長 195 nm 附近會有一正吸收峰 (由 $\pi \rightarrow \pi^*$ transition 造成)，而在波長 218 nm 附近會有一寬廣的負吸收峰 (由 $n \rightarrow \pi^*$ transition 造成)；

至於無規則捲曲 (random coil) 之結構特徵則是在 195 nm 附近有一明顯的負吸收峰。近紫外光區之波長範圍主要是觀察此區段具有較強吸光係數的分子如胺基酸殘基中含芳香環的側鏈 (aromatic acid chain) 為主，通常用於鑑定蛋白質或胜肽的三級結構 (tertiary structure) 等分子立體特性¹¹²。

進行普立昂胜肽自發性類澱粉纖維形成實驗時，先將普立昂胜肽溶於去離子水中配置成 prion peptide stock solution (2×)，再與 fibril formation buffer (280 mM NaCl、40 mM NaOAc, pH3.7) 以等比例混合，得到最終的 prion peptide fibril formation solution。由於普立昂胜肽序列含有 1 個 Tyr，因此利用紫外光-可見光分光光譜儀在 UV_{275nm} 之吸光度進行定量，使普立昂胜肽最後濃度為 0.25 mg/ml (50 μM)。培養時，靜置於 25°C 培養箱中，在每個時間點進行測試前會先以微量吸管吸放溶液攪拌約 10 次，而後利用 CD 於每個時間點下觀察 218nm 變化的情形。測量時使用的石英比色槽為光徑 1 mm 的比色槽 (購自 Hellma)；室溫下掃描波長範圍自 200 nm 至 250 nm；相關參數設定：bandwidth 為 2 nm，scanning speed 為 20 nm/min，data spacing 為 0.05 nm。每次每一個樣品各二管，每管掃描 2 次，所得光譜結果為 2 次掃描後的平均值，之後利用 origin 軟體進行擬合 (fitting)，然後再計算出生長遲滯時間 (lag time)。由於每個樣品重複 4-8 次不等，因此將重複 4-8 次之 lag time 時間以 bPrP 為控制組進行 one-way ANOVA，計算出各普立昂胜肽的 lag time 與 bPrP 相比較是否有顯著差異 (significant difference)。分析數據時，尚需扣除纖維培養溶液所造成的背景光譜 (background spectrum)。

每一樣品之類澱粉纖維形成的 lag time 計算：隨時間變化之 218 nm (F) 的橢圓率 (ellipticity, mdeg) 對培養時間 (incubation time, t) 之 fitting 方程式，得到一非線性、二次方程式分析：

$$F = A + B / (1 + \exp[k(t_m - t)]) \quad (\text{equ 1})$$

A 代表在遲滯期時於 218 nm 偵測的橢圓率，B 代表在遲滯期一開始與最終平衡時的
最大差異，k 代表類澱粉纖維生成時的速率常數 (h^{-1})， t_m 表示不同的時間
點。

類澱粉纖維形成的生長遲滯期計算可利用下列方程式而得：

$$\text{lag time} = t_m - 2/k \quad (\text{equ 2})$$

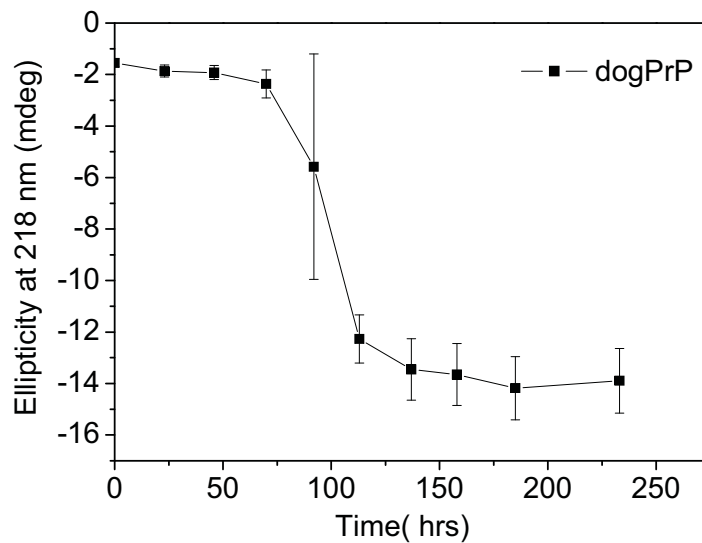


圖 2.4 利用 CD 觀測不同物種之普立昂胜肽類澱粉纖維形成之生長遲滯期。以
dogPrP 為例，在不同時間點下觀察普立昂胜肽於 218 nm 之變化情形，圖示之曲
線表示該樣品進行 2 次實驗後之光譜結果。

(2) 普立昂類澱粉纖維之晶種製備

為了進行引晶 (seeding) 實驗，必須先行置備晶種 (seed)。晶種製備：將

已經培養一段時間之普立昂纖維形成溶液 (fibril formation solution) 進行離心 (13200 × g, 室溫, 20 分鐘) 後, 移除上清液, 以去離子水使沉澱之纖維懸浮 (re-suspend) 並攪拌均勻, 此過程重複三次 (最後晶種溶液體積約 500 μl), 再以超音波打碎機 (Dr.Hielscher UP 100H ultraschallprozessor) 震碎纖維, 以獲得大小較為均一的纖維片段做為晶種。震碎纖維時, 使用 1 mm 微針探頭, 將打碎機功率調整為 40 %, 頻率為每秒鐘震 0.6 秒稱作 1 次, 5 次為 1 個循環 (cycle); 為避免溶液過熱, 每 1 個循環便暫停 5 秒, 將微針探頭移出纖維溶液外; 每一個普立昂胜肽之纖維溶液各執行 20 個循環。震碎之晶種需避免晃動並置於 4°C 冰箱隔夜後再進行引晶實驗, 進行引晶之晶種使用最多 4 天就需更換。普立昂晶種濃度則由原本普立昂纖維生成時所使用的普立昂單體 (monomer) 濃度估算。

(3) 普立昂胜肽之引晶實驗

進行引晶實驗時, 普立昂溶液 (prion solution) 含有濃度為 0.25 mg/ml 的普立昂單體以及 25 mM NaOAc、175 mM NaCl, pH3.7 以 1:1 混合, 之後將 50 μl 已經經過超音波打碎機震碎的晶種溶液加入原本的 prion solution 並利用微量吸管吸放約 5 次攪拌均勻, 使其最後濃度達 0.2 mg/ml, 若引晶時的晶種量少於 50 μl 時, 加水補滿。進行引晶實驗時, data pitch 為 5 秒, response 為 1 秒, band width 為 2.0 nm, 使用圓二色光譜觀察普立昂類澱粉纖維在 1 小時內於 218 nm 下變化情形。為避免時間過長導致 fiber 形成而影響數據判讀, 一開始的延長速率 (elongation rate) 是利用 origin 軟體以 linear fitting 方式 fitting 前 2000 秒。

(4) 評估牛與其他物種間之種族屏障 (species barrier)

許多物種會受到 BSE 感染而罹患 TSE 疾病, 為了找出 BSE 感染其他物種之影響, 嘗試將不同量之牛普立昂胜肽 (bPrP) 晶種溶液加入其他普立昂胜肽溶液, 從引晶屏障來觀察當以 bPrP 為晶種時, 對其他普立昂胜肽類澱粉纖維形成之動

力學影響，藉以評估 bPrP 與其他普立昂胜肽間之種族屏障。製備單體普立昂胜肽溶液、類澱粉纖維溶液以及測量種族屏障方式如前述。



(5) 評估北美大角鹿與其他物種間之種族屏障

在北美地區曾經爆發大規模的 CWD，而北美的獵人有食用鹿肉的習慣，雖然目前並未發現有人因食用鹿肉而感染 TSE 疾病，然為了找出 CWD 對人類與其他物種的影響，因此以 mdPrP 為晶種，加入其他普立昂胜肽溶液，從引晶屏障來觀察當 mdPrP 存在時，對其他普立昂胜肽類澱粉纖維形成之動力學影響。藉以評估 mdPrP 與其他普立昂胜肽間之種族屏障。製備單體普立昂胜肽溶液、類澱粉纖維溶液以及測量種族屏障方式如前述。

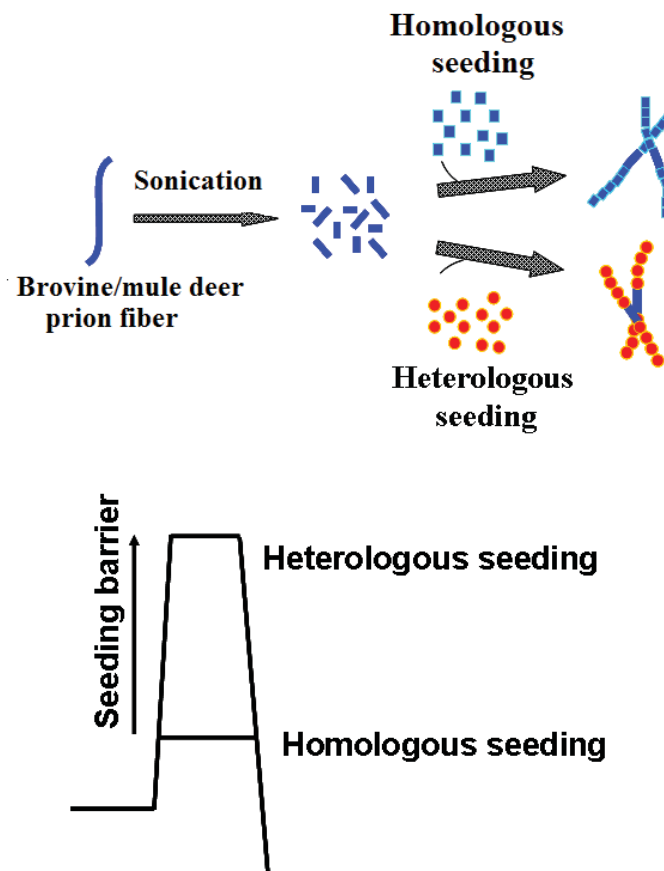


圖 2.5 分別以 bPrP 與 mdPrP 為晶種進行引晶。將牛普立昂胜肽 (bPrP) 與北美

大角鹿普立昂胜肽 (mdPrP) 養成類澱粉纖維後，經超音波打碎當作晶種加入各普立昂胜肽進行引晶，當晶種與被加入的普立昂單體相同時 (homologous seeding)，熱力學較穩定因此引晶屏障低，反之 (heterologous seeding) 則引晶屏障較高。

2.3.3 以高效液相層析儀進行熱力學溶解度的分析

將普立昂胜肽濃度標準品 (50 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M) 注入 HPLC，並將之層析圖譜繪製出校正曲線後，再將已培養一段時日 (3 星期, 25°C) 之普立昂纖維形成溶液 (fibril formation solution) 之上清液 (在室溫下進行離心 13200 \times g, 30 分鐘) 置放於 HPLC 自動樣品注入器 (autosampler) 中，依序注入管柱中進行分析，系統將依據設定的 Buffer B (99.9% acetonitrile / 0.1% TFA) 的梯度，將普立昂胜肽沖洗出來。之後再積分計算出普立昂纖維溶液之上清液中 PrP^{Sc} 單體 (amyloid-precursor state) 的濃度。

2.3.4 以穿透式電子顯微鏡觀測普立昂蛋白類澱粉纖維纖維形態

經過培養後形成的普立昂蛋白類澱粉纖維，可利用穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM) 來觀察其形態 (morphology)。樣品製備於 formvar-carbon coated 300-mesh copper grid 上，使用前先進行數分鐘 recharge 動作，以利樣品附著；首先將纖維試樣溶液滴在 grid 上並靜置約 3 分鐘，使纖維能吸附其上，再以約 200 μ l 過濾之去離子將試樣溶液沖洗去除，並以濾紙將多餘水分吸乾，之後再將過濾後之 2 % uranyl acetate 滴於 grid 上，避光染色約 3 分鐘，而後以濾紙吸除染劑，此即為負染色動作 (negative stain)；最後將樣品置於有蓋容器中，室溫下隔夜乾燥後即可以 TEM 觀察。使用中研院細胞與個體生物研究所之穿透式電子顯微鏡 (Hitachi H-7000) 進行觀察。

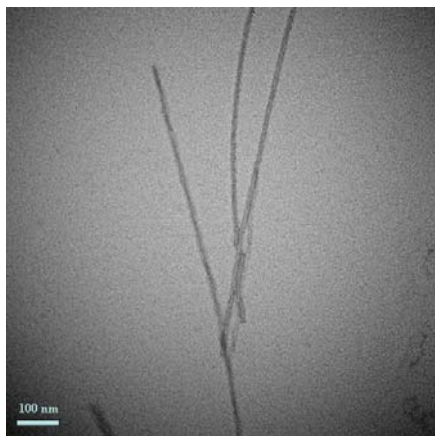


圖 2.6 電子顯微鏡底下顯示化學合成之人類普立昂胜肽 (huPrP) 片段序列。huPrP 多呈直線、未分叉，較少扭轉 (twister) 現象。

2.3.5 細胞存活檢測 (MTT cell viability assay)

利用粒線體中琥珀酸去氫酶之作用將 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 之 tetrazolium 轉為藍色之產物 MTT formazan。MTT 轉變僅在存活細胞中進行並堆積在細胞內，加入酸性的異丙酮 (acidified isopropanol) 溶解後，可由波長 570 nm 下讀取其吸光度並定量。

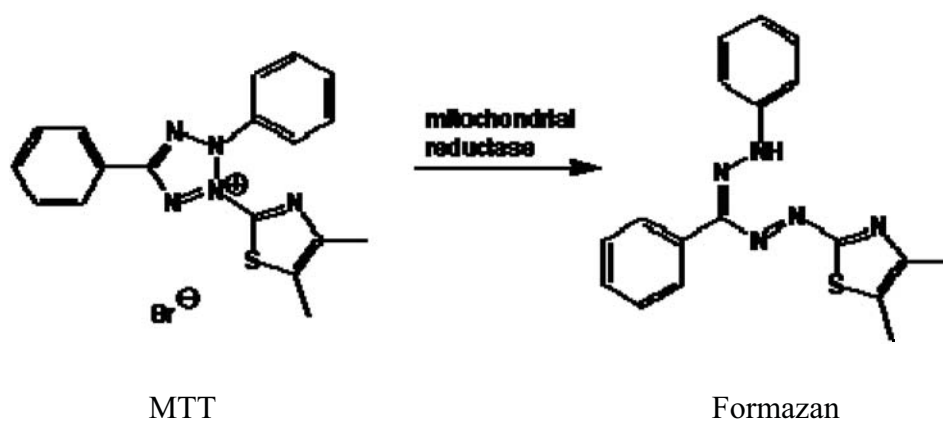


圖 2.7 MTT 作用機制。MTT 經過粒線體還原酶作用後會形成 Formazan。

本實驗所選用的細胞為小鼠神經纖維母細胞 (N2a)。小鼠纖維母細胞株培養於含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum) 及 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培養液，放置於含 5% CO₂、37°C 恆溫培養箱中培養。進行細胞存活檢測時的步驟：利用 trypsin 將細胞切下，加入不含胎牛血清之 DMEM 使其懸浮，計算一定的細胞數 (3.5×10^5 cell/ml) 後分裝到 96 well 培養皿 (使每個 well 有 100 μ l 細胞溶液)，將細胞培養於 5% CO₂、37°C 恆溫培養箱中培養 24 小時使細胞貼盤，由於 DMEM 已不含胎牛血清，因此細胞不再分化。經過 24 小時後，取出培養液，在每個 well 內加入 100 μ l 溶於 DMEM (不含胎牛血清) 的 peptide solution，然後在含有 5% CO₂、37°C 恆溫培養箱中培養 48 小時，之後利用 MTT 進行細胞存活檢測。在第四天時，將欲檢測之 96-well plate，加入 10 μ l/well 之 MTT 溶液，放入細胞培養箱中培養 4 小時，取出 96-well plate 小心地抽乾黃色的 MTT 溶液且盡可能不抽走細胞及 MTT 結晶，之後加入 100 μ l 酸性異丙酮溶液 (含有 90% isopropanol, 0.5% SDS 以及 40 mM HCl)，盡可能 pipette 使 MTT 結晶完全溶解擴散均勻，時間不可過久，使 MTT 結晶完全溶解成紫色，之後利用 ELISA reader 以 570 nm 波長讀取其吸光值。細胞存活率的計算是以不含任何胜肽只含 buffer 那個 well 的吸光值為控制組，各個胜肽占控制組的比例乘以 100% 即為細胞存活率，藉此觀測各物種普立昂胜肽的毒性。

Peptide solution 的製備：先將各普立昂胜肽和滅菌水配製成 600 μ M stock solution，再將此 stock solution 和 fibril formation solution (280 mM NaCl、40 mM NaOAc, pH3.7) 以等比例混合即為 peptide solution，之後取 100 μ l peptide solution 加入 900 μ l 的 DMEM 中，使 peptide 最終濃度為 30 μ M，在室溫下以轉速 50 rpm 速度搖動 24 小時後，就可加入 96-well plate。

MTT solution 的製備：以磷酸緩衝液 (PBS) 將 MTT 配製成 5 mg/ml，於 4 °C 下避光保存。

第三章 結果與討論



3.1 胺基酸殘基在類澱粉纖維形成中所扮演的重要角色

不同的普立昂胜肽會有不同的類澱粉形成動力學。先前研究指出，普立昂蛋白序列 106-147 是主要發生構形轉變，並且能夠堆疊成類澱粉纖維的區域。因此我們合成多種普立昂胜肽，其序列的差異以牛普立昂胜肽 (bPrP) 為基準，與其對應不同之胺基酸殘基，分別為一個、二個或是三個胺基酸殘基之不同(表 3.1)，觀察是否因為序列差異影響類澱粉形成進而對引晶效率造成影響。

	108	109	112		129	135	138	139	143	144
bPrP										
bvPrP									M	
mdPrP									N	
dogPrP						L				
catPrP			M							
pigPrP									S	D
lionPrP			M						N	
mPrP		N								M
huPrP			M						I	S
haPrP			M						M	M

表 3.1 與牛普立昂胜肽片段相比較之其他物種胺基酸序列。錢鼠、北美大角鹿、小鼠、人類、倉鼠之普立昂胜肽序列分別命名為 bvPrP、mdPrP、mPrP、huPrP 與 haPrP。紅色表示加速類澱粉纖維的形成、綠色表示延遲類澱粉纖維的形成、藍色表示對類澱粉纖維的形成無太大影響。

利用不同的橢圓率與時間對普立昂胜肽做圖，可得一類澱粉纖維形成動力圖。

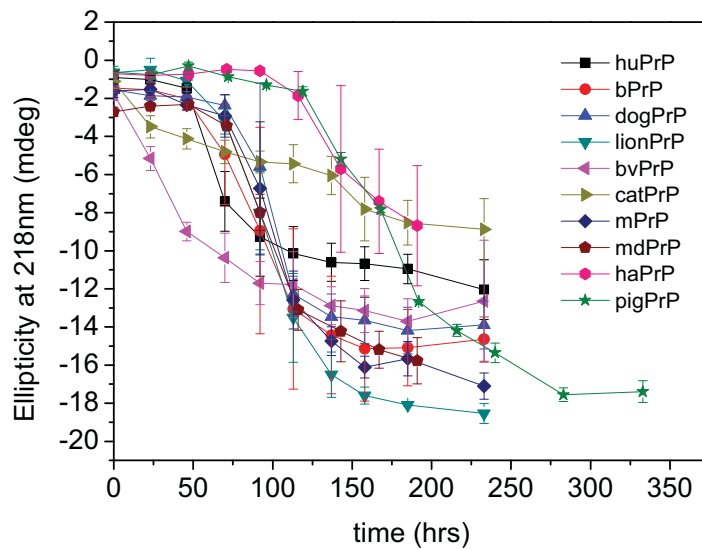
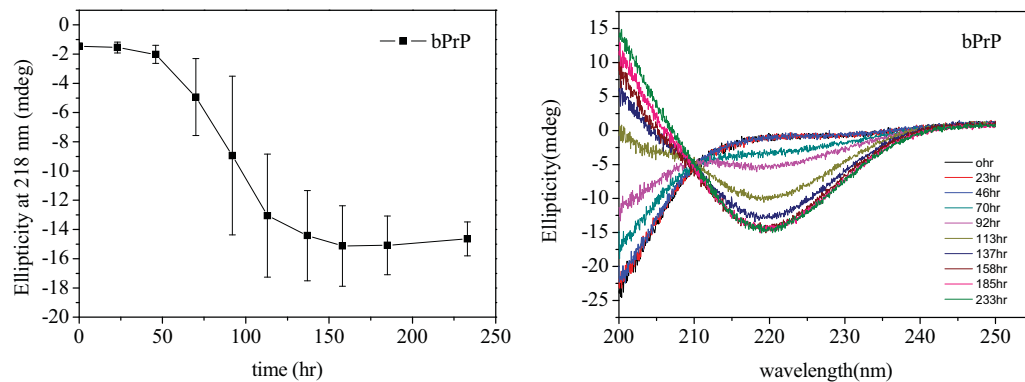


圖 3.1 普立昂胜肽在自然情況下形成類澱粉纖維的情形。生長遲滯期比 bPrP 短的是 catPrP 與 bvPrP，生長遲滯期比 bPrP 長的為 haPrP 與 pigPrP，其餘普立昂胜肽之生長遲滯期與 bPrP 相差不多。圖為 CD 光譜掃描 2 次後之平均值結果。

