

Fig. 23. 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

Rank No.	Protein No.	Accession No.	Score	PrF0 Score
P	1	hemoglobin beta chain complex (g#793546)	1394	—
	2	myosin basic protein (g#450257)	570	—
	3	Hokora 3, HEba (g#339482)	393	—
	4	myosin basic protein isoform 2 (g#70108255)	407	—
	5	myosin basic protein isoform 1 (g#70108249)	677	—
	6	tubulin beta 2 (g#490729)	367	—
	7	glutathione S-transferase, pI 2 (g#25463412)	376	—
	8	Tpfl protein (g#3512111)	563	—
	9	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, zeta polypeptide (g#753041)	530	—
	10	67-35 VMAO-39 like voltage dependent anion channel (g#290030)	467	—
	11	7C300a nucleotide 3'-triphosphate dehydrogenase (NADPH) (g#120507)	657	—
	12	alkaline C ₁ fructose-1,6-bisphosphate (g#370493)	672	—
	13	tyrosinase (g#71823)	1174	—
	14	tubulin beta 2 (g#490729)	1892	—
	15	tubulin alpha 2 (g#474083)	704	—
	16	nonaflavonol, light polypeptide (g#322002)	1094	—
	17	77kDa adhesion molecule F3 (g#103508)	490	—
	18	77kDa/100 -A' Pass alpha 3 subunit (g#672547)	650	—
S	1	hemoglobin beta chain complex (g#793546)	2633	—
	2	hemoglobin beta chain complex (g#793546)	244	70
	3	vesicle associated membrane protein 23 (g#494492)	377	80
	4	beta 2 microglobulin (g#204570)	395	—
	5	myosin I (g#192103)	391	—
	6	myosin I (g#202305)	1119	—
	7	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, zeta polypeptide (g#753041)	672	80
	8	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, zeta polypeptide (g#753041)	1044	80
	9	voltage dependent anion channel 1 (g#103508)	779	—
	10	voltage dependent anion channel 1 (g#103508)	837	—
	11	hemoglobin nuclear fraction protein 17/F3 isoform F1 (g#403037)	435	105
	12	growth associated protein 43 (g#333415)	692	—
	13	3 kb protein (g#103720)	731	—
	14	beta tubulin, nonbeta attached signal protein 1 (g#160035)	631	—
	15	albumin (g#700931)	2305	—
	16	transferrin (g#135900)	785	—
	17	albumin (g#700931)	622	—
	18	Myosin I protein (g#74353690)	813	—
	19	nucleo cytosolic nucleolin F3 (g#103508)	908	—
	20	Myosin I protein (g#74353690)	627	—
	21	myosin binding cell adhesion molecule classifactor (g#042426)	1102	—

