

# 動物用医薬品における異常プリオン蛋白(PrPSc)否定試験法の開発

誌名	農林水産省動物医薬品検査所年報
ISSN	03887421
著者名	能田,健 平澤,緑 永井,英貴 丹菊,直子 西川,論 Kumar,P.K.R. 関矢,聡 横山,隆
発行元	農林水産省動物医薬品検査所
巻/号	42号
掲載ページ	p. 19-24
発行年月	2006年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



[プロジェクト研究終了報告書]

動物用医薬品における異常プリオン蛋白(PrP<sup>Sc</sup>)否定試験法の開発  
 -PrP<sup>Sc</sup>に対する RNA アプタマーの選択-

プロジェクト研究責任者 能田 健  
 プロジェクト研究構成員 平澤緑、永井英貴、丹菊直子、西川 諭<sup>1, 2</sup>、  
 P.K.R.クマール<sup>1</sup>、関矢 聡<sup>1, 2</sup>、横山 隆<sup>3</sup>

[FINAL REPORT OF THE PROJECT STUDY]

Development of detection method for the infectious form of prion protein (PrP<sup>Sc</sup>)  
 contaminated in veterinary medicinal products  
 -In vitro selection of RNA aptamers against PrP<sup>Sc</sup>-

Ken NODA, Midori HIRASAWA, Hidetaka NAGAI, Naoko TANGIKU, Satoshi NISHIKAWA, P.K.R. KUMAR,  
 Satoru SEKIYA, Takashi YOKOYAMA

National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 1-15-1 Tokura, Kokubunji, Tokyo 185 8511, Japan  
 (Received : July 15, 2005; Accepted : October 12, 2005)

We have conducted research aimed at the development of a PrP<sup>Sc</sup> specific probe and to increase the sensitivity of PrP<sup>Sc</sup> detection. The RNA aptamer method, which is a combinatorial chemistry based technology that enables the selection and cloning of target-specific RNA molecules *in vitro*, was employed to obtain a PrP<sup>Sc</sup> specific probe. Initially, a selection experiment against the cellular-form of prion protein (PrP<sup>C</sup>) was performed, and blotting and concentration methods using the selected anti-PrP<sup>C</sup> aptamer were developed. An aptamer molecule against PrP<sup>Sc</sup> was subsequently selected and its binding specificity was confirmed. Concurrently, a literature search was conducted on newly developed TSE diagnostics and PrP<sup>Sc</sup> detection methods.

## 1 緒言

本報告は、平成 13 年度後期から平成 16 年度にかけて行われたプロジェクト研究の概要である。異常プリオン蛋白 (PrP<sup>Sc</sup>) は、牛海綿状脳症 (BSE) をはじめとするプリオン病の感染因子と考えられている。PrP<sup>Sc</sup> の拡散を防止するために、様々な方策が実行されている。そのなかで、動物用医薬品を介した拡散を防止するためには、「動物用生物由来原料基準」(平成 15 年農林水産省告示第 1911 号) においてその使用について規制するとともに、承認申請書において当該医薬品が BSE に感染していない動物等由来の原材料を使用して製造された旨を書面上で確認するという措置で対応している。これに加え動物用医薬品に PrP<sup>Sc</sup> が迷入していない事を実験的に証明する、いわゆる PrP<sup>Sc</sup> 迷入否定試験を実施することができれば、いっその安全性が担保される。しかしながら、現在の検出技術で PrP<sup>Sc</sup> 否定試験を実施することは、検出感度の点から不可能である。高感度化を図るためには、PrP<sup>Sc</sup> 特異的なプローブの創出とこれを用いたプリオン蛋白濃縮等の技術開発が必要とされる。そ

ここで我々は、PrP<sup>Sc</sup> 特異的プローブの創出と検出感度の向上を目的として研究を行った。検出プローブの開発には、コンビナトリアルケミストリーに基づいた手法である RNA アプタマー法を用いた。まず、正常プリオン蛋白 (PrP<sup>C</sup>) に結合するアプタマーを単離し、これを用いて周辺技術 (検出・解析・濃縮) の整備を行った。これらの技術を背景とし、PrP<sup>Sc</sup> に特異的に結合するアプタマーの単離を行った。上記技術の開発とともに、海外の PrP<sup>Sc</sup> 否定試験法の実施状況、伝達性海綿状脳症 (TSE) 診断法など、PrP<sup>Sc</sup> 検出法全般に関する情報収集を行った。

