

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19209020

研究課題名（和文）発光性アプタマーを用いる異常プリオンタンパク質の新規検査法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel detection method for abnormal prion protein using luminescent aptamer.

研究代表者

甲斐 雅亮（KAI MASAOKI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00160953

研究成果の概要（和文）：本研究は、プリオン病の原因と考えられている異常プリオンタンパク質の高感度で簡便な新規検出法の開発を目的としている。そこで、正常プリオンタンパク質の大腸菌での発現とアフィニティーカラムによる精製を行ない、この正常プリオンタンパク質をもとに、プロテアーゼ分解に対して抵抗性を示すプリオンタンパク質を作製した。次に、核酸であるアプタマーと化学発光試薬、または、高分子プローブを用いることで、膜上に吸着させたプリオンタンパク質の高感度かつ特異的な検出法を開発した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research is to develop the novel detection method for the abnormal prion protein, which causes the prion disease. The recombinant normal prion protein was expressed in *E. coli*, and purified with affinity chromatography. The denatured prion protein, which indicates resistance against protease digestion, was prepared by the treatment of the normal prion protein with cupric ions. In this project, we developed highly sensitive and specific detection methods for the prion proteins on a solid phase membrane using nucleic aptamer and chemiluminescent reagents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2008年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2009年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2010年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
年度			
総計	36,400,000	10,920,000	47,320,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：プリオン、アプタマー、感染症

## 1. 研究開始当初の背景

狂牛病（牛海綿状脳症、BSE）やクロイツフェルト・ヤコブ病などは、総称してプリオン病と呼ばれている。プリオン病は、脳細胞に発現している正常のプリオンタンパク質（PrP<sup>C</sup>）が、立体構造的に変化した異常なプリオンタンパク質（PrP<sup>Sc</sup>）となり、中枢神経系において凝集・沈着することで発症すると考えられている。

プリオンタンパク質は、正常型では4カ所の $\alpha$ ヘリックスを形成しているが、異常型では、その中の2つが $\beta$ シートへと変化している。この異常型プリオンタンパク質は、熱に安定、難溶解性、プロテアーゼ分解に対して抵抗性を示すという特徴があり、動物の体内に摂取されると、その動物の正常型プリオンタンパク質を異常型へと変化させる。このことから、異常プリオンタンパク質は、プリオ

ン病感染の病原体と考えられており、これまでに、狂牛病に感染した牛由来の肉骨粉などの飼料を通して、他の動物に感染していることが指摘されている。したがって、食肉牛などは、市場に流通する前に、異常プリオンタンパク質の全頭検査を行なう必要があるが、現在の検査法では莫大な経費が必要とされている。

現在、異常プリオンタンパク質の検査には、抗体が用いられている。この抗体は、正常および異常プリオンタンパク質の両者を認識するため、検体組織を破砕して、proteinase K やコラゲナーゼなどで、正常プリオンタンパク質を完全に酵素分解しなければならず、数時間の前処理を必要としている。また、2次検査でも、異常型と正常型を区別できない抗体を使用するため、電気泳動後、ウェスタンブロットを行ない、酵素標識抗体で発色または発光検出することで調べられている。この方法は、さらに長時間の検査時間が必要であり、かつ多検体を1回で検査することが困難な欠点を有する。

## 2. 研究の目的

本研究は、異常プリオンタンパク質と特異的に結合する新しいアプタマー核酸を見出し、安価な吸着膜に吸着させた多検体中の異常プリオンタンパク質の直接、かつ迅速な新検査法の開発を目的としている。この研究戦略として、研究代表者らが開発している化学発光反応技術 (Fig. 1)、および化学発光性高分子プローブを適用する。

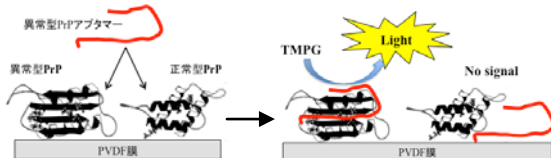


Fig. 1. アプタマーを用いた異常プリオンタンパク質の検出法

## 3. 研究の方法

### (1) 組換えプリオンタンパク質の発現・精製

マウスプリオンタンパク質 (mPrP) をコードする遺伝子を、マウス脳 cDNA ライブラリーより PCR を用いてクローニングし、発現ベクター (pMal c2x) に組み込んだ後、大腸菌を形質転換した。このとき、発現タンパク質の精製を容易にするために、プリオンタンパク質は、マルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質 (MBP-mPrP) として発現するようにした。形質転換体を培養後、アミロース樹脂を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより、MBP-mPrP を精製

