

平成22年4月30日現在

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

研究代表者の専門分野：臨床検査学、生物物理化学

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、発光検出、核酸、タンパク質、マイクロアレイ

## 1. 研究計画の概要

クロイツフェルト・ヤコブ病や牛海綿状脳症 (狂牛病) などは、総称してプリオン病と呼ばれ、正常プリオンタンパク質 (PrP<sup>C</sup>) が異常プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) に変化し、凝集することによって発症すると考えられている。現在、PrP<sup>Sc</sup> の検出には、エライザ法と電気泳動後にウエスタンブロットを行ない、抗体で検出する方法が主に用いられている。これらの方法は、プロテアーゼで消化されない PrP<sup>Sc</sup> を抗体で検出するものであるが、現在のところ、正常型と異常型を区別できる抗体がないことから、前者は擬陽性が出やすい、後者は検出までに長時間が必要、多検体の検査が困難などの欠点を有する。

そこで本研究は、プリオンタンパク質 (PrP) と特異的に結合するアプタマーと呼ばれる核酸を見出し、誰もが調製でき、かつ安価な吸着膜を用い、それに吸着させた多検体中の PrP<sup>Sc</sup> の網羅的、かつ迅速な新検査法の開発を目的としている。この研究課題を達成させるために、あらゆる DNA 配列を組み込んでいる DNA (DNA プール) を用いて、正常及び異常プリオンタンパク質に対して、強結合性かつ安定性を示す DNA または RNA アプタマーを調製し、さらに、当該研究代表者らが開発している核酸の化学発光反応を用いた簡便な検出法、または、発光性ビオチン化デキストラプローブ、発光性長鎖 DNA プローブなどを適用することによって、アプタマーによる PrP<sup>Sc</sup> の超高感度検出法を開発する。

## 2. 研究の進捗状況

(1) マウスプリオンタンパク質 (mPrP) を、大腸菌中でマルトース結合タンパク質 (MBP)

との融合タンパク質 (MBP-mPrP) として発現させた。その後、アフィニティーカラムを用いて MBP-mPrP を精製し、MBP を切除することで、mg 単位の mPrP が精製できた。このとき、大腸菌を超音波と低張ホモジナイズの2種類の方法で破碎し、それぞれの方法で精製した mPrP を比較したところ、各種溶媒に対する溶解度などの物理化学的性質が多少異なっていることが分かった。

(2) 精製した mPrP を PVDF 膜に固定化後、アプタマーを含む 1×PBS に浸し、mPrP とアプタマーを結合させた。mPrP と結合したアプタマーの検出は、研究代表者が開発した核酸中のグアニンと特異的に反応して化学発光する化学発光試薬 (TMPG) を用いて行なった。その結果、アプタマーによって膜上の mPrP (5-20  $\mu$ g/spot) を検出することができた。このとき、同時に膜に固定化したウシ血清アルブミンやカゼイン (20  $\mu$ g/spot) などのタンパク質は検出されなかった。これらの結果は、アプタマーによって、PrP を特異的に検出できることを示している。また、TMPG 化学発光反応において、5'末端を 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大が観察された。そこで、FITC 標識アプタマーを用いて同様に mPrP を検出したところ、非標識アプタマーと比較して、約 2.5 倍化学発光強度が増大した。また、mPrP を CuCl<sub>2</sub> で処理したところ、proteinase K 消化に対して抵抗性を示す mPrP<sup>res</sup> が得られた。これらの結果から、FITC 標識アプタマーや mPrP<sup>res</sup> を用い、さらに結合反応条件などを検討することで、高感度なアプタマーを用いた異常プリオンタンパク質の検出法が開発できると考えられる。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。理由：アプタマーを用いて、吸着膜上の PrP<sup>C</sup> を特異的に検出でき、次の標的分子である proteinase K 抵抗性 PrP を調製できたため。

