

機関番号：16101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20580354

研究課題名 (和文) BSE (狂牛病) 超高感度診断法の開発

研究課題名 (英文) The development of a ultra-sensitive diagnostic technique for BSE (Mad cow disease)

研究代表者

山口 仁孝 (YAMAGUCHI YOSHITAKA)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教

研究者番号：90432765

研究成果の概要 (和文)：

プリオン超高感度検出法の開発を目的に研究を行った。プリオン蛋白質と特異的に結合する DNA 配列を決定し、結合した DNA を増幅することで、高感度で特異的な検出系の確率を目指した。REPSA 法を用いた DNA 配列の検索で、コンセンサス配列の候補として GGATG が得られたが、今回の研究では再現性・特異性において十分な結果は得られなかった。

研究成果の概要 (英文)：

This research was designed to develop a ultra-sensitive detection method for prion disease. We tried to establish the detection method with high sensitivity and singularity, according to amplify the DNA which uniquely bound to the prion protein and decide the sequence. Though the DNA sequence GGATG was identified from REPSA method as a candidate of consensus sequence, it didn't support sufficient for reproducibility and specificity in the latest study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 臨床獣医学

キーワード：獣医学、蛋白質、脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) 英国で発生した新型クロイツフェルト・ヤコブ病患者は、2007年10月の時点で200名以上が報告され

(<http://www.cjd.ed.ac.uk/>)、その原因と考えられる BSE (狂牛病) 感染牛の存在は畜産物における食の安全を脅かす大きな脅威となっている。このため、消費者の不安や感

染リスクを軽減する目的で、BSE 罹患牛の摘発・淘汰が世界中で行われている。

プリオン病原体であるプリオンは、正常神経細胞に発現する正常プリオン蛋白質 (PrP^C) が何らかの原因で構造変化を起し、異常になった異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) から構成されている。したがって、プリオン病の診断は

PrP^{Sc}を検出することが重要である。

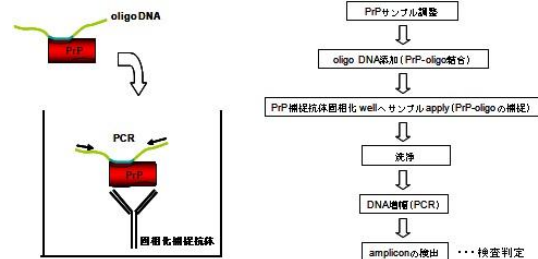
PrP^{Sc}はPrP^Cと比べて、構造上βシートに富みプロテイナーゼKに対して耐性である。現在広く行われているプリオン診断法は、このPrP^CとPrP^{Sc}の生化学的性質の違いを利用している。すなわち、調べたい試料にプロテイナーゼK処理を行うことで、PrP^Cが消化され、PrP^{Sc}のみが残る。その残渣について免疫学的手法により、プリオン蛋白を検出する抗体（現在PrP^{Sc}とPrP^Cを明瞭に区別できる抗体がないため、どちらにも結合する抗体を用いる）を用いてPrP^{Sc}を検出することで診断している。

しかしながら、現在行われているプリオン検査法の主なもの（Westernblotting法およびELISA法）は、いずれも10–30ng/mlのプリオン蛋白が検出限界で、マウスへの感染実験から得られた1LD₅₀(100fg/ml)の100–300倍のプリオン蛋白量を必要とし、プリオンが十分に増殖していない無症状感染状態での診断は不可能である。したがって、BSEり患牛の早期診断では、より高感度のプリオン診断法の開発が望まれている。

(2) 近年、プリオン蛋白質がある核酸の特異的配列と結合することが確かめられている(Weissら、1997)ことから、実際我々は、目的の蛋白と結合するDNA配列を特定するREPSA(restriction endonuclease protection selection amplification)法(Van Dykeら、Methods)を用いて、ヒトレコンビナントPrP(human recPrP)と結合するDNA配列を決定した。そして、抗体のみを用いるELISA法と比較して約100万倍の検出感度を有する新規検査法を開発した(未発表)。そこで、human rec PrPで開発した手法を用いて、ウシおよびヒツジにおいてもプリオン蛋白と特異的に結合するDNA配列を同定することが可能と思われる。

2. 研究の目的

本研究では、ウシ(またはヒツジ)のPrPと結合したDNAをPCR法などで直接増幅することにより、短時間で超高感度の診断を目指す。



oligoDNAは、抗体よりPrPとの結合性が高く・安定的で反応の至適化も行いやすい。そして、合成するコストが低く、様々な化学修飾も行いやすいという利点がある。また、検出する場合はその増幅法(nested PCR、real-time PCR、LAMP法など)の選択肢も広がり、特異性と検出感度を上げ、理論上1分子のPrPをも検出することが可能となる。したがって、この手法が確立すれば、若齢・無症状感染動物を早期に確実に発見できるようになり、淘汰されるべき個体の識別が早まることで、無駄な管理コストの削減につながる。また、と畜検査時以外にも畜産物中に混入した極微量のプリオンをも検出することが可能になり、ウシ蛋白を使用する食品・医薬品等の安全性向上に寄与できる。そして、ヒトに応用することで定期健康診断などで、無症状感染者を診断できるようになり、ヒトの感染リスク低減にも貢献できる。

3. 研究の方法

以下の項目について順次計画し研究を行った。

(1) ウシおよびヒツジレコンビナントPrP(recPrP)を用いての、PrP結合DNA断片の配列決定

①ウシおよびヒツジPrPのcDNAクローニング

GenBank 等により得られたウシおよびヒツジ PrP 塩基配列を参考に、酵素認識配列を付加したプライマー対を設計し PCR 法にて PrP 翻訳領域の DNA を増幅する。