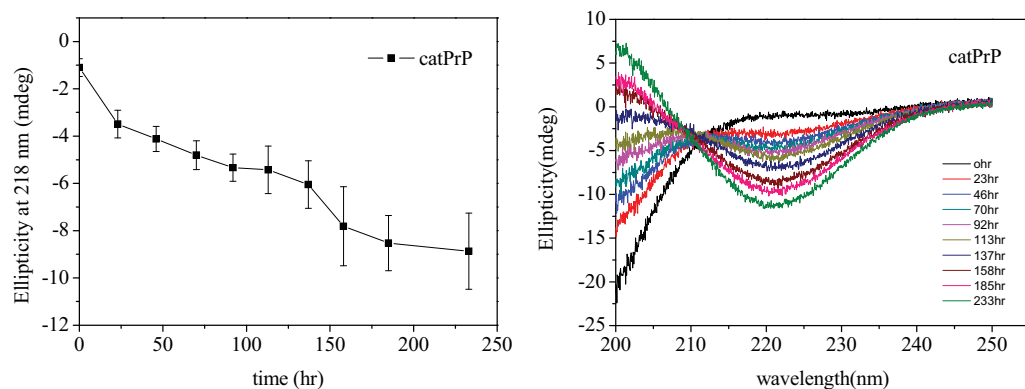
在此次實驗條件下，普立昂胜肽生長遲滯期最長的是倉鼠（118.9 小時），最短的是錢鼠（42.3 小時），而貓則是無法找出生長遲滯期。這些物種中，和 bPrP 有 1 個胺基酸不同的物種分別是貓（112 位置的 Val→Met）、狗（129 位置的 Met→Leu）、北美大角鹿（135 位置的 Ser→Asn）、錢鼠（138 位置的 Leu→Met）與豬（143 位置的 Asn→Ser）（圖 3.1）。bPrP 生長遲滯期約 61.1 小時，當從單體形成類澱粉纖維過程（二級結構從 random coil 變成 β -sheet）時，其 CD 光譜圖形會交會在同一點（圖 3.2a）。當 catPrP 溶解在緩衝溶液時會立刻開始形成類澱粉纖維，但其橢圓率每天變化幅度並不大，因此不易觀測到生長遲滯期，是所有物種中橢圓率變化幅度最小的（圖 3.2b）。dogPrP 生長遲滯期約 71.4 小時，較 bPrP 稍長（圖 3.2c）。pigPrP 生長遲滯期在所有物種中為次長的，約 117.8 小時，

可見當胺基酸 143 位置由 Asn→Ser 時會嚴重影響此胜肽形成類澱粉纖維的能力 (圖 3.2d)。當 bvPrP 溶解在緩衝溶液中，觀察第一天的橢圓率發現變化幅度很大 (橢圓率變化幅度 $-1.7 \text{ mdeg} \rightarrow -5.1 \text{ mdeg}$)，意味 bvPrP 在第一天即開始形成類澱粉纖維，雖然 catPrP 也是第一天即開始形成類澱粉纖維 (橢圓率變化幅度 $-1.1 \rightarrow -3.4$)，但 bvPrP 和 catPrP 不同點在於，bvPrP 的橢圓率變化幅度較大且明顯，檢視存在類澱粉生長溶液中單體的含量發現，catPrP 與 bvPrP 之殘存單體濃度各為 $1.65 \mu\text{M}$ 以及 $1.39 \mu\text{M}$ (圖 3.2e)。mdPrP 類澱粉纖維生成之遲滯期約 72.2 小時，較 bPrP 稍長 (圖 3.2f)。由這些胜肽的比較可知，即使只有一個胺基酸的不同，如: 112 位置由 V→M (catPrP)、138 位置由 L→M (bvPrP) 也會大幅縮短類澱粉纖維形成的遲滯期，而 135 位置由 S→N (mdPrP)、129 位置由 M→L (dogPrP) 及 143 位置由 N→S (pigPrP) 則會延長類澱粉纖維形成的遲滯期。

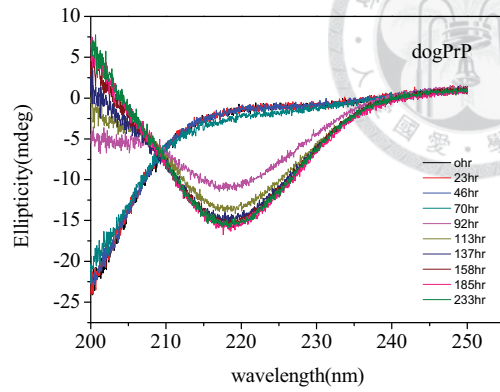
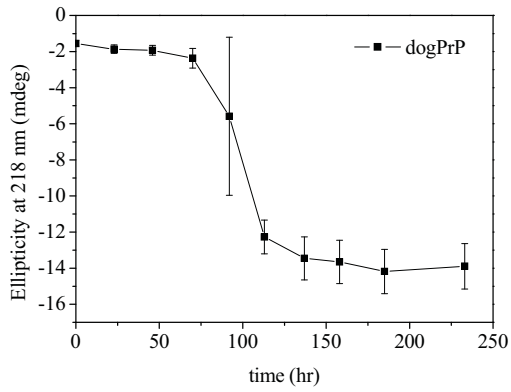
(3.2a)



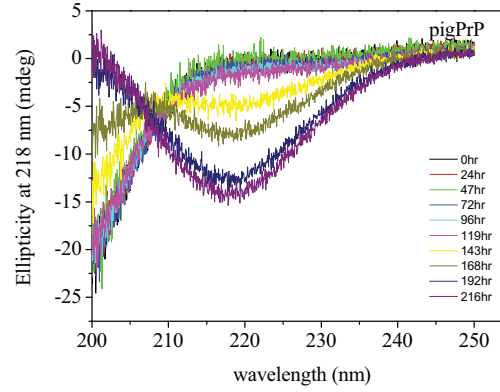
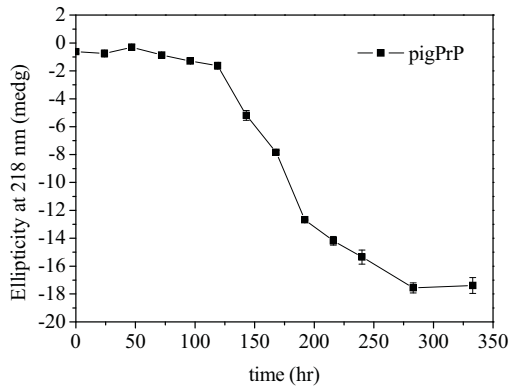
(3.2b)



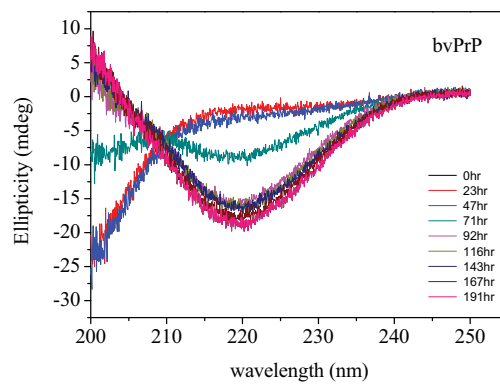
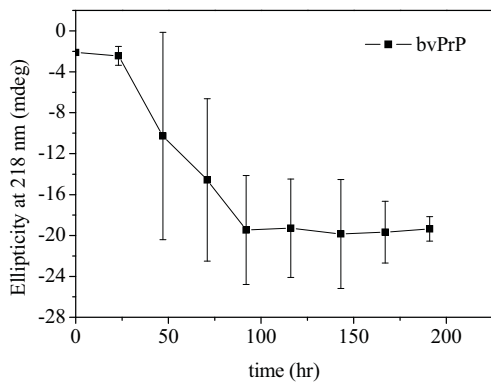
(3.2c)



(3.2d)



(3.2e)



(3.2f)

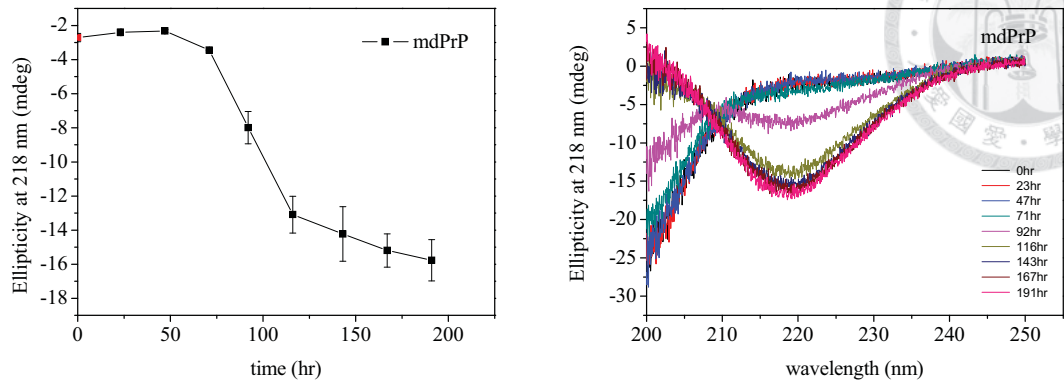
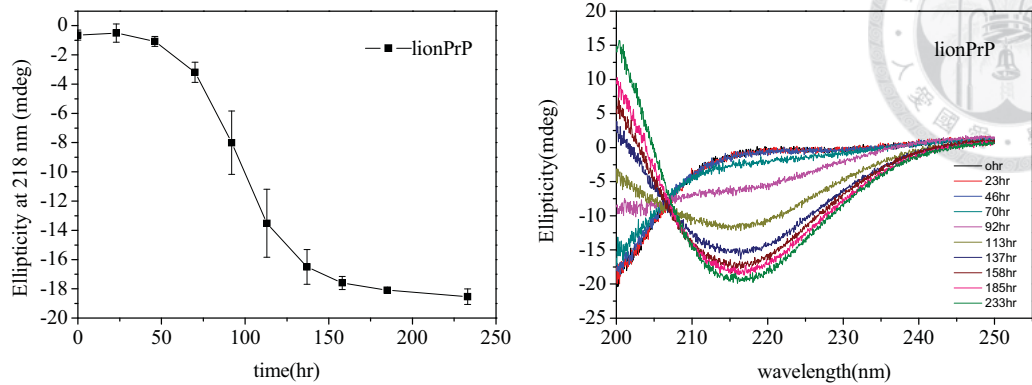


圖 3.2 與 bPrP 相差一個胺基酸之物種（貓、狗、豬、錢鼠、北美大角鹿）普立昂胜肽形成類澱粉過程之圓二極光遠紫外光（far-UV CD）光譜。左圖表示隨時間不同觀察 218 nm 變化，樣品進行 2 次實驗後之光譜結果，右圖表示樣品隨時間變化，普立昂胜肽結構會由 random coil 轉變為 β -sheet，掃描波長範圍自 200 nm 至 250 nm。

獅子、小鼠是與 bPrP 片段序列 108-144 相差二個胺基酸的物種，lionPrP 與 bPrP 的差異在於，原本 112 位置的 Val \rightarrow Met，以及 135 位置的 Ser \rightarrow Asn，當這兩個變異單獨存在時，112 位置由 V \rightarrow M 是促進類澱粉纖維的形成而 135 位置由 S \rightarrow N 則是延遲類澱粉纖維形成，因此當兩者同時出現時會使 lionPrP 的遲滯期與 bPrP 相近，可見不同位置胺基酸的變異對胜肽類澱粉形成的效應有相互影響的效力（圖 3.3a）。將 bPrP 序列 108-144 區間 109 位置的 Met \rightarrow Leu，138 位置的 Leu \rightarrow Met 即是 mPrP，mPrP 生長遲滯期約 65.5 小時，與 bPrP 生長遲滯期相近。將 bPrP 與 mPrP 序列相比較發現剛好是 109 位置與 138 位置的胺基酸互換，所以整體來說胜肽的疏水性（hydrophobic）是一樣的（圖 3.3b）。

(3.3a)



(3.3b)

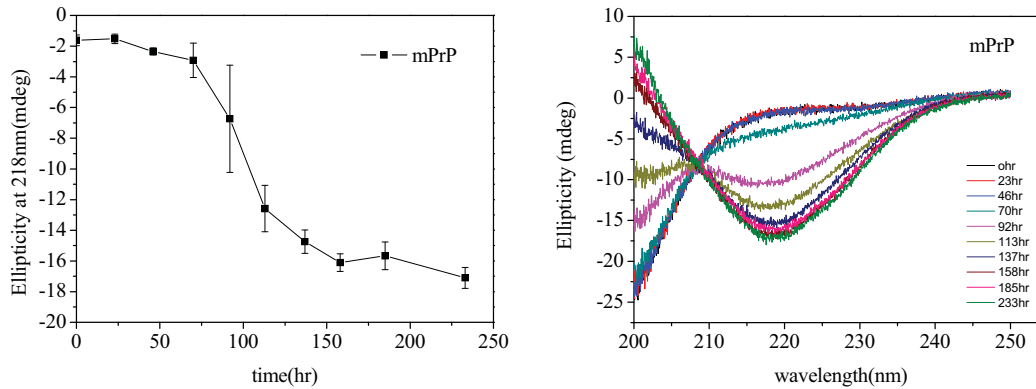


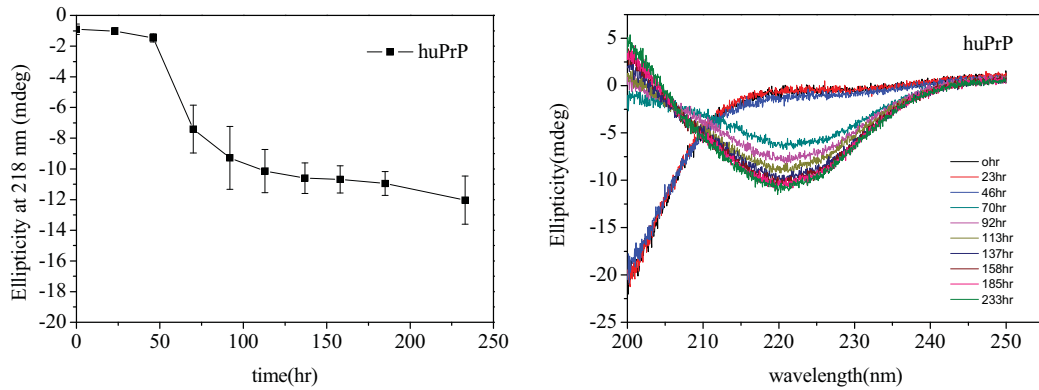
圖 3.3 與 bPrP 相差二個胺基酸之物種（獅子、小鼠）形成類澱粉過程之圓二極光遠紫外光 (far-UV CD) 光譜。左圖表示隨時間不同觀察 218 nm 變化，樣品進行 2 次實驗後之光譜結果，右圖表示樣品隨時間變化，普立昂胜肽結構會由 random coil 轉變為 β -sheet，掃描波長範圍自 200 nm 至 250 nm。

與 bPrP 序列 108-144 區間相差三個胺基酸的物種有人類及倉鼠，huPrP 分別是 112 位置的 Val \rightarrow Met、138 位置的 Leu \rightarrow Ile、143 位置的 Asn \rightarrow Ser，當 112 位置由 V \rightarrow M 時會加速成核步驟因此造成遲滯期的縮短，但當 143 位置由 N \rightarrow S 時會延遲核步驟使遲滯期延長，而 138 位置由 L \rightarrow I 則對生長遲滯期無太大影響，因此加成起來的效果使的 huPrP 遲滯期與 bPrP 相近 (圖 3.4a)。haPrP 分別是 112

位置的 Val→Met、138 位置的 Leu→Met、以及 139 位置的 Ile→Met，當 V112→M，L138→M，I139→M 時，會使得遲滯期稍微延長至 118.9 小時（圖 3.4b）。



(3.4a)



(3.4b)

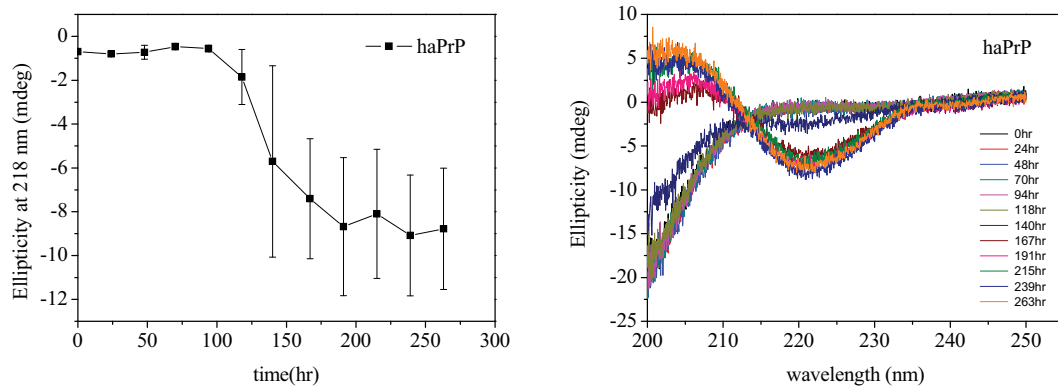


圖 3.4 與 bPrP 相差三個胺基酸之物種，其普立昂胜肽形成類澱粉過程之圓二極光遠紫外光 (far-UV CD) 光譜。左圖表示隨時間不同觀察 218 nm 變化，樣品進行 2 次實驗後之光譜結果，右圖表示樣品隨時間變化，普立昂胜肽結構會由 random coil 轉變為 β -sheet，掃描波長範圍自 200 nm 至 250 nm。

我們將上述普立昂胜肽區分成下列幾項觀察，比較同為齧齒類的普立昂胜肽生長遲滯期發現，生長遲滯期長短為 haPrP > mPrP > bvPrP (分別為 118.9 小時、

65.5 小時以及 42.3 小時) (表 3.2)。mPrP 與 bvPrP 二者只有在胺基酸 109 的位置不同，依據文獻記載，若將 bvPrP 胺基酸 109 位置置換成 Leu 或 Ile 皆會影響潛伏期 (incubation time) (利用細胞表現錢鼠 wild-type 與 mutated PrP^C 後，以免疫沉澱法收集 ³⁵S 標誌之錢鼠 PrP^C 與 scrapie 於活體外進行培養，發現錢鼠的 M109 位置突變成 Leu 或 Ile 時，scrapie 誘導 PrP^C 結構改變的時間較長)^{113; 114}，因 mPrP 在 109 的位置胺基酸殘基為 Leu，所以使得其生長遲滯期較 bvPrP 長。而從實驗得知，若是 bPrP139 位置由 Ile→Met (命名為 bPrPI139M) 會使生長遲滯期延長許多，因此造成 haPrP 生長遲滯期較 bvPrP 長的原因，比較 mPrP 與 haPrP 生長遲滯期，因為 haPrP 受到 139 位置 Met 的影響，所以生長遲滯期亦較 mPrP 為延長。而若是將 109 位置置換成 Val 時 (命名為 bPrPM109V)，雖然 Val 與 Leu 同是疏水性胺基酸，然而比較整體胜肽發現，bPrPM109V 的疏水性較 mPrP 大，因此造成其生長遲滯期較 mPrP 長 (亦較 bPrP 長) (實驗室助理廖苔言提供)。

Peptide	sequence			lag time (hr)
	109	112	138 139	
mPrP	NLKHVAGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAMSRP MIHFGND	65.5
haPrP	NMKHMAGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAMSRP MMHFGND	118.9
bvPrP	NMKHVAGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAMSRP MIHFGND	42.3
bPrPI139M	NMKHVAGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAMSRP LMHFGND	214.9
bPrPM109V	NVKHVAGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAMSRP LIHFGND	83.3

表 3.2 比較 mPrP、haPrP、bvPrP、bPrPrM109V 與 bPrPI139M 之 108-144 胺基酸序列與生長遲滯時間。胺基酸的位置與其屬性會影響胜肽的生長遲滯期長短。

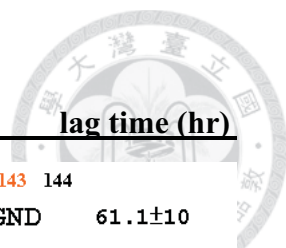
比較貓科類的 lionPrP 與 catPrP 遲滯期時發現，二者胜肽的差異僅有 1 個胺基酸不同，lionPrP 在 135 胺基酸殘基位置為 Asn，而 catPrP 在同樣位置則是 Ser，比較在 135 位置同樣是 Asn 的 mdPrP 發現，112 的位置由 V→M 會縮短生長遲滯期，而 135 的位置由 S→N 會延遲類澱粉纖維的形成，當兩者同時存在會使得

生長遲滯期中和，因此 lionPrP 的生長遲滯期與 bPrP 相近（表 3.3）。

Peptide	sequence				lag time(hr)
	112		135		
catPrP	NMKH M AGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAMSRP	LIHFGND	N.D
lionPrP	NMKH M AGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAM N RP	LIHFGND	51.2
mdPrP	NMKH V AGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAM N RP	LIHFGND	72.2

表 3.3 比較 catPrP、lionPrP 與 mdPrP 之 108-144 胺基酸序列與生長遲滯時間。mdPrP 之 135 位置為 S→N，其生長遲滯期略長於 bPrP；catPrP 之 112 位置為 V→M，其生長遲滯期無法偵測，而 lionPrP 之 112 位置 V→M，135 位置 S→N，所以其生長遲滯期略短於 bPrP。

綜合以上所述，當 109 位置改成為疏水性的胺基酸如 Leu、Val（物種分別為 mPrP 與 bPrPM109V）時，物種的生長遲滯期和 bPrP 相差不多；當 112 位置換成親水性的 Met（如 catPrP）時，會縮短生長遲滯期；當 129 位置置換成疏水性的 Leu、Val（物種分別是 dogPrP、bPrPM129V）時，生長遲滯期會比 bPrP 稍微延長（分別為 71.4 小時、57.9±26.3 小時）；而 134 位置突變成 Val 時，生長遲滯期和 bPrP 相近（約 55.2 小時），當 135 換成 Asn 時會使生長遲滯期延長（如 mdPrP），但此改變會受其他位置胺基酸（Met112）的影響，因此當普立昂胜肽帶有 Met112 時，生長遲滯期就不會延長（如 lionPrP）；同樣的 138 位置若是較為親水性的 Met（如 bvPrP、mPrP、haPrP），理應生長遲滯期也隨之縮短（如 bvPrP），但若有其他位置胺基酸存在（Leu109、Met112），生長遲滯期仍會受影響（如 mPrP、haPrP）；139 位置的 Met 會使生長遲滯期延長很多（如 bPrPI139M），同樣的效果亦易出現在 143 位置的 Ser（如 pigPrP），但是若序列出現 Met112 的話，則會打破此項規則。



Peptide	sequence							lag time (hr)	
	108	109	112		129	135	138 139 143	144	
bPrP	NMKHVAGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAMSRP	LIHFGND					61.1±10
bvPrP	NMKHVAGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAMSRP	MIHFGND					42.3±13.5
mdPrP	NMKHVAGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAMNRP	LIHFGND					72.2±5.5
dogPrP	NMKHVAGAAA	AGAVVGGLGG	YLLGSAMSRP	LIHFGND					71.4±12
catPrP	NMKHMAGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAMSRP	LIHFGND					N.D
pigPrP	NMKHVAGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAMSRP	LIHFGSD					117.8±1.5
lionPrP	NMKHMAGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAMNRP	LIHFGND					51.2±14.3
mPrP	NLKHVAGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAMSRP	MIHFGND					65.5±6.8
huPrP	NMKHMAGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAMSRP	LIHFGSD					61.8±8.4
haPrP	NMKHMAGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAMSRP	MMHFGND					118.9±4.9

