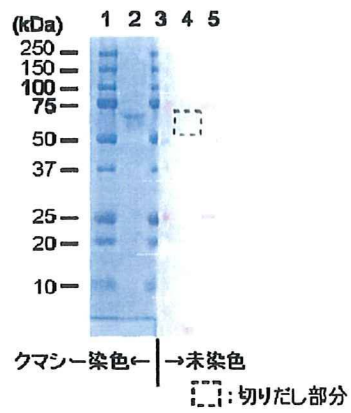


(A)



(B)

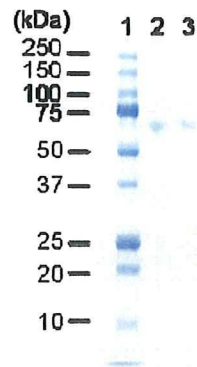


図 6. フェツインの回収実験結果 (アクリルアミドゲルからの回収-2)

(A) 回収前の SDS-PAGE

レーン 1, 3, 5: 分子量マーカー

レーン 2 (参照レーン) : フェツイン (1  $\mu\text{g}$ , クマシー染色)

レーン 4: フェツイン (1  $\mu\text{g}$ , 未染色)

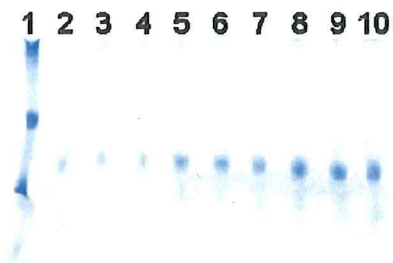
(B) 抽出回収液の SDS-PAGE

レーン 1: 分子量マーカー,

レーン 2: 回収前のフェツイン (1  $\mu\text{g}$ ) (Control)

レーン 3: 回収後フェツイン

(A)



(B)



図7. フェツインの回収実験結果 (10%BAC-ポリアクリルアミドゲルからの回収)

(A) 回収前の泳動図

レーン 1: マーカー

レーン 2, 3, 4: フェツイン (1  $\mu\text{g}$ )

レーン 5, 6, 7: フェツイン (3  $\mu\text{g}$ )

レーン 8, 9, 10: フェツイン (5  $\mu\text{g}$ )

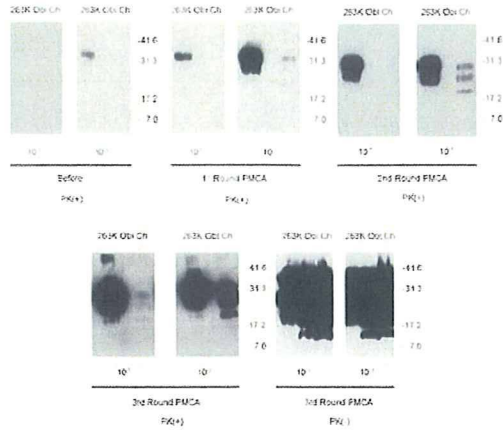
(B) 強イオン交換体カラムで処理した回収液

レーン 1: マーカー

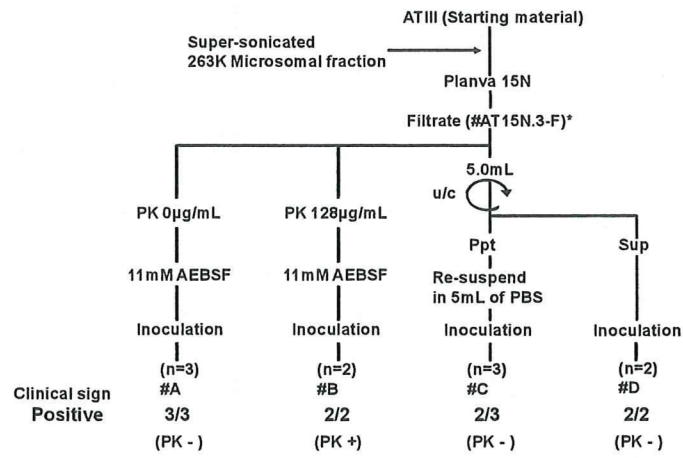
レーン 2, 3, 4: 回収前のフェツイン (1, 3, 5  $\mu\text{g}$ )

レーン 5: フェツイン (1  $\mu\text{g}$ ) (Control)

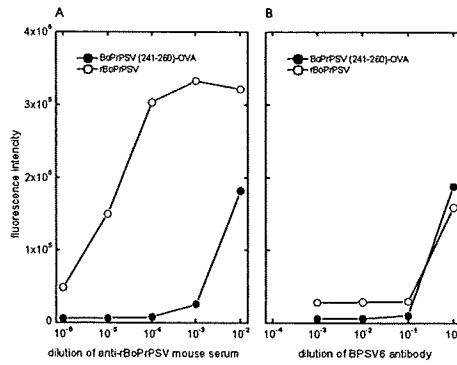
レーン 6, 7, 8: 回収後のフェツイン (1, 3, 5  $\mu\text{g}$ )



8. *In vitro* amplification of PrP<sup>res</sup>

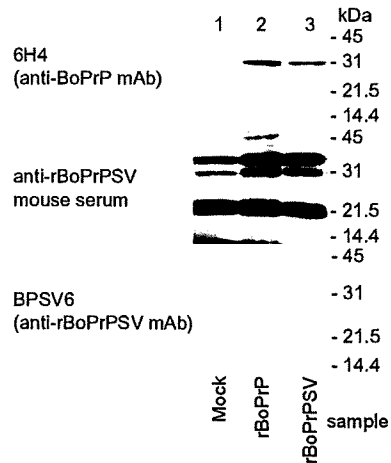


9.



