

## 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

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<sup>Sc</sup> 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

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

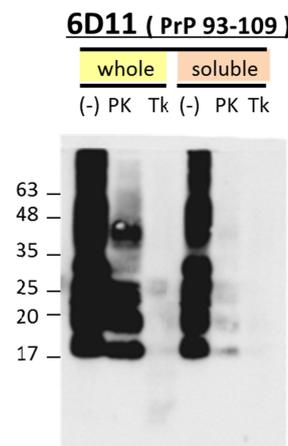
超好熱古細菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 株が生産する 2 種類の subtilisin family protease (Tk-sub, Tk-SP) は極めて高い耐熱性と界面活性剤耐性を有する。これらの酵素は高温、界面活性剤存在下でプリオンタンパク質を含む生体試料と反応させることができる。本研究では、大腸菌に異種発現させた Tk-sub、Tk-SP を用いて PrP<sup>Sc</sup> の分解が可能かどうかを検証した。さらに酵素を医療用洗浄剤に応用することを目的とした、酵素入り洗浄剤の開発を行った。開発においては、酵素生産法の確立、適正な洗浄剤組成の開発、洗浄剤中での酵素学的特性解析、PrP<sup>Sc</sup> の分解試験、感染性評価を行った。

### (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。

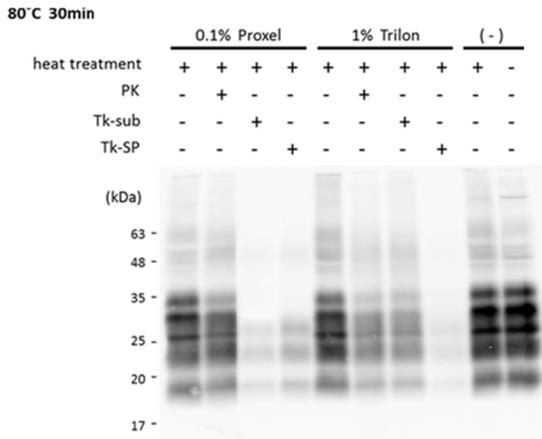
### C. 研究結果

Tk-subtilisin と、RML 感染マウス脳ホモジネート中の PrP<sup>Sc</sup> の分解を試みた。



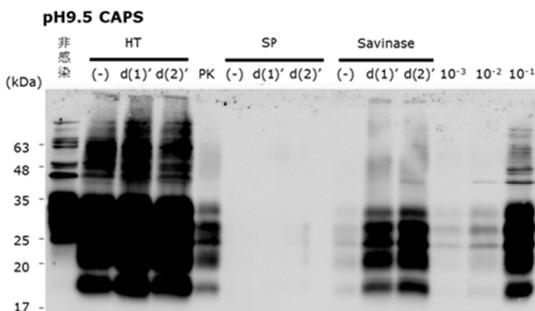
この結果、PK に比べて効率的に Tk-sub が PrP<sup>Sc</sup> を分解できることが示された。Tk-SP を有効成分とする洗浄剤の試作を行

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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup>分解

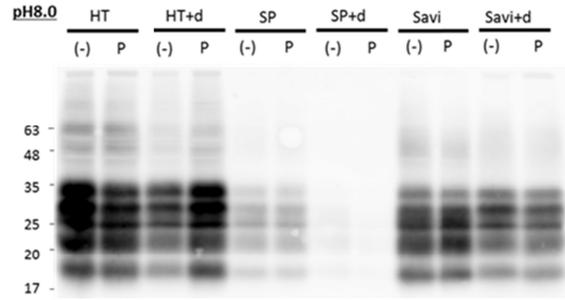
一般的なプロテアーゼ PK に比べ、超好熱菌由来プロテアーゼ (Tk-sub、Tk-SP) は PrP<sup>Sc</sup> に対する分解活性が高い。しかし、キレート成分 (Trilon) 存在下では Tk-SP のみが、強い分解活性を示す事がわかった。洗浄有効成分として陽イオン界面活性剤 2 種、キレート剤はそれぞれ 5% 最終濃度になるように調整した。また洗浄剤の濁りを抑制するために両性界面活性剤も終濃度 5% まで添加した。これらの組成物に酵素を加えたところ、酵素の活性を損なうこと無く、効率的に PrP<sup>Sc</sup> を分解できる洗浄剤であることを確認できた。



試作洗浄剤でのPrP<sup>Sc</sup>分解能の比較

次に試作品洗浄剤で分解した PrP<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> の蓄積量で感染性を検証した。



PrP<sup>Sc</sup>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で分解した系で PrP<sup>Sc</sup> の蓄積の遅れが認められた。

#### 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。

Tk-SP とインティ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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> 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

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得る中に 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なければならない。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といえる。

本研究を通して、熱と界面活性剤とプロテアーゼの組合せが PrP<sup>Sc</sup> の分解に有効であることが示された。今後のヒトプリオンタンパク質を用いた感染性の検証により、感染予防に有効であることが実証されれば、今後の二次感染予防のための新しい選択肢を提供できると考えられる。

## [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 (2014/4/1~2015/3/31 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

清水七海, 古賀雄一, 作道章一, 原 英之, 坂口末廣, 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, 高野孫文、古賀雄一

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