## 2 研究成績の概要

### 2-1 技術開発関連

#### (1) 使用技術の選定

PrP<sup>Sc</sup> を検出するために用いる技術の選定を行うため、検出・診断技術に関する情報収集を行った。1995 年以降のプリオン関連論文、公表済の日本・米国・国際特許並びにインターネット上の情報等を可能な限り入手し分析した。その結果、医薬品や原材料の PrP<sup>Sc</sup> 検査にそのまま使用できる手法は存在しないが、現在開発が進んでいる方法の中では RNA アプタマー (RNA で作る抗体様分子) 法が最も有望であると考えられた。その他の手法についても継続的に調査を行い応用できるものが

- 
- 1 産業技術総合研究所
  - 2 筑波大学連携大学院
  - 3 独立行政法人農業・生物系特定産業研究機構動物衛生研究所プリオン病研究センター

あれば取り入れてゆくこととし、RNA アプタマーを用いた技術開発に着手した。

### (2) PrP 特異的 RNA アプタマーの単離

RNA アプタマーの単離、並びに周辺技術の整備を目的として実験を行った。標的蛋白としては、アプタマー単離後の解析等を考慮し組換えマウスプリオン蛋白 (rmPrP) を用いた。中間部に 30 mer のランダム配列を持ち、両端に定常配列を持つ RNA ライブラリーを用いて約 10 回のセレクション実験を行い、rmPrP に結合する RNA アプタマーのプールを得た (Fig. 1)。ここで得たプールからクローニングを行い、5'-UGG(A/U)-GG-3' の共通モチーフを有する、主に 3 種類の配列を得た (Fig. 2)。

これらの Anti-PrP<sup>C</sup> アプタマーはいずれも rmPrP に高い親和性を有していた。RNA アプタマーは生体材料中に含まれる RNase により消化されやすい性質を有しているが、フッ素修飾を施すことにより RNase 耐性となることができると。単離したアプタマーはいずれも、フッ素修飾後も高い結合能を維持していた (Fig. 3)。

### (3) 周辺技術の整備

アプタマーと標的分子の結合の有無を調べるためには、一般的にゲルシフトアッセイが用いられる。しかし、この方法は結合特異性の解析には不向きであり、アプタマーの性質を調べる

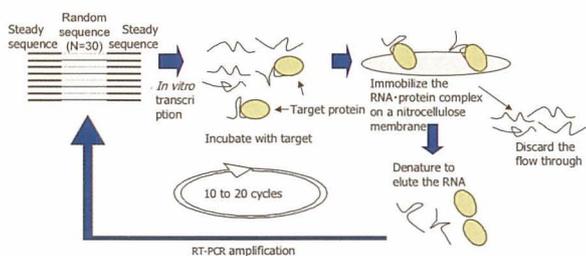


Fig. 1. *In vitro* selection method for RNA aptamers (インビトロ・セレクション方法の概略)

#### Anti-PrP<sup>C</sup> 60-3

5'-GGUAGAUACGAUGGAGGUGUAUUUUUAUGUGCGUAUUUGGAGGCAUGACGCGCAGCCA-3'

#### Anti-PrP<sup>C</sup> 74-9

5'-GGGAGAAUUCGACCAAGGUAUUUGCGCGUGGUGGAGUUGCGGUUGAGCG CCUUUCCUCU-3'

#### Anti-PrP<sup>C</sup> 74-25

5'-GGGAGAAUUCGACCAAGGUAUUUGGAGGUGGAGGUGGUGGAGUUGCGGUUGAGCG CCUUUCCUCU-3'

Fig. 2. Nucleotide sequence of RNA aptamers obtained by *in vitro* selection against recombinant mouse PrP (rmPrP).