**Fig. 10. Binding of antibodies to coating antigen in ELISA.**

(A) Various concentration of anti-rBoPrPSV mouse serum were incubated with BoPrP (241-260)-OVA (●) or rBoPrPSV (○) as coating antigen. (B) Various concentration of anti-rBoPrPSV antibody (BPSV6) were incubated with BoPrPSV (241-260)-OVA (●) or rBoPrPSV (241-260)-OVA (○) as coating antigen



**Fig. 11. Immunoblot analysis of recombinant bovine splice variant isoform of PrP.**

The mock, bovine PrP gene and splice variant were subcloned into and transformed into Escherichia coli BL21(DE3)pLysS. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE. Mock (lane 1), recombinant PrP (lane 2) and PrPSV (lane 3) were detected with anti-PrP mAb 6H4 (upper panel), anti-rBoPrPSV mouse serum (middle panel) and anti-PrPSV mAb BPSV6 (lower panel).

検例	ゲル形状(消化時)	キモトロフィン量 (BSA:キモトロフィン)	原量 (μL)	消化時間 (h)	ゲル形状(抽出時)	抽出液	抽出方法	カバー率 (%)
1	—	2&1	35	18	—	—	—	0
2	角片	2&1	35	18	角片	1%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	薬と手袋、超音波洗浄(90℃の温度と同じ)	1.9
3	角片	2&1	35	18	角片	1%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出	18.1
4	角片	1&1	70	18	塊状	1%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出	22.2
5	塊状	1&1	70	18	塊状	1%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出	22.3
6	塊状(ヒキサー使用)	1&1	70.1	18	塊状(ヒキサー使用)	1%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出後、フィルターでゲルを脱く	7.9
7	塊状(ヒキサー使用)	1&1	70.1	42	塊状(ヒキサー使用)	1%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出後、フィルターでゲルを脱く	16.1
8	PVDF膜	1&1	70.1	18	PVDF膜	1%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出	3.5
9	PVDF膜	1&1	70.1	42	PVDF膜	1%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出	0

\*:近赤外線分光法でモデル化したBSA、1μgを溶液の状態で消化した。

表 1. ゲル内消化, 及び PVDF 膜消化の検討結果

Day	Chander		Ohhiro	
	Abdomen	Ear	Abdomen	Ear
0				
3				
5				
20				
39		*		
50				
60				*
71		*		
81		*		
90		*	*	
99		*		
124*		*	*	
140		*		*
160*		*	*	*
170*		*	*	*
182*		*	*	*
189*		*	*	*
196*		*	*	*
201*		*	*	*
208*		*	*	*
215*		*	*	*
222*		*	*	*
242*		*	*	*
250*		*	*	*

表 2. 近赤外分光法により有意な違いの検出された接種後日数 (非感染群との比較; p<0.05)

Sample	Spiking agent	Preparation	Detection	LRF
PBS	Hamster PrP <sup>Sc</sup> 263K	MF	WB	≥2.5/≥3.2
		sMF	WB	≥3.2/≥3.2
Antithrombin	Hamster PrP <sup>Sc</sup> 263K	lsMF	WB	≥3.5/≥3.5
			BA	≥4.7/4.0
		sMF* (0.22 μm)	WB	≥2.8
			BA	+ve
Factor IX	Hamster PrP <sup>Sc</sup> 263K	sMF* (0.22 μm)	WB	≥2.9
Thrombin	Hamster PrP <sup>Sc</sup> 263K	dsMF	WB	≥3.5/≥3.5

LRF: Log reduction factor; MF: Mitosomal fraction; BH: Brain homogenate; sMF: "Super-sonicated" MF;  
 dBH: BH including sarcosyl; dMF: MF including sarcosyl; sMF': 0.22 μm filtered sMF;  
 dsMF: SD (NBP and Tween 80) treated and followed by "super-sonicated" MF.  
 lsMF: Lysolcedthin treated and extensively sonicated MF (without ultracentrifugation). Yunoki M. et al. Future Virol. 2006, 1(5), 659-674  
 Yunoki M. et al. Biologics. 2008, 36(1), 27-36  
 Yunoki M. et al. Biologics, 2009, In press

表 3. PrP<sup>Sc</sup> removal using Planova 15N

PrP <sup>Sc</sup> 画分	希釈列							総PrP <sup>Sc</sup> 量 <sup>0</sup> Log[PMCA <sub>20</sub> ]
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	
濾過前	NT	NT	+++ <sup>0</sup>	+++	+++	+-- <sup>0</sup>	---	10.6
濾過後	---	---	---	NT	NT	NT	NT	<5.3

表 4. FVIII 溶液のプロセスバリデーション(プラノバ 20N 濾過)

- n=3で実施し, 3検体ともPrP<sup>Sc</sup>が増幅されなかったことを示す。
- n=3で実施し, 3検体ともにPrP<sup>Sc</sup>陽性であったことを示す。
- n=3で実施し, 1検体のみPrP<sup>Sc</sup>陽性であったことを示す。
- PrP<sup>Sc</sup>の検出結果から求めたPMCA力価と溶液量から総PrP<sup>Sc</sup>量を算出した。

PrP <sup>Sc</sup> 画分	希釈列							総PrP <sup>Sc</sup> 量 Log[PMCA <sub>20</sub> ]
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	
濾過前	NT	NT	+++	+++	+++	+--	---	10.4
濾過後	NT	NT	+++	++-	---	---	---	8.9

表 5. HBIG 溶液のプロセスバリデーション(プラノバ 35N 濾過)

## 異常型プリオンの検出のための試験研究

分担研究者： 川崎ナナ （国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部第1室長）  
協力研究者： 高倉大輔 （国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部）  
伊藤さつき （国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部）

**研究要旨** 異常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) の特異的検出法の開発を目的とした正常プリオンタンパク質 (PrP<sup>C</sup>) 及び PrP<sup>Sc</sup> の構造解析を実施するため、電気泳動で分離された糖タンパク質を含むゲルより、ペプチド及び糖タンパク質を効率的に回収する方法について検討した。ペプチドの回収に関しては、ゲル内消化後にゲルを粉砕し、超音波抽出を検討したが、回収率は高くなかった。ゲルからの糖タンパク質については、アクリルアミドゲルで分離した糖タンパク質を固定化せずに切り出し、ゲルを粉砕後、高塩濃度溶液で抽出することによって、良好な回収率が得られることが明らかになった。

