

Chemiluminescence detection of prion protein on membrane and its enzymatic degradation in the presence of aptamers or amino acids

(プリオンタンパク質の膜上での化学発光検出とアプタマー又はアミノ酸存在下での酵素分解)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 Md Towhid Hossain

[目的]

牛海綿状脳症（狂牛病）や羊のスクレイピー、ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病やクールー病などは、総称してプリオン病と呼ばれる。このプリオン病は、細胞膜に存在するプリオンタンパク質（PrP）の立体構造が変化し、いわゆる異常型プリオンタンパク質（PrP^{Sc}またはPrP^{Res}）が形成・凝集し、中枢神経系に蓄積することで発症する伝染性の疾患である。プリオン病の伝染機構は、体内に取り込まれた（または体内で生成した）PrP^{Sc}が、次々と正常型プリオンタンパク質（PrP^C）を異常型に変換し、PrP^{Sc}が増殖するためだと考えられている。しかし、PrP^{Sc}の生成メカニズムや感染性発現のメカニズムなどが不明のため、現在、根治療法は見つかっていない。

プリオン病の診断や治療薬開発において、PrPの特異的で定量的な検出法は必要不可欠である。現在、PrPの検出には、抗体を用いた免疫測定法が利用されているが、抗体はPrP^CとPrP^{Sc}やPrP^{Res}を区別できないという欠点がある。この抗体に代わるものとしてアプタマーと呼ばれる一本鎖核酸が注目されている。アプタマーは、一本鎖RNAやDNAがとる三次元構造により、特異的に標的分子と結合する能力を持った核酸分子である。そこで本研究では、当研究室で開発したグアニン塩基と特異的に反応して化学発光する3,4,5-trimethoxyphenylglyoxal (TMPG)とアプタマーを用いて、PrPを特異的に検出する方法の開発を行なった。

PrP^{Sc}やPrP^{Res}が形成されると、難溶性でproteinase K分解に対して抵抗性の凝集体を形成し、プリオン病が発症すると考えられている。したがって、PrP^{Sc}やPrP^{Res}をPrP^Cに変換できるような物質は、プリオン病の治療薬開発において極めて重要である。そこで今回、アプタマー及びアミノ酸に着目し、Cu²⁺によって作製したPrP^{Res}を用いて、PrP^{Res}のproteinase K分解におけるアミノ酸の効果を調べた。

[実験方法]

1) TMPGとアプタマーを用いたPrP測定法：大腸菌で発現させた組換えマウスPrP（mrPrP）を精製した後、polyvinylidene difluoride (PVDF)膜にスポットした。またネガティブコントロールとして、カゼイン、カタラーゼ、ウシ血清アルブミン（BSA）、ヘモグロビン、マルトース結合タンパク質（MBP）も同様に膜にスポットした。膜を5%スキムミルク溶液でブロッキングした後、アプタマーを含む溶液に浸し、結合反応を行なった。その後、膜を20 mM Tris-HCl buffer (pH 6.5)と精製水で洗浄し、TMPG溶液に浸すことで化学発光反応を行なった。化学発光は、Lumino CCD AE-6930

densitograph で測定し、Densitometer Analyst version 4.0 Software を用いて解析した。

2) mrPrP^{Res} の proteinase K 分解におけるアミノ酸の効果：mrPrP^{Res} の作製は、mrPrP を Cu²⁺ 存在下、4 °C、一晩静置することで行なった。mrPrP^{Res} を高濃度のアミノ酸と混合し、37 °C、1 h 保温した後、proteinase K を加え、37 °C、1 h 酵素反応を行なった。反応液を SDS-PAGE で分離し、染色後、mrPrP のバンドの有無を確認した。

[結果および考察]