表 3.4 化學合成之普立昂胜肽之生長遲滯時間。以 bPrP 序列與生長遲滯時間為基準，各普立昂胜肽之比較。以 haPrP 為例，與 bPrP 相差 3 個胺基酸 (V112M、L138M、I139M)，生長遲滯期最長；而 catPrP 與 bPrP 相差 1 個胺基酸 (V112M)，生長遲滯期無法偵測 (N.D: not-detectable)。紅色表示加速類澱粉纖維的形成、綠色表示延遲類澱粉纖維的形成、藍色表示對類澱粉纖維的形成無太大影響。

3.2 物種間種族屏障及普立昂疾病跨種傳染的評估

正常 PrP^C 轉變為 PrP^{Sc} 在同種不同部位、或不同種動物可能產生不同之影響，因此種族屏障 (species barrier) 可以解釋為何一種動物的異常 PrP 較難引起另一種系動物之普立昂疾病，為了研究種族屏障與不同種動物的普立昂蛋白胺基酸序列差異的關係，因此利用晶種滴定方法 (seed titration method) 量化出不同物種間普立昂疾病的感染屏障。

3.2.1 引晶對類澱粉纖維形成的影響

類澱粉纖維的形成過程依時間先後可分為三個時期：(1) 遲滯期，此時單

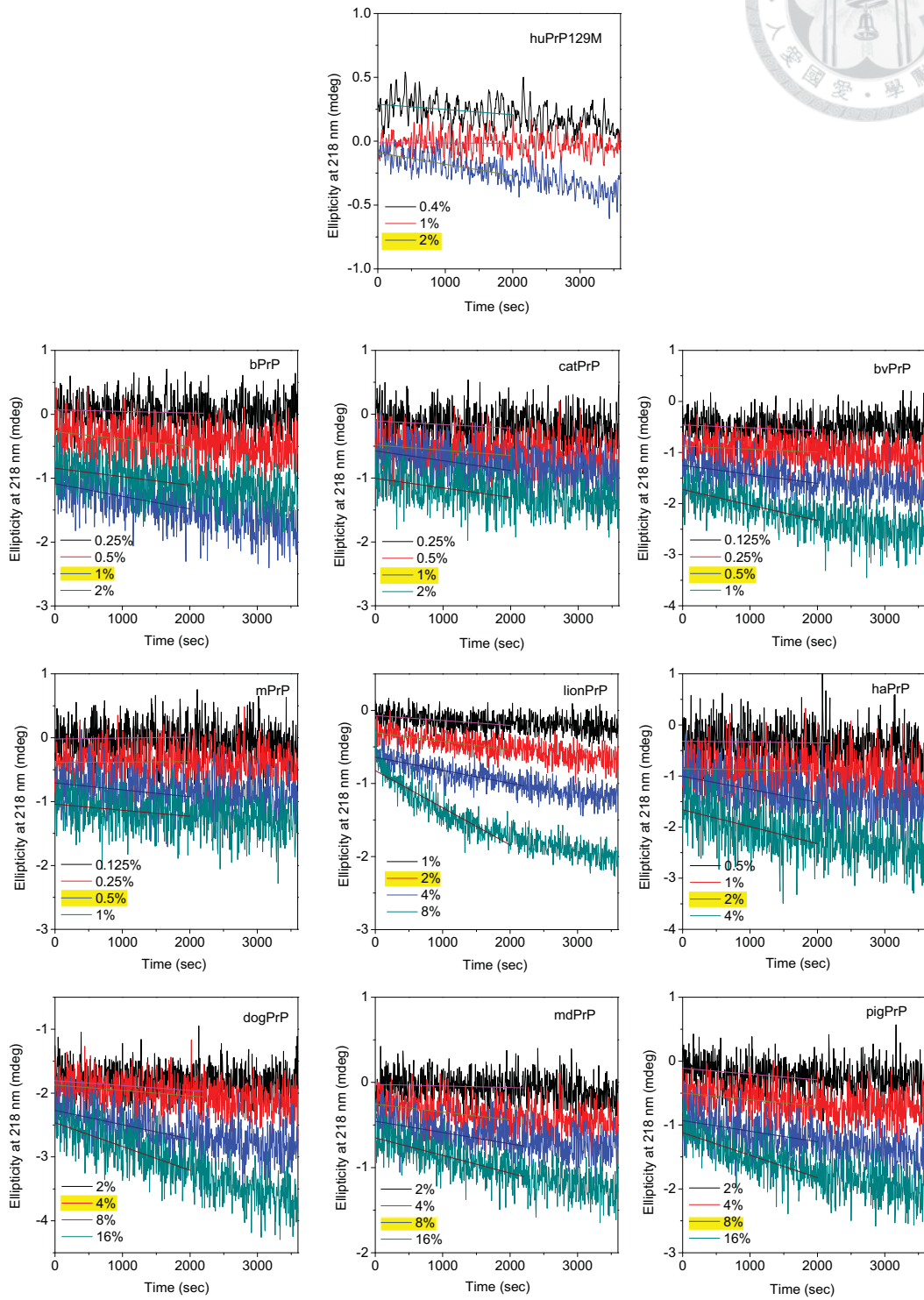
體分子正在形成晶核 (nucleus); (2) 延長期, 此時其他單體分子快速在晶核上進行聚合, 形成較長的類澱粉纖維; (3) 平衡期, 此時類澱粉纖維之形成與分解速率約略相等 (Harper and Lansbury, 1997)。由普立昂自發性類澱粉纖維形成的結果得知 (圖 3.2), 因為遲滯期的不同, 各物種之類澱粉纖維形成時間從 30 小時至 200 小時不等, 因此若在培養初期使用外加晶種進行引晶 (seeding) 則可縮短晶核形成的遲滯期長度, 使類澱粉纖維更快進入延長期。為了觀測種間序列差異對於引晶效率的影響, 我們比較各物種加入晶種後之類澱粉纖維形成動力學進而評估普立昂傳染之種族屏障。本實驗取已培養 1 個月以上, 進入平衡期的牛普立昂朊肽作為晶種, 先以超音波震碎儀將培養一段時間之牛普立昂朊肽震為較小片段以增加晶種 (seed) 數量後, 置入其他物種之普立昂朊肽溶液, 使用圓二色光譜觀察普立昂類澱粉纖維在 1 小時內所形成之動力學。

由於使用不同數量之晶種, 為了比較方便, 因此需要將所有試驗進行中的參數予以量化。自類澱粉纖維獲得晶種的過程中, 會將原本的纖維成長溶液換成去離子水, 但不論是類澱粉纖維或是晶種皆無法溶解於去離子水中而是呈懸浮狀態, 因此無法以「濃度」之概念進行定量化描述。引晶屏障的評估是以最小所需要的晶種量就能有效進行引晶作用 (遲滯期為 0 分鐘) 標準化 (normalized) 而來。本實驗所需之晶種量是以一剛開始之延長期速率高於 1×10^{-4} mdeg/sec 來決定, 因為我們發現未加入晶種前之普立昂朊肽其一開始之延長速率皆小於 1×10^{-4} mdeg/sec, 但隨著晶種量增多, 其一開始之延長速率就會慢慢高於 1×10^{-4} mdeg/sec。

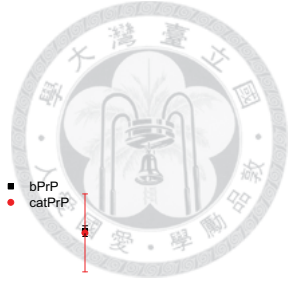
3.2.2 觀察牛 (bPrP) 與不同物種間之種族屏障

不同宿主、不同 TSE 來源, 感染普立昂疾病的效力不同, 本研究以牛普立昂朊肽 (bPrP108-144) 為晶種, 對不同普立昂朊肽做引晶, 藉由引晶作用量化出不同物種間普立昂疾病的感染屏障。

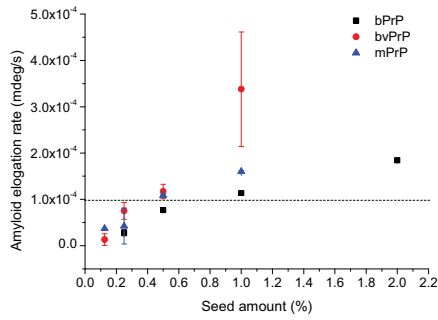
(A)



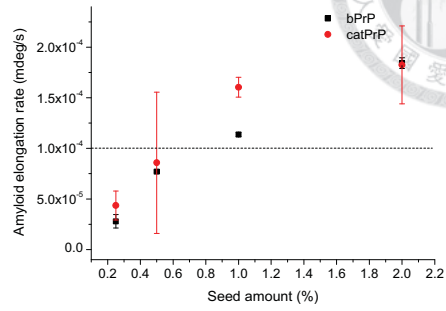
(B)



Low barrier

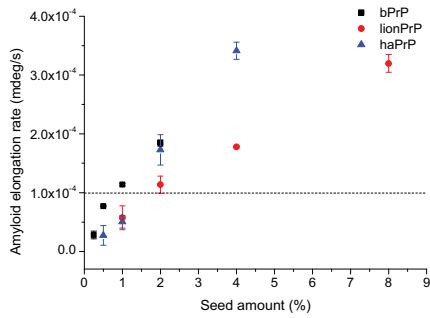


mPrP :bvPrP: bPrP= 0.5:0.5:1

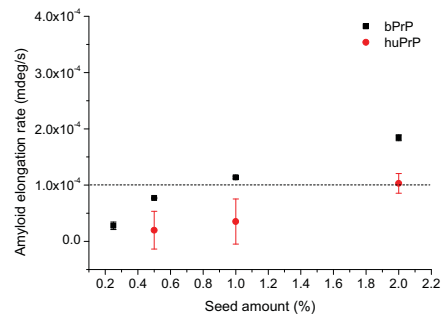


catPrP: bPrP= 1:1

Moderate barrier

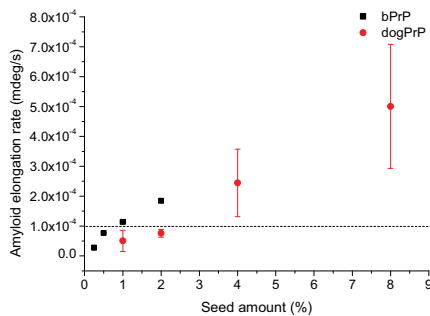


haPrP: lionPrP: bPrP= 2:2:1

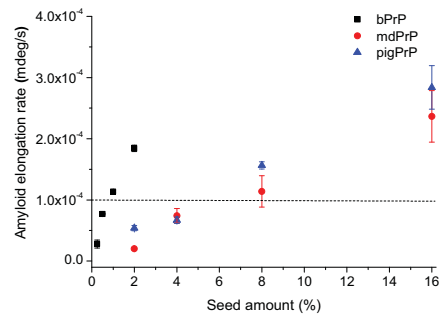


huPrP : bPrP= 2:1

High barrier



dogPrP: bPrP= 4:1



mdPrP:pigPrP: bPrP= 8:8:1

圖 3.5 利用 CD 光譜觀察 bPrP 之類澱粉纖維對各普立昂胜肽之引晶作用。(A)

以不同量之 bPrP 當作品種加入各個不同普立昂胜肽溶液，觀察在 218 nm 時，混合物之類澱粉纖維形成動力學；圖上顯示單體胜肽以及所加入之晶種量。(B) 圖表是以初始類澱粉延長速率 (amyloid elongation rate) 與晶種量 (seed amount) 作圖而得。以最小晶種量就能有效產生引晶作用為準則，將普立昂胜肽區分成低度種族屏障、中度種族屏障以及高度種族屏障。

由引晶實驗看出，以 bPrP 所形成之類澱粉纖維為晶種時，分別使錢鼠、小鼠、貓、倉鼠、獅子、人類、狗、豬、以及北美大角鹿產生引晶作用所需最少的晶種量為 0.5%、0.5%、1%、2%、2%、2%、4%、8% 以及 8%。將數據標準化 (normalized) 後得到種族屏障。

$$\text{Normalization seeding barrier} = [\text{seed}]_{\text{hetero}} / [\text{seed}]_{\text{homo}}$$

$[\text{seed}]_{\text{hetero}}$ ：在異種引晶時，所需的最少的晶種量就能不經過遲滯期而使類澱粉纖維形成立刻開始。

$[\text{seed}]_{\text{homo}}$ ：在同種引晶時，所需的最少的晶種量就能不經過遲滯期而使類澱粉纖維形成立刻開始。

以牛為晶種，對其他物種之相對種族屏障為錢鼠：小鼠：貓：倉鼠：獅子：人類：狗：豬：北美大角鹿 = 0.5：0.5：1：2：2：2：4：8：8。

我們將種族屏障區分成 3 類，分別為 (1) 低度種族屏障，物種有錢鼠 (bank vole)、小鼠 (mouse) 與貓 (cat)；(2) 中度種族屏障，物種是倉鼠 (hamster)、獅子 (lion) 與人類；(3) 高度種族屏障，物種為狗 (dog)、豬 (pig) 以及北美大角鹿 (mule deer)。當以 bPrP 為晶種進行引晶作用時，143 位置由 N→S (豬) 與 135 位置由 S→N (北美大角鹿) 屬於強烈的引晶延緩因子 (strong retardion seeding factor)，所以其引晶效率差，種族屏障是牛的 8 倍，而 129 位置由 M→L

(狗)的引晶效果亦不好，種族屏障是牛的4倍。目前文獻上並未發現有狗感染狂牛病的案例，而豬亦被記載為不易受普立昂感染的物種，具有普立昂抗性 (prion resistant)¹⁰²，因此當129位置由M→L、143位置由N→S時會延緩晶核的形成造成高度種族屏障；而狂鹿症的起源仍舊不明，由從此次實驗可知，當135位置由S→N時會造成牛與鹿之種族屏障很高，透過oral方式使鹿罹患CWD的機率較低，因此CWD的起因是來自狂牛症感染的機率較小。至於，對獅子來說，雖然其胺基酸135位置同樣具有Asn，但獅子在112位置又含有Met，M112是引晶促進因子 (strong acceleration seeding factor) 會加速PrP結構的轉換，加速晶核的形成，因此造成更多的β-PrP可供引晶作用，所以獅子的種族屏障不似北美大角鹿高，因此歸類在中度種族屏障。同樣在112位置為Met的物種還有人類、倉鼠以及貓。人類的普立昂胜肽序列雖然在143位置為Asn，但同樣受到M112的影響，因此種族屏障亦不高亦歸類在中度種族屏障。當138位置由L→M (錢鼠)時屬於引晶促進因子，引晶效果甚至比同物種間 (bPrP當晶種，對bPrP進行引晶)更好 (種族屏障為0.5:1)，比較同樣在138的位置含有Met的小鼠和倉鼠，因為倉鼠在139位置上的Met (M139屬引晶延緩因子，種族屏障和牛相比為4:1，數據未顯示)，造成晶種延後形成，因此較少的β-PrP可供引晶作用，造成其種族屏障比錢鼠與小鼠來的高一點 (種族屏障為2:1)，但無論如何，錢鼠、小鼠或倉鼠，在以bPrP為晶種之引晶實驗中皆歸類為低度種族屏障，屬於易受普立昂感染的物種，因此常被用來實驗室普立昂研究實驗動物。

3.3 胺基酸的結構、化學特性與位置對普立昂胜肽的影響

3.3.1 將Met置換成Val或Leu

由類澱粉形成動力學實驗得知，bPrP序列 (108-144)所出現的2個Met胺基酸殘基 (M109以及M129)在所有的普立昂序列中皆有之，而大部份哺乳類的普立昂蛋白所帶有的Met通常出現在109以及129的位置上，但是mPrP的109

位置，dogPrP 的 129 位置以及人類的 129 位置除外。先前研究已顯示人類 PrP129 殘基呈現胺基酸多型性 (polymorphism) 的特質，此特質不但影響了人類對普立昂疾病的敏感度，且患者呈現截然不同的致病表型，因此當我們將 Met 置換成 Val 或 Leu 時其生長遲滯期與 bPrP 類似，並不會影響類澱粉形成的成核步驟 (nucleation step)，然而 dogPrP (M129→L) 則顯示有較慢的延長速率 (elongation rate)，同樣的狀況出現在當人類 129 位置由 Met 變成 Val 時也具較慢的延長速率⁶⁹ 因此我們推測，129 位置上 Met 的置換 (Met→ Val / Leu) 會增加動力學轉換 (也就是從無規則扭曲轉變成類澱粉形成之前驅狀態) 的屏障，而進行引晶實驗時，M129→L 亦會影響引晶效率。從胺基酸結構與化學特性得知，比起 Met，Val 與 Leu 屬於疏水性且具較高扭轉形成 (turn-forming) 特性，因此較能穩定普立昂胜肽的無規則扭曲狀態 (表 3.5)。

3.3.2 將 Val、Leu 或 Ile 置換成 Met

同樣在類澱粉形成動力學中觀察到，普立昂胜肽 108-144 區間之 139 位置的胺基酸若是從 Ile→Met 時，其生長遲滯期較 bPrP 長，而先前研究亦顯示，若是將老鼠普立昂胜肽 139 位置突變成 Met 時，其生長遲滯期較 139 位置帶有 Ile 長⁶⁹，顯示 139 位置在普立昂胜肽中扮演著影響成核步驟的關鍵影響。此外，比較 Met、Leu 與 Ile 發現，Ile 具有較高的 β -sheet 形成特性，因此猜測 139 位置可能涉及普立昂胜肽形成類澱粉結構的 cross- β 結構內。對於 138 位置將 Leu 置換成 Met 時，其生長遲滯期較 bPrP 短，表示 Met138 除了對於成核作用具有正向影響外同時也參與類澱粉結構的形成。然而對於出現在 112 位置的 Met 則較無法解釋其作用，從實驗結果只知道當 Met112 時會加速類澱粉纖維的形成且形成速度之快到無法測得其生長遲滯期，但同樣帶有 M112 的 lionPrP、haPrP 以及 huPrP 則無同樣的影響。在引晶實驗時，M112 對引晶屏障沒有任何影響，而 M138 會促進引晶作用但 M139 則會增加引晶屏障。

3.3.3 Ser 與 Asn 互相置換

比較 Ser 與 Asn 發現，Asn 比 Ser 較具親水性 (hydrophilic)、較高的 turn 形成潛力以及較低的 helix 形成傾向 (表 3.5)，然而將 135 位置的 Ser 置換成 Asn 時並未發現其生長遲滯期與 bPrP 相較有何明顯不同，但是若是將 143 位置的 Asn 置換成 Ser 時，其生長遲滯期則變為 bPrP 的 2 倍之多。雖然如此，由引晶實驗得知，無論是 S135→N 或是 N143→S，對於 bPrP 所感染的普立昂疾病的影響皆屬於高度種族屏障的一群。

表 3.5

	Met	Val	Leu	Ile	Asn	Ser
Branched at β -carbon	-	+	-	+	-	-
Hydrophilicity ^a (kcal/mol)	-3.87	-0.40	-0.11	-0.24	-12.07	-7.45
Hydrophobicity ^a (kcal/mol)	-1.41	-3.10	-3.98	-3.98	7.58	4.34
Van der Waals volume ^b (\AA^3)	124	105	124	124	96	73
β -sheet forming propensity in $\Delta\Delta G$ (kcal/mol) ^c	-0.46	-0.53	-0.48	-0.56	-0.38	-0.39
α -helix forming propensity in $\Delta\Delta G$ (kcal/mol) ^d	-0.50	-0.14	-0.62	-0.23	-0.07	-0.35
Turn potential ^e	0.57	0.70	0.66	0.59	1.44	1.15

表 3.5 比較 Met、Val、Leu、Ile、Asn 與 Ser 之結構與化學特性。

^a 數據來自 1988 年 Biochemistry 27:1664-1770

^b 數據來自 1984 年書本“Proteins: Structures and molecular properties”

^c 數據來自¹¹⁵

^d 數據來自¹¹⁶

^e 數據來自¹¹⁷

3.4 普立昂胜肽的熱力學溶解度 (thermodynamic solubility) 觀察

PrP^C 與 PrP^{Sc} 間的轉換處於熱力學上之平衡狀態 (thermodynamic equilibrium)，並傾向以 PrP^C 之構形存在，熱力學上較不穩定的 PrP^{Sc} 必須彼此結合形成特定大小的寡聚體 (oligomer) 後才能穩定存在，而此寡聚體又稱為形成類澱粉纖維的晶核 (nucleus)，而當晶核形成後，PrP^{Sc} 單體便可快速添加於晶核上，進而延長類澱粉纖維最後達到平衡為止。本實驗中所合成的普立昂胜肽能有效的溶在 20 mM NaOAc、140 mM NaCl，pH 3.7 纖維溶液中，在 CD 觀察下一開始呈現無扭曲狀態，經過培養三個星期後，最終成為類澱粉纖維。而對於仍存在纖維溶液中未形成類澱粉纖維的 PrP^{Sc} 單體 (amyloid-precursor state) 可用來表示普立昂胜肽的熱力學溶解度。從胺基酸化學特性得知 (表 3.5)，相對於 Val、Ile 與 Leu，Met 屬於較親水性，同樣的 Asn 亦較 Ser 具親水性，雖然 haPrP 與 bPrPI139M (結果未顯示) 其仍存在纖維溶液中未形成類澱粉纖維的 PrP^{Sc} 單體濃度較高是合理的，然比較 bPrP 與 mPrP 卻發現有矛盾之處，因照理來說 mPrP 胺基酸序列組成為 M109L、L138M 已經使其普立昂胜肽特性與 bPrP 相同，但從實驗結果卻發現兩者有明顯不同，因此胺基酸化學屬性相對於普立昂胜肽的熱力學溶解度並不完全相符，而且也發現胺基酸化學屬性與胜肽的生長遲滯期或是引晶屏障亦無相關性。

