

耐熱性プロテアーゼによるプリオン蛋白質の分解と二次感染予防法の確立

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（耐熱性プロテアーゼによるプリオン蛋白質の分解と二次感染予防法の確立）

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い、プリオンの二次感染予防を目的とした洗浄剤の開発を行った。本酵素単体もしくは酵素を有効成分とする試作洗浄剤を用いて、プリオン感染マウスの脳ホモジネートに含まれる PrP^{Sc} を不活化処理し、その感染性低減効果の定量的評価を行った。

A. 研究目的（耐熱性プロテアーゼによるプリオン蛋白質の分解と二次感染予防法の確立）

本研究ではプリオン蛋白質（PrP）を分解し二次感染予防する酵素洗浄剤の開発を目的とした。これまでに超好熱菌由来プロテアーゼでプリオン蛋白質を酵素分解できることを確認している（BMC Biotechnology, 2013, 13,19）が、分解産物の感染性の有無は不明であった。また、実用的なプリオン蛋白質の酵素分解法についても検討する必要がある。本年度は非 SDS 系の界面活性剤を用いた酵素入り洗浄剤を試作し、プリオン分解特性の評価を行った。

B. 研究方法

洗浄用酵素として、超好熱菌由来プロテアーゼ Tk-SP を実用化するためには、本酵素を大量生産できる系を確立する必要がある。しかし、本酵素はプロテアーゼ活性が大腸菌等発現宿主の生育を阻害するため通常の生産方法を取ることができない。そこで、セルフスプライシング能を持つペプチド配列インティンを Tk-SP の構造形成コアに融合し、酵素を

不活化して生産した後に、自己触媒的に再活性化する生産法を検討した。

Tk-SP と界面活性剤、キレート剤、pH 調整剤などを混合した洗浄剤試作品を作成した。酵素活性、保存安定性、プリオン分解能力の評価を行った。培養細胞を用いた感染性の評価を行った。感染に係る実験は徳島大学において行い、その他は大阪大学で実施する。

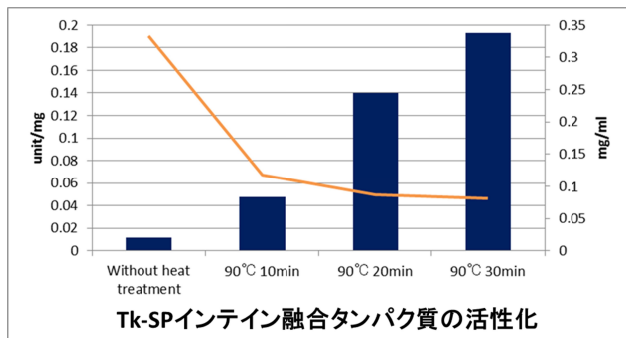
（倫理面への配慮）

実験動物に必要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。

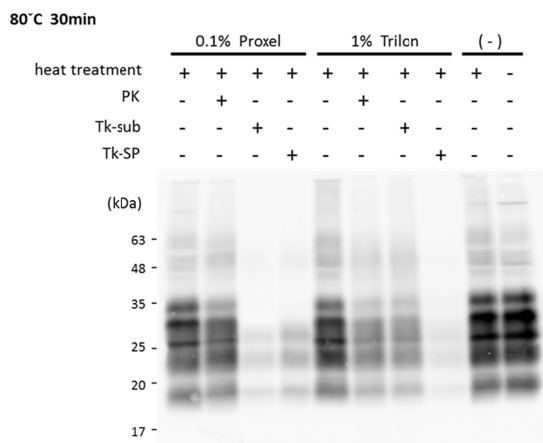
C. 研究結果

インティン配列を活用した Tk-SP 発現系の構築を行った。超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来 Cell division control protein(Tk1620)に含まれる mini intein は温度依存的にセルフスプライシングすることができる。本配列を Tk-SP の 359 番目の Ser の前に挿入した融合タンパク質遺伝子を設計し、大腸菌菌体内で発現させた。野生型酵素