### 4. 今後の研究の推進方策

(1) Proteinase K 抵抗性プリオンタンパク質の大量調製：現在までに、精製した mPrP を CuCl<sub>2</sub> で処理することで、proteinase K 抵抗性を示す mPrP<sup>res</sup> を得ている。今後、mPrP<sup>res</sup> の大量調製を行い、mPrP<sup>C</sup> と mPrP<sup>res</sup> を識別できるアプタマーのスクリーニングを行なう。また、HeLa 細胞でも、MBP-mPrP を発現させることが出来たので、大腸菌で発現させた場合と同様に大量調製を行い、CuCl<sub>2</sub> 処理や大腸菌で発現させた mPrP との物理化学的性質の比較を行う。

(2) アプタマーを用いた PrP の高感度検出方法の開発：mPrP を PVDF 膜上に固定化後、既報の DNA アプタマーと結合反応を行ない、研究代表者が開発した化学発光試薬 (TMPG) を用いることで、mPrP と結合したアプタマーを検出することができた。しかし、検出感度としては、100 ng レベルの mPrP が必要であるため、今後、使用する試薬の組成や濃度、pH、ブロッキングや洗浄などの条件検討を行ない、mPrP の超高感度検出法の開発を目指す。また、研究代表者が開発した発光性ビオチン化デキストランプローブや発光性長鎖 DNA プローブは、ビオチン化分子の検出に応用できるので、これらのプローブとビオチン化アプタマーを組み合わせた mPrP の超高感度検出法の開発を行なう。

(3) アミノ酸を用いた mPrP<sup>res</sup> の proteinase K 抵抗性の改善：CuCl<sub>2</sub> 処理によって mPrP<sup>res</sup> を作製後、プロリンやフェニルアラニンなど、一部のアミノ酸の水溶液中で mPrP<sup>res</sup> を保温すると、mPrP<sup>res</sup> の proteinase K による消化が促進された。これは、これらのアミノ酸が、mPrP<sup>res</sup> の立体構造を変化させた可能性を示しており、プリオン病治療薬の開発に役立つ可能性がある。今後、アミノ酸処理および未処理の mPrP<sup>C</sup> や mPrP<sup>res</sup> の円偏光二色性やフーリエ変換赤外分光分析計のデータを比較し、CuCl<sub>2</sub> やアミノ酸が、mPrP の立体構造や物性にどのような影響を与えているのかを調べる。また、CuCl<sub>2</sub> 処理による mPrP<sup>res</sup> 作製をアプタマーやアミノ酸存在下で行ない、これらの分子のプリオン病治療薬としての可能性を調べる。

### 5. 代表的な研究成果

(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 12 件)

①Huan Zhang, Takayuki Shibata, Tomasz Krawczyk, Tsutomu Kabashima, Jianzhong Lu, Myung K. Leec, Masaaki Kai: Facile detection of proteins on a solid-phase membrane by direct binding of dextran-based luminol-biotin chemiluminescent polymer. *Talanta*, 79 (3), 700-705 (2009), 査読有。

②Huan Zhang, Chaivat Smanmoo, Tsutomu Kabashima, Jianzhong Lu, Masaaki Kai: Dextran-based polymeric chemiluminescent compounds for the sensitive optical imaging of a cytochrome P450 protein on a solid-phase membrane. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46 (43), 8226-8229 (2007), 査読有。

〔学会発表〕 (計 23 件)

①Masaaki Kai: New tools for the research on HIV and prion diseases. The second Asia symposium on pharmaceutical sciences in Nagasaki, March 16-18, 2009, Nagasaki.

〔産業財産権〕

○出願中 (計 2 件)

①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：特願

番号：2010-044610

出願年月日：2010年3月1日

国内外の別：国内

②名称：ウイルスの識別方法

発明者：甲斐雅亮、梶島 力

権利者：長崎大学

種類：願

番号：2010-047640

出願年月日：2010年3月4日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

①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

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