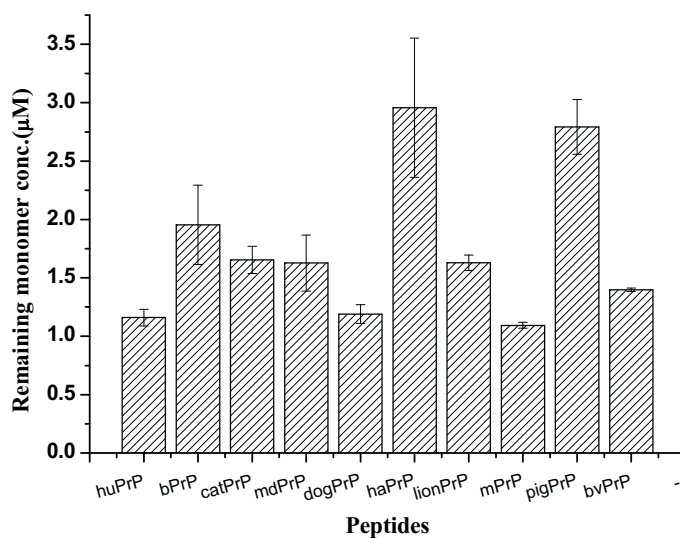


圖 3.6 普立昂胜肽熱力學溶解度之觀察。仍存在纖維溶液中未形成類澱粉纖維的 PrP^{Sc} 單體濃度與胺基酸化學屬性並不相符，如 bPrP 與 mPrP。

表 3.6

Peptides	lag time (hr)	Remaining monomer concentration (μM)
bPrP	61.1 \pm 10	1.95 \pm 0.33
catPrP / bPrPV112M	N.D	1.65 \pm 0.11
dogPrP / bPrPM129L	71.4 \pm 12***	1.19 \pm 0.07***
bvPrP / bPrPL138M	42.3 \pm 13.5**	1.39 \pm 0.01**
mdPrP / bPrPS135N	72.2 \pm 5.5	1.62 \pm 0.24
pigPrP / bPrPN143S	117.8 \pm 1.5	2.79 \pm 0.23***
lionPrP (V112M,S135N)	51.2 \pm 14.3	1.63 \pm 0.06
mPrP (M109L,L138M)	65.5 \pm 6.8***	1.09 \pm 0.02***
haPrP (V112M,L138M,I139M)	118.9 \pm 4.9***	2.95 \pm 0.59***
huPrP (V112M,L138I,N143S)	61.8 \pm 8.4***	1.16 \pm 0.07***

表 3.6 比較各普立昂胜肽熱力學溶解度。

3.5 普立昂胜肽形成之類澱粉纖維型態

當普立昂胜肽(序列 108-144)培養在 140 mM NaCl、20 mM NaOAc, pH3.7 緩衝溶液環境中會自發性的轉換成類澱粉纖維，其形態 (morphology) 可利用穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM) 觀察。通常類澱粉纖維型態，多呈直線、未分叉，有時又有扭轉 (twister) 現象的纖維，直徑約 8-10 nm，長度約 1400 nm 或甚至更長。

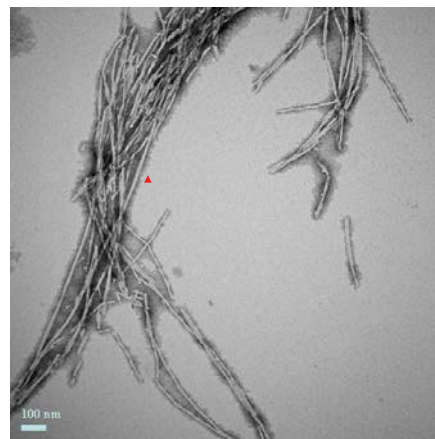
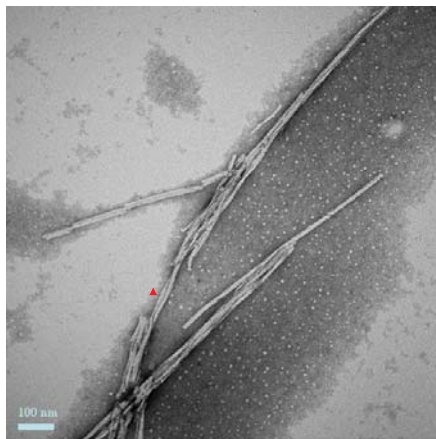
3.5.1 以穿透式電子顯微鏡觀測各物種普立昂胜肽片段序列 108-144

類澱粉纖維之形態

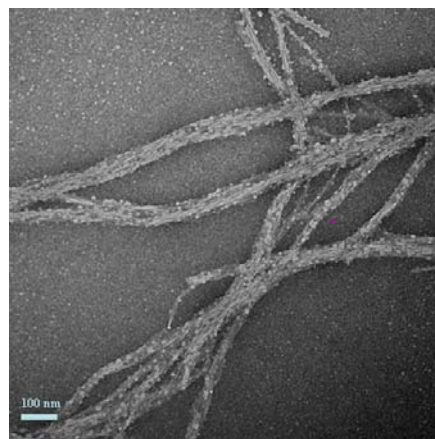
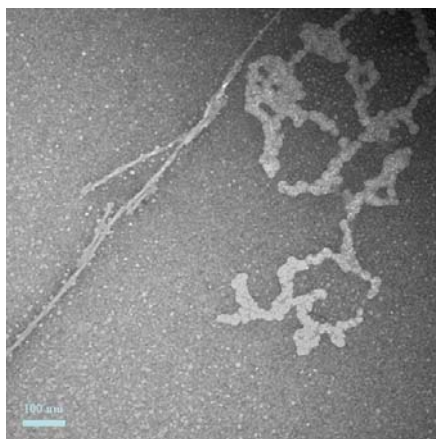
將各物種之普立昂胜肽片段序列 108-144 培養於 140 mM NaCl、20 mM NaOAc, pH3.7 緩衝液環境中，利用 TEM 對於已形成的各物種普立昂類澱粉纖維進行形態觀察，以比較不同物種對於類澱粉纖維造成外觀或是堆疊特性上的不同。bPrP 類澱粉纖維多呈直線、未分支有時又有扭轉 (twister) 現象的纖維，通常由多根纖維所形成的纖維簇 (cluster) 結構中，纖維長度較長，而在多條類澱粉纖維共同形成的型態中，常可發現兩條類澱粉纖維彼此平行緊貼 (align parallel) 的現象，有時類澱粉纖維彼此如麻繩般扭轉 (twister) (圖 3.7A)。觀察 catPrP (V112M) 類澱粉纖維多呈直線、少有分支現象的纖維，由多根纖維所形成的纖維簇結構中，纖維長度較短，在多條類澱粉纖維共同形成的型態中，兩條類澱粉纖維多為彼此平行緊貼並無扭轉現象 (圖 3.7B)。dogPrP (M129L) 類澱粉纖維多呈直線、未分支，在多條類澱粉纖維共同形成的型態中，兩條類澱粉纖維多為彼此平行緊貼無扭轉現象，所形成的纖維簇根根分明且纖維長度長，不似 catPrP 類澱粉纖維簇般多重堆疊 (圖 3.7C)。lionPrP (V112M、S135N) 類澱粉纖維多呈直線，有分支少有扭轉現象的纖維，由多根纖維所形成的纖維簇結構中，纖維長度長，在多條類澱粉纖維共同形成的型態中，兩條類澱粉纖維多為彼此平行緊貼現象 (圖 3.7D)。pigPrP (N143S) 類澱粉纖維多呈直線，多分枝，纖維長度長，在多條類澱粉纖維共同形成的型態中，兩條類澱粉纖維多為彼此平行緊貼無扭轉現象 (圖 3.7E)。mPrP (M109L、L138M) 類澱粉纖維多呈現絲狀、無分支之結構，由多根纖維所形成的纖維簇結構中，纖維長度分布較廣 (纖維長度長、短皆有)，在多條類澱粉纖維共同形成的型態中，常可發現兩條類澱粉纖維彼此平行緊貼的現象 (圖 3.7F)。haPrP (V112M、L138M、I139M) 普立昂類澱粉纖維多呈絲狀、無分支有扭轉現象的纖維，纖維長度較長，在多條類澱粉纖維共同形成的型態中，可發現兩條類澱粉纖維彼此平行緊貼的現象，有時亦可觀

察到類澱粉纖維彼此如麻繩般扭轉（圖 3.7G）。bvPrP (L138M) 類澱粉纖維多呈直線、有分支且纖維長度較短之結構，在多條類澱粉纖維共同形成的型態中，可發現兩條類澱粉纖維彼此平行緊貼（圖 3.7H）。mdPrP (S135N) 類澱粉纖維多呈直線、無分支，纖維長度較長，在多條類澱粉纖維共同形成的型態中，兩條類澱粉纖維多為彼此如麻繩般扭轉，有時又彼此平行緊貼現象（圖 3.7I）。huPrP (V112M、L138I、N143S) 類澱粉纖維。多呈直線、無分支，纖維長度較長，在多條類澱粉纖維共同形成的型態中，可發現兩條類澱粉纖維彼此平行緊（圖 3.7J）。

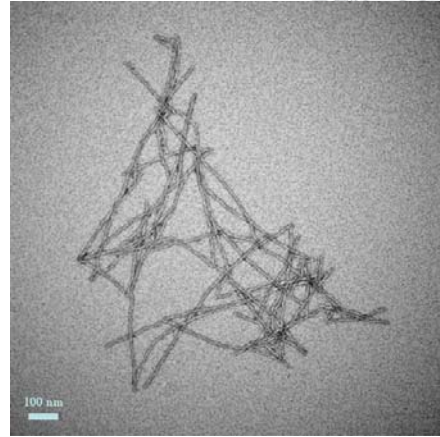
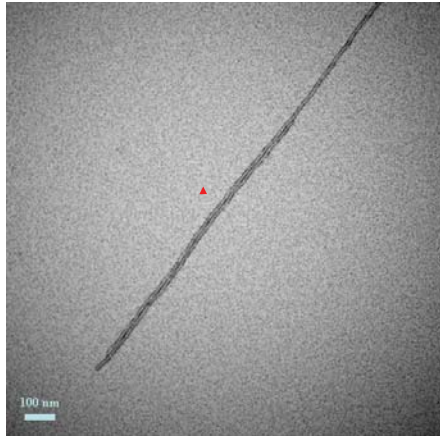
(A) bPrP 類澱粉纖維



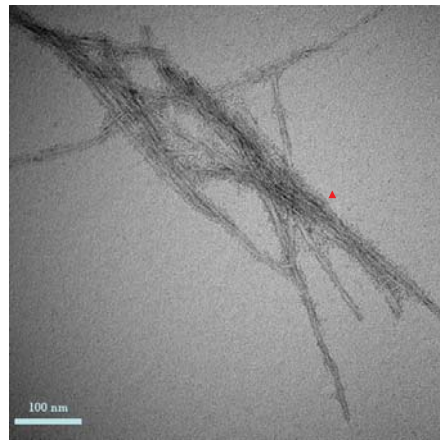
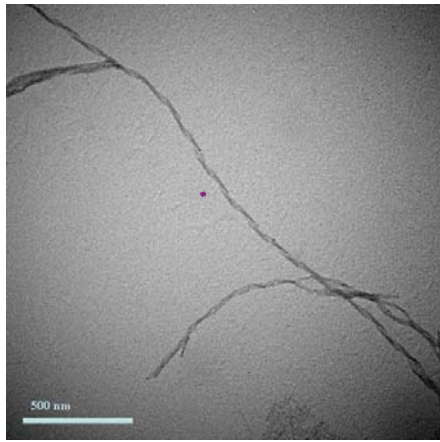
(B) catPrP 類澱粉纖維



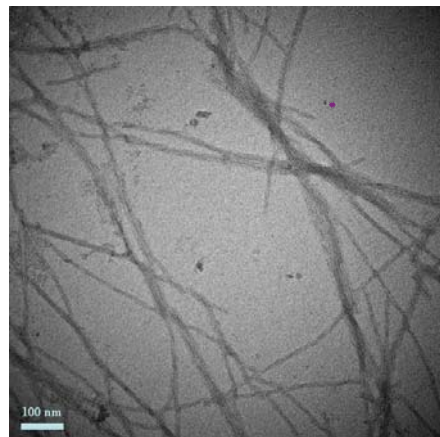
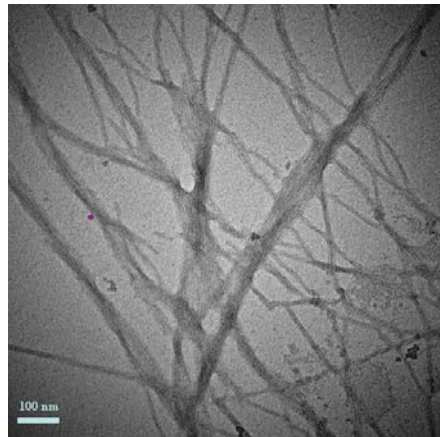
(C) dogPrP 類澱粉纖維



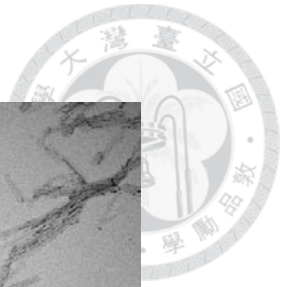
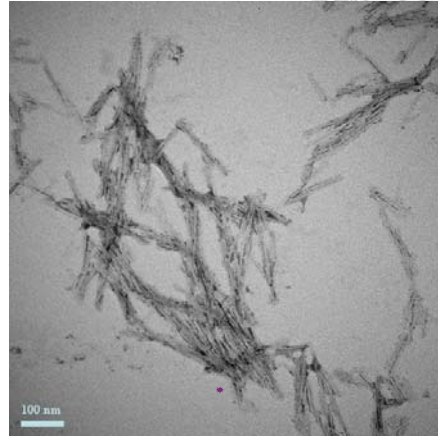
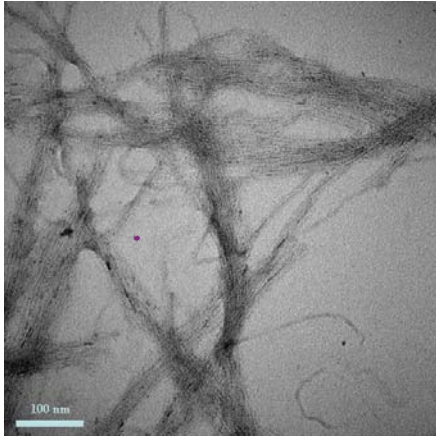
(D) lionPrP 類澱粉纖維



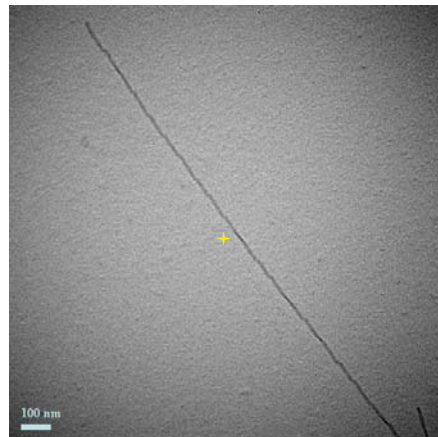
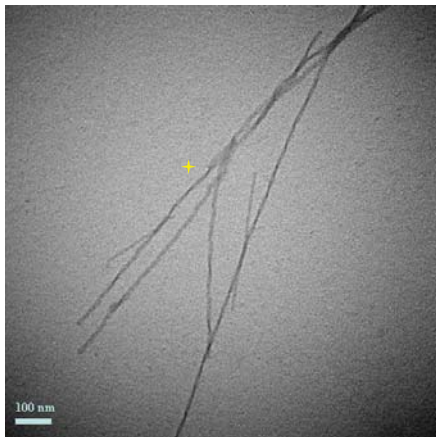
(E) pigPrP 類澱粉纖維



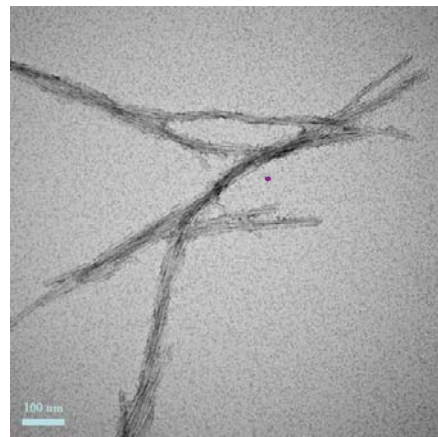
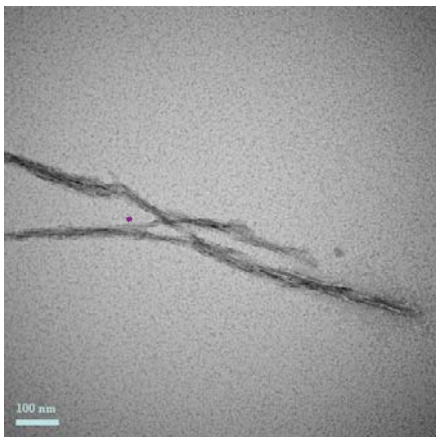
(F) mPrP 類澱粉纖維



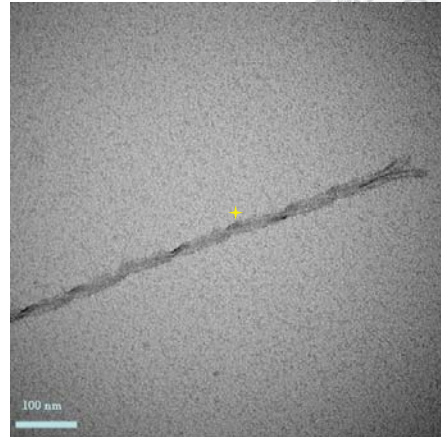
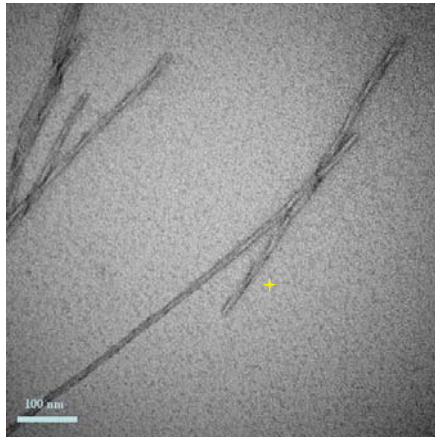
(G) haPrP 類澱粉纖維



(H) bvPrP 類澱粉纖維



(I) mdPrP 類澱粉纖維



(J) huPrP 類澱粉纖維

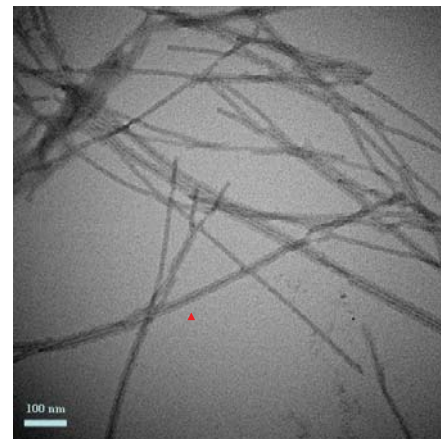
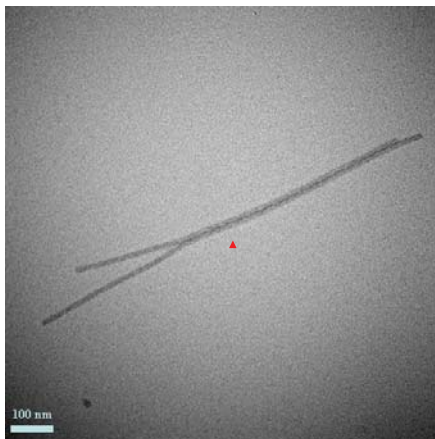


圖 3.7 各物種普立昂胜肽片段 108-144 形成類澱粉纖維在 TEM 下之形態。(A) bPrP (B) catPrP (C) dogPrP (D) lionPrP (E) pigPrP (F) mPrP (G) haPrP (H) bvPrP (I) mdPrP (J) huPrP。▲：平行緊貼排列 (align parallel) 之類澱粉纖維；★：形成交纏狀 (twister) 之類澱粉纖維；*：成簇 (cluster) 之類澱粉纖維。

表 3.7

	Short stack	Long twister	Long disordered bundle	Long parallel
bPrP		V (2 條平行 or 單獨一支)		
catPrP			V (fibril 較短)	
bvPrP			V (中長)	
mdPrP		V		
dogPrP				V
pigPrP			V	V
lionPrP			V (few twister)	
mPrP			V	
huPrP				V (rare twister)
haPrP		V (few twister)		