では毒性を示し大腸菌は宿主として適さないが、本融合タンパク質は大腸菌が生育し、タンパク質として発現していることも確認できた。発現後のタンパク質を熱処理すると経時的に酵素の比活性が上昇し、Tk-SP が活性化していることが示された。一方でタンパク質濃度が低下していた。



Tk-SP を有効成分とする洗浄剤の試作を行った。洗浄剤組成物として、陽イオン界面活性剤 2 種、両性界面活性剤、キレート剤の酵素との相性を検討した。各成分と酵素を混合し、RML 感染脳ホモジネートに加えて加熱し、*in vitro* での PrP^{Sc} 分解活性をウエスタンブロットによって検討した。

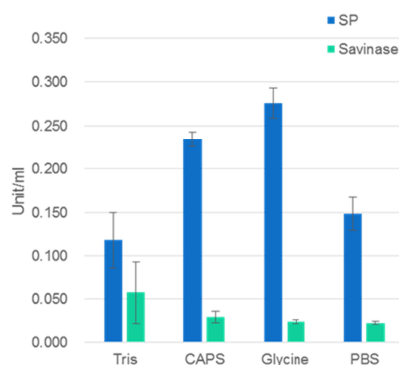


洗浄剤成分とプロテアーゼによるPrP^{Sc}分解

一般的なプロテアーゼ PK に比べ、超好熱菌由来プロテアーゼ (Tk-sub、Tk-SP) は PrP^{Sc} に対する分解活性が高い。しかし、キレート成分 (Trilon) 存在下では Tk-SP のみが、強い分解活性を示す事がわかった。

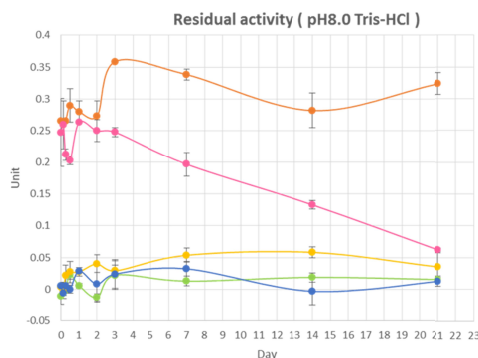
これらの洗浄剤成分を組合せた試作品を検

討した。洗浄有効成分として陽イオン界面活性剤 2 種、キレート剤はそれぞれ 5%最終濃度になるように調整した。また洗浄剤の濁りを抑制するために両性界面活性剤も終濃度 5%まで添加した。これらの組成物に酵素を加え、pH7~9.5 で酵素活性に与える影響を検討した。



洗浄剤中のプロテアーゼ活性のpH依存性

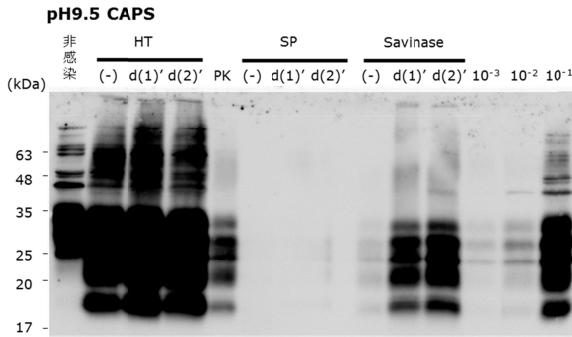
また、洗浄剤を 40 で保存し、洗浄剤組成物中での酵素の保存安定性を検討した。その結果、洗浄剤存在下では Tk-SP の半減期が 2 週間程度であることが分かった。