した。この MBP-mPrP を Factor Xa で酵素分解した後、酵素反応液を遠心分離することで MBP を除去し、正常プリオンタンパク質 (mPrP<sup>C</sup>) を精製した。

### (2) プロテアーゼ抵抗性プリオンタンパク質の調製

精製した mPrP<sup>C</sup> を CuCl<sub>2</sub> 水溶液に懸濁させ、4°C で冷蔵することで、プロテアーゼ抵抗性のプリオンタンパク質 (mPrP<sup>Res</sup>) を作製した。mPrP<sup>Res</sup> の確認は、proteinase K で分解した後、SDS-PAGE におけるバンドの有無により行なった。

### (3) DNA アプタマーまたは高分子プローブを用いた固相膜上のプリオンタンパク質の網羅的発光検出

膜に mPrP を含む様々なタンパク質を吸着後、mPrP<sup>C</sup> を認識する DNA アプタマーを含む溶液に浸すことで結合反応を行なった。タンパク質と結合したアプタマーの検出は、研究代表者らが開発した化学発光試薬 (TMPG) を用いて発光検出した。

また同様に、膜上の mPrP に、抗 mPrP 抗体である一次抗体およびビオチン化二次抗体を順次結合させ、化学発光性高分子プローブを、ストレプトアビジンを介して連鎖的に結合させて、mPrP の高感度検出を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 組換えプリオンタンパク質の発現・精製とプロテアーゼ抵抗性プリオンタンパク質の調製

本研究を遂行するにあたり、大量のプリオンタンパク質が必要となることから、大腸菌発現系を用いて、mPrP の大量調製を行なった。その結果、1 回のアフィニティーカラムクロマトグラフィーと Factor Xa による酵素分解、遠心分離に基づく簡易な操作で mg 単位の精製 mPrP<sup>C</sup> を得ることができた。

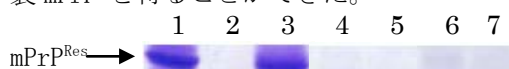


Fig. 2. 銅イオンを用いた mPrP<sup>Res</sup> の作製  
mPrP<sup>C</sup> を 1. H<sub>2</sub>O、2. H<sub>2</sub>O、3. CuCl<sub>2</sub>、4. MgCl<sub>2</sub>、5. MnCl<sub>2</sub>、6. ZnSO<sub>4</sub>、7. FeCl<sub>2</sub> と混合後、proteinase K で分解し、SDS-PAGE を行なった。1 は proteinase K 未処理、2-7 は proteinase K 分解を行なった。金属イオンは 0.3 mM とした。

この mPrP<sup>C</sup> を CuCl<sub>2</sub> 水溶液中、4°C で冷蔵したところ、proteinase K 分解に対して抵抗性を示す mPrP<sup>Res</sup> が作製できた。他の重金属を用いた場合には、同様の現象は観察されなかったことから (Fig. 2)、銅イオンが mPrP の立

体構造の変化を引き起こし、その結果、mPrPがプロテアーゼに対して抵抗性を持つようになったと考えられる。

(2) 固相膜上のプリオンタンパク質の網羅的検出法の開発

①DNA アプタマーを用いた検出法：mPrP<sup>C</sup>を含む様々なタンパク質を膜に吸着し、mPrP<sup>C</sup>を認識する DNA アプタマーを用いて、mPrP<sup>C</sup>の特異的な検出法を開発した。このとき、アプタマーの検出には、研究代表者らが開発した化学発光試薬 (TMPG) を用いた。TMPG は、室温で短時間 (2 分以内) に核酸中のグアニンと反応し、化学発光する試薬であり、核酸であるアプタマーの検出には最適であった。また、TMPG 化学発光反応において、5'末端を fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識した DNA を用いた場合、非標識 DNA と比較して、約 5-10 倍の化学発光強度の増強を見出したことから、FITC 標識アプタマーを用いた検出法の開発を行なった。その結果、Fig. 3 に示すように mPrP<sup>C</sup>のみを特異的に検出することができた。