表 3.7 普立昂胜肽形成類澱粉纖維後於 TEM 下觀察整理。

bPrP：多 twister，細長條，twister 與 3、4 條組成的 stacking fiber 參雜

haPrP：細長條，twister 較少，多 stacking（2 條平行或 3、4 條 stacking）

huPrP：細長條，多 stacking，極少 twister（2 條平行或單獨一支）

lionPrP：較上述三者略短，多 stacking，極少 twister

mPrP：長度同 lionPrP，多條 stacking

catPrP：較短，3、4 條形成 stacking，極少 twister

mdPrP：細長條，多 twister

dogPrP：細長條，2 條平行或單獨一支，無 stacking

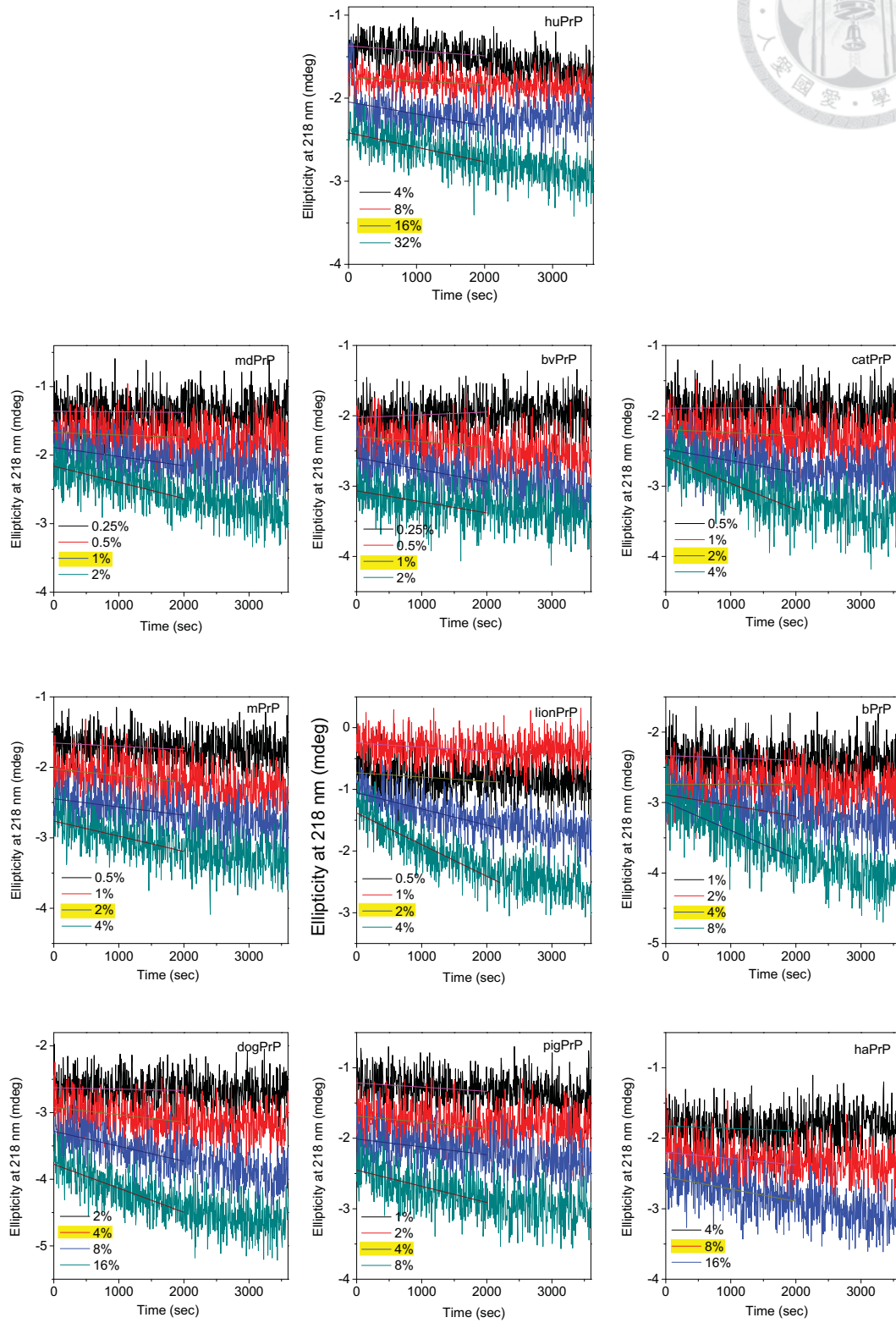
bvPrP：較短，多 stacking

pigPrP：細長條，2 條平行或 3、4 條 stacking

3.6 觀察北美大角鹿 (mdPrP) 與不同物種間之種族屏障

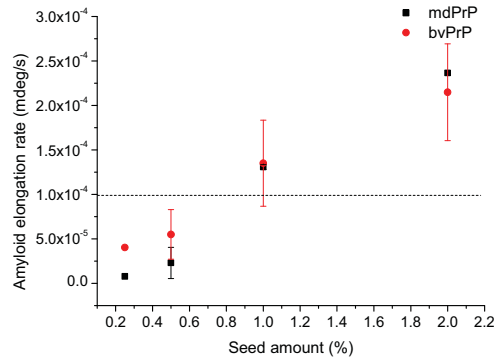
對於跨物種之普立昂疾病的傳播目前仍是無法預期或是所知甚少。比較清楚的是 vCJD 以及 FSE (feline spongiform encephalopathy) 都是因為食用了患有 BSE 感染的牛肉或骨頭所造成^{59;79}，而 TME (transmissible mink encephalopathy) 也是因為食用了患有 scrapie 或是 BSE 感染的肉製品所引發¹¹⁸，目前已經知道 scrapie 可跨物種的傳染，也就是罹患 scrapie 的羊群將普立昂傳染給牛隻，使牛罹患 BSE 而羊隻也可透過 intracerebral inoculation 方式將 scrapie 傳染給鹿，使鹿感染 CWD¹¹，然而目前對於 CWD 引發的原因仍不清楚，因此我們以 mdPrP 為晶種進行引晶作用，藉由晶核形成的效率探討 mule deer 對各物種間的種族屏障，藉此研究動物與人類對於罹患 CWD 的潛藏危機。

(A)



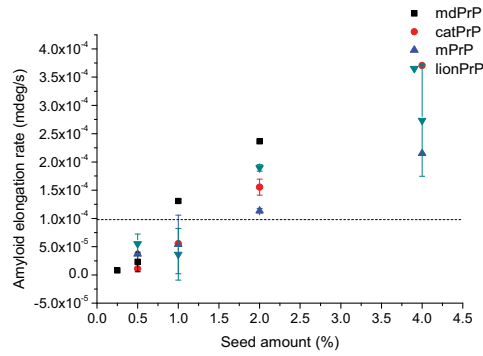
(B)

Low barrier



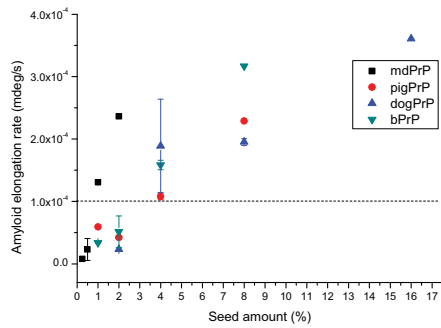
mule deer : bank vole = 1 : 1

Moderate barrier

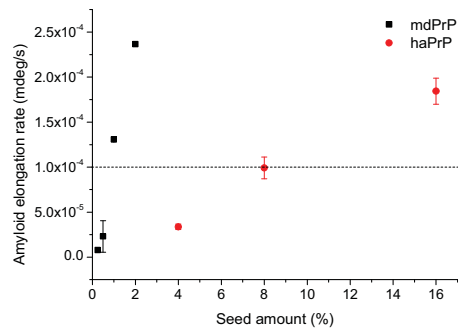


cat : mPrP : lionPrP : mdPrP = 2 : 2 : 2 : 1

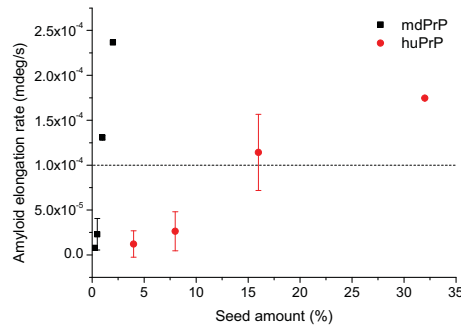
High barrier



pig : dogPrP : bPrP : mdPrP = 4 : 4 : 4 : 1



haPrP : mdPrP = 8 : 1



$$\text{huPrP} : \text{mdPrP} = 16 : 1$$

圖 3.8 利用 CD 光譜觀察 mdPrP 之類澱粉纖維對各普立昂胜肽之引晶作用。(A) 以不同量之 mdPrP 當作晶種加入各個不同普立昂胜肽溶液，觀察在 218 nm 時，混合物之類澱粉纖維形成動力學；圖上顯示單體胜肽以及所加入之晶種量。(B) 圖表是以初始類澱粉延長速率 (amyloid elongation rate) 與晶種數 (seed amount) 作圖而得。以最小晶種量就能有效產生引晶作用為準則，將普立昂胜肽區分成低度種族屏障、中度種族屏障以及高度種族屏障。

由引晶實驗顯示，以 mdPrP 所形成之類澱粉纖維為晶種時，分別使北美大角鹿、錢鼠、貓、獅子、小鼠、豬、狗、牛以及敘利亞倉鼠產生引晶作用所需最少的晶種量為 1%、1%、2%、2%、2%、4%、4%、4%、8% 以及 16%。將數據標準化 (normalized) 後得到種族屏障為北美大角鹿：錢鼠：貓：獅子：小鼠：豬：狗：牛：敘利亞倉鼠：人類 = 1：1：2：2：2：4：4：4：8：16。

根據實驗結果將種族屏障區分成 3 類，分別為 (1) 低度種族屏障，物種有北美大角鹿與錢鼠 (2) 中度種族屏障，物種有貓、獅子以及小鼠 (3) 高度種族屏障，物種有豬、狗、牛、敘利亞倉鼠以及人類。以 mdPrP 所形成之類澱粉纖維為晶種進行引晶作用時，低度與中度種族屏障之物種，如：bvPrP (L138→M)、catPrP (V112→M)、lionPrP (V112→M、S135→N) 以及 mPrP (M109→L、L138

→M)，這些位置胺基酸的改變使的引晶效率較好，因而種族屏障較小，這與先前研究一致，錢鼠、貓、獅子以及小鼠皆會受到 CWD 感染^{21; 119; 120; 121}；然而對於高度種族屏障的物種，如 pig (N143→S)、dogPrP (M129→L)、bPrP、huPrP (V112→M、L138→I、N143→S) 以及 haPrP (V112→M、L138→M、I139→M) 來說，143 的位置由 N→S、129 的位置由 M→L 以及 139 的位置由 I→M，這些位置胺基酸的改變降低引晶效率因此使得種族屏障較高，從文獻上尚未發現上述物種感染 CWD 的病例發生。此外我們發現 mdPrP 對於 bvPrP、mPrP 以及 haPrP 有不同的種族屏障 (分別是 1:1、1:2 以及 1:8)，查閱文獻中曾記載並非所有的齧齒類動物都容易受到 CWD 的感染，除了錢鼠與小鼠外，hamster (敘利亞倉鼠) 是屬於不易被 CWD 感染的齧齒類動物之一¹²⁰，原因可能是因為 CWD 有兩種不同 strains (CWD1、CWD2)，因此我們比較可感染 CWD 的鹿群普立昂胜肽 108-144 序列 (圖 3.10) 發現在此區間有兩種不同的序列，一種序列是在 135 位置為 Ser (如 moose，序列同 bPrP)，另外一種序列則是 135 位置為 Asn (如 mule deer)，當 135 位置由 S→N 時，mdPrP 與 haPrP 的種族屏障為 1:8，但若是 135 位置是 Ser 時，種族屏障則為 1:2，因此 mdPrP 108-144 序列不同會造成種族屏障的不同。此外有文獻證實，CWD 可透過先感染第一種物種而再間接感染第二種物種，例如 CWD 可先感染貂 (ferret) 然後透過 ferret 再感染 hamster⁸⁹，因此雖然 mdPrP 與 haPrP 間的種族屏障很高，但透過間接傳染的方法幾乎可以使大部分的齧齒類都能感染 CWD。

	108			135		144																														
moose	N	M	K	H	V	A	G	A	A	A	G	A	V	V	G	G	L	G	G	Y	M	L	G	S	A	M	S	R	P	L	I	H	F	G	N	D
mule deer	N	M	K	H	V	A	G	A	A	A	G	A	V	V	G	L	G	G	Y	M	L	G	S	A	M	N	R	P	L	I	H	F	G	N	D	
mule deer-s	N	M	K	H	V	A	G	A	A	A	G	A	V	V	G	L	G	G	Y	M	L	G	S	A	M	S	R	P	L	I	H	F	G	N	D	
American elk	N	M	K	H	V	A	G	A	A	A	G	A	V	V	G	L	G	G	Y	M	L	G	S	A	M	S	R	P	L	I	H	F	G	N	D	
white-tailed deer	N	M	K	H	V	A	G	A	A	A	G	A	V	V	G	L	G	G	Y	M	L	G	S	A	M	S	R	P	L	I	H	F	G	N	D	
white-tailed deer-n	N	M	K	H	V	A	G	A	A	A	G	A	V	V	G	L	G	G	Y	M	L	G	S	A	M	N	R	P	L	I	H	F	G	N	D	

表 3.8 比較 CWD 可感染之鹿群之普立昂胜肽 108-144 區間之序列。在普立昂

胜肽 108-144 區間的序列主要可區分成兩種不同類型，一種是在 135 位置胺基酸為 Ser (如 moose)，另一種則是在 135 位置是 Asn。



無論是 vCJD、BSE、FSE 或是 TME 皆因吃了普立昂疾病感染的肉製食物或骨粉而引發 TSE 疾病，因此藉由飲食或是環境進而感染普立昂疾病的機率不是沒有，有研究顯示，無論是直接接觸患有 CWD 感染的鹿群^{122; 123; 124}或是暴露於 CWD 普立昂感染的環境中¹²⁵亦或者吃入罹患 CWD 體液或是組織之鹿群^{126; 127; 128; 129; 130}，這些行為及動作皆有機會感染 CWD；此外研究亦顯示，比起健康的鹿，獅子 (mountain lion) 更喜歡獵捕罹患 CWD 的鹿¹³¹，而齧齒類食腐肉動物 (如 vole 與 deer mice) 同樣容易感染普立昂並致病^{132; 133}，而這些食腐肉齧齒動物在大自然中同樣是許多大型獵食性或食腐肉性動物的食物來源，因此這些齧齒類動物在大自然中可能扮演普立昂跨物種傳染的蓄水池 (reservoir) 或是橋樑 (bridge) 的功能。在美國少數州，獵人習慣獵殺野生鹿隻並且食用，這樣的行為可能增加罹患人類 TSE 的風險，然而從引晶實驗得知 mdPrP : huPrP 的種族屏障為 1 : 16，這說明人類食用感染 CWD 的鹿肉進而導致罹患人類 TSE 的機率不高。先前文獻曾記載，雖然透過 intracerebral (i.c.) inoculation 方式可將 CWD 傳染給牛，但感染效力的好壞需視 prions 來自哪種物種²¹，透過 oral feeding 方式並不會使牛隻感染 CWD；而引晶實驗亦顯示 mdPrP 與 bPrP 的種族屏障為 1 : 4，種族屏障亦高，這表示牛隻因食用感染 CWD 的骨粉、食品不容易引發 BSE，因此不管是直接食用 CWD 感染的鹿或是間接吃入了感染 CWD 的牛，使人類因透過食物進而罹患人類 TSE 的風險，從實驗上看來機率是比較小的。

3.7 類澱粉纖維的前驅物 (precursor) 對細胞毒性的影響

之前人們相信，無論是成熟的類澱粉纖維或是形成堆疊聚集 (aggregate) 的蛋白質，對細胞而言皆是最具毒性的，因此在病理學上通常偵測是否有堆疊聚集

之蛋白質的沉澱來判定是否罹患中樞神經系統退化的疾病。直到最近從許多案例中發現，其實對細胞最具毒性的類型之一是 pre-fibrillar aggregate (又稱為雜亂無序的聚集 (amorphous aggregate)、蛋白質分子團 (protein micelle) 或是纖維原型 (protofibril)) 而非成熟的纖維，特別是針對 A β 、 α synuclein 以及 transthyretin 而言，前人報告中皆指出其早期所產生的聚集對細胞是最具毒性的^{134; 135; 136; 137; 138; 139}。

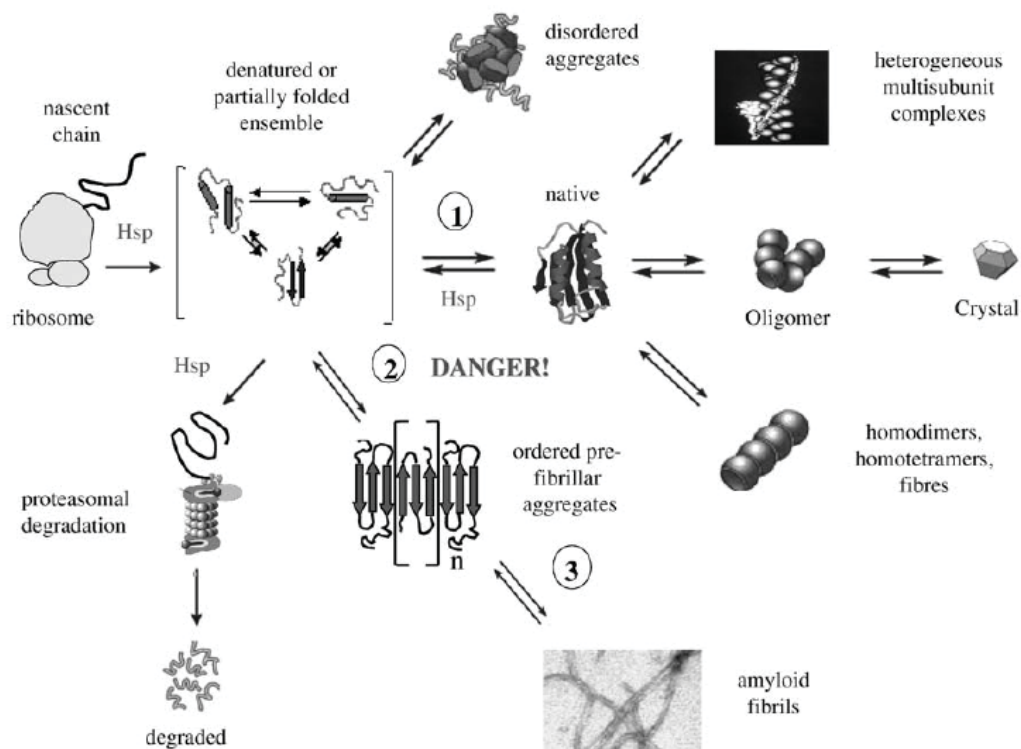


圖 3.9 綜觀新合成的多胜肽可能的路徑。路徑 1 代表的是 partially folded 與 native folded 的狀態，在一般情況下蛋白質傾向以 native folded 形式存在，然而若是蛋白質產生突變、經過化學修飾或是存在於不穩定的溶液下則蛋白質會以 partially folded 形式存在，一旦產生太多 partially folded 或 denatured 的蛋白質的時候，會透過 proteasome 將之分解。若此清除機制受損，蛋白質會形成不規則聚集或是 shif 到路徑 2 的路線；路徑 2 所走的路線是先形成 pre-fibrillar species 最後再慢慢長成成熟的纖維 (路徑 3)。DANGER! 表示在大部分的案例中，pre-fibrillar species

比成熟的纖維具有較高的毒性，Heat shock protein(Hsp)可以幫助減少 pre-fibrillar 的形成，例如將 partially folded 的蛋白質正確摺疊成新的多胜肽或是將不正確摺疊的蛋白質分解掉⁶。



此外亦有文獻所載¹⁴⁰：將在聚集狀蛋白質早期所先形成的 pre-fibrillar species 加入時會對細胞產生毒性，相反的，成熟的纖維則對細胞所造成的毒性傷害較小，因此對細胞所產生的毒性是來自其結構產生聚集所導致，而非因為單體胜肽 (monomer polypeptide) 的胺基酸序列所造成，這與早先我們認為「蛋白質的一級結構可以決定三級結構以及生理作用」的觀念有所出入。因此，我們想知道本實驗中的各個普立昂胜肽對細胞的毒性影響為何，從上述的實驗 (time course) 結果顯示，各種普立昂胜肽從單體形成類澱粉纖維所需的時間除 catPrP 無法測得外，其餘胜肽形成類澱粉纖維所需時間約 40 小時至 120 小時不等，因此當培養在培養液 (medium) 48 小時後之普立昂胜肽加入 N2a 細胞時，對細胞產生的毒性如下圖 (圖 3.13)，貓的細胞毒性最強，豬次之，而倉鼠對細胞的傷害最小，再來是北美大角鹿次之，其餘物種對細胞的傷害相差不多；對細胞毒性影響前三名分別為：貓、豬以及錢鼠，然其生長遲滯期分別為：無法測得 (貓)、 117.8 ± 1.5 小時 (豬) 以及 42.3 ± 13.5 小時 (錢鼠)。貓與錢鼠普立昂胜肽生長遲滯期短，因此在室溫下培養 24 小時後再加入細胞時，普立昂胜肽所形成的結構或許是剛好容易造成細胞毒性的 pre-fibrilla，然而對於生長遲滯期較長的豬與倉鼠普立昂胜肽而言，情況就較難理解，雖然豬與倉鼠普立昂的生長遲滯期相差不多 (分別為 117.8 ± 1.5 小時 (豬)、 118.9 ± 4.9 小時 (倉鼠))，但對細胞存活率卻有所差異 ($67.3 \pm 4.8\%$ (豬)、 $93.0 \pm 5.9\%$ (倉鼠)) (表 3.5)。

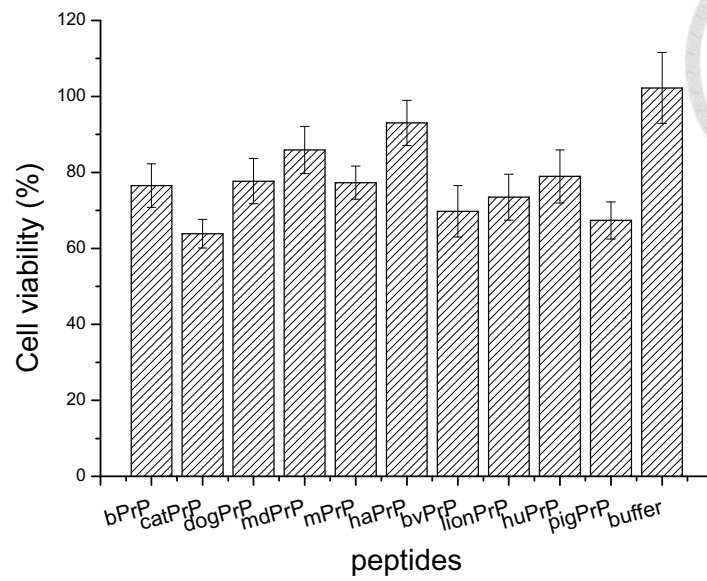


圖 3.10 化學合成的普立昂胜肽對細胞毒性的影響。從細胞存活率得知各普立昂胜肽對細胞的毒性相差不多，然仍比較出 catPrP 具較強毒性而 haPrP 的毒性最弱。

表 3.9

Peptides	lag time (hr)	Cell viability (%)
bPrP	61.1±10	76.5±5.7
catPrP / bPrPV112M	N.D	63.8±3.7
dogPrP / bPrPM129L	71.4±12***	77.7±5.9
bvPrP / bPrPL138M	42.3±13.5**	69.7±6.7
mdPrP / bPrPS135N	72.2±5.5	85.9±6.1
pigPrP / bPrPN143S	117.8±1.5	67.3±4.8
lionPrP (V112M,S135N)	51.2±14.3	73.4±6.0
mPrP (M109L,L138M)	65.5±6.8***	77.2±4.3
haPrP (V112M,L138M,I139M)	118.9±4.9***	93.0±5.9
huPrP (V112M,L138I,N143S)	61.8±8.4***	78.9±6.9

備註：p<0.05*；p<0.01**；p<0.001***

表 3.9 各個普立昂胜肽其生長遲滯期與對細胞毒性的影響。對細胞毒性影響最大的前三名為貓、豬與錢鼠，而對細胞毒性影響最小的為倉鼠，其餘物種對細胞的影響相近。

第四章 結果與討論



TSE 裡所說的種族屏障是指：當一物種將 TSE 疾病感染另一物種時，被感染的物種對此疾病有抵抗力。而所謂的抵抗力就是：在 TSE agent 感染新的物種時，該物種第一代呈現有較長的培養時間，而這個時間甚至會超過物種的生命週期。但是當 agent 隨著數代推移時，該物種會產生適應性並且縮短培養時間直達穩定狀態。自從英國與美國爆發 BSE 與 CWD，我們相信，BSE 與人類 vCJD 是相關的，也是從那時候才開始重視 TSE 對其他物種感染的種族屏障問題。在物種感染 prion agent 時，donor 與 receptor 的 PrP 胺基酸序列之相似度在轉換過程中扮演重要角色。PrP 胺基酸序列相似度高，則形成 PrP-res 的效率好，也就是 PrP-res 會較快累積而產生臨床疾病，反之 PrP 胺基酸序列相似度低的話（引晶效果差），導致 PrP-res 不易形成而降低了病發過程。

