

2021 年度臨床研究推進研究費報告書

提出年月日: 2022 年 6 月 9 日

代表者	氏名	堀内 基広	所属	獣医衛生学教室
	内線	5293	e-mail	horiuchi@vetmed.hokudai.ac.jp
研究課題	RT-QuIC 反応を用いた犬認知機能不全症候群の診断系の構築			
研究チーム 参加者	氏名	所属		役割
	堀内 基広	獣医衛生学教室		RT-QuIC 反応の実施
	笹岡 一慶	附属動物病院		脳脊髄液の採取と臨床症状評価
	鈴木 章夫	獣医衛生学教室		組換えタンパク質の作出・精製
研究期間	2021 年 6 月 ～ 2022 年 3 月			
研究目的と 成果の概要 (400 字以内)	犬認知機能不全症候群 (CDS) は犬の見当識障害、行動異常を主徴する犬の認知障害であり、8 歳の犬で約 20%、11 歳の犬で 60%以上が何らかの症状を呈すると言われている。脳内アミロイド β ($A\beta$) の蓄積は本症候群の原因の一つと考えられている。 $A\beta$ が簡便に検出可能となれば CDS の病態進行や予後の予測等の臨床研究が実施可能となる。そこで本研究では、アミロイド原性タンパク質のアミロイド伸張活性を検出する RT-QuIC 反応を用いて、犬脳脊髄液中の $A\beta$ の検出系を構築することを目的とした。RT-QuIC の基質として、シカプリオンタンパク質に 40 ($A\beta_{40}$) あるいは 42 ($A\beta_{42}$) アミノ酸を組み込んだ組換え融合タンパク質を発現する原核細胞発現プラスミドベクター6種を構築し、うち4種で、大腸菌で融合タンパク質の発現を確認した。組換え遺伝子の作製に時間を要したため、研究期間内では、融合タンパクの発現を確認するまでに留まった。			

研究方法、結果、考察、成果の公表（上記書式、図表を含めて 3 ページ以内に纏めて下さい）

【方法】

$A\beta_{40}$ あるいは $A\beta_{42}$ をコードする DNA を合成し、PCR より 2 本鎖 DNA とした。Assembly PCR 法により、シカプリオンタンパク質 (CerPrP) 遺伝子のコドン 120-125、135-143、および 104-125 の領域に $A\beta_{40}$ あるいは $A\beta_{42}$ をコードする DNA を組み込み (図 1)、CerPrP- $A\beta$ 融合遺伝子断片を pCR TOPO II にクローニングして塩基配列を確認した。その後、CerPrP- $A\beta$ 融合遺伝子断片を原核細胞発現ベクター pET11a に組み込み、BL21(DE3)pLysS にて融合タンパク質を発現させた。

融合タンパクの発現は MagicMedia E. coli expression medium (Invitrogen) で、37°C、30 時間培養した。菌体を遠心により回収後、

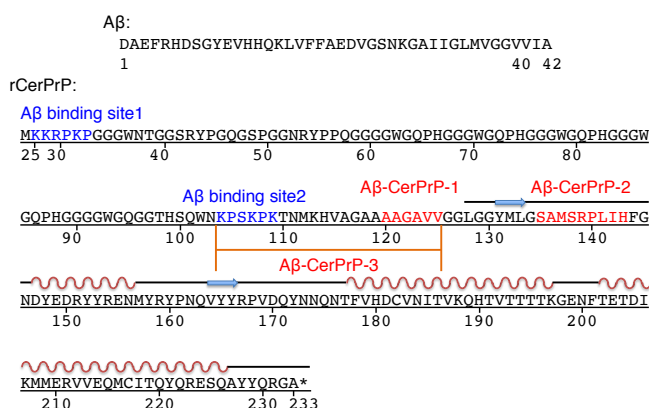


図1 CerPrPと $A\beta$ 融合タンパク質の構築

CerPrPのコドン120-125に $A\beta_{1-40}$ あるいは $A\beta_{1-42}$ を挿入した融合遺伝子 ($A\beta_{40}$ -CerPrP-1 あるいは $A\beta_{42}$ -CerPrP-1)、コドン135-143に $A\beta_{1-40}$ あるいは $A\beta_{1-42}$ を挿入した融合遺伝子 ($A\beta_{40}$ -CerPrP-2 あるいは $A\beta_{42}$ -CerPrP-2)、コドン104-125に $A\beta_{1-40}$ あるいは $A\beta_{1-42}$ を挿入した融合遺伝子 ($A\beta_{40}$ -CerPrP-3 あるいは $A\beta_{42}$ -CerPrP-3) を構築した。PrP分子上の $A\beta$ 結合部位と報告されている領域は青字で示した。青矢印はPrP分子上の β -strand、波線はPrP分子上の α -ヘリックスを形成する領域を示す。

lysozyme (Sigma)、および benzonase (Millipore, USA) を含む CelLytic B cell lysis reagent (Sigma)で室温、30 分間処理した。不溶性の封入体を 14,400 × g、10 分の遠心により回収した。封入体の沈殿は 10% CelLytic B cell lysis reagent で3回洗浄した。封入体を SDS-PAGE サンプルバッファーに溶解し、NuPAGE 12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) で電気泳動した。泳動後のゲルはクマシブリリアントブルーで染色した。