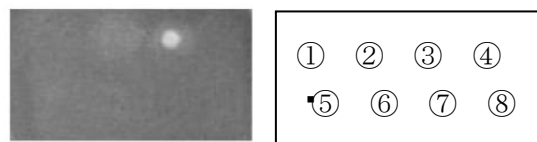


Fig. 3. アプタマーと TMPG を用いた mPrP の特異的な検出

①H<sub>2</sub>O、②Guanidine-HCl、③mPrP<sup>C</sup>、④MBP、⑤BSA、⑥Casein、⑦Catalase、⑧Hemoglobin

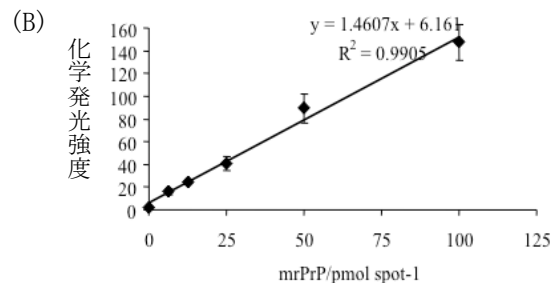
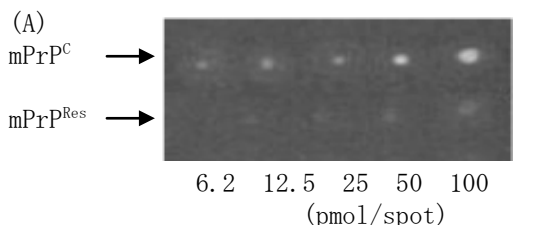


Fig. 4. mPrP<sup>C</sup>アプタマーを用いた mPrP<sup>C</sup>の化学発光検出画像 (A) と検量線 (B)

次に、mPrP<sup>C</sup>と mPrP<sup>Res</sup>を膜に吸着後、同様に mPrP<sup>C</sup>を認識する DNA アプタマーと TMPG を用いて、化学発光検出を行なった。その結果、

Fig. 4A に示すように、mPrP<sup>C</sup>のみを検出することができた。この結果は、アプタマーを用いることで、立体構造の異なる PrP を特異的に検出できることを示唆するものである。今回開発した測定法における PrP の検出限界は、約 125 ng (5 pmol)/spot であった (Fig. 4B)。

②発光性高分子プローブを用いた検出法：研究代表者は、デキストランや長鎖 DNA などの高分子をもとに、タンパク質や遺伝子解析用のプローブを開発している。そこで、デキストランに複数の horse radish peroxidase (HRP) とビオチンを結合させた発光性高分子プローブ (HRP 標識ビオチン化デキストラン) を新たに合成し、mPrP の検出へと応用した。この HRP 標識ビオチン化デキストランプローブは、ビオチンとストレプトアビジンの親和性を利用して、プローブが連鎖的に標的分子へと結合し、シグナルが増強されるものである (Fig. 5A)。

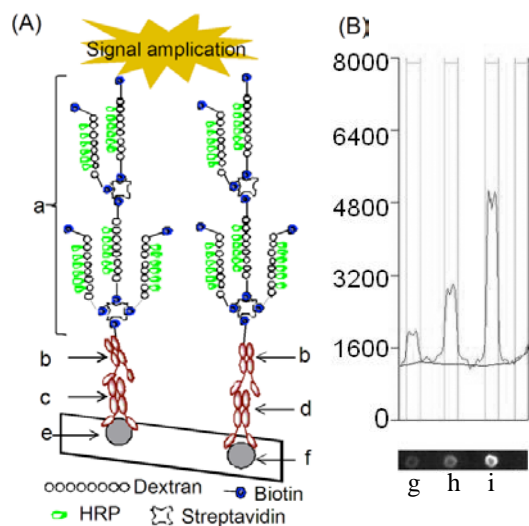


Fig. 5. 発光性高分子プローブを用いた mPrP 検出

(A) 検出法の原理図：a = プローブ複合体、b = ビオチン化二次抗体、c、d = 一次抗体、e、f = 標的タンパク質。(B) mPrP の化学発光検出画像：g = 100 fmol、h = 200 fmol、i = 400 fmol (/spot)。