在本次實驗中我們截取對於類澱粉形成相當重要的區段（相當於人類普立昂序列 108-144）為模型，除了定量傳染屏障外，並更進一步了解在晶種存在下促進 PrP^C 結構的轉變過程中特殊的胺基酸所帶來的影響：M112 因為加速了成核作用使得更多的 β -PrP 可供引晶時使用，因此會促進 PrP 結構的轉變，S143、M139 會延遲成核作用，而當加速與延遲兩項因子存在相同 peptide 上時，會相互抵銷其效果，因此倉鼠（haPrP）與人類（huPrP）的生長遲滯期與牛（bPrP）相近。比較牛與鹿當晶種，分別對各物種進行引晶屏障發現其結果類似，對於錢鼠、小鼠、貓以及獅子等物種，從前人的實驗就已經證實會受到 BSE 或是 CWD 的感染^{18; 121}，因此對這些物種的引晶效率好，種族屏障亦低，特別是對貓來說，之前有研究顯示 BSE 比 CWD 更容易引起貓感染 TSE 疾病，而由引晶作用亦發現同樣的結果；而對狗、豬來說，是被標示為對 BSE 或是 CWD 有抵抗力的物種，因此引晶效果差，種族屏障高。此外，無論是牛對鹿進行引晶實驗或是鹿當晶種對牛進行引晶，皆發現彼此間的種族屏障都很高，因此利用 oral 方式跨種感染的

可能性很低；比較例外的是敘利亞倉鼠，敘利亞倉鼠雖然會受到 BSE 感染，但當 CWD 感染時卻因存在不同 strain 而影響其感染效率（若 strain 在 135 位置為 Ser，則引晶屏障為 1：2，若 strain 在 135 位置為 Asn，則引晶屏障為 1：8）；對於人類而言，已經發現因吃了患有狂牛症的牛肉而導致罹患 vCJD，從引晶實驗證實牛對人之間的種族屏障並不高，但至今卻尚未發現因吃了受 CWD 感染的鹿肉而罹患人類 TSE 疾病，而我們的實驗也發現鹿對人之間的高種族屏障。以 bPrP 為晶種進行引晶時，M138 會降低引晶屏障，L129、N135、M139 以及 S143 皆會增加引晶屏障，因此當降低與增加兩項因子同時存在相同 peptide 時，其效果會被中和，像是人類 (huPrP)，此外 bPrP 對 dogPrP 與 pigPrP 的引晶屏障分別為 4 倍與 8 倍，就分子層次而言，BSE 較難跨越種族屏障傳染給狗與豬。而當以 mdPrP 為晶種進行引晶時，mdPrP 對 haPrP 的種族屏障為 8 倍，因此 CWD 較難跨越種族屏障傳染給倉鼠，此外 mdPrP 對 huPrP 的種族屏障為 16 倍顯示 CWD 比 BSE 更難傳染給人類。將合成的普立昂胜肽其自發性形成類澱粉動力學以及引晶屏障結果整理成圖表（表 4.1）。

而從熱力學溶解度實驗中發現，雖然本篇論文中所有合成的普立昂胜肽溶解度皆很好，但各普立昂胜肽仍存在纖維溶液中未形成類澱粉纖維的 PrP^{Sc} 單體濃度與其胺基酸化學屬性並不相符且與 lag time 和引晶屏障亦無相關性。此外，各普立昂胜肽對細胞毒性的作用相差不多，並無明顯區別。

對普立昂蛋白來說，胺基端的序列 1-94 對於 PrP-res 的形成不具重要性，因為這段區域相對整條普立昂蛋白來說具有彈性且不具有任何結構性，然而卻可能涉及分子間 (inter-) 或分子內 (intra-) 對於蛋白質中心 (protein core)、細胞表面以及天然配體 (natural ligand) 間的作用；然而序列 106-147 卻是構形轉變堆疊成類澱粉纖維主要發生的區域。在大多數的研究中所使用的都是小片段的普立昂胜肽而對於普立昂蛋白的其他區域是否有介入類澱粉纖維的形成卻不清楚，從本實驗結果也得知單一胺基酸的負面影響 (類澱粉形成效率與引晶屏障) 可以經由其他胺基酸的取代來補償 (compensate)，然而終究只是對某段區域做探討，

未來如能將研究長度延伸，將探討的不將僅僅侷限於序列的相似度對 PrP-res 的影響，而是就整體普立昂蛋白的三級結構做研究。



表 4.1 普立昂胜肽其自發性形成類澱粉動力學、熱力學溶解度以及引晶屏障

Peptides	lag time (hr)	Remaining monomer concentration (μM)	Normalized seeding barrier using bPrP fibrils as seeds	Normalized seeding barrier using mdPrP fibrils as seeds
bPrP	61.1 \pm 10	1.95 \pm 0.33	1	4
mdPrP/bPrPS135N	72.2 \pm 5.5	1.62 \pm 0.24	8	1
One-residue different				
catPrP / bPrPV112M	N.D	1.65 \pm 0.11	1	2
dogPrP / bPrPM129L	71.4 \pm 12	1.19 \pm 0.07***	4	4
bvPrP / bPrPL138M	42.3 \pm 13.5*	1.39 \pm 0.01**	0.5	1
pigPrP /bPrPN143S	117.8 \pm 1.5***	2.79 \pm 0.23***	8	4
Two-residue different				
lionPrP (V112M,S135N)	51.2 \pm 14.3	1.63 \pm 0.06	2	2
mPrP (M109L,L138M)	65.5 \pm 6.8	1.09 \pm 0.02***	2	2
Three-residue different				
haPrP (V112M,L138M,I139M)	118.9 \pm 4.9***	2.95 \pm 0.59***	2	8
huPrP (V112M,L138I,N143S)	61.8 \pm 8.4	1.16 \pm 0.07***	2	16

備註：p<0.05*；p<0.01**；p<0.001***

N.D：not-detectable

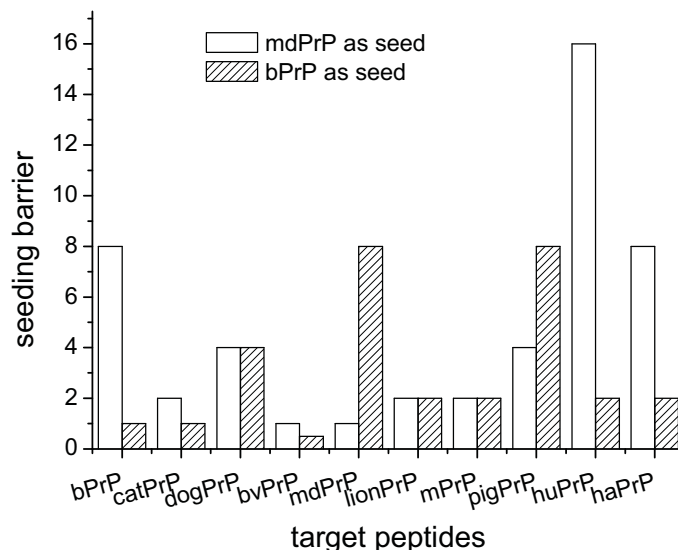


圖 4.1 以 bPrP 或 mdPrP 為晶種對各物種普立昂胜肽之引晶屏障。無論是以 bPrP 或 mPrP 為晶種時，對 dogPrP 與 pigPrP 之引晶屏障皆高 (1:4)，然而以 mdPrP 為晶種時，對 haPrP 與 huPrP 之引晶屏障 (分別為 1:8 與 1:16) 比以 bPrP 為晶種時高 (分別為 1:2 與 1:2)。

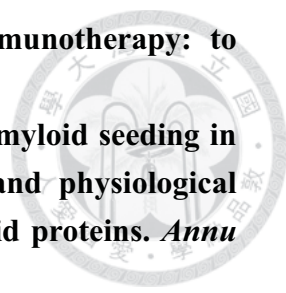
參考文獻



1. Dobson, C. M. (2004). Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol* 15, 3-16.
2. Wolynes, P. G., Onuchic, J. N. & Thirumalai, D. (1995). Navigating the folding routes. *Science* 267, 1619-20.
3. Dill, K. A. & Chan, H. S. (1997). From Levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol* 4, 10-9.
4. Jahn, T. R. & Radford, S. E. (2005). The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J* 272, 5962-70.
5. Rochet, J. C. & Lansbury, P. T., Jr. (2000). Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr Opin Struct Biol* 10, 60-8.
6. Stefani, M. & Dobson, C. M. (2003). Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med (Berl)* 81, 678-99.
7. Hartl, F. U., Bracher, A. & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324-32.
8. Cobb, N. J. & Surewicz, W. K. (2009). Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry* 48, 2574-85.
9. Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13363-83.
10. Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* 24, 519-50.
11. Imran, M. & Mahmood, S. (2011). An overview of animal prion diseases. *Viral J* 8, 493.
12. Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. & Smith, P. G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347, 921-5.
13. Trevitt, C. R. & Singh, P. N. (2003). Variant Creutzfeldt-Jakob disease: pathology, epidemiology, and public health implications. *Am J Clin Nutr* 78, 651S-656S.
14. Beghi, E., Gandolfo, C., Ferrarese, C., Rizzuto, N., Poli, G., Tonini, M. C., Vita, G., Leone, M., Logroscino, G., Granieri, E., Salemi, G., Savettieri, G., Frattola, L., Ru, G., Mancardi, G. L. & Messina, C. (2004). Bovine spongiform encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob disease: facts and uncertainties underlying the causal link between animal and human diseases. *Neurol Sci* 25, 122-9.

15. Baeten, L. A., Powers, B. E., Jewell, J. E., Spraker, T. R. & Miller, M. W. (2007). A natural case of chronic wasting disease in a free-ranging moose (*Alces alces shirasi*). *J Wildl Dis* 43, 309-14.
16. Joly, D. O., Samuel, M. D., Langenberg, J. A., Rolley, R. E. & Keane, D. P. (2009). Surveillance to detect chronic wasting disease in white-tailed deer in Wisconsin. *J Wildl Dis* 45, 989-97.
17. Walsh, D. P. & Miller, M. W. (2010). A weighted surveillance approach for detecting chronic wasting disease foci. *J Wildl Dis* 46, 118-35.
18. Sigurdson, C. J. (2008). A prion disease of cervids: chronic wasting disease. *Vet Res* 39, 41.
19. Williams, E. S. (2005). Chronic wasting disease. *Vet Pathol* 42, 530-49.
20. Miller, M. W., Williams, E. S., Hobbs, N. T. & Wolfe, L. L. (2004). Environmental sources of prion transmission in mule deer. *Emerg Infect Dis* 10, 1003-6.
21. Gilch, S., Chitoor, N., Taguchi, Y., Stuart, M., Jewell, J. E. & Schatzl, H. M. (2011). Chronic wasting disease. *Top Curr Chem* 305, 51-77.
22. Bolton, D. C., McKinley, M. P. & Prusiner, S. B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218, 1309-11.
23. Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A. & Clarke, M. C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214, 764-6.
24. Rogers, N. G., Basnight, M., Gibbs, C. J. & Gajdusek, D. C. (1967). Latent viruses in chimpanzees with experimental kuru. *Nature* 216, 446-9.
25. Griffith, J. S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature* 215, 1043-4.
26. Prusiner, S. B., Bolton, D. C., Groth, D. F., Bowman, K. A., Cochran, S. P. & McKinley, M. P. (1982). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 21, 6942-50.
27. Gabizon, R., McKinley, M. P., Groth, D. & Prusiner, S. B. (1988). Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6617-21.
28. Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E. & et al. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40, 735-46.
29. Hsiao, K. K., Scott, M., Foster, D., Groth, D. F., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1990). Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science* 250, 1587-90.
30. Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. & Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-47.

31. Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K. & Prusiner, S. B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229-40.
32. Kretzschmar, H. A., Stowring, L. E., Westaway, D., Stubblebine, W. H., Prusiner, S. B. & Dearmond, S. J. (1986). Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* 5, 315-24.
33. Aguzzi, A. & Polymenidou, M. (2004). Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* 116, 313-27.
34. Kretzschmar, H. A., Prusiner, S. B., Stowring, L. E. & DeArmond, S. J. (1986). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* 122, 1-5.
35. Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. & Wuthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* 382, 180-2.
36. Donne, D. G., Viles, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Wright, P. E. & Dyson, H. J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13452-7.
37. Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R. & Wuthrich, K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* 413, 282-8.
38. Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G. & Wuthrich, K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 145-50.
39. Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. & et al. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10962-6.
40. Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-30.
41. McKinley, M. P., Bolton, D. C. & Prusiner, S. B. (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35, 57-62.
42. Surewicz, W. K. & Apostol, M. I. (2011). Prion protein and its conformational conversion: a structural perspective. *Top Curr Chem* 305, 135-67.
43. Jarrett, J. T. & Lansbury, P. T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055-8.

- 
44. Aguzzi, A. & Sigurdson, C. J. (2004). Antiprion immunotherapy: to suppress or to stimulate? *Nat Rev Immunol* 4, 725-36.
45. Harper, J. D. & Lansbury, P. T., Jr. (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem* 66, 385-407.
46. Rogers, M., Yehiely, F., Scott, M. & Prusiner, S. B. (1993). Conversion of truncated and elongated prion proteins into the scrapie isoform in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3182-6.
47. Supattapone, S., Bosque, P., Muramoto, T., Wille, H., Aagaard, C., Peretz, D., Nguyen, H. O., Heinrich, C., Torchia, M., Safar, J., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. & Scott, M. (1999). Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell* 96, 869-78.
48. Holscher, C., Delius, H. & Burkle, A. (1998). Overexpression of nonconvertible PrPc delta114-121 in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells leads to trans-dominant inhibition of wild-type PrP(Sc) accumulation. *J Virol* 72, 1153-9.
49. Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O. & Tagliavini, F. (1993). Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362, 543-6.
50. Chabry, J., Caughey, B. & Chesebro, B. (1998). Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides. *J Biol Chem* 273, 13203-7.
51. Nguyen, J., Baldwin, M. A., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1995). Prion protein peptides induce alpha-helix to beta-sheet conformational transitions. *Biochemistry* 34, 4186-92.
52. Kaneko, K., Peretz, D., Pan, K. M., Blochberger, T. C., Wille, H., Gabizon, R., Griffith, O. H., Cohen, F. E., Baldwin, M. A. & Prusiner, S. B. (1995). Prion protein (PrP) synthetic peptides induce cellular PrP to acquire properties of the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11160-4.
53. Huang, Z., Gabriel, J. M., Baldwin, M. A., Fletterick, R. J., Prusiner, S. B. & Cohen, F. E. (1994). Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7139-43.
54. Zhang, H., Kaneko, K., Nguyen, J. T., Livshits, T. L., Baldwin, M. A., Cohen, F. E., James, T. L. & Prusiner, S. B. (1995). Conformational transitions in peptides containing two putative alpha-helices of the prion protein. *J Mol Biol* 250, 514-26.

55. Blondelle, S. E., Forood, B., Houghten, R. A. & Perez-Paya, E. (1997). Polyalanine-based peptides as models for self-associated beta-pleated-sheet complexes. *Biochemistry* 36, 8393-400.
56. Huang, Z., Prusiner, S. B. & Cohen, F. E. (1996). Structures of prion proteins and conformational models for prion diseases. *Curr Top Microbiol Immunol* 207, 49-67.
57. Alpers, M. & Gajdusek, D. C. (1965). Changing patterns of kuru: epidemiological changes in the period of increasing contact of the Fore people with western civilization. *Am J Trop Med Hyg* 14, 852-79.
58. Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T. & Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370, 471-4.
59. Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. & Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389, 498-501.
60. Aguzzi, A., Heikenwalder, M. & Polymenidou, M. (2007). Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 552-61.
61. Schatzl, H. M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1995). Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol* 245, 362-74.
62. Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S. J., Westaway, D. & Prusiner, S. B. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59, 847-57.
63. McKintosh, E., Tabrizi, S. J. & Collinge, J. (2003). Prion diseases. *J Neurovirol* 9, 183-93.
64. Priola, S. A., Caughey, B., Wehrly, K. & Chesebro, B. (1995). A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP. *J Biol Chem* 270, 3299-305.
65. Scott, M. R., Kohler, R., Foster, D. & Prusiner, S. B. (1992). Chimeric prion protein expression in cultured cells and transgenic mice. *Protein Sci* 1, 986-97.
66. Scott, M., Groth, D., Foster, D., Torchia, M., Yang, S. L., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1993). Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell* 73, 979-88.
67. Raymond, G. J., Bossers, A., Raymond, L. D., O'Rourke, K. I., McHolland,

- L. E., Bryant, P. K., 3rd, Miller, M. W., Williams, E. S., Smits, M. & Caughey, B. (2000). Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease. *EMBO J* 19, 4425-30.
68. Raymond, G. J., Hope, J., Kocisko, D. A., Priola, S. A., Raymond, L. D., Bossers, A., Ironside, J., Will, R. G., Chen, S. G., Petersen, R. B., Gambetti, P., Rubenstein, R., Smits, M. A., Lansbury, P. T., Jr. & Caughey, B. (1997). Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature* 388, 285-8.
69. Lee, L. Y. & Chen, R. P. (2007). Quantifying the sequence-dependent species barrier between hamster and mouse prions. *J Am Chem Soc* 129, 1644-52.
70. Kocisko, D. A., Priola, S. A., Raymond, G. J., Chesebro, B., Lansbury, P. T., Jr. & Caughey, B. (1995). Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3923-7.
71. Goldmann, W., Martin, T., Foster, J., Hughes, S., Smith, G., Hughes, K., Dawson, M. & Hunter, N. (1996). Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period. *J Gen Virol* 77 (Pt 11), 2885-91.
72. Priola, S. A. (1999). Prion protein and species barriers in the transmissible spongiform encephalopathies. *Biomed Pharmacother* 53, 27-33.
73. Horiuchi, M. & Caughey, B. (1999). Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *EMBO J* 18, 3193-203.
74. Chernoff, Y. O. (2004). Do amyloids remember their origin? New insights into the prion species barrier. *Mol Cell* 14, 147-8.
75. Vanik, D. L., Surewicz, K. A. & Surewicz, W. K. (2004). Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions. *Mol Cell* 14, 139-45.
76. Tahiri-Alaoui, A. & James, W. (2005). Rapid formation of amyloid from alpha-monomeric recombinant human PrP in vitro. *Protein Sci* 14, 942-7.
77. Asano, M., Mohri, S., Ironside, J. W., Ito, M., Tamaoki, N. & Kitamoto, T. (2006). vCJD prion acquires altered virulence through trans-species infection. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 293-9.
78. Scott, M. R., Safar, J., Telling, G., Nguyen, O., Groth, D., Torchia, M., Koehler, R., Tremblay, P., Walther, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. &

- Prusiner, S. B. (1997). Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14279-84.
79. Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J. & Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383, 685-90.
80. Shibuya, S., Higuchi, J., Shin, R. W., Tateishi, J. & Kitamoto, T. (1998). Protective prion protein polymorphisms against sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 351, 419.
81. Palmer, M. S., Dryden, A. J., Hughes, J. T. & Collinge, J. (1991). Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 352, 340-2.
82. Mead, S., Stumpf, M. P., Whitfield, J., Beck, J. A., Poulter, M., Campbell, T., Uphill, J. B., Goldstein, D., Alpers, M., Fisher, E. M. & Collinge, J. (2003). Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science* 300, 640-3.
83. Liu, H., Farr-Jones, S., Ulyanov, N. B., Llinas, M., Marqusee, S., Groth, D., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. & James, T. L. (1999). Solution structure of Syrian hamster prion protein rPrP(90-231). *Biochemistry* 38, 5362-77.
84. Angers, R. C., Browning, S. R., Seward, T. S., Sigurdson, C. J., Miller, M. W., Hoover, E. A. & Telling, G. C. (2006). Prions in skeletal muscles of deer with chronic wasting disease. *Science* 311, 1117.
85. Mawhinney, S., Pape, W. J., Forster, J. E., Anderson, C. A., Bosque, P. & Miller, M. W. (2006). Human prion disease and relative risk associated with chronic wasting disease. *Emerg Infect Dis* 12, 1527-35.
86. Belay, E. D., Maddox, R. A., Williams, E. S., Miller, M. W., Gambetti, P. & Schonberger, L. B. (2004). Chronic wasting disease and potential transmission to humans. *Emerg Infect Dis* 10, 977-84.
87. Bruce, M. E., McBride, P. A. & Farquhar, C. F. (1989). Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci Lett* 102, 1-6.
88. Xie, Z., O'Rourke, K. I., Dong, Z., Jenny, A. L., Langenberg, J. A., Belay, E. D., Schonberger, L. B., Petersen, R. B., Zou, W., Kong, Q., Gambetti, P. & Chen, S. G. (2006). Chronic wasting disease of elk and deer and Creutzfeldt-Jakob disease: comparative analysis of the scrapie prion protein. *J Biol Chem* 281, 4199-206.
89. Bartz, J. C., Marsh, R. F., McKenzie, D. I. & Aiken, J. M. (1998). The host range of chronic wasting disease is altered on passage in ferrets. *Virology*

- 251, 297-301.
90. Bartz, J. C., Bessen, R. A., McKenzie, D., Marsh, R. F. & Aiken, J. M. (2000). Adaptation and selection of prion protein strain conformations following interspecies transmission of transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 74, 5542-7.
 91. Bellworthy, S. J., Hawkins, S. A., Green, R. B., Blamire, I., Dexter, G., Dexter, I., Lockey, R., Jeffrey, M., Ryder, S., Berthelin-Baker, C. & Simmons, M. M. (2005). Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy infectivity in Romney sheep up to the onset of clinical disease after oral challenge. *Vet Rec* 156, 197-202.
 92. O'Rourke, K. I., Besser, T. E., Miller, M. W., Cline, T. F., Spraker, T. R., Jenny, A. L., Wild, M. A., Zebarth, G. L. & Williams, E. S. (1999). PrP genotypes of captive and free-ranging Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) with chronic wasting disease. *J Gen Virol* 80 (Pt 10), 2765-9.
 93. Kong, Q., Huang, S., Zou, W., Vanegas, D., Wang, M., Wu, D., Yuan, J., Zheng, M., Bai, H., Deng, H., Chen, K., Jenny, A. L., O'Rourke, K., Belay, E. D., Schonberger, L. B., Petersen, R. B., Sy, M. S., Chen, S. G. & Gambetti, P. (2005). Chronic wasting disease of elk: transmissibility to humans examined by transgenic mouse models. *J Neurosci* 25, 7944-9.
 94. Tamguney, G., Giles, K., Bouzamondo-Bernstein, E., Bosque, P. J., Miller, M. W., Safar, J., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (2006). Transmission of elk and deer prions to transgenic mice. *J Virol* 80, 9104-14.
 95. Marsh, R. F., Kincaid, A. E., Bessen, R. A. & Bartz, J. C. (2005). Interspecies transmission of chronic wasting disease prions to squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J Virol* 79, 13794-6.
 96. Ventura, S., Lacroix, E. & Serrano, L. (2002). Insights into the origin of the tendency of the PI3-SH3 domain to form amyloid fibrils. *J Mol Biol* 322, 1147-58.
 97. Bessen, R. A. & Marsh, R. F. (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 68, 7859-68.
 98. Aldhous, P. (1990). BSE: spongiform encephalopathy found in cat. *Nature* 345, 194.
 99. Gibbs, C. J., Jr. & Gajdusek, D. C. (1973). Experimental subacute spongiform virus encephalopathies in primates and other laboratory animals. *Science* 182, 67-8.
 100. Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C. M., Wallace, A. C.,

