

## 耐熱性プロテアーゼによるプリオン蛋白質分解

研究分担者：古賀雄一 大阪大学大学院工学研究科

研究協力者：清水七海 大阪大学大学院工学研究科

### 研究要旨

プリオンの二次感染予防を目的として、熱安定性の高いプロテアーゼによる異常プリオンタンパク質の分解及び感染性の評価を行った。さらに医療用特殊洗浄剤としての開発目標に適した酵素の特性評価を行った。

### A. 研究目的

熱安定なプロテアーゼで分解した異常プリオンタンパク質の感染性が残る問題の原因を明確にし、二次感染防止に向けた技術の改良要素とし、実用的なプリオン不活化技術の開発を目的とした。

### B. 研究方法

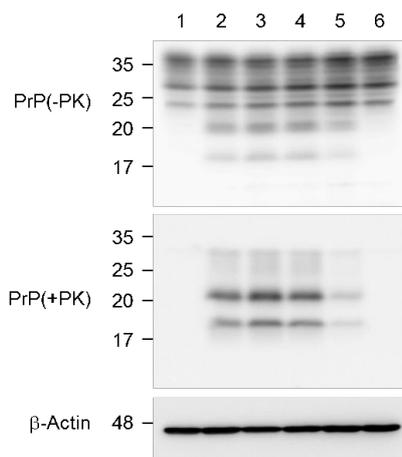
異常プリオン蛋白質の酵素分解物の感染性を再評価する目的で、RML 感染マウスの脳ホモジネートを各条件で酵素処理し、培養した神経芽細胞に接種し、異常プリオン蛋白質の蓄積量をウエスタンブロットにより評価した。酵素分解の条件として、脳ホモジネートの前処理（不溶物除去）の有無、酵素量、処理温度を変化させ検討を行った。

#### （倫理面への配慮）

実験動物に必要な以上の苦痛を与えないことを旨とし、発症後の速やかな安楽死を行った。研究計画および倫理面での配慮については研究実施機関の承認を得、また、当機関の規則にのっとり実施した。

### C. 研究結果

RML の熱に対する耐性を比較するために、60、80、100 で 30 分から 60 分 RML 缶洗脳ホモジネートを熱処理し、神経芽細胞に摂取した所、80、100 で 60 分処理するだけで感染性が低下することが確認された。



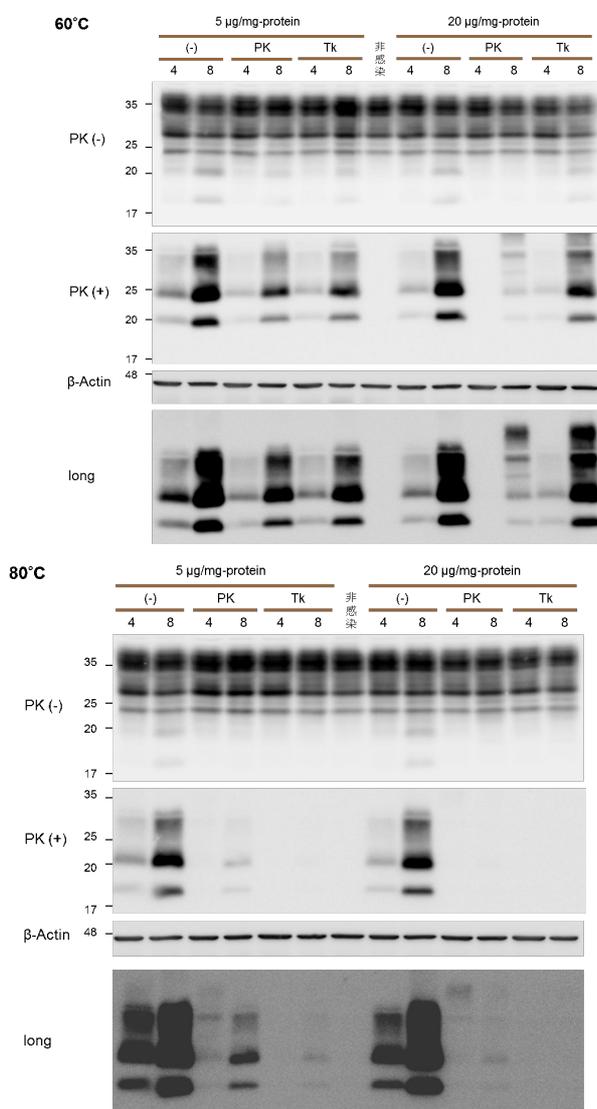
- 1: uninfected brain homogenate/熱処理無し
- 2: RML-infected brain homogenate/熱処理無し
- 3: RML-infected brain homogenate/60°C, 30min
- 4: RML-infected brain homogenate/60°C, 60min
- 5: RML-infected brain homogenate/80°C, 60min
- 6: RML-infected brain homogenate/100°C, 60min