【結果】

計画していた 6 種の融合遺伝子を原核細胞発現ベクター pET11a にクローニングし、pET11a/Aβ₄₀-CerPrP-1, pET11a/Aβ₄₂-CerPrP-1, pET11a/Aβ₄₀-CerPrP-2, pET11a/Aβ₄₂-CerPrP-2, pET11a/Aβ₄₀-CerPrP-3, pET11a/Aβ₄₂-CerPrP-3 を構築した。このうち、pET11a/Aβ₄₀-CerPrP-1 (図 2A), pET11a/Aβ₄₂-CerPrP-1 (図 2B), pET11a/Aβ₄₀-CerPrP-2 (図 2C), および pET11a/Aβ₄₂-CerPrP-2 (図 2D) を BL21(DE3)pLysS に導入し、融合タンパク質の発現誘導を行った。

図 2 の赤矢印で示すように、予想される分子量に陰性対照 (NC) では認められないバンドが検出され、CerPrP-Aβ の融合タンパク質が発現していることが確認できた。

【考察】

組換え融合タンパク質 rAβ₄₀-CerPrP-1 (図 2A) および rAβ₄₂-CerPrP-1 (図 2B) の発現誘導は良好であり、我々が実施している rPrP の精製と同じ方法で問題無く精製できると思われる。rAβ₄₀-CerPrP-2 および rAβ₄₂-CerPrP-2 は、CerPrP-1 の融合タンパク質と比較すると発現効率は悪いが、ニッケルキレートカラムで精製できる必要量は得られると思われる。

融合遺伝子構築の Assembly PCR が上手くいかず、原核細胞発現ベクターの構築に時間を要したため、予定していた 6 種の発現プラスミドは構築できたが、組換え融合タンパク質の発現を確認する段階までしか進まなかった。しかし、組換えタンパク質の精製法は確立していることから、今後、組換えタンパク質を精製して、予定していた RT-QuIC 法の実施へと研究を進める。pET11a/Aβ₄₀-CerPrP-3 および pET11a/Aβ₄₂-CerPrP-3 についても、今後、発現誘導の確認、組換えタンパク質の精製を進めていく。

今回作出した組換え融合タンパク質が目的とするイヌ Aβ の検出に使用可能であるかは、今後の成績を待つことになるが、当初の目的である、犬脳脊髄液中の Aβ の検出系を構築するための研究を継続する。

【成果の公表（代表的なもの）】

- ・論文発表：該当なし
- ・学会発表：該当なし

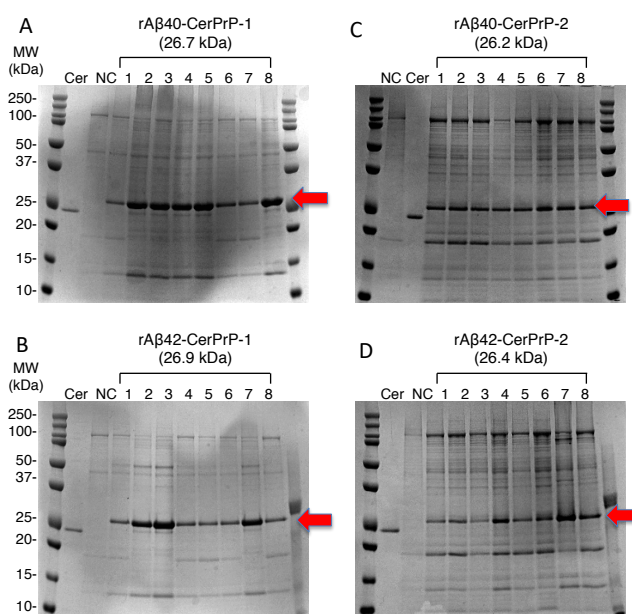


図2 CerPrPとAβ融合タンパク質の発現

pET11a/pET11a/Aβ₄₀-CerPrP-1(A), pET11a/Aβ₄₂-CerPrP-1(B), pET11a/Aβ₄₀-CerPrP-2(C), pET11a/Aβ₄₂-CerPrP-2 (D)を BL21(DE3)pLysSに導入し、MagicMediaにより融合タンパク質を発現誘導した。各発現プラスミドで、8クローンを選抜して融合タンパク質の発現を調べた。封入体をSDS-PAGE用のサンプルバッファーに溶解し、NuPAGE 12% Bis-Tris ゲルで電気泳動した。泳動後のゲルをクマシブリリアントブルーで染色した。赤矢印は目的とする融合タンパクを示す。

NC: プラスミドを導入していないBL21(DE3)pLysS, Cer: 0.5ug 精製 rCerPrP。