表 1. ラット脳画分の SDS-PAGE 及びタンパク質同定結果

Rank No.	Protein	P (m)	Score	MSV	Accession	Protein ID	id	
5	1	mitochondrial ATP synthase, H ⁺ -transferring F1 complex beta subunit (Mus musculus)	1.1E-08	30.26	3095.6	Q62748.1	5 (5 0 0 0)	4.58
	2	GTP-binding protein alpha s (Rattus norvegicus)	6.14E-08	10.28	40042.0	Q96119.2	1 (1 0 0 0)	5.25
	3	GNAO1_CFLD Guarino nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 2	6.14E-08	10.28	40072.0	120077	1 (1 0 0 0)	5.51
	4	myosin I isoform 1 (Rattus norvegicus) 2 alpha H frame 2 (Mus musculus)	1.18E-08	10.13	39972.0	10962927	9 (9 0 0 0)	6.40
	5	MESL1_MESL1 (Rat-related protein Rab-38)	2.82E-05	10.13	26700.2	Q167701	1 (1 0 0 0)	4.70
	6	A Chain A, Solution New Structure Of Phosphoinositide 3-OH Kinase (Pip3K-43K), 38 Structures	4.42E-08	10.19	39272.0	Q72904	2 (2 0 0 0)	6.07
	7	prion protein (Mus musculus)	4.42E-08	10.19	39711.0	11048020	1 (1 0 0 0)	6.59
	8	beta-actin (Homo sapiens)	6.24E-08	10.17	41700.7	Q01487	1 (1 0 0 0)	5.10
	9	beta-actin (Mus musculus)	6.24E-08	10.17	40117.0	7700700	1 (1 0 0 0)	6.63
7	1	complement protein C1qB (Mus musculus)	1.52E-08	10.19	6331.0	Q74297	1 (1 0 0 0)	3.65
	2	prion protein (Mus musculus)	4.78E-07	10.19	39711.0	11048020	4 (4 0 0 0)	6.59
	3	A Chain A, Solution New Structure Of Phosphoinositide 3-OH Kinase (Pip3K-43K), 38 Structures	4.78E-07	10.19	39272.0	Q72904	5 (5 0 0 0)	6.07
	4	myosin I isoform 1 (Rattus norvegicus) 2 alpha H frame 2 (Mus musculus)	4.21E-08	10.19	39972.0	10962927	8 (7 1 0 0)	6.40
	5	beta-actin (Mus musculus)	3.19E-08	10.17	40117.0	7700700	2 (2 0 0 0)	6.63
	6	beta-actin (Homo sapiens)	5.19E-08	10.17	41700.7	Q01487	1 (1 0 0 0)	5.10
	7	GNAO1_CFLD Guarino nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 2	7.77E-08	10.09	43353.0	Q50753	1 (1 0 0 0)	5.01
	8	PRKCI_C296 (Rat prion protein precursor (PrP) (PrP ^{Sc})) (PrP ^{Sc}) (C296) (rat prion)	2.62E-05	10.13	37817.0	Q166158	1 (1 0 0 0)	6.91
	9	placental cell adhesion molecule 1 (Mus musculus)	6.22E-05	10.09	10001.2	Q410940	1 (1 0 0 0)	4.53
9	1	nucleoside diphosphate kinase subunit B (Mus musculus)	1.72E-11	30.21	39345.0	Q62730.0	8 (8 0 0 0)	6.74
	2	GTP-binding protein alpha o (Rattus norvegicus)	5.20E-10	10.26	40042.0	Q96119.2	2 (2 0 0 0)	6.23
	3	GNAO1_CFLD Guarino nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 2	5.20E-10	10.26	40072.0	120077	2 (2 0 0 0)	5.51
	4	beta-actin (Homo sapiens)	2.14E-09	10.26	41700.7	Q01487	3 (3 0 0 0)	6.40
	5	myosin I isoform 1 (Rattus norvegicus) 2 alpha H frame 2 (Mus musculus)	5.71E-08	10.13	39972.0	10962927	3 (3 0 0 0)	6.40
	6	beta-actin (Mus musculus)	2.69E-05	10.17	40117.0	7700700	2 (2 0 0 0)	6.63
10	1	MESL1_MESL1 (Rat-related protein Rab-38)	3.48E-10	30.26	26700.2	Q167701	8 (8 0 0 0)	4.70
	2	nucleoside diphosphate kinase subunit B (Mus musculus)	4.44E-11	40.17	39345.0	Q62730.0	9 (9 0 0 0)	6.74
	3	beta-actin (Homo sapiens)	1.20E-10	10.26	41700.7	Q01487	1 (1 0 0 0)	6.40
	4	myosin I isoform 1 (Rattus norvegicus) 2 alpha H frame 2 (Mus musculus)	1.20E-10	10.26	39972.0	10962927	3 (3 0 0 0)	6.40
	5	beta-actin (Mus musculus)	1.20E-10	10.24	40117.0	Q727001	1 (1 0 0 0)	4.9
	6	GTP-binding protein alpha s (Rattus norvegicus)	1.88E-09	10.23	40042.0	Q96119.2	2 (2 0 0 0)	5.25
	7	GNAO1_CFLD Guarino nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 2	1.88E-09	10.23	40072.0	120077	2 (2 0 0 0)	6.01
	8	nucleoside diphosphate kinase subunit B (Mus musculus)	1.84E-09	10.23	39345.0	Q62730.0	2 (2 0 0 0)	4.58
	9	myosin I isoform 1 (Rattus norvegicus) 2 alpha H frame 2 (Mus musculus)	2.94E-07	10.17	39972.0	10962927	2 (2 0 0 0)	6.40
	10	APCAL_MESL1 (Rat prion protein precursor (PrP)) (PrP ^{Sc}) (APCA-1)	2.87E-07	10.19	37817.0	Q166158	1 (1 0 0 0)	6.91
	11	prion protein (Mus musculus)	1.80E-08	10.10	39345.0	Q62730.0	1 (1 0 0 0)	7.53
	12	A Chain A, Solution New Structure Of Phosphoinositide 3-OH Kinase (Pip3K-43K), 38 Structures	6.49E-07	10.19	39272.0	Q72904	1 (1 0 0 0)	6.07
	13	prion protein (Mus musculus)	6.42E-08	10.19	39711.0	11048020	1 (1 0 0 0)	6.59
	14	cytochrome c 2 (Mus musculus)	7.41E-06	6.08	11265.0	Q796266	1 (1 0 0 0)	6.24

表 2. 混在するタンパク質の同定結果

検時	ゲル形状(消化時)	キモトロン量 (BSA+キモトロン)	液量 (μL)	消化時間 (h)	ゲル形状(抽出時)	抽出液	抽出方法	回収率 (%)
1	—	20.1	35	18	—	—	—	53.8
2	角片	20.1	35	18	角片	1%TFA/50%CH ₃ CN	振とう後、超音波照射(タンパク質同定と同じ)	1.8
3	角片	20.1	35	18	角片	1%TFA/50%CH ₃ CN	超音波抽出	18.1
4	角片	10.1	70	18	粉砕	1%TFA/50%CH ₃ CN	超音波抽出	29.8
5	粉砕	10.1	70	18	粉砕	1%TFA/50%CH ₃ CN	超音波抽出	29.5
6	粉砕(ミキサー使用)	10.1	70.1	18	粉砕(ミキサー使用)	1%TFA/50%CH ₃ 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)	1%TFA/50%CH ₃ CN	超音波抽出後、フィルターでゲルを除去	18.7
8	PVDF膜	10.1	70.1	18	PVDF膜	1%TFA/50%CH ₃ CN	超音波抽出	3.8
9	PVDF膜	10.1	70.1	42	PVDF膜	1%TFA/50%CH ₃ CN	超音波抽出	0

*: 還元カルボキシアエドメチル化したBSA, 1 μgを懸液の状態で消化した。

表 3. ゲル内消化, 及び PVDF 膜消化の検討結果

Day	Chandler		Obihiro	
	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 4. 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 ^{Sc} 263K	MF	WB	≥2.5/≥3.2
		sMF	WB	≥3.2/≥3.2
Antithrombin	Hamster PrP ^{Sc} 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 ^{Sc} 263K	sMF* (0.22 μm)	WB	≥2.9
Thrombin	Hamster PrP ^{Sc} 263K	dsMF	WB	≥3.5/≥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 μm filtered sMF;
 dsMF: SD (ENBP and Tween80) treated and followed by "super-sonicated" MF.
 lsMF: Lysolecthin 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), 27-34
 Yunoki M, et al, Biologicals, 2009, In press

表 5. PrP^{Sc} removal using Planova 15N

PrP ^{Sc} 画分	希釈列							PrP ^{Sc} 濃度 Log[PMCA ₅₀ /mL]
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	
スパイク用 試料	NT	NT	+++	+++	+++	+++	+++	11.3
プラノバ20N 濾液	+++	++	+++	---	---	NT	NT	9.9
プラノバ15N 濾液	+++	+++	---	---	---	NT	NT	8.9

表 6. 各 PrP^{Sc}画分の PMCA₅₀ 値

- n = 2で実施し, 2検体ともにPrP^{Sc}陽性であったことを示す.
- n = 3で実施し, 3検体ともにPrP^{Sc}陽性であったことを示す.
- n = 3で実施し, 1検体のみPrP^{Sc}陽性であったことを示す.
- n = 3で実施し, 3検体ともPrP^{Sc}が増幅されなかったことを示す.