RML 感染脳ホモジネートは熱処理すると沈殿物を生じる。これは酵素反応を阻害する可能性があるため遠心分離と超音波による分散

を行った。その結果、前処理しないサンプルに比べ感染性は低下するものの、RML の神経芽細胞への感染性は残ることから、再現性の良い結果の得られる前処理を行うこととした。

次に、RML 感染マウス脳ホモジネートのタンパク質量を定量し、タンパク質 1mg あたり 5 $\mu$ g または 20 $\mu$ g の Tk-subtilisin (あるいは Proteinase K, PK) を用いて、60 30 分、80 30 分酵素処理を行った。処理後のサンプルを N2a 細胞に接種し、4dpi,8dpi で細胞に蓄積している PrP<sup>Sc</sup> の量をウエスタンブロットにより確認した。

感染後細胞ライセート (6D11 x2000)



60 での処理ではいずれのサンプルも 8dpi のライセート中に PrP<sup>Sc</sup> の蓄積が認められた。

一方、80 での処理においては、Tk-subtilisin で処理したサンプルは PK 処理したものに比べて、8dpi のライセートでの PrP<sup>Sc</sup> の蓄積量が少なく、感染性の低下が示唆された。

## D. 考察

Tk-subtilisin は 80 以上の高温で高い活性を示すが、RML は熱に対して弱いため 60、もしくは 80 30 分など、感染性を失わない範囲で実験しなければ、酵素の感染性への影響を評価できないことが明らかになった。PrP の酵素分解による感染性の低減効果は、Tk-subtilisin に特異的なものではなく、PK であっても高温で大量の酵素を用いれば PrP<sup>Sc</sup> が分解でき、また、感染性を低減できると思われる。Tk-subtilisin は酵素の熱安定性が高いために、PrP<sup>Sc</sup> の構造が緩む高温での分解が顕著に現れたと思われる。

## E. 結論

医療器具の洗浄においては、脳ホモジネートや体液などのように、脂質やタンパク質が大量に含まれる中に PrP が存在するものが分解対象となる。PrP<sup>Sc</sup> を構造的に分解しやすくするためには 80 以上の高温で処理することが有利に働くが、同時にタンパク質の沈殿も生じて PrP<sup>Sc</sup> を抱き込んでしまう可能性が考えられる。従って、界面活性剤など不溶性沈殿物が生じないように処理することが必要であり、このような条件で酵素を作用させるには Tk-subtilisin や Tk-SP が有効であると考えられる。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

### 1. 論文発表

## 2. 学会発表

清水七海, 古賀雄一, 作道章一, 原 英之,  
坂口未廣, 金谷茂則

超好熱菌由来プロテアーゼによるプリオン蛋  
白質分解の評価

第 87 回 日本生化学会大会

京都

2014 年 10 月 16 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

名称: 新規なプロテアーゼおよびその利用

発明者: 金谷茂則, チタ フーバオ, 高野和文, 古賀  
雄一

出願番号 PCT/JP2009/063547

登録番号: 5339543 (国内)、8535928 (米  
国)、ZL200980130490.4 (中国)、欧州で  
審査段階

(拡張サーチレポートに応答済み)

### 2. 実用新案登録

### 3. その他