(リコンビナントマウスプリオン蛋白に対する選択実験で得られたRNAアプタマーの塩基配列)

ためには、抗体で良く用いられるプロットティング法による検出法の開発が必要とされた。まず、ドットプロットティングのフォーマットで、Anti-PrP<sup>C</sup> アプタマーをビオチン化してプリオン蛋白に結合させ、これを酵素標識したストレプトアビジンで検出する方法を確立した (Fig. 4)。次に、ノースウエスタンプロットティングによりマウス脳抽出物中のマウスプリオン蛋白 (mPrP) を特異的に結合するかどうかを確認した。その結果、市販のモノクローナル抗体 MAb6H4 とほぼ同様の結合特異性を有することが明らかになった (Fig. 5)。

通常、アプタマーの選択実験の途中に行うバインディングアッセイ (標的蛋白に対する選択が有効に行われているかどうかを確認する試験) は、RI 標識したアプタマーを用いて行われる。RI を用いず、蛋白質と結合したアプタマーを定量できれば、アプタマーの応用範囲が広がる。そこで、リアルタイム PCR 装置による RNA の定量条件を検討した。その結果、RI を用いずにアプタマーの定量が可能であることが明らかとなった (Fig. 6)。

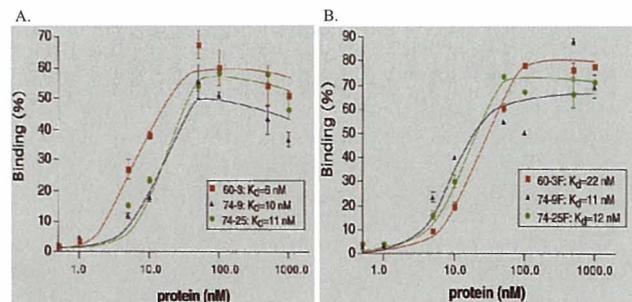


Fig. 3. Binding affinity analysis of RNA aptamers against rmPrP. (各アプタマーの rmPrP に対する親和性)

- A. RNA aptamers without chemical modification.  
B. 2'Fluoride modified RNA aptamers.

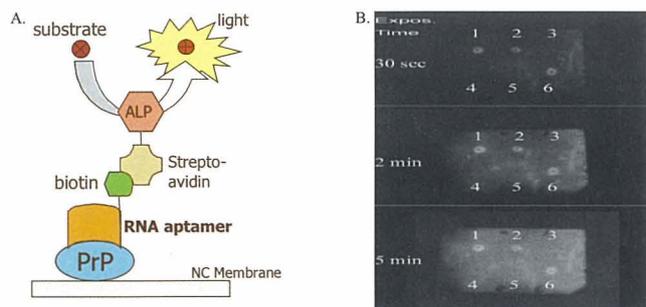


Fig. 4. Detection of rmPrP by dot blotting. (ドットプロットティングによるrmPrPの検出)

- A. Detection scheme for membrane blotting.  
B. Spot No. 1 to 5 were stained with rmPrP; 1, 250 ng; 2, 125 ng; 3, 62.5 ng; 4, 31 ng; 5, 15.5 ng. No. 6 was stained with 68ng of streptavidin-alkaline phosphatase conjugate as a positive control.

(4) 単離したアプタマーのPrP結合部位の探索とPrP濃縮法の検討

ドットプロットングにより、様々な長さの mPrP フラグメント組換え蛋白に対する結合を調べたところ、アプタマーはアミノ酸番号(aa)23-230 と aa89-230 に結合したが、aa155-230 と aa167-230 には結合しなかった (Fig. 7)。このことから、少なくとも結合エピトープが aa155 より N 末端側に存在すると考えられた。次に、aa23-230 と aa89-230 に対するアプタマーの解離定数(Kd)を求めたところ、前者は約 30nM で後者は約 400nM だった (Kd が低いほど親和性は高い) (Fig. 8)。以上の結果から、結合部位は aa23-155 の間にあるが、高い結合親和性を維持するためには、aa23-89 の存在が必要であると考えられた。

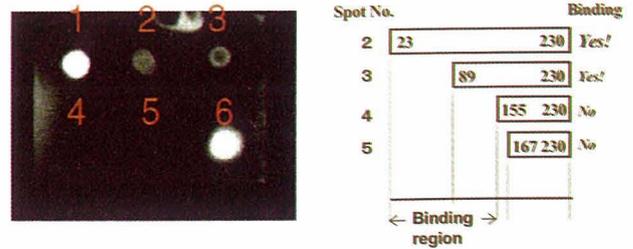


Fig. 7. Binding site analysis of the 60-3 aptamer.