1) TMPG とアプタマーを用いた PrP 測定法：結合反応や洗浄に用いる緩衝液や結合温度、結合時間、アプタマー濃度を検討したところ、Fig. 1 に示すように、mrPrP を定量的に検出することができた。また、同時にスポットしたカゼイン、カタラーゼ、BSA、ヘモグロビン、MBP からは、化学発光は観察されなかった。これらの結果は、TMPG とアプタマーを用いた本測定法は、特異的かつ定量的に mrPrP を検出できることを示している¹⁾。本測定法の検出限界は 4.2 pmol spot⁻¹ (signal per noise ratio, S/N=2) であり、アプタマーと mrPrP の解離定数は 1.7×10⁻⁸ M であった。一方で、mrPrP と比較して、mrPrP^{Res} からのシグナルは低く、これは、mrPrP と mrPrP^{Res} は立体構造が異なっており、今回使用したアプタマーは mrPrP^{Res} に対して、親和性が低いことを示している。TMPG を用いた本測定法は、標的分子に対するアプタマーが開発できれば、PrP だけでなく他のタンパク質の検出にも応用可能と考えられる。

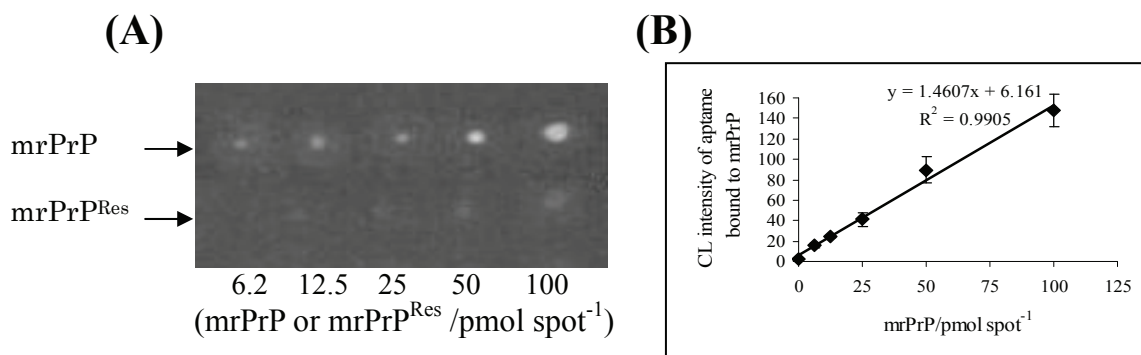


Fig. 1 (A) Chemiluminescence (CL) signals of mrPrP or mrPrP^{Res} (6.2, 12.5, 25, 50, and 100 pmol spot⁻¹) in 6 M guanidine hydrochloride detected by aptamer-based TMPG-CL method and (B) its calibration curve.

2) mrPrP^{Res} の proteinase K 分解におけるアミノ酸の効果：異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc} または PrP^{Res}) の特徴の一つに、proteinase K 分解に対する抵抗性があげられる。そこで、PrP^{Res} の proteinase K 分解を促進するような物質は、プリオン病の治療薬候補となりうると考え、mrPrP^{Res} の酵素分解におけるアプタマーおよびアミノ酸の効果調べた。まず、mrPrP を Cu²⁺ で処理したところ、proteinase K に抵抗性を持つ mrPrP^{Res} が作製できた (Fig. 2, lanes 2 and 6)。次に、mrPrP^{Res} を 3 種類の DNA アプタマーまたは 4 種類のアミノ酸と保温した後、proteinase K で分解したところ、アミノ酸で処理した場合に、proteinase K 分解の促進が観察された。Fig. 2 に示すように、アルギニンでは、50 mM 以上の濃度で促進効果がみられ、このほか、50 mM フェニル

アラニン、10 mM プロリン、10 mM アスパラギン酸でも同様の効果が観察された²⁾。これに対して、DNA アプタマーを用いた場合には、このような効果は観察されなかった。以上の結果より、これらのアミノ酸は、mrPrP^{Res}と相互作用することでmrPrP^{Res}の立体構造変化を引き起こし、mrPrP^{Res}の酵素分解を促進した可能性が示唆された。