### A. 研究目的

遺伝子組換え医薬品等の開発において、異常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) の混入/迷入の低減は、医薬品の安全性を確保するための大きな課題である。異常型プリオンタンパク質の特異的検出法を開発するためには、その構造を解析し、正常プリオンタンパク質 (PrP<sup>C</sup>) との違いを明らかにする必要がある。プリオンタンパク質 (PrP) は、分子内に2本のN結合型糖鎖及びGPIアンカーを有する糖タンパク質であり、PrP<sup>Sc</sup>の糖鎖やGPI構造は、Proteinase Kによって不純物を消化することによって得られる。Hamster adapted prion scrapie 263Kを用いた研究により、既に明らかにされている。しかし、PrP<sup>C</sup>は、Proteinase Kに対して感受性であるため同じ方法による精製が困難であり、構造に関する報告例は少ない。昨年度は、正常ハムスター脳に発現しているPrP<sup>C</sup>の濃縮を検討し、界面活性剤 Octyl  $\beta$ -glucoside 及び CHAPS による可溶化、並びに Ni カラムと PEI コーティングメンブレンの併用により、PrP<sup>C</sup>が濃縮されることを明らかにした。また、SDS-PAGE で PrP<sup>C</sup> が検出された範囲には、PrP<sup>C</sup> 以外にも複数のタンパク質が含まれることを確認した。そこで本年度は、こ

のような電気泳動で分離されたゲル内の微量タンパク質の部位特異的な糖鎖構造を解析するために、ゲルより効率的にペプチド、又は糖タンパク質を回収する方法について検討した。

### B. 研究方法

#### 1) ゲル内消化、及びPVDF膜消化によるペプチド回収に関する検討

モデル試料としてBSAを使用した。BSAを還元カルボシキメチル化後、12.5%アクリルアミドゲル、1レーンあたり1 $\mu$ gをアプライし、25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS, pH8.3 泳動用緩衝液中で20 mAで泳動した。泳動後のゲルをクマシーにより (Simple Blue Stain, Invitrogen) 染色した。染色されたBSAのバンドを切り出し、1 mm程度の角片とし、30%アセトニトリル水溶液を用いて脱色後、50%アセトニトリル水溶液を加え脱水した。脱水液を除去後、減圧濃縮遠心エバポレーター (Speed Vac) を用いて、ゲル片を乾燥させた。表1に示すように、ゲルの形状、消化酵素量、消化時間、及び抽出方法等を変えながら、消化及び抽出を行った。また、F膜に転写されたタンパク質の消化と抽出についても検

討する場合は、カルボキシメチル化した BSA を PVDF 膜にブロッティング後、ブロッティングされた部分を切り取り、0.5%ポロビニルピロリドン K30 を含む 100 mM 酢酸でブロッッキングした後、検討に用いた。

抽出されたペプチドについて、以下の条件で LC/MS/MS、及びデータベース検索を行い、同定されたペプチドから BSA のアミノ酸配列のカバー率を算出した。

#### HPLC :

装置 : Paradigm MS4 (Michrom BioResource)

カラム : L-column (化学物質評価機構, 0.075×150 mm, 3 μ)

溶離液 A : 0.1%ギ酸を含む 2%アセトニトリル水溶液

溶離液 B : 0.1%ギ酸を含む 90%アセトニトリル水溶液

グラジエントプログラム : 2~65%B (0~50 分)

流速 : 0.3 μl/min

#### MS :

装置 : Finnigan LTQ (Thermo Fisher Scientific)

イオン源 : nanoESI

キャピラリー温度 : 200°C

キャピラリー電圧 : 1.8 kV

スキャン範囲 ( $m/z$ ) : 450-2000

衝突エネルギー : 35%

測定メソッド :

① single mass scan ( $m/z$  450-2000)

② data-dependent MS/MS

#### データベース検索

検索エンジン : Bioworks (Thermo Fisher Scientific)

データベース : Swissprot

#### 2) ゲルからのタンパク質回収に関する検討

(アガロースゲルからのタンパク質の回収)

還元カルボキシメチル化した BSA を 5%アガロースゲルにアプライし、100 V で分離後、クマシー染

色 (Simple Blue Stain) を行った。検出された BSA のバンドを切り取り、DNA 回収用スピンカラム

(Quantum Prep Freeze N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Column, Bio-Rad) を用いて、タンパク質の回収を行った。回収液を SDS-PAGE (12.5%ゲル) で分離し、クマシー染色により検出した。

(アクリルアミドゲルからのタンパク質の回収-1)

フェツインを還元カルボキシアミドメチル化した後、Cy5 (GE Healthcare) で蛍光標識した。12.5%アクリルアミドゲル、1 レーンあたり 1 μg をアプライし、25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1%SDS, pH8.3 泳動用緩衝液中で 20 mA で泳動した。蛍光スキャナー (Typhoon9400, GE Healthcare) でフェツインのバンドを検出後、ゲルを切り取り、回収検討実験に用いた。図 3A に示した抽出条件で、ゲルからのフェツインの振とう抽出を行い、抽出条件によっては得られた抽出液のフィルターろ過、又はゲルろ過

(NAP-5, GE Healthcare) を行った。回収液を SDS-PAGE (12.5%ゲル) で分離し、蛍光検出、及びクマシー染色により検出し、回収度合いを確認した。

抽出条件⑤で回収したフェツインについては、キモトリプシンを 0.1 μg を加え、2 mM 塩化カルシウムを含む 100 mM 重炭酸アンモニウム (pH8.0) 中、37°C, 24 時間消化した。消化物について、LC/MS<sup>n</sup> で分析を行った。

#### HPLC :

装置, カラム, 溶離液, 流速は、1) ゲル内消化、及び PVDF 膜消化によるペプチド回収に関する検討と同じ。

グラジエントプログラム : 2~60%B (0~100 分)

#### MS :

装置 : Finnigan LTQ (Thermo Fisher Scientific)

イオン源 : nanoESI

キャピラリー温度 : 200°C

キャピラリー電圧 : 2.0 kV

スキャン範囲 ( $m/z$ ) : 700-2000

衝突エネルギー : 35%



測定メソッド:

- ① single mass scan  
( $m/z$  700-2000, FT 分解能: 50000)
- ② data-dependent MS/MS
- ③ data-dependent MS/MS/MS
- ④ data-dependent MS/MS/MS/MS
- ⑤ data-dependent MS/MS/MS/MS/MS

(アクリルアミドゲルからのタンパク質の回収-2)

還元カルボキシアミドメチル化したフェツインを12.5%アクリルアミドゲル, 1レーンあたり1 $\mu$ gをアプライし, 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS, pH8.3 泳動用緩衝液中で20 mAで泳動した。マーカー, 及びフェツインの1レーン分についてクマシー染色 (Simple Blue Stain) を行い, これを参照レーンとして, 未染色のゲルよりフェツインの泳動位置に相当するゲルを切り出した。図3Aの抽出条件⑤を用いて, ゲルからフェツインの振とう抽出を行った。回収液をSDS-PAGE (12.5%ゲル) で分離し, クマシー染色により検出し, 回収度合いを確認した。

### 3) 溶解性ゲルからのタンパク質回収に関する検討

Hansenらの報告 (Hansen, JN. et al., Analytical Biochemistry, **105**, 192, 1980) を参考に, アクリルアミドゲルを作成する際に, N, N' -メチレンビスアクリルアミド (BIS) の代わりにN, N' -ビス(アクリロイル)シスタミン (BAC,  $(\text{CH}_2\text{CHCONHCH}_2\text{CH}_2\text{S})_2$ ) を使用し, ゲルを作成した。アクリルアミドはBio-Rad社製, BACはSigma社製を使用し, 溶解溶媒にホルムアミドを用いて, 10%BAC-ポリアクリルアミドゲルを作成した。ゲルに還元カルボキシメチル化したフェツインを1レーンあたり1, 3, 5 $\mu$ gをアプライし, 89 mM Tris, 2.5 mM EDTA- $\text{Na}_2$ , 89 mM ホウ酸の泳動用緩衝液中で20 mAで泳動し, ゲルはクマシー染色 (Simple Blue Stain) を行った。

ゲルの溶解には, 還元剤ジチオスレイトール (DTT), 又はトリス(2-カルボキシエチル)フォスフィン (TCEP) を用い, タンパク質を回収することを試みた。フェツインを含むゲルを切り出し, 30% アセトニトリル水溶液で脱色後, 1.25 M DTT, 又は

0.5 M TCEP (Bond-Breaker TCEP solution, Neutral pH, PIERCE) を500 $\mu$ L加え, ゲルを粉碎した後, 室温で一晩振とうした。

溶解したゲル溶液からフェツインの回収するために, Sulfo Link Coupling Resin (PIERCE社製), 及び強イオン交換体カラム (Accell Plus QMA, Waters社製) を利用する方法を検討した。Sulfo Link Coupling Resin を利用する方法では, 溶解したゲル溶液, Sulfo Link Coupling Resin と Coupling buffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH8.5) を一晩混合し, 還元によりゲル内のS-S結合の開裂で生成したSH基をSulfo Link Coupling Resin に結合させることによってゲルの分解物を除いた後, さらにゲルろ過 (NAP-5, GE Healthcare) によって還元剤を除いた。強イオン交換体カラムを利用する方法では, フェツインを含むゲルに1.25 M DTTを含む50 mM Tris-HCl, pH8.0, 500 $\mu$ Lを加えて粉碎し, 一晩振とうしながら溶解した後, 強イオン交換体カラムにアプライしフェツインを吸着させ。カラムを50 mM Tris-HCl, pH8.0で洗浄後, 1 M NaClを含む50 mM Tris-HCl, pH8.0でフェツインを溶出し, さらに溶出液をゲルろ過 (NAP-10, GE Healthcare) で脱塩した。また, 強イオン交換体カラムの回収度合いの確認のため, フェツイン, 1 $\mu$ gを50 mM Tris-HCl, pH8.0, 500 $\mu$ Lに加え, 同様に操作した。回収液は, それぞれ濃縮乾固した後, SDS-PAGEで分離し, クマシー染色により検出し, 回収度合いを確認した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来サンプル及び動物を使用していないので, 特に配慮していない。

## C. 結果と考察

### 1) ゲル内消化, 及びPVDF膜消化によるペプチド回収に関する検討

ゲル内消化, 及びPVDF膜消化の検討条件, 及び結果を表1に示す。ゲル内消化効率については, データベース検索で同定されたBSAのペプチドから算出したアミノ酸配列のカバー率を指標とした。検討1, 2, 及び3の結果から, 消化後のペプチドの抽

出には、超音波抽出が有効であるが、溶液状態での消化効率（カバー率：52.8%）に及ばないことが判った。検討4の結果から、酵素量は基質BSAに対して10:1の割合で加えたほうが消化効率は良く（カバー率：23.2%）、検討5の結果から、ゲル内消化時、ゲルを粉碎したほうが消化効率は上がることが判った（カバー率：29.3%）。さらに、消化時のゲル形状について、ミキサーを用いて粉碎し、消化時間についても検討したが（検討6、及び7）、カバー率は上がらなかった。原因として、抽出後にゲル片を除くために行ったフィルターろ過の際に、ペプチドがフィルターに吸着し回収できなかったことが考えられた。また、PVDF膜にブロッティングしたBSAの消化効率（検討8、及び9）についてもカバー率は上がらなかった。原因として、PVDF膜のブロッキングが不十分でキモトリプシンが膜に吸着し、十分に消化できなかったこと、消化後の抽出の際にブロッキングが剥がれ、生成したペプチドが吸着してしまったこと等が考えられた。以上の結果から、ゲルよりペプチドを回収する場合は、ゲル内消化を用い、消化及び抽出時にゲルは粉碎し、超音波抽出すると回収率は上がることが判った。

## 2) ゲルからのタンパク質回収に関する検討

### （アガロースゲルからのタンパク質の回収）

5%アガロースゲルで分離する前のBSAと、分離後（図1）、DNA回収用スピнкаラムを用いて回収したタンパク質回収液を、SDS-PAGE（12.5%）で分離し、クマシー染色により検出した。その結果、アガロースゲルからは、全くBSAは回収されていないことが判った（図2）。原因としては、アガロースゲルの濃度が高すぎることや、タンパク質のゲルへの固定化が強固であることが考えられた。