(Anti-PrP<sup>Sc</sup>アプタマーのmPrP結合部位)

No. 1, rmPrP(Prionics, positive control)

No. 2 to 5, mPrP fragments

No. 6, Streptavidin-ALP (positive control)

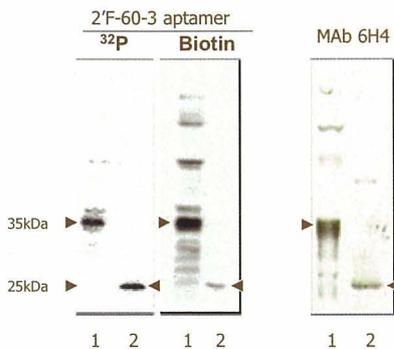


Fig. 5. Detection of mPrP by North-Western blotting.

(ノースウエスタンブロットングによるmPrPの検出)

Lane 1, mouse brain extract. Lane 2, rmPrP.

<sup>32</sup>P, stained with <sup>32</sup>P labeled 60-3 anti-PrP aptamer and visualized using BAS-2500 (Fuji film). Biotin, stained with 5'-biotinilated 2'F60-3 aptamer and SA-AP conjugate. MAb6H4, stained with monoclonal antibody 6H4 (Prionics) and AP-conjugated secondary antibody.

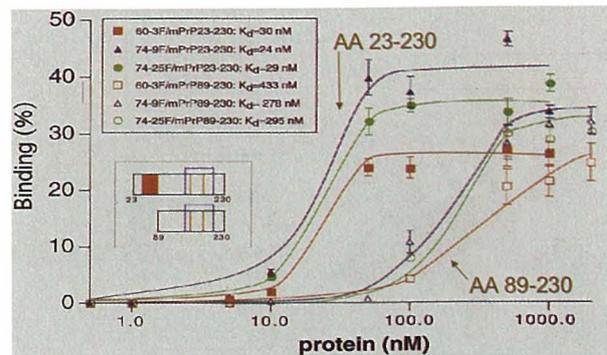


Fig. 8. Binding affinity of the anti-PrP<sup>c</sup> aptamer to the rmPrP fragments.

(Anti-PrP<sup>c</sup>アプタマーのmPrPフラグメントに対する親和性の解析)

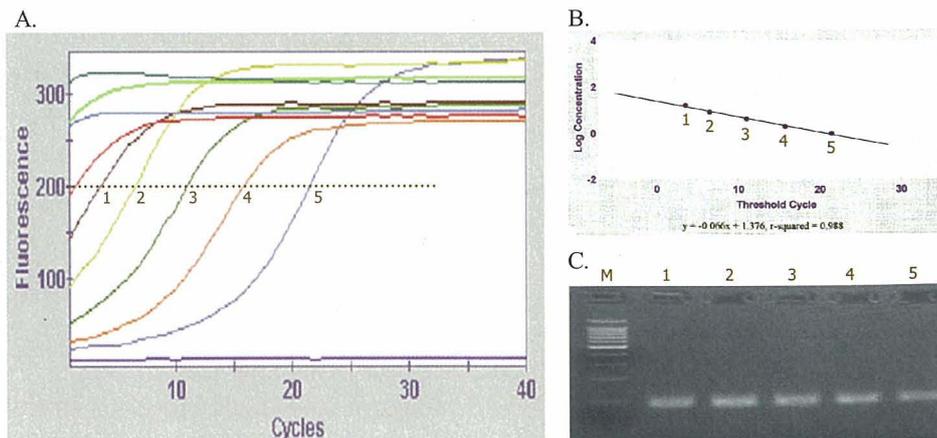


Fig. 6. Quantification of RNA aptamer by real-time RT-PCR.