PrP ^{Sc} 画分	希釈列							PrP ^{Sc} 濃度 Log[PMCA ₃₀ /mL]
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
濾過前 ^{a)}	NT	NT	+++	+++	++-	---	---	8.6
プラノバ35N 濾液	+	+++	+++	---	---	NT	NT	6.9

表 7. SUS 濃度がスパイク用試料の PrP^{Sc}力価に及ぼす影響

a) 表6のスパイク用試料をPBSで100倍に希釈した。

PrP ^{Sc} 画分	希釈列							総PrP ^{Sc} 量 ^{b)} Log[PMCA ₃₀]
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
濾過前	NT	NT	+++ ^{b)}	+++	+++	+-- ^{b)}	---	10.6
濾過後	--- ^{b)}	---	---	NT	NT	NT	NT	<5.3

表 8. 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^{Sc}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^{Sc}陽性であったことを示す。
- n=3で実施し、1検体のみPrP^{Sc}陽性であったことを示す。
- PrP^{Sc}の検出結果から求めたPMCA力価と溶液量から総PrP^{Sc}量を算出した。

PrP ^{Sc} 画分	希釈列							総PrP ^{Sc} 量 Log[PMCA ₃₀]
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
濾過前	NT	NT	+++	+++	+++	+--	---	10.4
濾過後	NT	NT	+++	++-	---	---	--	8.9

表 9. 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

研究分担者： 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
研究協力者： 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
浦山 健 (株) ベネシス研究開発本部 大阪研究所
柚木 幹弘 (株) ベネシス研究開発本部 大阪研究所
生田 和良 大阪大学 微生物病研究所 ウイルス免疫分野教授

研究要旨 遺伝子組換え医薬品の製造工程における異常型プリオン (PrP^{Sc}) の除去／不活能評価のための PrP^{Sc} 選択的検出法の開発を目的として、正常型プリオン (PrP^C) 及び PrP^{Sc} の構造特性に関する調査研究、並びに PrP^C 及び PrP^{Sc} 構造特性解析のための効率的 PrP 分画法の検討を行った。ラット脳粉末を用いた予備検討では、脱脂後、非イオン性界面活性剤 Triton X-114 を用いて PrP^C を可溶化することにより PrP^C が分画されることが明らかとなった。また、正常ハムスター脳に発現する PrP^C は、界面活性剤 Octyl β -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ランの併用によって、効率的に回収されることを見出した。さらに、電気泳動で分離された糖タンパク質を含むゲルより、糖タンパク質を効率的に回収する方法について検討し、アクリルアミドゲルで分離した糖タンパク質はゲルを固定化せずに切り出し、粉碎後、高塩濃度溶液で抽出することによって、良好な収率で回収されることを見出した。

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^{Sc}) 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^C) 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^{Sc} 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^C 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。そこで、まず、PrP^{Sc}、及び PrP^C の構造特性、特に糖鎖と GPI アンカーの構造に関する調査研究を行った。つぎに、PrP^{Sc}、及び PrP^C の糖鎖及び GPI アンカーの構造特性解析を実施するために、モデル試料として正常ラット及びハムスター脳粉末を用い、PrP^C の効率的な分画・濃縮法を検討した。さらに、電気泳動で分離されたゲル内の微量タンパク質を用いて部位特異的な糖鎖構造解析を行うために、ゲルからのペプチド、又は糖タンパク質の効率的回収法について検討した。

B. 研究方法

1) PrP^C 及び PrP^{Sc} の構造に関する調査

以下の文献を参考にした。

構造全体

- Stahl, N. et al., *Biochemistry*, 1990, **29**, 8879
Stahl, N. et al., *Biochemistry*, 1990, **29**, 5405
Stahl, N. et al., *FASEB J.*, 1991, **5**, 2799
Rudd, PM. et al., *Biochemistry*, 2001, **40**, 3759
Ermonval, M. et al., *Biochimie.*, 2003, **85**, 33
Lawson, VA. et al., *J. Neurochem.* 2005, **93**, 793
Baldwin, M. et al., *Method in Enzymol.*, 2005, **405**, 172

糖鎖構造

- Haraguchi, T. et al., *Arch Biochem Biophys.*, 1989, **274**, 1
Endo, T. et al., *Biochemistry*, 1989, **28**, 8380
Stahl, N. et al., *Biochemistry*, 1993, **32**, 1991
Stimon, E. et al., *Biochemistry*, 1999, **38**, 4885
Rudd, PM. et al., *PNAS*, 1999, **96**, 13044

GPI アンカー構造

- Stahl, N. et al., *Cell*, 1987, **51**, 229
Baldwin, MA. et al., *Anal Biochem.*, 1990, **191**, 174
Stahl, N. et al., *Biochemistry*, 1992, **31**, 5043