- James, T. L., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1997). Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10069-74.
101. Sweeting, B., Khan, M. Q., Chakrabartty, A. & Pai, E. F. (2010). Structural factors underlying the species barrier and susceptibility to infection in prion disease. *Biochem Cell Biol* 88, 195-202.
102. Lysek, D. A., Schorn, C., Nivon, L. G., Esteve-Moya, V., Christen, B., Calzolari, L., von Schroetter, C., Fiorito, F., Herrmann, T., Guntert, P. & Wuthrich, K. (2005). Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 640-5.
103. Zhang, J. (2011). The structural stability of wild-type horse prion protein. *J Biomol Struct Dyn* 29, 369-77.
104. Perez, D. R., Damberger, F. F. & Wuthrich, K. (2010). Horse prion protein NMR structure and comparisons with related variants of the mouse prion protein. *J Mol Biol* 400, 121-8.
105. Saborio, G. P., Permanne, B. & Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411, 810-3.
106. Fernandez-Borges, N., de Castro, J. & Castilla, J. (2009). In vitro studies of the transmission barrier. *Prion* 3, 220-3.
107. Vidal, E., Fernandez-Borges, N., Pintado, B., Ordonez, M., Marquez, M., Fondevila, D., Torres, J. M., Pumarola, M. & Castilla, J. (2013). Bovine spongiform encephalopathy induces misfolding of alleged prion-resistant species cellular prion protein without altering its pathobiological features. *J Neurosci* 33, 7778-86.
108. Jones, E. M. & Surewicz, W. K. (2005). Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids. *Cell* 121, 63-72.
109. Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., Carlson, G. A. & et al. (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 63, 673-86.
110. Priola, S. A., Caughey, B., Race, R. E. & Chesebro, B. (1994). Heterologous PrP molecules interfere with accumulation of protease-resistant PrP in scrapie-infected murine neuroblastoma cells. *J Virol* 68, 4873-8.
111. Vorberg, I., Groschup, M. H., Pfaff, E. & Priola, S. A. (2003). Multiple amino acid residues within the rabbit prion protein inhibit formation of

- its abnormal isoform. *J Virol* 77, 2003-9.
112. Sreerama, N. & Woody, R. W. (2004). Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol* 383, 318-51.
113. Cartoni, C., Schinina, M. E., Maras, B., Nonno, R., Vaccari, G., Di Baria, M. A., Conte, M., Liu, Q. G., Lu, M., Cardone, F., Windl, O., Pocchiari, M. & Agrimi, U. (2005). Identification of the pathological prion protein allotypes in scrapie-infected heterozygous bank voles (*Clethrionomys glareolus*) by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1081, 122-6.
114. Takei, T., Okonogi, A., Tateno, K., Kimura, A., Kojima, S., Yazaki, K. & Miura, K. (2006). The effects of the side chains of hydrophobic aliphatic amino acid residues in an amphipathic polypeptide on the formation of alpha helix and its association. *J Biochem* 139, 271-8.
115. Kim, C. A. & Berg, J. M. (1993). Thermodynamic beta-sheet propensities measured using a zinc-finger host peptide. *Nature* 362, 267-70.
116. O'Neil, K. T. & DeGrado, W. F. (1990). A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science* 250, 646-51.
117. Hutchinson, E. G. & Thornton, J. M. (1994). A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins. *Protein Sci* 3, 2207-16.
118. Marsh, R. F. & Bessen, R. A. (1993). Epidemiologic and experimental studies on transmissible mink encephalopathy. *Dev Biol Stand* 80, 111-8.
119. Piening, N., Nonno, R., Di Bari, M., Walter, S., Windl, O., Agrimi, U., Kretzschmar, H. A. & Bertsch, U. (2006). Conversion efficiency of bank vole prion protein in vitro is determined by residues 155 and 170, but does not correlate with the high susceptibility of bank voles to sheep scrapie in vivo. *J Biol Chem* 281, 9373-84.
120. Raymond, G. J., Raymond, L. D., Meade-White, K. D., Hughson, A. G., Favara, C., Gardner, D., Williams, E. S., Miller, M. W., Race, R. E. & Caughey, B. (2007). Transmission and adaptation of chronic wasting disease to hamsters and transgenic mice: evidence for strains. *J Virol* 81, 4305-14.
121. Mathiason, C. K., Nalls, A. V., Seelig, D. M., Kraft, S. L., Carnes, K., Anderson, K. R., Hayes-Klug, J. & Hoover, E. A. (2013). Susceptibility of domestic cats to chronic wasting disease. *J Virol* 87, 1947-56.
122. Miller, M. W. & Williams, E. S. (2003). Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer. *Nature* 425, 35-6.
123. Weissmann, C., Fischer, M., Raeber, A., Bueler, H., Sailer, A., Shmerling,

- D., Rulicke, T., Brandner, S. & Aguzzi, A. (1998). The use of transgenic mice in the investigation of transmissible spongiform encephalopathies. *Rev Sci Tech* 17, 278-90.
124. Miller, M. W., Wild, M. A. & Williams, E. S. (1998). Epidemiology of chronic wasting disease in captive Rocky Mountain elk. *J Wildl Dis* 34, 532-8.
125. Mathiason, C. K., Hays, S. A., Powers, J., Hayes-Klug, J., Langenberg, J., Dahmes, S. J., Osborn, D. A., Miller, K. V., Warren, R. J., Mason, G. L. & Hoover, E. A. (2009). Infectious prions in pre-clinical deer and transmission of chronic wasting disease solely by environmental exposure. *PLoS One* 4, e5916.
126. Mathiason, C. K., Powers, J. G., Dahmes, S. J., Osborn, D. A., Miller, K. V., Warren, R. J., Mason, G. L., Hays, S. A., Hayes-Klug, J., Seelig, D. M., Wild, M. A., Wolfe, L. L., Spraker, T. R., Miller, M. W., Sigurdson, C. J., Telling, G. C. & Hoover, E. A. (2006). Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* 314, 133-6.
127. Sigurdson, C. J., Williams, E. S., Miller, M. W., Spraker, T. R., O'Rourke, K. I. & Hoover, E. A. (1999). Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*). *J Gen Virol* 80 (Pt 10), 2757-64.
128. Tamguney, G., Miller, M. W., Wolfe, L. L., Sirochman, T. M., Glidden, D. V., Palmer, C., Lemus, A., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (2009). Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces. *Nature* 461, 529-32.
129. Tamguney, G., Richt, J. A., Hamir, A. N., Greenlee, J. J., Miller, M. W., Wolfe, L. L., Sirochman, T. M., Young, A. J., Glidden, D. V., Johnson, N. L., Giles, K., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (2012). Salivary prions in sheep and deer. *Prion* 6, 52-61.
130. Haley, N. J., Mathiason, C. K., Zabel, M. D., Telling, G. C. & Hoover, E. A. (2009). Detection of sub-clinical CWD infection in conventional test-negative deer long after oral exposure to urine and feces from CWD+ deer. *PLoS One* 4, e7990.
131. Miller, M. W., Swanson, H. M., Wolfe, L. L., Quartarone, F. G., Huwer, S. L., Southwick, C. H. & Lukacs, P. M. (2008). Lions and prions and deer demise. *PLoS One* 3, e4019.
132. Heisey, D. M., Mickelsen, N. A., Schneider, J. R., Johnson, C. J., Langenberg, J. A., Bochsler, P. N., Keane, D. P. & Barr, D. J. (2010). Chronic wasting disease (CWD) susceptibility of several North American rodents that are sympatric with cervid CWD epidemics. *J Virol* 84, 210-5.

133. Kurt, T. D., Telling, G. C., Zabel, M. D. & Hoover, E. A. (2009). Trans-species amplification of PrP(CWD) and correlation with rigid loop 170N. *Virology* 387, 235-43.
134. Conway, K. A., Lee, S. J., Rochet, J. C., Ding, T. T., Williamson, R. E. & Lansbury, P. T., Jr. (2000). Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 571-6.
135. Conlon, I. J., Dunn, G. A., Mudge, A. W. & Raff, M. C. (2001). Extracellular control of cell size. *Nat Cell Biol* 3, 918-21.
136. Al-Habori, M. (2001). Macromolecular crowding and its role as intracellular signalling of cell volume regulation. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 844-64.
137. Bhatia, R., Lin, H. & Lal, R. (2000). Fresh and globular amyloid beta protein (1-42) induces rapid cellular degeneration: evidence for AbetaP channel-mediated cellular toxicity. *FASEB J* 14, 1233-43.
138. Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C. B., Condron, M. M., Axelman, K., Forsell, C., Stenh, C., Luthman, J., Teplow, D. B., Younkin, S. G., Naslund, J. & Lannfelt, L. (2001). The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci* 4, 887-93.
139. Sousa, M. M., Cardoso, I., Fernandes, R., Guimaraes, A. & Saraiva, M. J. (2001). Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy: evidence for toxicity of nonfibrillar aggregates. *Am J Pathol* 159, 1993-2000.
140. Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M. & Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416, 507-11.

附錄

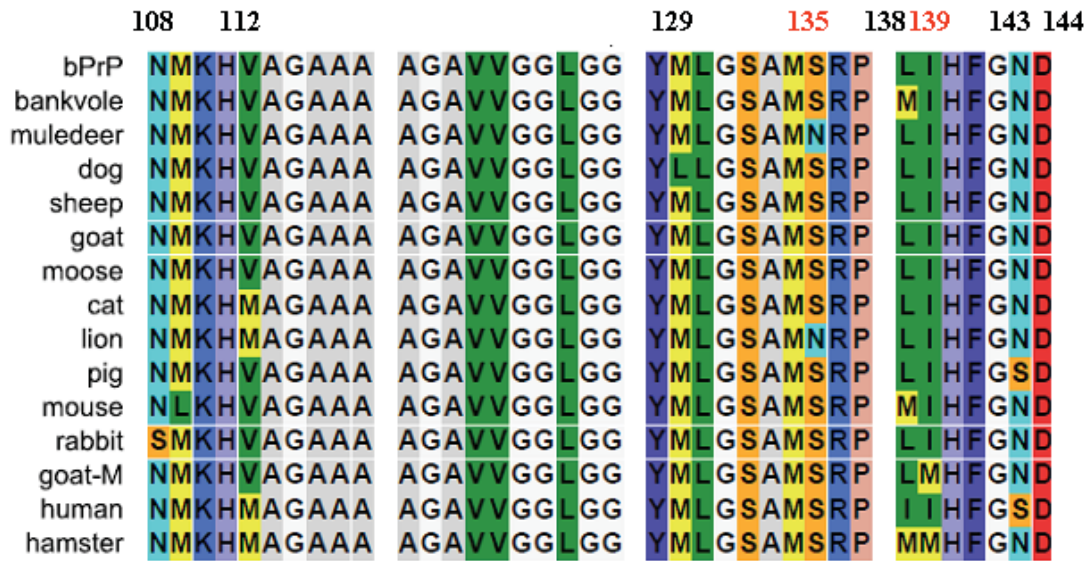


圖 1 本篇論文中所有提到之物種普立昂胜肽序列 108-144 (序列以人類普立昂蛋白為基準)。goat-M 表示其 135 位置為 Met。

	Amino acid at codon:							RFLP*	Restriction†			
	136	141	142	143	154	171	240		<i>Sma</i> I 42	- 138	<i>Nsi</i> I 142	<i>Ma</i> ell 144
(a) Goat												
1, wt	Ala	Leu	Ile	His	Arg	Gln	Ser	h2	A (-)	C	A (-)	A (-)
2, wt _{Pro}	Ala	Leu	Ile	His	Arg	Gln	Pro	h1	G (+)	T	A (-)	A (-)
3, Met ₁₄₂	Ala	Leu	Met	His	Arg	Gln	Pro	h1	G (+)	T	G (+)	A (-)
4, Arg ₁₄₃	Ala	Leu	Ile	Arg	Arg	Gln	Pro	h1	G (+)	T	A (-)	G (+)
(b) Sheep												
wt	Ala	Leu	Ile	His	Arg	Gln	Ser	h1, h2	G (+)	C	A (-)	A (-)
Val ₁₃₆	Val	Leu	Ile	His	Arg	Gln	Ser	h2	G (+)	C	A (-)	A (-)
Phe ₁₄₁	Ala	Phe	Ile	His	Arg	Gln	Ser	h1	G (+)	C	A (-)	A (-)
His ₁₅₄	Ala	Leu	Ile	His	His	Arg	Ser	h1	G (+)	C	A (-)	A (-)
Arg ₁₇₁	Ala	Leu	Ile	His	Arg	Arg	Ser	h1	G (+)	C	A (-)	A (-)

圖 2 山羊與綿羊的 PrP 基因 haplotype⁷¹。有 4 條不同 PrP 蛋白被發現，其中 3 條 PrP 蛋白其位於 142、143 與 240 的胺基酸改變只有在山羊體內看的見，第 4 條 PrP 蛋白則在大部份的綿羊中很常見此種變異 (Ala136-Arg154-Gln171)。

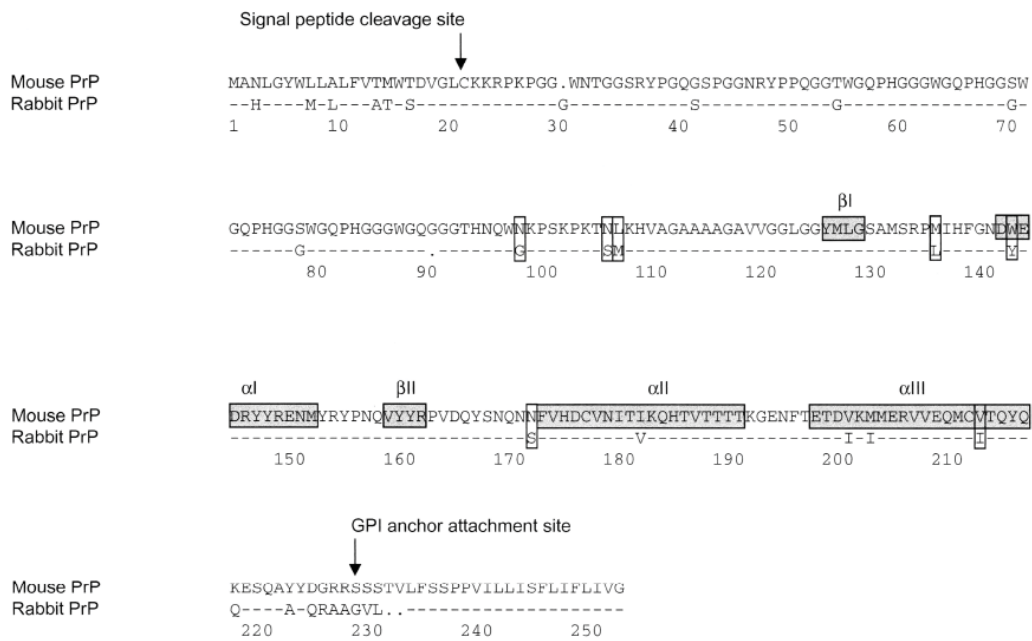
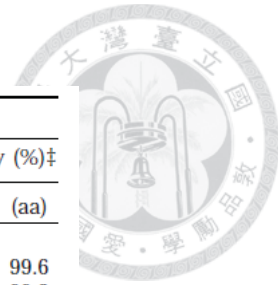


圖 3 比較小鼠與兔子的 PrP 胺基酸序列¹¹¹。小鼠與兔子的 PrP 蛋白有 87% 相似度，只有 22 個胺基酸不同，若是將小鼠 PrP 之 137、144、173 與 214 位置上胺基酸置換成兔子的胺基酸，則會影響 PrP-res 的形成。

(A)

Species	Samples†	Differences		Identity (%)‡	
		(nt)	(aa)	(nt)	(aa)
A. Apes					
Gorilla	4	2	1	99.7	99.6
Chimpanzee	5	6	2	99.2	99.2
Pygmy chimpanzee	2	6	2	99.2	99.2
Gibbon (<i>H. lar</i>)	3	15	2	98.0	99.2
Stamang (<i>H. synd.</i>)	3	15	2	98.0	99.2
Orang-utan	5	17 (41)	5 (-8)§	97.8	98.0
B. Old-world monkeys					
Colobus	5	27	7	96.5	97.2
Presbytis	3	26	8	96.6	96.8
Baboon	4	32	9	95.8	96.4
Mandrill	3	32	10	95.8	96.0
Rhesus macaque	3	32	9	95.8	96.4
Cynomolgus macaque	2	32	9	95.8	96.4
Stumptail macaque	2	33	9	95.7	96.4
Japanese macaque	2	32	9	95.8	96.4
Pigtail macaque	3	32	9	95.8	96.4
AGM/aethiops	2	31 (55)	9 (-8)	93.3	92.9
AGM/sabaeus	1	31 (55)	9 (-8)	93.3	92.9
AGM/diana	3	31 (55)	9 (-8)	93.3	92.9
C. New-world monkeys					
Spider	3	34 (61)	7 (-1; -8)	92.4	93.7
Squirrel	5	38 (65)	9 (-1; +8)	92.2	93.8
Capuchin	3	39 (42)	10 (-1)	94.6	95.7
Callicebus	4	35	9	95.4	96.4
Aotes	2	39 (42)	10 (-1)	94.5	95.7
Marmoset	4	34 (37)	9 (-1)	95.3	96.0
Tamarin	2	35 (38)	9 (-1)	95.1	96.0



(B)

	90	105	120	135	150	165	
human	QPHGG-GWQGGGTHSQWNKPSKPKTN	M	H-1	H-2	I	F	174
gorilla	174
chimp	174
pygmy chimp	174
gibbon	174
orang utan	174
colobus	S	L	N	Y	174
presbytis	S	L	N	Y	174
baboon	N	H	S	L	N	174
mandrill	N	H	N	S	L	174
rhesus macaque	N	H	S	L	N	174
cynomolgus mac.	N	H	S	L	N	174
stumptail mac.	N	H	S	L	N	174
Japanese mac.	N	H	S	L	N	174
pigtail mac.	N	H	S	L	N	174
AGM (aethiops)	N	H	S	L	N	166
AGM (diana)	N	H	S	L	N	166
AGM (sabaeus)	N	H	S	L	N	166
squirrel	N	L	N	Y	181
capuchin	N	S	V	L	N	173
spider	N	L	N	Y	173
callicebus	N	V	L	N	Y	174
aotes	N	L	N	Y	173
marmoset	N	V	L	N	Y	173
tamarin	N	V	L	N	Y	173

(C)

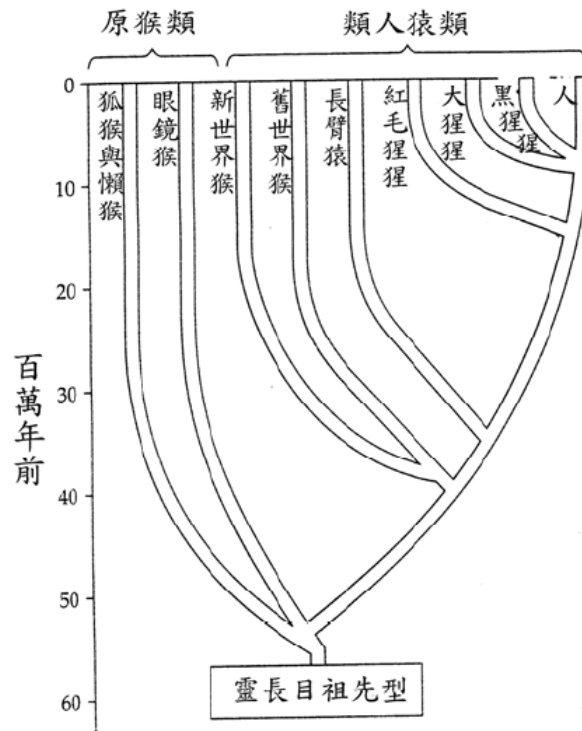
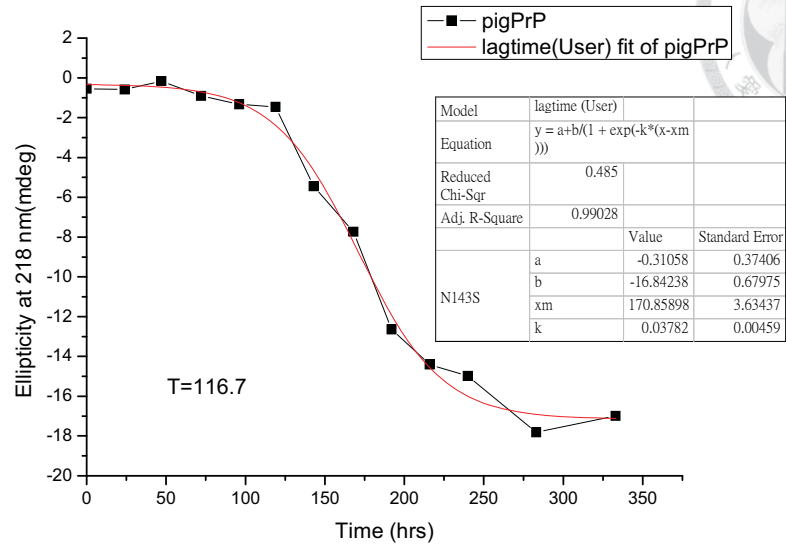


圖 4 猴、猿與人類的親緣關係⁶¹。(A) 比較靈長類與人類 PrP 胺基酸相似度從 92.9%至 99.6%；(B) 靈長類 PrP 在 129 胺基酸位置皆為 Met；(C) 新世界猴染色體數目 54 條、舊世界猴有 48 條與人類 46 條較相近，此外在構造、生理與演化親緣上，舊世界猴與猿類和人類亦比較接近；然而新世界猴、舊世界猴與猿類和人類可以共同歸類為類人猿類 (Anthropoids)。