(リアルタイム逆転写-PCRによるRNAアプタマーの定量)

A. 1, 48pg ; 2, 24pg ; 3, 12pg ; 4, 6pg ; 5, 3pg of RNA aptamer

B. Standard curve drawn by threshold cycle versus RNA concentration on a log scale.

C. Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis.

高感度検出のために、アプタマーを用いた mPrP の沈降・濃縮法を検討した。アビジンコーティングされた磁気ビーズにビオチン化したアプタマーを結合させ、アプタマービーズを調製した。アプタマービーズとマウス脳抽出物をインキュベートした後に、ビーズに結合した mPrP をウエスタンブロッティングで検出したところ、mPrP のアプタマーへの結合が確認された (Fig. 9)。また、通常ウエスタンブロッティングでは検出限界以下である 0.05% のマウス脳抽出物からも、mPrP を検出可能なレベルにまで (25~50 倍程度) 濃縮することができた (Fig. 10)。さらにアプタマーのコーティング量を増やすことにより、高感度検出法へ応用することが可能と考えられた。

#### (5) PrP<sup>Sc</sup> に結合する RNA アプタマーの単離

スクレーピーObihiro 株感染マウスの脳より精製したスク

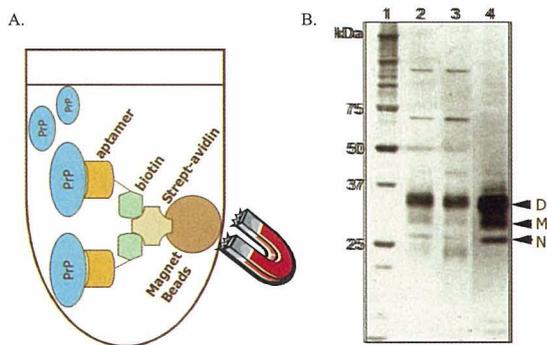


Fig. 9. Precipitation of PrP using 2'F-60-3 aptamer coated-magnet beads.

(2'F-60-3をコートしたビーズによるプリオン蛋白の沈降)

- A. Scheme for the precipitation experiment.  
B. Lane 1, Molecular weight markers; Lane 2, mouse brain homogenate; Lane 3, supernatant; Lane 4, magnetic beads precipitate fraction. N, M and D represent non-, mono- and di-glycosylated forms of mPrP, respectively. PrPs were stained with 6H4 anti-PrP monoclonal antibody and SA-AP conjugate.

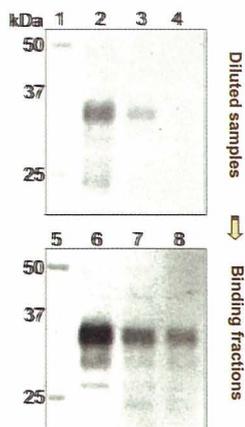


Fig. 10. Concentration of mPrP by the anti-PrP<sup>C</sup> aptamer coated-magnet beads.

(Anti-PrP<sup>C</sup> アプタマービーズによる mPrP の濃縮)

- Lane 1 and 5, MW markers. Lane 2 and 6, 1.25% brain homogenate. Lane 3 and 7, 0.25% brain homogenate. Lane 4 and 8, 0.05% brain homogenate.

レーピー関連繊維 (SAF) を標的タンパク質として、RNA アプタマーの選択を行った。RNA は Anti-PrP<sup>C</sup> アプタマーの単離に使用したものと同様の、中間部に 30 mer のランダム配列を持つライブラリーを用いた。10 サイクルの選択中に PrP<sup>C</sup> と結合する RNA を除くステップ等を含み、より PrP<sup>Sc</sup> に特異的な RNA の選択を図った。その結果、4 種類の配列のアプタマー (Anti-SAF) が得られ、これらは相同性の高い 14 塩基モチーフ 5' -UGG(A/U)GG(A/U)G(G/U)(A/C)GGG(A/U)-3' を有していた (Fig. 11)。この配列は Anti-PrP<sup>C</sup> アプタマーで得られた 6 塩基長の共通モチーフ (5' -UGG(A/U)-GG-3') を含み、そのサイズは 2 倍以上であることから、14 塩基モチーフは PrP の重合体である PrP<sup>Sc</sup> の構造を捉えた配列である可能性が示唆された。