### （アクリルアミドゲルからのタンパク質の回収-1）

Cy5で蛍光標識したフェツインをSDS-PAGEで分離し、図3に示した抽出条件でゲルからの回収を試みた。抽出溶媒には、従来、多量のゲル内タンパク質の抽出に使用していたトリス緩衝液系溶液（条件①、②、③）や、高塩濃度溶液（条件④、⑤（参考

文献：PIERCE, Technical Resource, TR0051.0）を検討した。回収液をSDS-PAGEで分離後、検出されたフェツインのバンドを比較した結果、条件⑤が最もよく抽出されており、回収前のフェツインとほぼ同じ濃さを示し（図3B）、タンパク質を固定化しないこと、及び抽出溶液が効果的であることが示された。また、本条件で抽出されたCy5標識フェツインについて、キモトリプシン消化を行い、LC/MS<sup>n</sup>で分析した結果、ゲルにアプライしなかったCy5標識フェツインの消化物のクロマトグラムと同様のパターンを示した（図4）。フェツインには、N-型糖鎖結合部位が3箇所、及びO-型糖鎖結合部位が2箇所存在するが、糖ペプチドの解析を行ったところ、N-型糖鎖結合部位のうち2箇所（Asn199, Asn256）について、糖鎖構造を解析することができた。いずれの結合部位にも、すでに報告されているような、主にコアフコースが結合していない3本鎖、及び2本鎖のコンプレックス型糖鎖が結合していた（Green, ED. et. al., *J. Biol. Chem.*, **263**, 18253）（図4）。また、これらの結果は、ゲルにアプライしなかったCy5標識フェツインの消化物のLC/MS<sup>n</sup>から解析された結果と一致していた。

### （アクリルアミドゲルからのタンパク質の回収-2）

フェツインをSDS-PAGEで分離後、マーカー、及びフェツインの各1レーンを含むゲルを分割し、クマシー染色（Simple Blue Stain）を行った。これを参照レーンとして、未染色のゲルより、フェツインの泳動位置に相当するゲルを切り出した（図5A、レーン4、破線で囲んだ部分）。図3Aの抽出条件⑤を用いて、ゲルからフェツインの振とう抽出を行った。抽出液をゲルろ過（NAP-5, GE Healthcare）後、SDS-PAGEで分離し、クマシー染色により検出した（図5B）。検出されたフェツインのバンドの濃さを比較した結果、回収されたフェツインは回収前のフェツインとほぼ同様の濃さを示し、Cy-5標識したフェツインと同様、タンパク質を固定化しないこと、及び高塩濃度の抽出溶液が効果的であることが示された。

### 3) 溶解性ゲルからのタンパク質回収に関する検討

BACの溶解溶媒にホルムアミドを使用して10% BAC-ポリアクリルアミドゲルを作成し、還元カルボキシメチル化したフェツインを泳動後、クマシー染色を行った(図6A)。フェツインを含むゲルを切り出し、30%アセトニトリル水溶液で脱色後、フェツインを含むゲルにそれぞれ1.25 M DTT, 又は0.5 M TCEPを500 µL加え、ゲルを粉碎した後、室温で一晩振とうした。DTT, 及びTCEPのいずれの還元剤を用いた場合も、ゲルが溶解していることが目視で確認できた。DTT, 及びTCEPで溶解したゲル溶液を Sulfo Link Coupling Resin と一晩混合し、還元によって生成したゲル内のSH基を Sulfo Link Coupling Resin に結合させた。ゲル溶解液を回収し、凍結乾燥後、ゲルろ過を行った後、SDS-PAGEで分離し、回収度合いを確認した。その結果、DTT, 及びTCEPのいずれの還元剤を用いた場合も、SDS-PAGE用サンプリングバッファーに溶解した回収物は粘度が高く、また、泳動は乱れ、フェツインの回収も確認できなかった(データ示さず)。回収できなかった原因としては、ゲルの溶解が完全でなかった、吸着等によって微量のフェツインが回収できなかったことが考えられた。泳動の乱れについては、ゲルの溶解物がゲルろ過で除ききれなかったためと考えられた。

強イオン交換体カラムを利用する方法では、回収した液をSDS-PAGEで分離し、クマシー染色により検出した結果、フェツインは検出されなかった(図6B, レーン6-8)。回収できなかった原因としては、Sulfo Link Coupling Resinと同様、ゲルの溶解が完全

でなかった、吸着等によって微量のフェツインが回収できなかったこと、また、参照実験として行ったフェツイン、1 µgについても検出されなかったことから(図6B, レーン4)、強イオン交換体カラムの使用条件がフェツインには適していないことが考えられた。

### D. 結論

電気泳動で分離されたタンパク質について、ゲル内消化及びPVDF膜消化によってペプチドを、あるいはゲルから糖タンパク質を高収率で回収する方法を検討した。ペプチドの回収に関しては、ゲル内消化後、ゲルを粉碎し、超音波抽出する方法を検討したが、回収率は高くなかった。また、アクリルアミドゲルから糖タンパク質を固定化せずに、高塩濃度溶液で抽出することによって、高収率で回収できることが判った。

### E. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

### F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

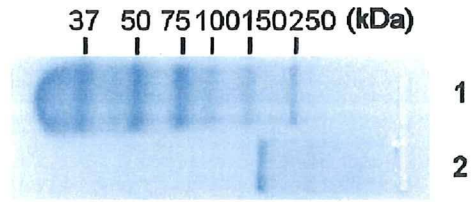


図1. 5%アガロースゲル電気泳動によるBSAの分離

レーン1: 分子量マーカー

レーン2: BSA

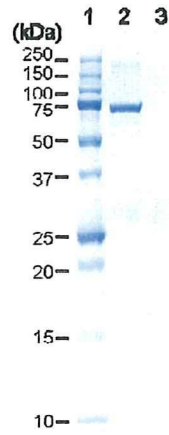


図2. BSA回収実験の結果

レーン1: 分子量マーカー

レーン2: アガロースゲルによる分離前のBSA (Control)