(A)



(B)

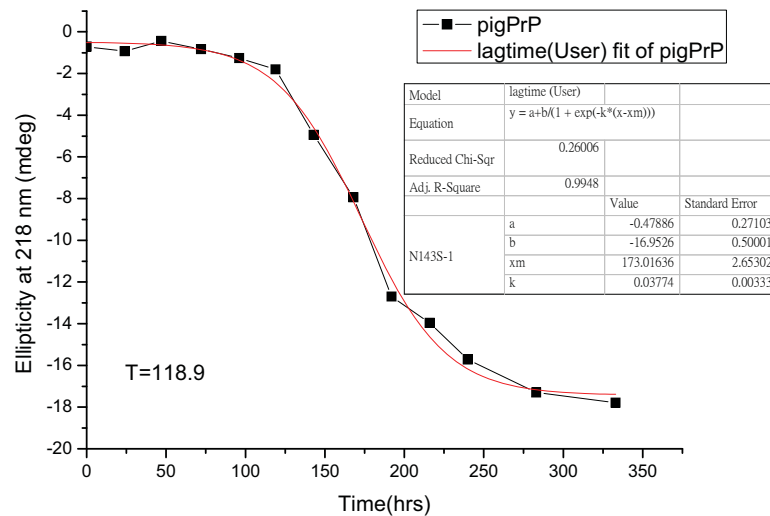
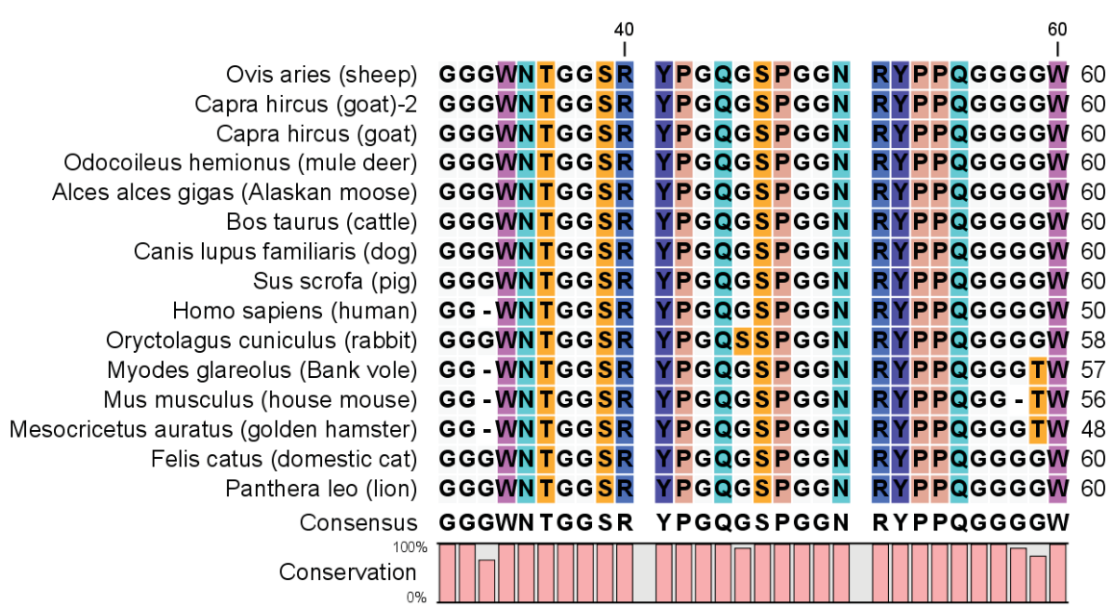
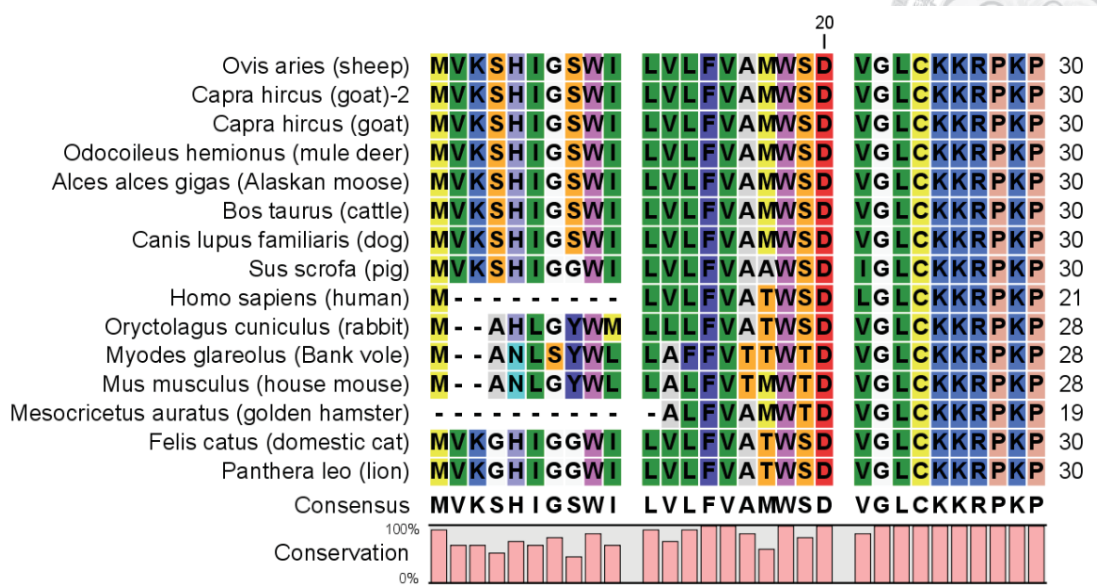
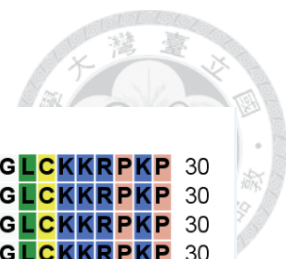
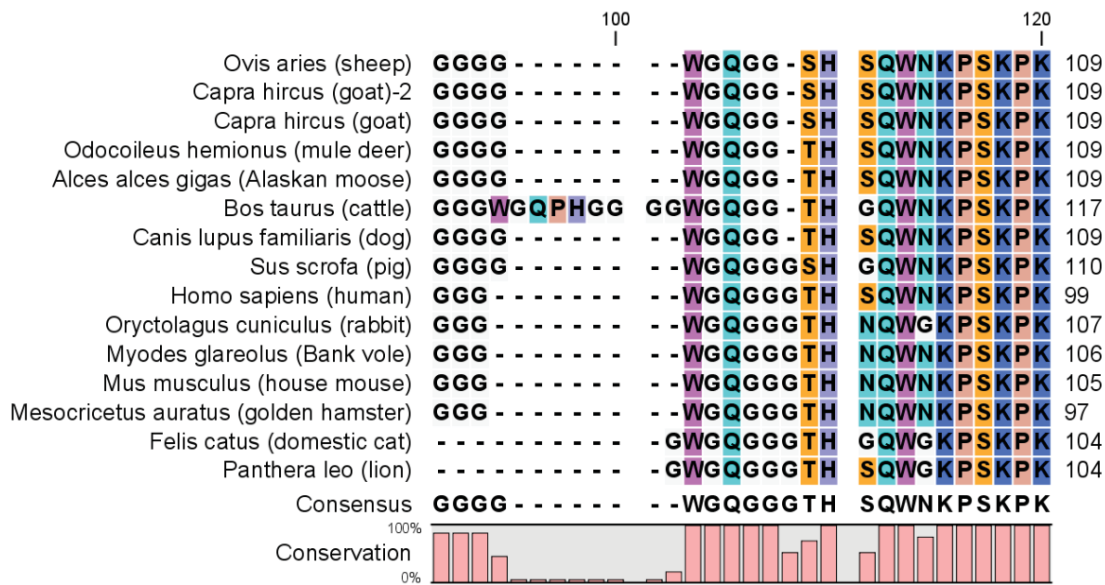
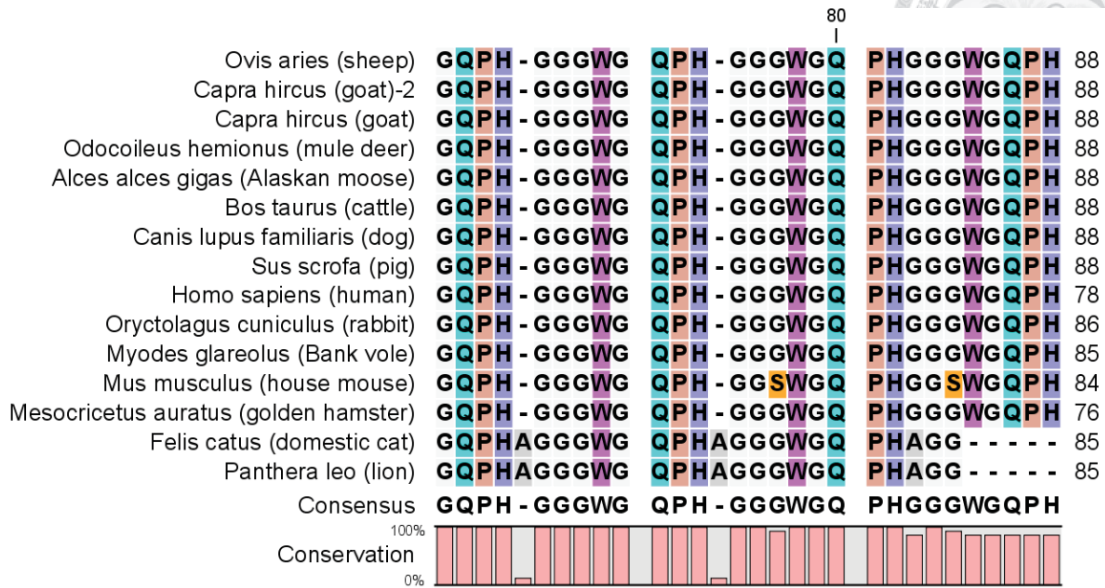
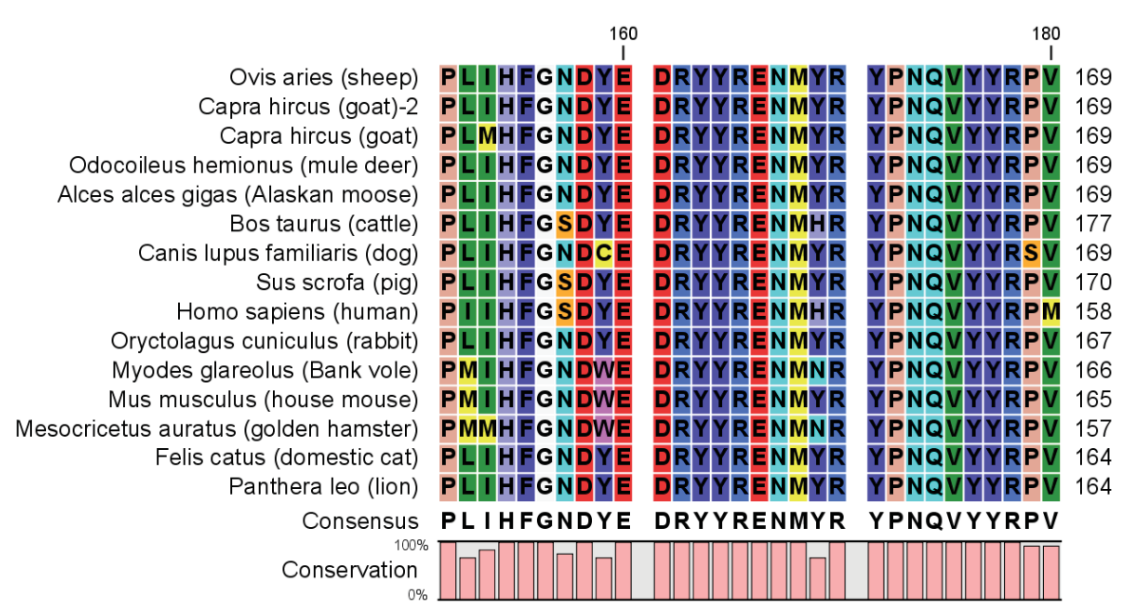
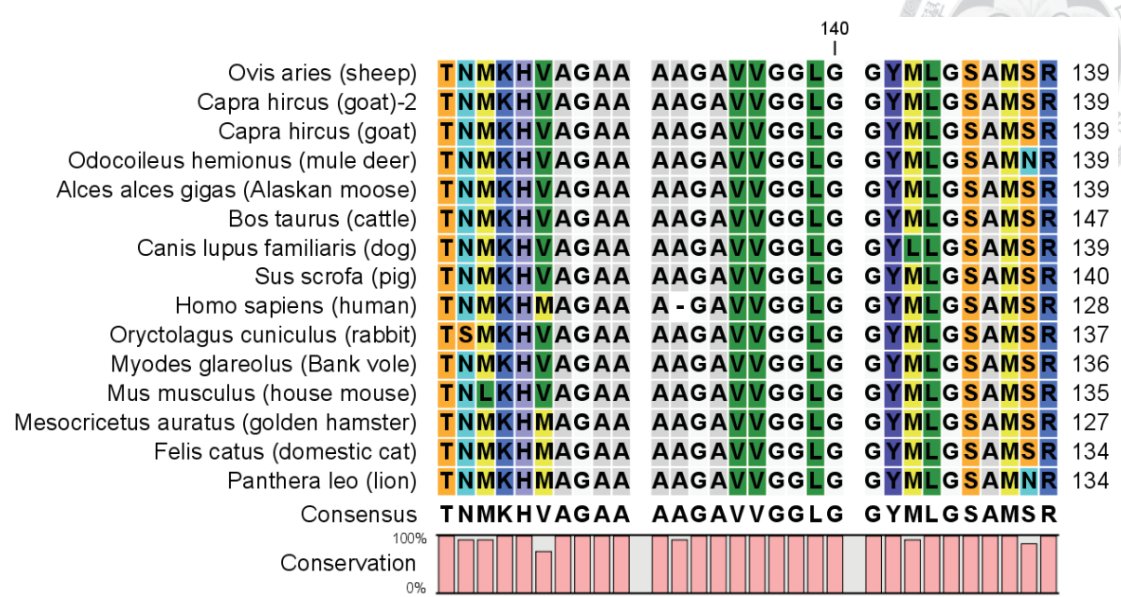
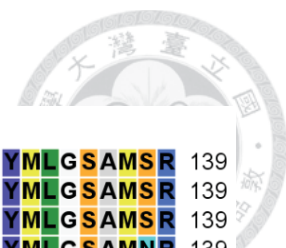
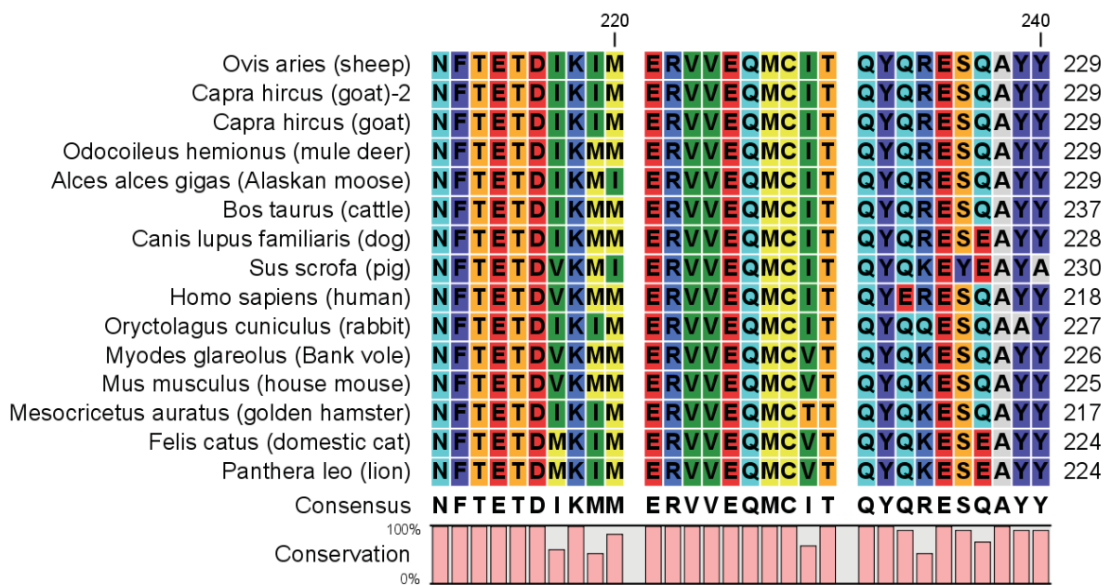
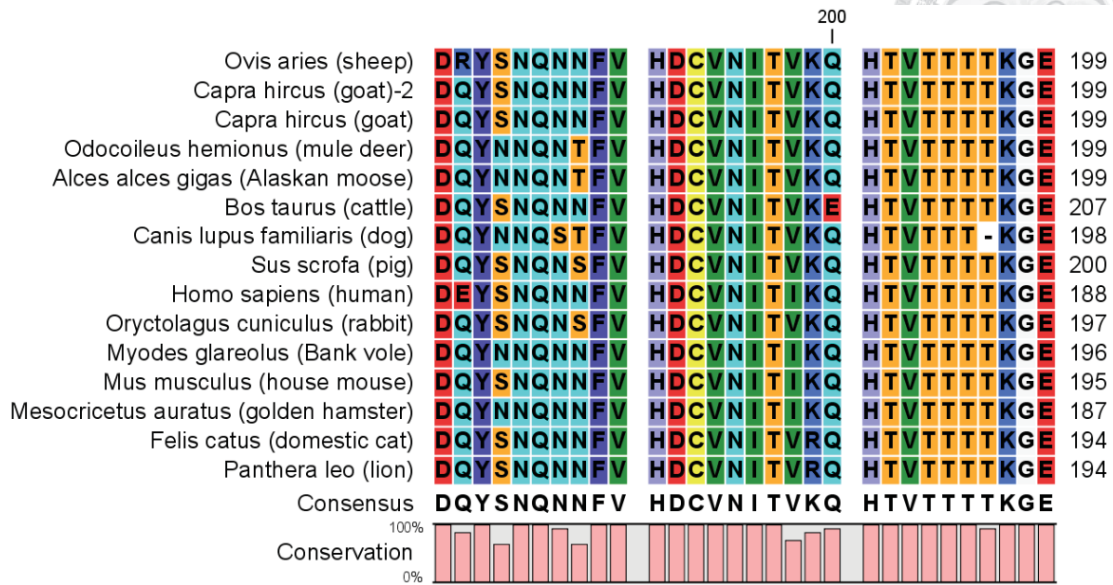
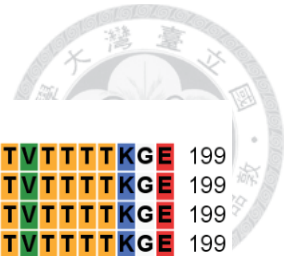


圖 5 利用 CD 觀測普立昂胜肽類澱粉纖維形成之生長遲滯期。以 pigPrP 為例，在不同時間點下觀察普立昂胜肽於 218 nm 之變化情形，圖(A)(B)之曲線表示該樣品分別進行 2 次掃描後，利用 origin 軟體 fitting 後計算出 lagtime。其他各普立昂胜肽之 lagtime 用同樣方式計算而得。









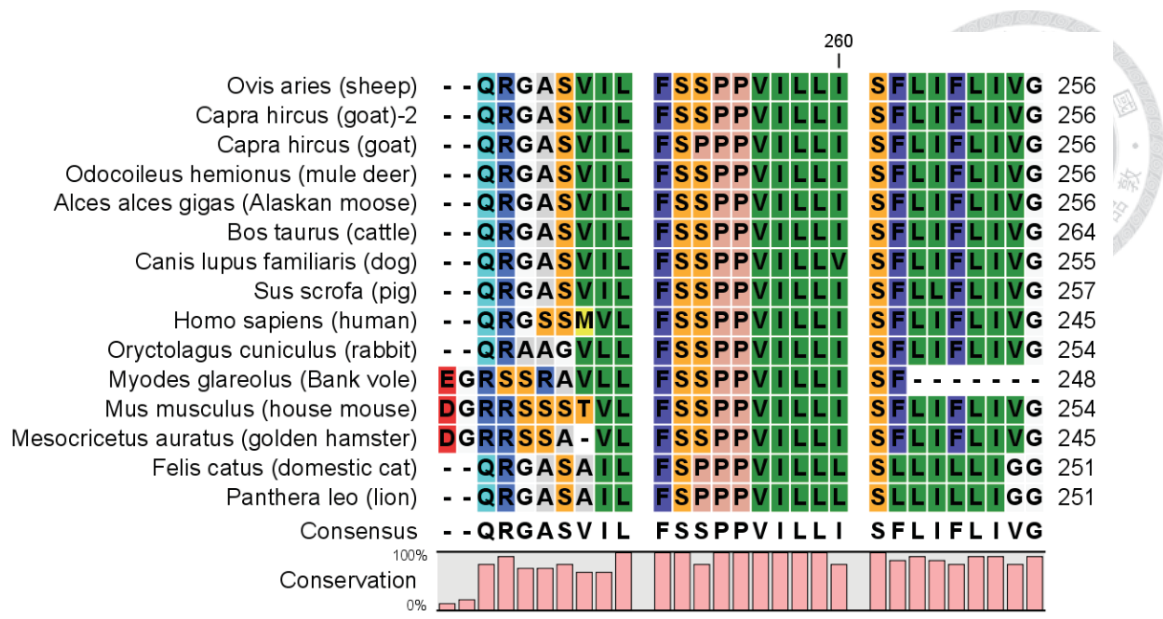


圖 6 哺乳類動物之普立昂蛋白基因序列。Bos taurus (cattle) (CAA39368), Felis catus (domestic cat)(AGA63675), Canis lupus familiaris (dog)(ACO71291), Myodes glareolus (Bank vole) (AF367624_1), Sus scrofa (pig) (AAA92862), Odocoileus hemionus (mule deer) (P47852.1), Panthera leo (lion) (ABY83003), Mus musculus (house mouse) (AAH06703), Mesocricetus auratus (golden hamster) (ABL75504), Homo sapiens (human) (BAA00011), Ovis aries (sheep) (CAA04274), Capra hircus (goat) (CAA63050), Capra hircus (goat)-2 (ACV31927), Alces alces gigas (Alaskan moose) (AAZ81479), Oryctolagus cuniculus (rabbit) (AAD01554)。