SAF の相当領域である aa89-230 の組換えフラグメント並びに SAF に対する結合性を調べた。Anti-SAF は SAF には良く結合するが、aa89-230 には結合性が低いことから、Anti-SAF は PrP<sup>Sc</sup> に、より高い親和性を有することが示唆された (Fig. 12)。

#### Anti-SAF60-05

5'-GGUAGAUACGAUGGA UUGCUUAGAUUGGAGGAGUAGGGACUUAGGCAUGACGCGCAGCCA-3'

#### Anti-SAF60-12

5'-GGUAGAUACGAUGGA UGGAGGAGGGUUAUUCUCAUCGGCUUAGUGCAUGACGCGCAGCCA-3'

#### Anti-SAF74-04

5'-GGGAGAAUUCGACCAGAAG GUUUGGCGCGUGGUGAGUCGGGUUGAGCGCCUUUCCUCUCUCCUCCUCCU-3'

#### Anti-SAF74-10

5'-GGGAGAAUUCGACCAGAAG UGGAGGUGUCGGGUUGAUUCUGUGGGAAUCCUUUCCUCUCUCCUCCUCCU-3'

Fig. 11. Nucleotide sequences of RNA aptamers obtained by *in vitro* selection against scrapie-associated fibril (SAF).

(スクレーピー関連繊維 (SAF) を標的として選択した RNA アプタマーの塩基配列)

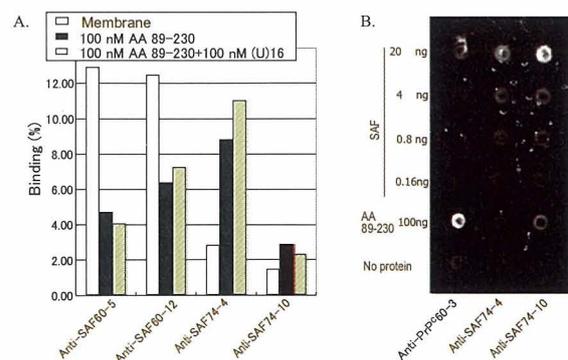


Fig. 12. Binding specificity of the anti-SAF RNA aptamers.

(Anti-SAFアプタマーの結合特異性)

- A. Binding of selected anti-SAF aptamers to rmPrP aa89-230 fragment (corresponding to SAF) in liquid phase.  
B. Binding of anti-SAF aptamers to SAF and rmPrP aa89-230 fragment using a filtration-blotting format. Binding of anti-PrP<sup>C</sup> 60-3 is shown for comparison.

## 2-2 海外情報収集関連

(1) EUと米国の担当機関と接触し、異常プリオン蛋白否定試験法開発の現状を調査した。

① EUでは、European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM)が医薬品の品質の監視やGMP査察を担当している。EDQMのDr. Peter Castleから聞き取りを行ったところ、医薬品のプリオン検査に関してはEDQMが責任ある立場である。検出法の研究開発はEDQM内では行っておらず、英国のNIBSC (National Institute for Biological Standards and Control)に委託しているとのことであった。現在まで、具体的な進展の報告は受けていないとのことだった。

② 米国では、動物用生物学的製剤を米国農務省(USDA)が、生物学的製剤以外の動物用医薬品を米国食品医薬品局(FDA)が担当している。USDAの動植物検疫局(APHIS)にあるCenter for Veterinary Biologics(CVB-L)が実際の検査を担当する機関である。CVB-LのDr. Linn A. Wilbur (Mammalian Virology Section)のセクションリーダーであり、動物用生物学的製剤におけるプリオン検査の責任者(当時)から聞き取りを行った。CVB-Lでは、動物用生物学的製剤へのPrP<sup>Sc</sup>迷入に関するリスクアセスメントを行った。アセスメントは、1、米国にはBSEが存在しない(当時)、2、羊血清を製造に使用することはない、3、ウイルス培養用株化細胞で羊由来のものはほとんど無いことを条件として行われた。その結果、生物学的製剤におけるPrP<sup>Sc</sup>迷入のリスクは無視できるほど小さく、新たに否定試験法を開発する必要はないという結論に達したということであった。