2) ラット脳内タンパク質の分画

市販のラット脳アセトン粉末, 250 mg (Sigma) にクロロホルム/メタノール混液 (2/1, v/v), 30 ml を加え, ポリトロンを用いて1分間均質化後, 室温で1時間放置した。遠心分離後 (3,000 rpm, 室温, 10分), 上清を除去し, 沈殿をメタノールで2回洗浄した。洗浄した沈殿に0.15 M 塩化ナトリウム, 1 mM EDTA 及び1 mM PMSF を含む10 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.4 (均質化用緩衝液), 30 ml を加え, 懸濁した。遠心分離後 (10,000×g, 4°C, 20分), 沈殿に均質化用緩衝液 20 ml を加え, 懸濁した後, 10% Triton X-114 を含む均質化用緩衝液 5 ml を加え, 4°C で一晩攪拌し, 膜画分の可溶化を行った。可溶化溶液を遠心分離し (10,000×g, 4°C, 20分), 沈殿 (画分 P) と上清 (画分 S) を得た。

3) 正常ハムスター脳からの PrP^C の精製

正常ハムスター脳を10倍量の0.25 M ショ糖を含む20 mM Tris-HCl (pH7.4) 中で, 氷冷しながらホモジナイズした。遠心分離後 (2,000×g, 室温, 7分) (沈殿:P1, 上清 S1), 得られた上清 S1 を再度遠心分離し (2,000×g, 室温, 7分) (沈殿:P2, 上清 S2), 得られた沈殿 P2 を先に得られた沈殿 P1 と合わせ, 先の半量の0.25 M ショ糖を含む20 mM Tris-HCl (pH7.4) 中で氷冷しながらホモジナイズした。遠心分離後 (2,000×g, 室温, 7分) (沈殿:P3, 上清 S3), 得られた上清 S3 と S2 を合わせ, 遠心分離 (150,000×g, 4°C, 60分) した (沈殿:P4, 上清 S4)。得られた沈殿 P4 に, Octyl β -glucoside, 及び CHAPS をそれぞれ最終濃度 1.4%, 及び 0.5% になるように添加し, 超音波照射を行った (45 kHz, 氷中, 5分×2回)。4°C で1時間放置後, 遠心分離し (200,000×g, 4°C, 60分) (沈殿:P5, 上清 S5), 得られた上清 S5 を陽イオン吸着メンブレンでろ過した。素通り画分を Lysis buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazole, pH8.0) を用いて4°C 下で一晩透析した。回収した透析内液を遠心分離し (10,000×g, 4°C, 30分) (沈殿:P6, 上清 S6), 得られた上清 S6 を, ニッケルスピンカラムに加えて遠心分離した (700×g, 2分間)。Wash buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM imidazole, pH8.0) を加えて遠心分離し (700×g, 2分間), さらに Wash buffer を加えて同じ操作を繰り返した。同様に Elute buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250mM imidazole, pH8.0) を加えて遠心分離し (700×g, 2分間) (溶出液:E1), 得られた E1 を Polyethyleneimine (PEI) コーティングメンブレンに通過させ, ろ過後のフィルターを回収した。回収したフィルターに1×SDS buffer (60mM Tris-HCl, 3% SDS, 5% Glycerol, 5% β -ME, 0.005% BPB) を加えて100°C で3分間 boil し, Spin down した上清を回収した (図1)。

4) SDS-PAGE

12.5% アクリルアミドゲルを用いて, 25 mM Tris, 0.192mM Glycine, 0.1% SDS, pH8.3 泳動用緩衝液中でゲル1枚あたり20-30 mA で泳動した。分離され

タンパク質は、Simply Blue SafeStain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて検出した。

5) ウェスタンブロットによる PrP^C の検出

PrP^C 画分を SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜に 20V で 60 分間転写した。一次抗体として、Anti-Prion monoclonal Antibody, mouse (3F4) (SIGNET), 2 次抗体として Anti-mouse IgG-HRP, sheep (SIGMA) を用いた。検出は、化学発光法 (ECL-Plus, GE Healthcare) を用いた。

6) ゲル内消化

SDS-PAGE で分離された主なバンドを切り出し、30%アセトニトリルを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いて脱色後、アセトニトリルを加え脱水した。アセトニトリルを除去後、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。乾燥ゲル片に 10 mM DTT を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 100-150 μ l を加え、56°C で 1 時間反応させた後、室温に戻した。還元化溶液を除いた後、25 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いてゲル片を洗浄した。洗浄用溶液を除いた後、55 mM モノヨード酢酸ナトリウムを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 100-150 μ l を加え、室温で遮光下 45 分間反応させた。反応後、アルキル化溶液を除いた後、洗浄用溶液を用いてゲル片を洗浄し、50%アセトニトリルを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 (脱水用溶液) を用いてゲル片を脱水し、Speed Vac を用いてゲル片を乾燥させた。

ゲル内アルキル化を行った乾燥ゲル片にトリプシン溶液 (20 μ g/ml, 25 mM 重炭酸アンモニウム) を加え、氷上で 30 分間放置し、ゲル片にトリプシン溶液を染み込ませた。余分なトリプシン溶液を取り除き、37°C で一晩反応させた。50%アセトニトリル及び 1%トリフルオロ酢酸水溶液 (抽出溶液) 100 μ l を加え、室温で 30 分間振とうし、超音波抽出を 10 分間行い、ペプチドを含む抽出液を回収した。再度抽出操作を行った後、抽出液をすべて回収し、Speed Vac を用いて濃縮した。

7) ゲル及び PVDF 膜からの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 を還元カルボキシメチル化し、SDS-PAGE により分離した後、クマシーにより染色した。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。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、PVDF 膜からのペプチド回収に関する検討では、カルボキシメチル化した BSA を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に転写した後、転写部分を切り取り、0.5%ポロビニルピロリドン K30 を含む 100 mM 酢酸でブロックした後、検討に用いた。

8) 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 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 μ 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。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。様々な抽出条件で、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 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。

(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 SDS-PAGE で分離した後、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。ゲルからフェツインの振とう抽出を行った後、回収液を再度 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。