一次抗体として抗 mPrP IgG 抗体、二次抗体としてビオチン化抗 IgG 抗体を用い、使用する試薬の種類や濃度、洗浄条件などを検討した結果、約 2.5 ng (100 fmol) /spot の mPrP を検出することができた (Fig. 5B)。この HRP 標識ビオチン化デキストランプローブは、ビオチン化抗体だけでなく、他のビオチン化分子の検出にも応用できるため、このプローブとビオチン化したアプタマーを組み合わせることで、異常プリオンタンパク質の特異的かつ超高感度な検出が可能であると考えら

れる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

- ① Peng Q, Cao Z, Lau C, Kai M, Lu J. Aptamer-barcode based immunoassay for the instantaneous derivatization chemiluminescence detection of IgE coupled to magnetic beads. *Analyst*, 査読有, 136, 2011, 140-147
- ② Krawczyk T, Kondo M, Azam MG, Zhang H, Shibata T, Kai M. Alginic acid-based macromolecular chemiluminescent probe for universal protein assay on a solid-phase membrane. *Analyst*, 査読有, 135, 2010, 2894-2900
- ③ Yu Z, Kabashima T, Tang C, Shibata T, Kitazato K, Kobayashi N, Lee MK, Kai M. Selective and facile assay of human immunodeficiency virus protease activity by a novel fluorogenic reaction. *Anal. Biochem.*, 査読有, 397, 2010, 197-201
- ④ Xin L, Cao Z, Lau C, Kai M, Lu J. G-rich sequence-functionalized polystyrene microsphere-based instantaneous derivatization for the chemiluminescent amplified detection of DNA. *Luminescence*, 査読有, 25, 2010, 336-342
- ⑤ Hossain MT, Shibata T, Kabashima T, Kai M. Aptamer-mediated chemiluminescence detection of prion protein on a membrane using trimethoxyphenylglyoxal. *Anal. Sci.*, 査読有, 26, 2010, 645-647
- ⑥ Jin CM, Yang YJ, Huang HS, Kai M, Lee MK. Mechanisms of L-DOPA-induced cytotoxicity in rat adrenal pheochromocytoma cells: implication of oxidative stress-related kinases and cyclic AMP. *Neuroscience*, 査読有, 170, 2010, 390-398
- ⑦ Shibata T, Kawasaki SY, Fujita JY, Kabashima T, Kai M. A novel and specific fluorescence reaction for uracil. *Anal. Chim. Acta*, 査読有, 674, 2010, 234-238
- ⑧ Zhang H, Shibata T, Krawczyk T, Kabashima T, Lu J, Lee MK, Kai M. Facile detection of proteins on a solid-phase membrane by direct binding of dextran-based luminol-biotin chemiluminescent polymer. *Talanta*, 査読有, 79, 2009, 700-705
- ⑨ Yan X, Cao Z, Kai M, Lu J. Label-free aptamer-based chemiluminescence detection of adenosine. *Talanta*, 査読有, 79, 2009, 383-387