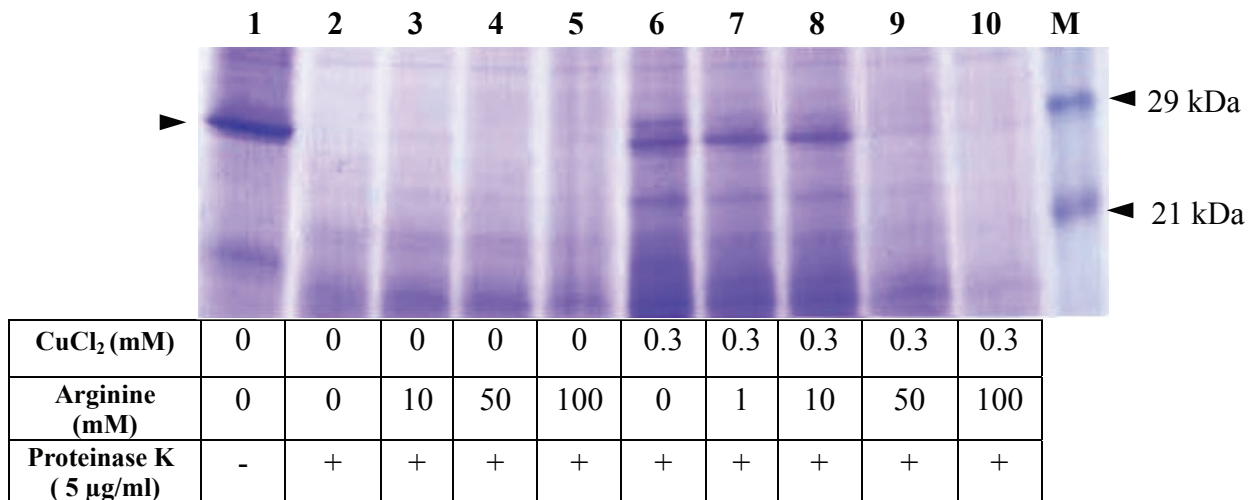


Fig. 2 Enzymatic degradation of mrPrP^{Res} in the presence of arginine.

一般にプリオン病は、感染から発症までの期間が長いと考えられており、異常型プリオンタンパク質の検出は早期治療を行なう上で重要である。現在、プリオンタンパク質の検出には、抗体が主に用いられている。今回開発した測定法で使用したアプタマーは、核酸であるため、抗体と比較して、大量合成が可能、修飾が比較的容易、安定性がよいなどの利点を有する。また、TMPG 化学発光反応も室温で短時間に進行するため、本測定法は、プリオン研究において有用な検出手法と考えられる。

当初、アプタマーがmrPrP^{Res}に結合することで、溶解性が上昇しproteinase K分解を促進することを期待していたが、このような効果は見られなかった。これは、使用したアプタマーのmrPrP^{Res}に対する親和性が低く、溶解性を上昇できなかったためと考えられる。今後、mrPrP^{Res}を膜上で特異的に検出するためにも、mrPrP^{Res}に高親和性のアプタマーの開発が必要であると考えられる。一方で、本研究において、アミノ酸がmrPrP^{Res}のproteinase K分解を促進することを見出した。この知見は、プリオン病の治療薬開発に有用な情報を提供できると考えられる。

[基礎となった学術論文]

- 1) Hossain M.T., Shibata T., Kabashima T., Kai M.: Aptamer-mediated chemiluminescence detection of prion protein on a membrane using trimethoxyphenylglyoxal. *Anal. Sci.*, 26, 645-647 (2010).
- 2) Hossain M.T., Shibata T., Kabashima T., Kai M.: Some amino acids facilitate the enzymatic degradation of recombinant prion protein after protease-resistant formation. (in preparation)