レーン3: アガロースゲルより回収したBSA

(A)

抽出条件	ゲル形状	抽出溶媒	抽出後の処理
①	角片	20 mM Tris-HCl (pH8.0)	—
②	粉砕(ミキサー使用)	20 mM Tris-HCl (pH8.0)	フィルターろ過
③	粉砕(ミキサー使用)	20 mM Tris-HCl (pH8.0) + 1% Octylglucoside	ゲルろ過
④	粉砕(ミキサー使用)	150 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (pH8.0)	ゲルろ過
⑤	粉砕(ミキサー使用)	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA (pH7.5)	ゲルろ過

(B)

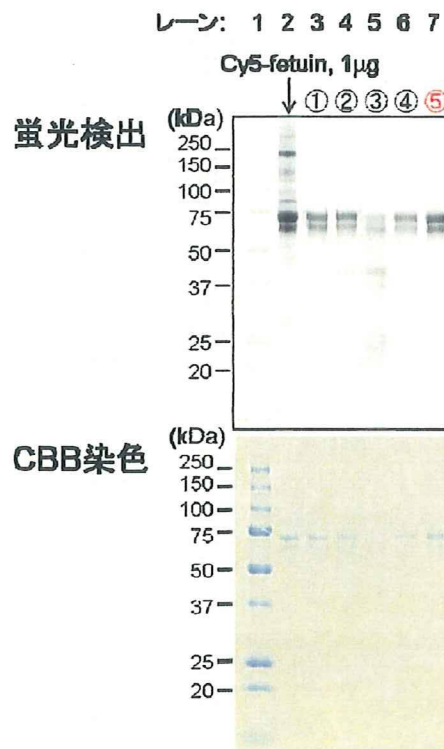


図3. フェツインの回収実験条件と結果 (アクリルアミドゲルからの回収-1)

(A) Cy5 標識したフェツインのゲルからの抽出条件

(B) 抽出回収液の SDS-PAGE (上: 蛍光検出, 下: クマシー染色)

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : 回収前のフェツイン (Control)

レーン 3-7 : 抽出条件①-⑤で回収したフェツイン

(A)

MKSFVLLFCL AQLWGCHSIP LDPVAGYKEP ACDDDETEQA ALAAVDYINK  
HLPRGYKHTL NQIDSVKWWP RRPTGEVYDI EID<sup>1</sup>LET<sup>1</sup>CH VLDPTPLAN<sup>199</sup>C  
SVRQQTQHAV EGD<sup>1</sup>CDI<sup>1</sup>HVLK QDGQFSVLEF KCDSSPDSAE DVRKLCPCCP  
LLAPLN<sup>256</sup>DSRV VHAVEVALAT FNAESN<sup>277</sup>GSYL QLVEISRAQF VPL<sup>2</sup>VSVSVE  
FAVAATDCIA KEVVDPTKCN LLAEKQYGF<sup>2</sup> KGSVIQKALG GEDVRVTCT<sup>1</sup>L  
FQTQ<sup>2</sup>VIPQF QPDGAEAEAP SAVPDAAGPT PSAAGPPVAS VVGPSVVAV  
PLPLHRAHYD LRETFSGVAS VESSSGEAFH VGK<sup>1</sup>TEIVGQP SIPGGPVRLC  
PGRIRYFKI

(B)

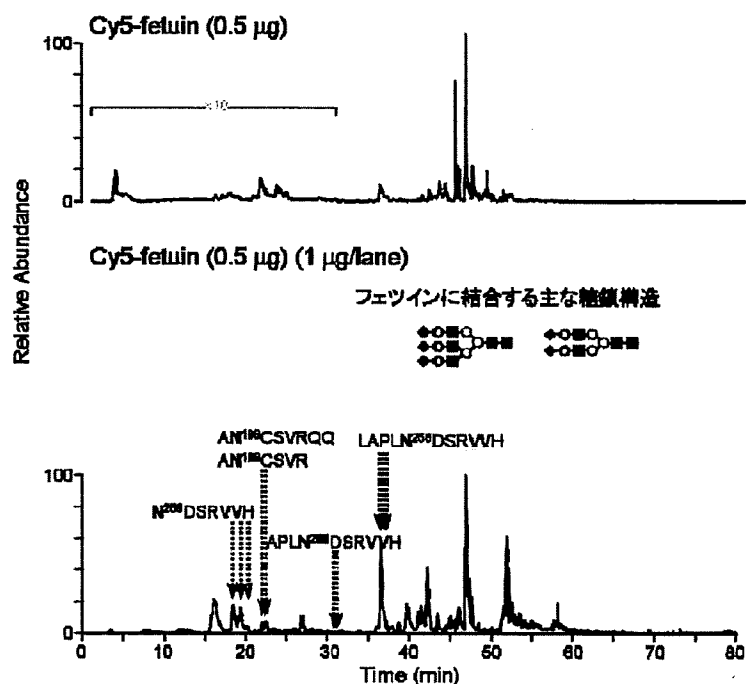


図 4.

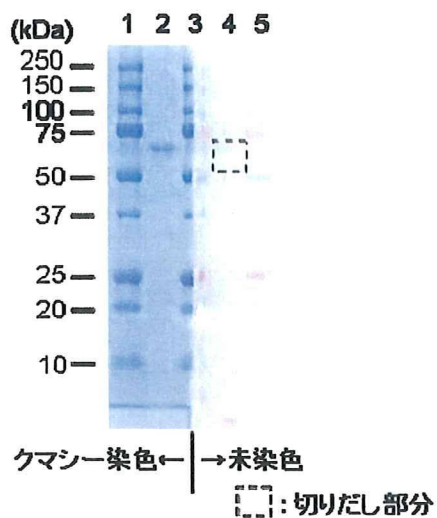
(A) フェツインのアミノ酸配列 (太字は糖鎖結合部位)

(B) Cy5 標識フェツインのキモトリプシン消化物の LC/MS の TIC

上: Cy5 標識フェツインのキモトリプシン消化物

下: ゲルから回収した Cy5 標識フェツインのキモトリプシン消化物

(A)