洗浄剤中での酵素活性の保存安定性
オレンジ: Tk-SP、ピンク: Tk-SPと洗浄剤

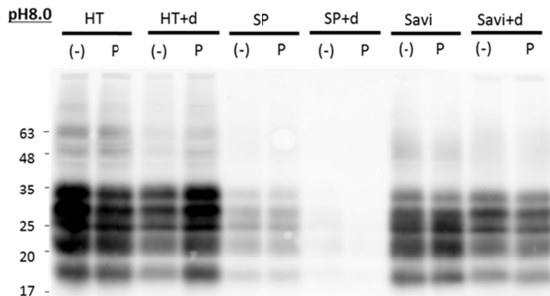
上記洗浄剤を用いて RML 感染脳ホモジネートに加えて加熱し、*in vitro* での PrP^{Sc} 分解活性をウエスタンブロットによって検討した。通常のプロテアーゼ (PK、サビナーゼ) と熱を加えると PrP^{Sc} の分解はある程度進むが、10⁻² の低減効果しかない。一方、Tk-SP では 10⁻³ 以上の低減効果が得られている。また、洗浄剤と Tk-SP を共存させると効率的に

分解が進むことが確認できた。



試作洗浄剤でのPrP^{Sc}分解能の比較

試作品洗浄剤で分解した PrP^{Sc} の感染性を検証するために、マウス神経芽細胞への感染試験を行った。感染後の細胞を継代し PrP^{Sc} の蓄積量で感染性を検証した。



PrP^{Sc}蓄積量による感染性の比較

Tk-SP と界面活性剤を組み合わせることで分解した系で PrP^{Sc} の蓄積の遅れが認められた。

D. 考察

Tk-SP とインテインを融合することで、毒性を抑制して大腸菌大量発現系を構築することに成功した。また、熱処理によって自己触媒的に Tk-SP が活性化することが確認できた。おり生産性を低下させているという問題点も明らかになった。

医療用洗浄剤としての実用化を目指して、陽イオン界面活性剤 2 種類、キレート剤、両性界面活性剤を組み合わせた洗浄剤に酵素を加えたが、Tk-SP は洗浄剤存在下で安定に酵素活性を発揮できることが明らかとなった。また、洗浄剤と Tk-SP を組み合わせることにより、PrP^{Sc} が効率的に進むことも確認でき

た。これは脳ホモジネートに含まれる脂質などの成分が界面活性剤により可溶化し、また、タンパク質の疎水面を界面活性剤が露出させたために、会合状態が解消されて PrP^{Sc} と Tk-SP の接触機会が増えたためと考えられる。

Tk-SP の分解効率の高さに比例して感染性の低減も認められた。一方で、界面活性剤が細胞毒性を示すことから、感染性の検証には今後の動物実験が必要と考えられる。

E. 結論

プリオン分解が可能なプロテアーゼとして Prionzyme が製品化されているが、耐熱性、界面活性剤耐性がないため使用条件が限定されており医療現場に普及していない。また、現在医療用洗浄剤に使用されている subtilisin 系プロテアーゼは今回用いた界面活性剤存在下で活性を失うことから、本酵素は界面活性剤存在下で熱をかけて洗浄する事が可能な初めての洗浄用酵素である。

[参考文献]

[雑誌] 著者名. 題名. 誌名. 発行年: 巻数; 頁

[書籍] 著者名. 題名. In: 編集者名・編.

書籍名, 発行地, 発行所名, 発行年; 頁-頁.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2015/4/1~2016/3/31 発表)

1. 論文発表

Azumi Hirata, Akikazu Sakudo, Kazufumi Takano, Shigenori Kanaya and **Yuichi Koga**, Effects of Surfactant and a Hyperthermostable Protease on Infectivity of Scrapie-Infected Mouse Brain Homogenate. Journal of Biotechnology and Biomaterials 2015, 5, 3 1000194

2. 学会発表

発表者名. 題名. 学会名. 発表地, 発表日.

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: 金谷茂規, チタ フーバオ, 高野和文、~~吉野雄一~~

出願番号 PCT/JP2009/063547

登録番: 5339543 (国内)、8535928 (米国)、

ZL200980130490.4 (中国)、欧州で許可通知受領済み

2. 実用新案登録

3. その他