・大腸菌発現系を用いたレコンビナント PrP の発現およびカラム法による精製

大腸菌発現ベクター (pQE30) を用いて、ヒスチジン Tag 付レコンビナント PrP を発現させ、Ni-NTA カラムにより精製する。

② REPSA 法を用いた、PrP 結合 DNA 断片の配列決定

Michael らの方法 (Methods, 2007) を参考に、Fok I および Bpm I 認識配列を断端に有し、中央に 20~30 塩基程度のランダムな塩基配列を有するオリゴヌクレオチドライブラリーを合成する。

③ レコンビナント PrP 特異結合 oligoDNA の選抜

REPSA 法により目的の蛋白と結合する DNA 断片を選抜する。

④ 診断用 oligo DNA の作製

中央部にウシおよびヒツジ PrP と結合するコンセンサス配列を持ち、Fok I および Bpm I 認識配列を断端に有する、BSE およびスクレイピー診断用 oligo DNA を合成する。

(2) 遺伝子増幅法の検討および検出限界値の決定

rec PrP および BSE プリオンに対して、診断用 oligo DNA を用いて、各遺伝子増幅法 (nested PCR、real-time PCR、LAMP 法) による検出効率の比較と検出限界値の決定

(3) BSE 罹患マウス材料を用いての実証試験

BSE 感染させたウシプリオン遺伝子導入 Tg マウスの組織材料を用いて、従来法 (Westernblotting 法、ELISA 法) との感

度・特異性等の比較試験を行う。

4. 研究成果

(1) ウシおよびヒツジレコンビナント PrP (recPrP) を用いての、PrP 結合 DNA 断片の配列決定

① ウシおよびヒツジ PrP の cDNA クローニング

ウシおよびヒツジ PrP 塩基配列

(GenBank Ac. No. AJ298878, U67922) を参考に、酵素認識配列を付加したプライマー対を設計し PCR 法にて PrP 翻訳領域の DNA を増幅した。

② 大腸菌発現系を用いたレコンビナント PrP の発現およびカラム法による精製

大腸菌発現ベクター (pQE30) を用いて、ヒスチジン Tag 付ウシおよびヒツジレコンビナント PrP を発現させ、Ni-NTA カラムにより精製した。

③ REPSA 法を用いた、PrP 結合 DNA 断片の配列決定

Fok I および Bpm I 認識配列を断端に有し、中央に 14 または 20 塩基のランダムな配列を有するオリゴヌクレオチドライブラリーを合成した。

④ レコンビナント PrP 特異結合 oligoDNA の選抜

REPSA 法によって、PrP 結合 DNA 断片 (-GGATG-) は得られたものの、その結合に再現性ならびに特異性は認められなかった。

oligo DNA 中のランダム配列の長さ、primer site の前後配列、制限酵素の変更や他の選抜方法等を行い、再検討を繰り返したがいずれにおいても再現性が認められず、十分な結果が得られなかった。すなわち、ウシおよびヒツジレコンビナント PrP 蛋白に結合する DNA は存在したが、これらと特異的に結合する DNA 配列は確

認できなかった。また、これらの DNA に共通する配列も確認されなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Koji Fujita, Yoshitaka Yamaguchi, Tsuyoshi Mori, Naomi Muramatsu, Takahito Miyamoto, Masashi Yano, Hironori Miyata, Akira Ootsuyama, Makoto Sawada, Haruo Matsuda, Ryuji Kaji, Suehiro Sakaguchi. Effects of a brain-engraftable microglial cell line expressing anti-prion scFv antibodies on survival times of mice infected with scrapie prions. Cellular and Molecular Neurobiology 2010 in press. 査読有
- ② Yoshikawa D, Yamaguchi N, Ishibashi D, Yamanaka H, Okimura N, Yamaguchi Y, Mori T, Miyata H, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S., Dominant-negative effects of the N-terminal half of prion protein on neurotoxicity of prion protein-like protein/doppel in mice. J Biol Chem. 2008 Aug 29;283(35):24202-11. 査読有
- ③ Nasu-Nishimura Y, Taniuchi Y, Nishimura T, Sakudo A, Nakajima K, Ano Y, Sugiura K, Sakaguchi S, Itoharu S, Onodera T. Cellular prion protein prevents brain damage after encephalomyocarditis virus infection in mice. Arch Virol. 2008;153(6):1007-12. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 山口仁孝、村松 直美、森 剛志、坂口 末廣、プリオン蛋白構造変換におけるアミノ酸 91-104 領域の役割、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、平成 22 年 11 月 7 日、徳島
- ② 坂口 末廣、宮田 博規、山口 仁孝、村松直美、森 剛志、異なるプリオン株に異なる感受性を示すプリオン蛋白：プリオン株産生メカニズムについての考察、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、平成 22 年 11 月 7 日、徳島

- ③ 山口仁孝、村松直美、藤田浩司、坂口末廣、プリオン構造変換に関与する N 末端領域の機能解析、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、平成 21 年 10 月 25 日、東京
- ④ 宮田博規、山口仁孝、坂口末廣、プリオン蛋白オクタペプチドリピート領域はプリオンの病原性を決定する、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、平成 21 年 10 月 25 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 仁孝 (YAMAGUCHI YOSHITAKA)
徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教
研究者番号：90432765

(2) 研究分担者

坂口 末廣 (SAKAGUCHI SUEHIRO)
徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授
研究者番号：60274635