(B)

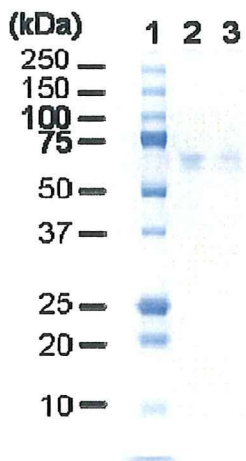


図5. フェツインの回収実験結果 (アクリルアミドゲルからの回収-2)

(A) 回収前の SDS-PAGE

レーン 1, 3, 5: 分子量マーカー

レーン 2 (参照レーン): フェツイン (1 µg, クマシー染色)

レーン 4: フェツイン (1 µg, 未染色)

(B) 抽出回収液の SDS-PAGE

レーン 1: 分子量マーカー,

レーン 2: 回収前のフェツイン (1 µg) (Control)

レーン 3: 回収後フェツイン

(A)



(B)

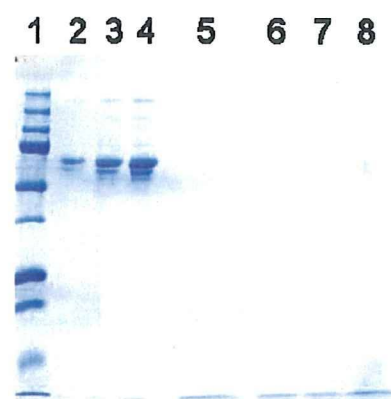


図6. フェツインの回収実験結果 (10%BAC-ポリアクリルアミドゲルからの回収)

(A) 回収前の泳動図

レーン1: マーカー

レーン2, 3, 4: フェツイン (1 µg)

レーン5, 6, 7: フェツイン (3 µg)

レーン8, 9, 10: フェツイン (5 µg)

(B) 強イオン交換体カラムで処理した回収液

レーン1: マーカー

レーン2, 3, 4: 回収前のフェツイン (1, 3, 5 µg)

レーン5: フェツイン (1 µg) (Control)

レーン6, 7, 8: 回収後のフェツイン (1, 3, 5 µg)



検体	ゲル形状(消化時)	キモトリプシン量 (BSA基準(μg))	液量 (μL)	消化時間 (h)	ゲル形状(抽出時)	抽出溶媒	抽出方法	カバー率 (%)
1	—	20.1	35	18	—	—	—	52.9
2	角片	20.1	35	18	角片	19%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	振とう後, 超音波照射(タンパシク阿東と同じ)	1.8
3	角片	20.1	35	18	角片	19%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出	18.1
4	角片	10.1	70	18	粉砕	19%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出	23.2
5	粉砕	10.1	70	18	粉砕	19%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出	28.9
6	粉砕(ミキサー使用)	10.1	70.1	18	粉砕(ミキサー使用)	19%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出後, フィルターでゲルを除去	7.9
7	粉砕(ミキサー使用)	10.1	70.1	42	粉砕(ミキサー使用)	19%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出後, フィルターでゲルを除去	18.1
8	PVDF膜	10.1	70.1	18	PVDF膜	19%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出	3.8
9	PVDF膜	10.1	70.1	42	PVDF膜	19%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出	0

\*: 還元カルボキシアミドメチル化したBSA, 1 μgを溶液の状態で消化した。

表 1. ゲル内消化, 及びPVDF膜消化の検討結果

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等バイオテクノロジーサイエンス総合研究事業）  
（分担研究報告書）

遺伝子組換え医薬品等のプリオン安全性確保のための検出手法の標準化及び  
プリオン除去工程評価への適用に関する研究（H19-医薬-一般-011）

分担研究者 生田 和良 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：

- ① PMCA 法により、ハムスター263K 株、マウス Obihiro 株、マウス Chandler 株の試験管内増幅による比較を行ったところ、263K 株と Chandler 株は既存の条件（1% TritonX-100, 4mM EDTA 含 PBS、40 cycle）での PrPres（蛋白質分解酵素抵抗性 PrP）の増幅が可能であったが、Obihiro 株では同条件では増幅がされなかった。
- ② スクレイパー263K 株を用いた孔径 15nm のフィルターを用いたろ過実験を 2 回行い、ほとんどの感染性のプリオンは除去され、その除去係数（Log reduction factor）は $\geq 4.72$  と 4.00 であった。しかしながら、一部は膜を通過した、超遠心操作でも沈殿しなかった。

A. 研究目的

今年度は①マウス脳に接種した異常型プリオンの増幅を非破壊的に検出する手法開発の一環として、異常型プリオン検出に有効な近赤外領域最適波長を明らかにする。②生物由来製品の工程評価に用いる最適な異常型プリオン蛋白の調製法を確立する。

B. 研究方法

- ①いくつかのプリオン株について、Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA)法を用いたプリオン検出の高感度化について検討した。
- ②15nm の平均孔径を有するナノフィルター（ウイルス除去フィルター）によるプリオン除去能力について動物実験による定量試験を実施した。
- ③倫理面への配慮。プリオン感染サンプルは大阪大学微生物病研究所バイオセイフティー委員会の規定、DNA 実験は遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）および大阪大学組換え DNA 実験実施規則に従い行った。動物実験は微生物病研究所動物委員会の規定に従い行った。

C. 研究成果

- ①PMCA 法により、ハムスター263K 株、マウス Obihiro 株、マウス Chandler 株の試験管内増幅による比較を行ったところ、263K 株と Chandler 株は既存の条件（1% TritonX-100, 4mM EDTA 含 PBS、40 cycle）での PrPres（蛋白質分解酵素抵抗性 PrP）の増幅が可能であったが、Obihiro 株では同条件では増幅がされなかった（図1）。
- ②スクレイパー263K 株を用いた孔径 15nm のフィルターを用いたろ過実験において、ほとんどの感染性のプリオンは除去され、その除去係数（Log reduction factor）は $\geq 4.72$  と 4.00 であった。しかしながら、一部は膜を通過した、超遠心操作でも沈殿しなかった（表1）。