9) 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, (CH₂CHCONHCH₂CH₂S)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 µg をアプライし、89 mM Tris, 2.5 mM EDTA-NA₂, 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 µL 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を回収するために、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 µL 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 µg を 50 mM Tris-HCl, pH8.0, 500 µL 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。

10) LC/MS

抽出された消化物を用いて、以下の条件で LC/MS/MS を行った。

HPLC :

装置: Paradigm MS4 (Michrom BioResource)

カラム:

1. Magic C18 (Michrom BioResource, 0.2×50 mm, 3µ, 100+)
2. L-column (化学物質評価機構, 0.075×150 mm, 3µ)

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 :

1. 2~65%B (0~50 分)

2. 2~65%B (0~100分; フェツイン)

流速: 0.3 μ l/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: 1.8~2.0 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

<フェツイン>

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

11) データベース検索

検索エンジン:

1. Mascot (Matrix Science 社)

2. Bioworks (Thermo Fisher Scientific)

データベース:

1. NCBIInr

2. Rattus

3. hamster

4. Swissprot

略語

GPI, glycosylphosphatidylinositol; PIPLC, phosphatidylinositol-specific phospholipase C; PNGase F, peptide-N-glycosidase F; Endo H, Endoglycosidase H; Fuc, フコース; Gal, ガラクトース; GlcNAc, *N*-アセチルグルコサミン; NeuAc, *N*-アセチルノイラミン酸; 2-AB, 2-aminobenzamide; Man, マンノース; Ino, inositol; GalNAc, *N*-アセチルガラクトサミン;

(倫理面への配慮)

研究実施機関が定めた動物実験に関する要領を遵守して動物実験を行った。

C. 結果と考察

1) PrP^C, 及び PrP^{Sc} の構造に関する調査結果 構造全体

PrP は, アミノ酸 209 残基からなる GPI アンカー型の糖タンパク質である. 一次構造は PrP^C, 及び PrP^{Sc} で変わらず, ラット, マウス, ハムスター, ヒトで約 90% の相同性を持つ. Asn181 (マウス: Asn180), 及び Asn196 (ヒト: Asn197) は N-型糖鎖結合可能位置であり, Asn231 には GPI アンカーが結合している. 三次構造は, PrP^C において α -ヘリックス構造の割合が, PrP^{Sc} では, β -シート構造の割合が高くなっており, PrP^{Sc} は, 宿主 PrP^C の三次構造の変化によって生じると考えられている. また, PrP^C, 及び PrP^{Sc} の PIPLC に対する感受性 (PrP^C: +, PrP^{Sc}: -), 及び Proteinase K への抵抗性 (PrP^C: -, PrP^{Sc}: +) は異なる (変性させた場合, PrP^C, 及び PrP^{Sc} 共に, PIPLC, 及び Proteinase K の両方に対して感受性となる). PrP は, SDS-PAGE で分子量約 33-35 kDa 付近に検出されるが, Proteinase K 消化された PrP^{Sc} (PrP27-30) は, 分子量約 27-30 kDa 付近で検出される. この他に, PrP には, Asn228 までの長さの GPI アンカーが結合していないものや, N 末端側から約 90 残基が切断されたもの, PrP^C では, 膜貫通型が存在する. 糖タンパク質の糖鎖には結合部位特異的不均一性があるため, これらの長さの異なる PrP に対して, それぞれ複数のグライコフォームを持ち, PrP^{Sc} のグライコフォームの多様性は, PrP^{Sc} 株種によって異なる.

糖鎖構造

ハムスター脳より調製したマイクロソーム画分, 及びホモジネートについて, PNGase F, 及び Endo-H 消化前後の SDS-PAGE 上の PrP^C, 及び PrP^{Sc} の泳動パターンを比較することによって, PrP^C, 及び PrP^{Sc} には, コンプレックス型糖鎖が結合していることが示された. PrP^{Sc} より精製した PrP27-30 については,

シアリダーゼ消化前後のレクチンとの結合を調べることによって、コンプレックス型糖鎖には非還元末端から NeuAc, Gal が、還元末端側の GlcNAc に Fuc が結合していることが示されている。さらに、精製されたハムスター脳 PrP27-30 の糖鎖について、ヒドラジンをを用いて糖鎖を遊離後、トリチウム標識し、カラムクロマトグラフィー、逐次エキソグリコシダーゼ消化、メチル化分析等を組み合わせて構造が解析された。PrP^{Sc}には、2本鎖、3本鎖、及び4本鎖のコンプレックス型糖鎖が結合しており、400以上のグライコフォームが存在することが報告されている。また、PrP^C、及び PrP^{Sc}に結合する糖鎖構造の違いについて、ハムスター脳の PrP^C、及び PrP27-30 よりヒドラジンで切り出された糖鎖の MS や、還元末端を 2-AB で標識された糖鎖の HPLC 溶出位置が比較され、PrP^{Sc}では bisecting GlcNAc が結合した糖鎖の割合が減少し、3本鎖、及び4本鎖糖鎖の割合が増加していることが報告されている。

結合部位ごとの糖鎖構造については、精製されたマウス PrP^{Sc}を還元アルキル化後、トリプシン消化し、逐次エキソグリコシダーゼ消化を組み合わせた LC/MS、及び LC/MS/MS によって解析されている。Asn180 には、2本鎖、及び3本鎖のコンプレックス型糖鎖が、Asn196 には、3本鎖、及び4本鎖のコンプレックス型糖鎖が主に結合しており、Asn180 では、Lewis x 構造、Asn196 では、Lewis x 構造、及び sialyl Lewis x 構造を非還元末端に持つ糖鎖の割合が高いことが示されている。

GPI アンカー構造

ハムスター脳 PrP27-30 を加水分解後、トリメチルシリル化し、GC/MS を行うことによって、GPI アンカーは、エタノールアミン、イノシトール、リン酸、ステアリン酸で構成されることが示された。