しかしながら、有効な検査法があれば米国でも検査を実施したいことにはかわらず、その場合、検査の対象となるのはマスターシードとマスターセルのストック及び製造原材料であり最終製品を検査の対象とすることはない。日本でもシードロット化の進行が予想されることから、PrP<sup>Sc</sup>否定試験法の開発の方向もシードと原材料の検査に的を絞るべきであろう。検査法が開発された折には、その有効性を検証するためのコラボレーションをぜひ行いたいとのことであった。

(2) 欧州食品安全機構(EFSA)の活動に関する調査

EFSAはTSEの検出法・診断法の評価法のガイドライン作成や評価を行うTSE対策における最重要機関であるため継続的に調査した。EFSAがECの食品安全・消費者保護局の科学委員会を独立させた形で活動を開始するまでの経緯と、BSE/TSEを担当するバイオハザードパネルから発出された意見およびBSE診断薬評価に関する技術報告等を整理した。

## 3 研究成果

(1) 公刊図書等

能田健、永井英貴、平澤緑、牛海綿状脳症(BSE)診断技術の

開発動向、獣医畜産新報(2003)56, 719-725.

平澤緑、永井英貴、能田健、欧州ヨーロッパ食品安全機構(EFSA:The European Food Safety Authority)、畜産技術(2003)4月号, 24-26.

平山紀夫、能田健、(総説)動物用医薬品における牛海綿状脳症対策—安全性確保のための現状と展望—、動薬検年報(2003)40, 1-10.

Satoru Sekiya, Ken Noda, K. Fumiko Nishikawa, Takashi Yokoyama, Penmetcha Kumar, Satoshi Nishikawa, Characterization and application of a novel RNA aptamer against the mouse prion protein, *The Journal of Biochemistry* (2005) JB-05-10-0205.R1 (Dec. 13. 2005 accepted)

(2) 研究会報告等

能田健、大槻紀之、永井英貴、P.K.R.クマール、関矢聡、西川諭、リアルタイムPCRによるRNAアプタマー定量法の検討、第135回日本獣医学会学術集会2003年10月3~5日、青森市

関矢聡、能田健、P.K.R.クマール、横山隆、西川諭、マウスプリオン蛋白に結合するRNAアプタマーのスクリーニング、第6回日本RNA学会年会、熊本市、平成16年8月4~6日

能田健、関矢聡、P.K.R.クマール、西川諭、横山隆、正常プリオン蛋白に結合するRNAアプタマーの単離、第138回日本獣医学会学術集会 平成16年9月10~12日、札幌

Satoru Sekiya, Ken Noda, P.K.R. Kumar, Takashi Yokoyama, Satoshi Nishikawa, In vitro selection of anti-mouse prion protein RNA aptamers. International Symposium on Prion Diseases: Food and Drug Safety, 2004 Oct.31-Nov.2, Sendai, Japan.

関矢聡、能田健、P.K.R.クマール、横山隆、西川諭、マウスプリオンタンパク質に対するRNAアプタマーの創出と解析 第14回アンチセンスシンポジウム、12月2~3日、横浜

Satoru Sekiya, Ken Noda, P.K.R. Kumar, Takashi Yokoyama, Satoshi Nishikawa, In vitro selection of RNA aptamers against cellular and abnormal isoform of prion protein. RNA2005 (10th Annual Meeting of the RNA Society), 2005 May 24-29, Banff, Canada.

(3) 特許

西川諭、関矢聡、P.K.R.クマール、能田健、プリオン蛋白質に特異的に結合する核酸分子、2004年8月出願、特願2004-226164

西川諭、関矢聡、P.K.R.クマール、横山隆、能田健、異常プリオン蛋白質に特異的に結合するRNAアプタマー、2005年5月、特願2005-148411

4. まとめ

コンビナトリアルケミストリーに基づいた新しい手法である

RNA アプタマー技術により、PrP<sup>C</sup>あるいは PrP<sup>Sc</sup>に特異的に結合する RNA アプタマーを取得した。また、アプタマーを用いたブロットィング検出法及び濃縮法を確立し、動物用医薬品

における異常プリオン蛋白否定試験法開発への技術的基盤を確立した。