D. 考察

製造工程の PrP<sup>Sc</sup> 除去／不活性化評価法の標準化および高度化のために留意すべき重要なポイントが明らかになった。動物を用いないプリオン検出系として、広範なプリオン株に適応可能な PMCA 条件の構築が必要であることが示唆された。

E. 結論

本研究から、製造工程評価における留意点が明らかになり、評価手法の標準化とプリオン検出高度化のための第一歩となる重要な情報が得られた。

研究協力者：

- ・酪農学園大学獣医学部 教授 萩原 克郎
- ・琉球大学医学部保健学科 准教授 作道 章一
- ・(株)ベネシス 柚木 幹弘

F. 健康危険情報

G. 研究発表 (○は本科研費に直接関係する論文)

論文発表

1. 論文発表

1. ○Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Kanai Y, Nishida A, Yoshikawa M, Ohkubo Y, Kawabata Y, Hagiwara K, Ikuta K. Infectious prion protein in the filtrate even after 15nm filtration. *Biologicals*. In press
2. Hirata Y, Ito H, Furuta T, Ikuta K, Sakudo A. Degradation and destabilization of abnormal prion protein using alkaline detergents and proteases. *Int J Mol Med*. 25, 267-270, 2010.
3. Sakudo A, Ikuta K. Fundamentals of prion diseases and their involvement in the loss of function of cellular prion protein. *Protein Pept Lett*. 16, 217-229, 2009.
4. Sakudo A, Ikuta K. Prion protein functions and dysfunction in prion diseases. *Curr Med Chem*. 16, 380-389, 2009.

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特許取得：なし

実用新案登録：なし

その他：

图 1 *In vitro* amplification of PrP<sup>res</sup>

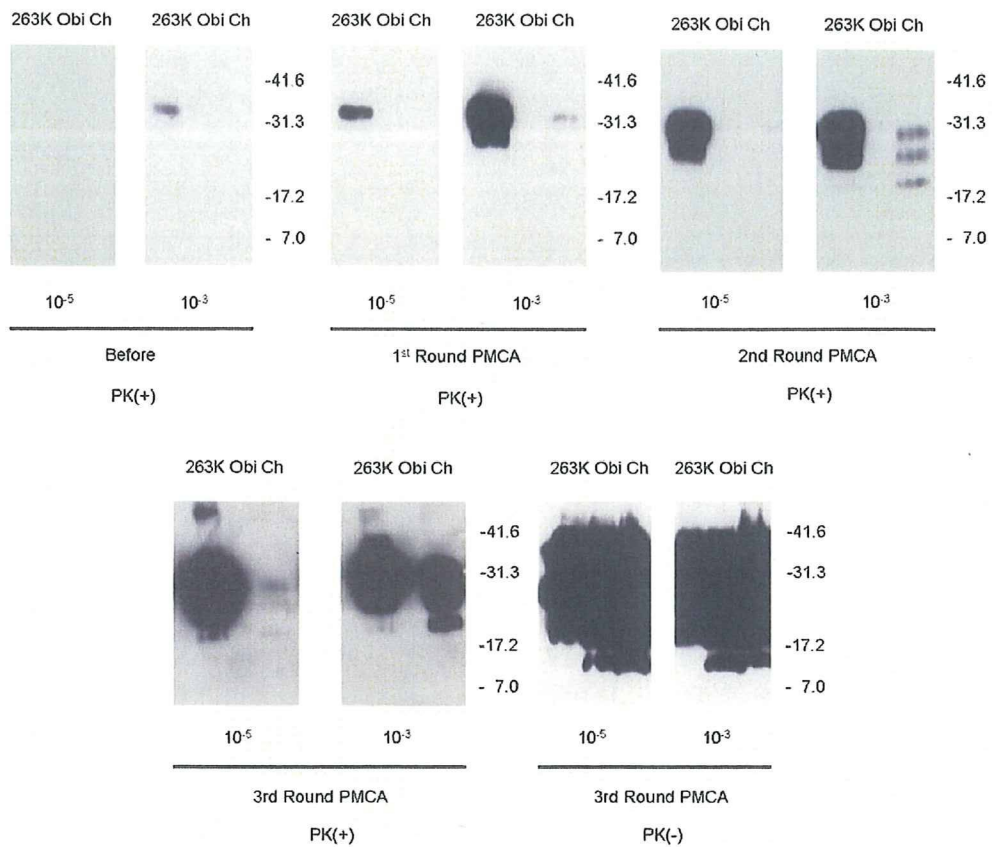


表 1 PrP<sup>Sc</sup> removal using 15nm virus removal filter

Sample	Spiking agent	Preparation	Detection	LRF
PBS	Hamster PrP <sup>Sc</sup> 263K	MF	WB	$\geq 2.5 / \geq 3.2$
		sMF	WB	$\geq 3.2 / \geq 3.2$
		lsMF	WB	$\geq 3.5 / \geq 3.5$
Antithrombin	Hamster PrP <sup>Sc</sup> 263K	sMF*	BA	$\geq 4.7 / 4.0$
		(0.22 $\mu$ m)	WB	$\geq 2.8$
			BA	+ve
Factor IX	Hamster PrP <sup>Sc</sup> 263K	sMF* (0.22 $\mu$ m)	WB	$\geq 2.9$
Thrombin	Hamster PrP <sup>Sc</sup> 263K	dsMF	WB	$\geq 3.5 / \geq 3.5$

LRF: Log reduction factor; MF: Microsomal fraction; BH: Brain homogenate; sMF: "Super-sonicated" MF;  
 dBH: BH including sarcosyl; dMF: MF including sarcosyl; sMF\*: 0.22  $\mu$ m filtered sMF;  
 dsMF: SD (TNBP and Tween80) treated and followed by "super-sonicated" MF.

lsMF: Lysolecithin treated and extensively sonicated MF (without ultracentrifugation). Yunoki M. et al., Future Virol. 2006, 1(5), 659-674  
 Yunoki M. et al., Biologicals. 2008, 36(1), 27-36  
 Yunoki M. et al., Biologicals, 2009, In press