- ⑩ Smanmoo C, Yamasuji M, Sagawa T, Shibata T, Kabashima T, Yuan DQ, Fujita K, Kai M. Diimine ligand as a novel chemiluminescence enhancer of luminol-containing compounds. *Talanta*, 査読有, 77, 2009, 1761-1766
- ⑪ Fan A, Cao Z, Li H, Kai M, Lu J. Chemiluminescence platforms in immunoassay and DNA analyses. *Anal. Sci.*, 査読有, 25, 2009, 587-597
- ⑫ Tonooka K, Kabashima T, Shibata T, Tang C, Yu Z, Kai M. Facile assay of telomerase activity utilizing a DNA-detectable chemiluminogenic reagent. *Anal. Sci.*, 査読有, 24, 2008, 471-475.
- ⑬ Jin CM, Yang YJ, Huang HS, Lim SC, Kai M, Lee MK. Induction of dopamine biosynthesis by L-DOPA in PC12 cells: implications of L-DOPA influx and cyclic AMP. *Eur. J. Pharmacol.*, 査読有, 591, 2008, 88-95
- ⑭ Kabashima T, Yu Z, Tang C, Nakagawa Y, Okumura K, Shibata T, Lu J, Kai M. A selective fluorescence reaction for peptides and chromatographic analysis. *Peptides*, 査読有, 29, 2008, 356-363
- ⑮ Wainaina MN, Shibata T, Smanmoo C, Kabashima T, Kai M. Fluorescence detection of amino acids in the postcleavage conversions for manual sequencing of a peptide. *Anal. Biochem.*, 査読有, 374, 2008, 423-425
- ⑯ Zhang H, Smanmoo C, Kabashima T, Lu J, Kai M. Dextran-based polymeric chemiluminescent compounds for the sensitive optical imaging of a cytochrome p450 protein on a solid-phase membrane. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 査読有, 46, 2007, 8226-8229
- ⑰ Tonooka K, Kabashima T, Yamasuji M, Kai M. Facile determination of DNA-binding nuclear factor-kappaB by chemiluminescence detection. *Anal. Biochem.*, 査読有, 364, 2007, 30-36
- ⑱ Yuan DQ, Lu J, Atsumi M, Yan JM, Kai M, Fujita K. Cerium complexes of cyclodextrin dimers as efficient catalysts for luminol chemiluminescence reactions. *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, 5, 2007, 2932-2939

[学会発表] (計 38 件)

- ① Golam Azam, et al: 高感度化学発光イメージングのための酵素的デキストランプローブ、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月、岡山市
- ② 室田紗由美, et al: プリオンタンパク質の溶解性における銅イオンの影響、第 27 回日

本薬学会九州支部大会、2010年12月、長崎市

③Golam Azam, et al: Alkaline phosphatase-labelled chemiluminescent probe for sensitive immunoassay of proteins on a solid-phase membrane、第27回日本薬学会九州支部大会、2010年12月、長崎市

④Hossain Md. Towhid, et al: Aptamer-mediated chemiluminescence detection of prion protein using trimethoxyphenyl glyoxal on membrane、第23回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2010年7月、宮城県宮城郡松島町

⑤Masaaki Kai: New tools for the research on HIV and prion diseases、The second Asia symposium on pharmaceutical sciences in Nagasaki、2009年3月、長崎市

⑥Hossain Md. Towhid, et al: Development of simple method for DNA aptamer against protein、The second Asia symposium on pharmaceutical sciences in Nagasaki、2009年3月、長崎市

⑦Tsutomu Kabashima, et al: Application of DNA detectable chemiluminogenic reagent (TMPG) to telomerase assay、Pure and applied chemistry international conference 2008、2008年1月、バンコク(タイ)

⑧Kenji Koba, et al: Expression of mouse prion protein in *E. coli* to develop aptamer、International conference in structural biology、2007年11月、香港(中国)

[図書] (計1件)

小野行雄 編集、廣川書店、薬学物理化学[第5版]、2010、79-98

[産業財産権]

○出願状況 (計4件)

①名称: ウイルスの識別方法

発明者: 甲斐雅亮、椛島 力

権利者: 長崎大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-047640

出願年月日: 2010年3月4日

国内外の別: 国内

②名称: ウラシル特異的な蛍光検出反応及びジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ欠損症の検査法

発明者: 甲斐雅亮、柴田孝之

権利者: 長崎大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-044610

出願年月日: 2010年3月1日

国内外の別: 国内

③名称: ペプチドの検出方法

発明者: 甲斐雅亮、椛島 力、柴田孝之

権利者: 長崎大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-045491

出願年月日: 2011年3月2日

国内外の別: 国内

④名称: 2環状シトシン誘導体含有人工二本鎖核酸

発明者: 甲斐雅亮、柴田孝之、椛島 力

権利者: 長崎大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-045485

出願年月日: 2011年3月2日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計1件)

名称: Luminescent polymer and use thereof in bioassay

発明者: 甲斐雅亮

権利者: 長崎大学

種類: 特許

番号: 4193055

取得年月日: 2008年10月3日

国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/function/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

甲斐 雅亮 (KAI MASAOKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 00160953

### (2) 連携研究者

椛島 力 (Kabashima Tsutomu)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 20274673

(H20→H22: 研究分担者→連携研究者)

柴田 孝之 (Shibata Takayuki)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 10448491

(H21→H22: 研究分担者→連携研究者)