GPI アンカーの糖鎖構造は、ハムスター脳 PrP27-30 について、PIPLC、及びエンドプロテイナーゼ Lys-C 消化で得られた GPI 結合ペプチドを単離し、HF 処理、メチル化後、MS/MS によって、また、単離された GPI 結合ペプチドについて、エキソグリコシダーゼ消化を組み合わせた MS によって解析さ

れている。糖鎖部分の主な構造は、Man-Man-Man-(GalNAc-)Man-GlcN-Ino、又は Man-Man-(Gal-GalNAc-)Man-GlcN-Ino であることが示された他、NeuAc を含む構造 \pm Man-Man-Man-(NeuAc-Gal-GalNAc-)Man-GlcN-Ino が示された。GPI の糖鎖部分に Gal を含む構造は哺乳類で、NeuAc を含む構造はすべての種において初めての構造であり、PrP^Cについても、NeuAc を含む GPI 構造を持つことが示されている。

2) ラット脳をモデルとした PrP^Cの分画法の検討

PrP^Cは、脳に存在する GPI アンカー型の膜タンパク質である。脳には、脂質類が多く、タンパク質と混在した状態では、分画への影響が懸念された。そこで、クロロホルム/メタノール混液中で試料の均質化を行うことによって脱脂した後、分画を行うこととした。モデル試料として、ラット脳アセトン粉末を用い、脱脂後、非イオン性界面活性剤 Triton X-114 を用いて膜タンパク質の可溶化を行い、PrP^Cを分画することを試みた。図 1 に示すような手順に従って分画を行い、得られた沈殿 (画分 P)、及び上清 (画分 S) に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で分離した (泳動図: 図 2, レーン 1: 分子量マーカー, 2: 画分 P(1/1000), 3: 画分 S(4/100))。

SDS-PAGE で分離・検出された主なバンド中に含まれるタンパク質は (画分 P: バンド 1-18, 画分 S: バンド 1-21)、ゲル内消化後、抽出されたペプチドについて LC/MS/MS を行い、得られたすべてのプロダクトイオンを用いたデータベース検索によって同定した。筆頭に同定されたタンパク質を表 2 に示す。PrP^Cは筆頭に同定されなかったが、画分 S のバンド 2, 3, 7, 8, 及び 11 に含まれることが判った。バンド 2, 及び 3 で検出された PrP^Cについては、PrP^Cのタンパク質部分の分子量が約 22,300Da であることから、分解物であると推定された。また、PrP^Cがバンド 7, 8, 及び 11 の広範囲に検出されたのは、複数の構造を有する糖鎖、及び GPI アンカーの結合により多数の分子種が存在するためと考えられた。

以上のことから、脱脂後、非イオン性界面活性剤 Triton X-114 を用いて可溶化し、PrP^Cを分画できる

ことが判った。また、PrP^Cが SDS-PAGE で分離されたゲル中の主なタンパク質でないことから、ゲル中の PrP^Cを用いて構造解析を進めるには、PrP^Cを高純度、高回収率で生体試料より分画する必要があると考えられた。このため、生体試料からの PrP^Cの可溶化、混在するタンパク質の除去等の試料分画法の検討や、ゲル中の微量 PrP^Cを用いて、糖鎖構造、及び GPI アンカー構造を解析するための試料調製方法、及び MS の分析条件検討が必要であると考えられた。また、PrP^{Sc}については、PrP^C分画の検討を踏まえ、界面活性剤の選択や、Proteinase K 消化を組み合わせた分画方法を検討する必要があると考えられる。

3) 正常ハムスター脳 PrP^Cの精製

正常ハムスター脳を 0.25 M ショ糖を含む 20 mM Tris-HCl (pH7.4)中で繰り返しホモジネートした後、Octyl β -glucoside、及び CHAPS を用いて PrP^C画分を可溶化し、超遠心分離によって不溶化画分を除去した (図 3)。さらに、ニッケルカラムと PEI コーティングメンブレンを併用することによって、PrP^Cが濃縮されていることが確認された。

4) SDS-PAGE において PrP^C泳動位置に混在するタンパク質の同定

PrP^C画分のタンパク質を SDS-PAGE で分離し、ウエスタンブロットを行った。その結果、分子量 27-34 kDa の範囲で PrP^Cが検出され (泳動図: 図 4, レーン 1: ウエスタンブロット検出, 2: クマシー染色), 本精製方法を用いて PrP^Cが分画されていることが確認された。また、検出された分子量範囲が広いことから、複数の構造の糖鎖、及び GPI アンカーの結合による多数の分子種の存在が示唆された。PrP^Cの精製度合いを確認するために、SDS-PAGE 上で PrP^C泳動位置に混在するタンパク質を同定した。PrP^Cが検出されたバンド (図 4, レーン 2, バンド 5, 7, 9, 10) を切り出し、ゲル内消化後、抽出されたペプチドについて LC/MS/MS を行った。得られたすべてのプロダクトイオンを用いたデータベース検索によって、混在するタンパク質を同定した。結果を表 1 に示す。LC/MS/MS、及びデータベース検索では、PrP^Cは、

バンド 5, 7, 及び 10 に含まれることが確認された。また、タンパク質の同定順位、Protein probability (P(pro)) や Score の値から、各バンドには、PrP^Cより上位に同定されるタンパク質も複数の含まれることが判った (Protein probability は、あるデータベースに対しての同定結果の偶然性の確率。値が低いほど、結果の確実性は高くなる。Score は、タンパク質の同定する根拠となったペプチドの理論的 b, y イオンに対して、実際のスペクトルがどの程度一致しているかを数値化し、同定されたすべてのペプチドについて積算した値)。これらのことから、LC/MSⁿによる糖鎖及び GPI の構造解析を実施するためには、サンプル量を増やすこと、また、純度を高めるためにさらなる精製を行うことが不可欠であると考えられた。次段階の精製手法として、PrP^C抗体カラムや、PrP^Cの等電点が高いことを利用したクロマトフォーカシング等が有用であると考えられる。

5) 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、及び結果について表 3 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。

6) 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5)、DNA回収用スピカ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6)。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7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7B)、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/MSⁿ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8)。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8)。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/MSⁿ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9A, レーン4, 破線で囲んだ部分)。図7A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9B)。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。

7) 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10A)。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 10B, 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 10B, 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. 考察

PrP は、2 箇所の糖鎖結合可能部位（Asn181, Asn196）を持つ糖タンパク質であり、PrP^C と比べると PrP^{Sc} には 3 本鎖、及び 4 本鎖のコンプレックス型糖鎖が多いこと、また、これらの糖鎖は主に Asn196 に結合していることが分かった。これまでに解析されたすべての種の PrP^C 及び PrP^{Sc} の GPI アンカー糖鎖は、NeuAc が結合したユニークな構造であったが、PrP^C 及び PrP^{Sc} の差異は明らかにされていなかった。以上の調査結果から、PrP^C 及び PrP^{Sc} の部位特異的糖鎖構造はまだ十分に解析されていないこと、また、GPI アンカー構造については差異が不明であることが確認され、PrP^{Sc} 選択的検出法の開発には、PrP^C 及び PrP^{Sc} の部位特異的糖鎖構造、及び GPI アンカーの糖鎖構造の差異を明らかにする必要があると考えられた。

そこで、PrP^C 及び PrP^{Sc} の構造解析を行うために、

モデル試料として、ラット脳粉末を用いて、PrP^C を分画するための予備検討を行った。その結果、脱脂後、非イオン性界面活性剤 Triton X-114 を用いて PrP^C を可溶化し、分画できることが判った。また、正常ハムスター脳から PrP^C を精製する方法を検討し、界面活性剤 Octyl β -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は、PrP^C の濃縮に有用であることが判った。しかし、PrP^C 画分中のタンパク質の同定結果から、依然としてタンパク質が混在していることが明かとなり、LC/MSⁿ による糖鎖及び GPI の構造解析を進めるためには、さらに PrP^C を精製する必要があることが示唆された。さらに、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、ゲルを粉砕し、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. 結論

PrP^{Sc} 選択的検出法を開発するために、PrP^C 及び PrP^{Sc} の部位特異的糖鎖構造、及び GPI アンカーの糖鎖構造の差異を明らかにする必要があると考え、モデル動物の脳の PrP を濃縮する方法を検討した。その結果、ハムスター脳に存在する PrP^C は、界面活性剤 Octyl β -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、濃縮されること。また、SDS-PAGE で分離された糖タンパク質は、ゲルを固定化せずに、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井 則貴, 山口照英: 液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構

- 造解析. 実験医学増刊号, 2007, 25, 1127-1136
- 2) Satsuki Itoh, Daisuke Takakura, Nana Kawasaki, and Teruhide Yamaguchi: Glycopeptide analysis using LC/MS and LC/MS/MS, in *The Protein Protocols Handbook* (John Walker, ed.) Humana, Totowa, NJ. 1419-1430 (2009)
 - 3) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Daisuke Takakura, Teruhide Yamaguchi: Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products. *Trends in Glycosci. Glycotech.* In press
 - 4) Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Takakura, D., Qin, Y., Xiaoyu, H., Yamaguchi, T. The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals, *Biol. Pharm. Bull.* In press
 - 5) Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Harazono, A., Takakura, D., Yamaguchi, T. Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products. *Trends in Glycosci. Glycotech.* 2008; 20, 97-116.
 - 6) Akira Harazono, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Yukari Matsuishi-Nakajima, Toru Kawanishi, and Teruhide Yamaguchi: Simultaneous glycosylation analysis of human serum glycoproteins by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 2008, 869, 20-30
 - 7) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, and Teruhide Yamaguchi: Alteration of N-glycosylation in the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus: relative quantification of N-glycans using an isotope-tagging method. 2008, *Immunology*, in press
 - 8) Satsuki Itoh, Akiko Hachisuka, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Reiko Teshima, Takao Hayakawa, Toru Kawanishi and Teruhide Yamaguchi: Glycosylation analysis of IgLON family proteins in rat brain by liquid chromatography and multiple-stage mass spectrometry. *Biochemistry*, 2008, 47, 10132-54
2. 学会発表
- 1) 川崎ナナ: LC/MS を用いた糖鎖の微量かつ網羅的解析と創薬への応用. 日本薬学会第 128 年会一般シンポジウム「グライコサイエンスから創薬へ」. 横浜 (2008. 3. 26-28)
 - 2) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖と医薬品. 日本応用糖質科学会平成 19 年度大会 (2007. 8. 30) 平塚
 - 3) 川崎ナナ: LC/MSⁿ を用いた糖蛋白質の特性解析大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質翻訳後修飾」吹田市 (2008. 1. 10, 11)
 - 4) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 篠原 聡, 山口照英: ヒト間葉系幹細胞の Thy-1 の糖鎖構造解析. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学大会 合同大会 (2008, 12, 9-12) 神戸
 - 5) 橋井則貴, 川崎ナナ, 中島 紫, 伊藤さつき, 山口照英: d₅-フェニルヒドラジンを用いた同位体標識法及び液体クロマトグラフィー/質量分析による糖鎖の定量解析. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学大会 合同大会 (2008, 12, 9-12) 神戸

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

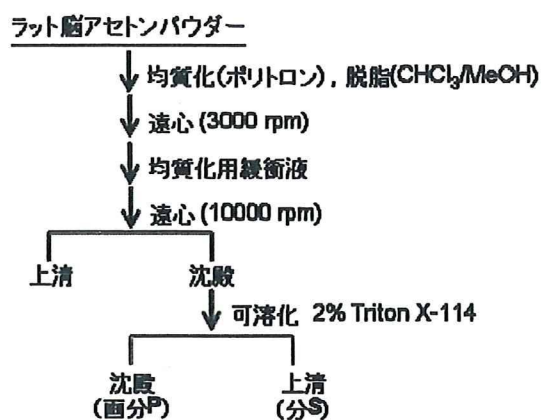


図 1. ラット脳の分画

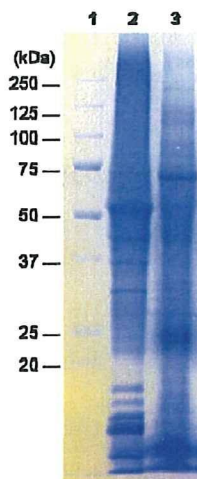


図 2. ラット脳の各画分の SDS-PAGE

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : 画分 P (1/1000)

レーン 3 : 画分 S (4/100)

Normal hamster brains

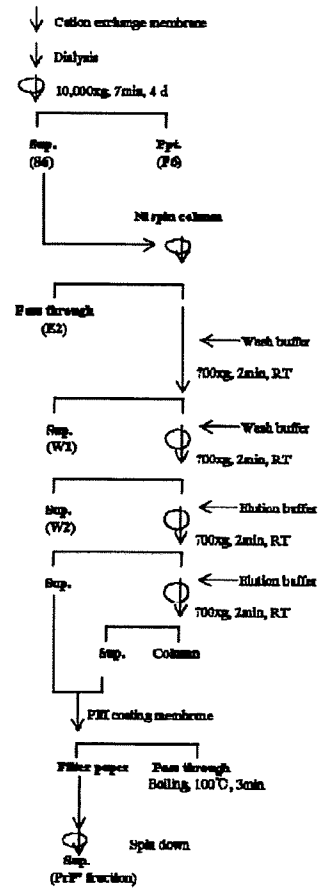
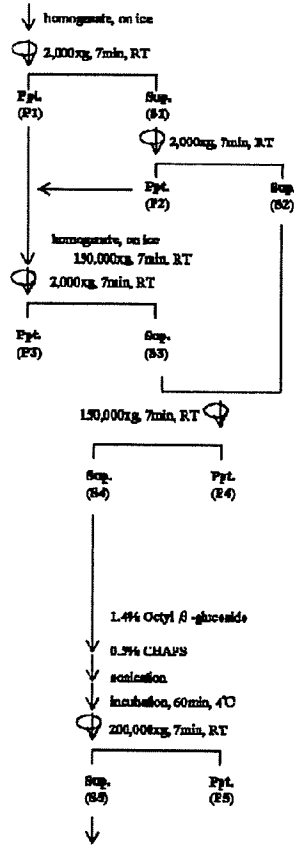


図3. ハムスター脳からの PrP^c の精製方法

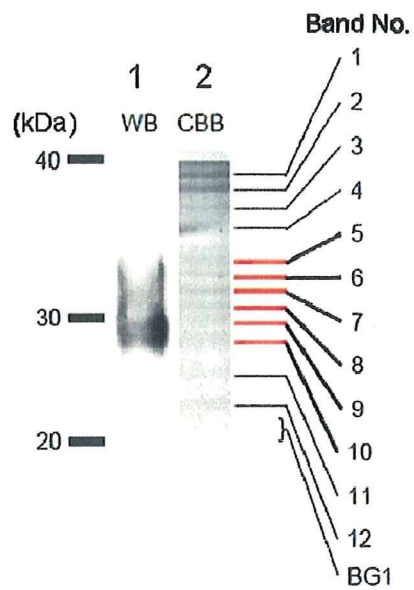


図 4. PrP^C 画分の SDS-PAGE

検出 レーン 1 : ウェスタンブロット

レーン 2 : クマシー染色

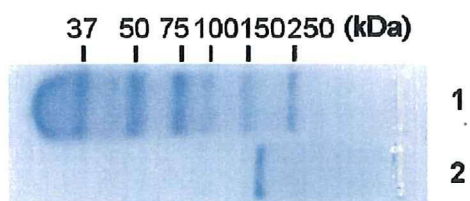


図 5. 5%アガロースゲル電気泳動による BSA の分離

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : BSA

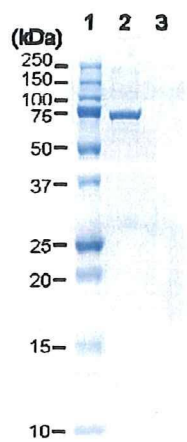


図 6. BSA 回収実験の結果

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 ₄ HCO ₃ (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)

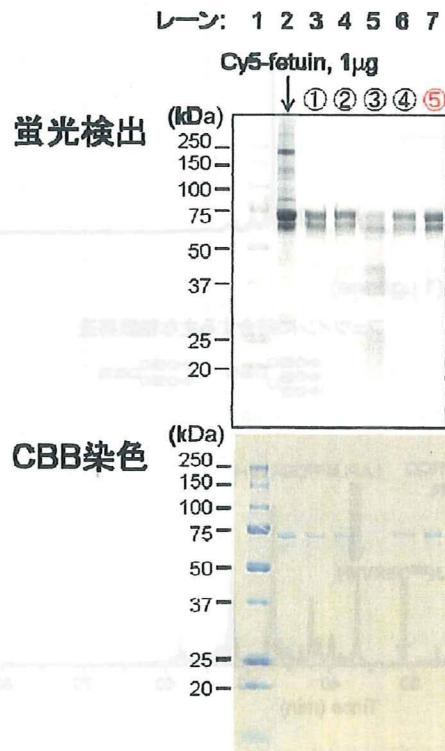


図7. フェツインの回収実験条件と結果 (アクリルアミドゲルからの回収-1)

(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