

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生命先端工学専攻・蛋白質工学講座

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。本酵素の実用化に向けた酵素の高発現系の構築と、洗浄剤による洗浄効率の比較を行った。

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する。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, J. Biotech. Biomater. 2015, 5, 1000194）。昨年度試作した酵素入り洗浄剤を用いて、洗浄評価、プリオン分解特性評価、分解産物の評価を行う。プリオン分解が可能なプロテアーゼとして Priozyme 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。医療器具洗浄剤でそのままプリオン分解が可能な洗浄剤の開発を目的とした。

B. 研究方法

試作した洗浄剤の改良とテストサンプルの製造を行う。テストサンプル製造においては Tk-SP の大量生産が律速になるため、従来法での生産に加えて、新規分泌発現系の構築をすすめた。洗浄剤テストサンプルを用い

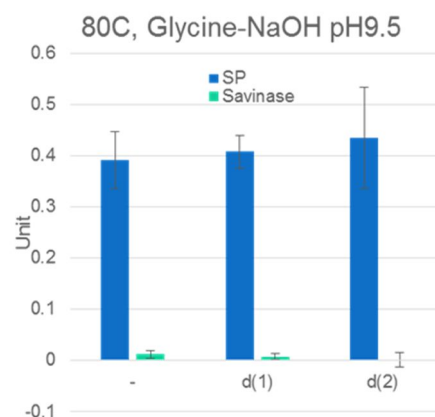
て、洗浄機での洗浄試験の評価を行った。

（倫理面への配慮）

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。

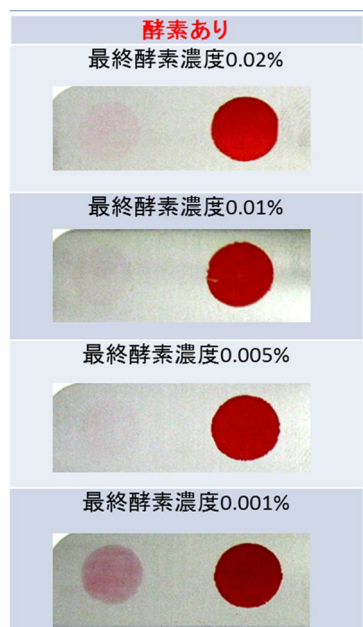
C. 研究結果

既存の医療用洗浄剤に用いられる界面活性剤、キレート剤、殺菌剤を検討し、酵素の安定性、活性に影響が少なく、濁りなどの不安定要素のない 4 種類の成分を決定した。これらの洗浄剤成分と、既存の洗浄用酵素と超好熱菌由来酵素 Tk-SP をそれぞれ混ぜて酵素活性を比較した。



PH8.5 80 での酵素活性の比較

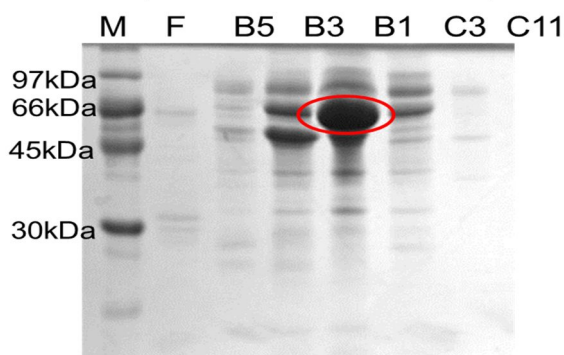
また、洗浄剤によるステンレス表面の擬似汚れの洗浄試験を行った。



洗浄インジケータ上の汚れ落ち試験。
酵素濃度に依存して洗浄力が向上することが認められた。

インテインを融合した Tk-SP 誘導体を用いて大腸菌体での異種発現を行った。これまで、インテインのスプライシング効率が低いために、Pro 体を SDS-PAGE で確認できるほどの量調製することができなかったが、立体構造形成を促す Ca イオンを加えた発現後の処理によって、インテインが効率的に外れ Pro 体の大量調製に成功した。

カルシウム存在下



F: Flow Through

D. 考察

殺菌成分（陽イオン界面活性剤）、清澄剤（陰イオン界面活性剤）を含む洗浄組成を決定することができた。また、既存酵素に比べ、Tk-SP はこの洗浄成分中で有意に酵素活性をた持つことができること。80 で効率的な洗浄効果を示すことがわかった。

酵素の大量生産には酵素毒性を抑えることが課題となっており、昨年度までに intein 配列を挿入することによる活性抑制が効果的であることがわかった。しかし、インテインのスプライシング（離脱）効率が低いために有用な活性型酵素の前駆体である Pro 体酵素を調製することが困難であった。インテインのスプライシングには、切断点を近接させるために分子の立体構造を正しく折りたたむ必要がある。ここで、折りたたみに寄与する可能性のあるカルシウムを添加することによって効率的にインテインが離脱することを見出した。

E. 結論

インテイン配列を用いた酵素活性抑制が有効であることが示され、産業用酵素としての生産法を提案することができた。

また、この酵素を用いて既存の酵素では洗浄することができなかった 80、pH8 付近での洗浄が可能になった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Koga Y, Uehara R, Takano K . Hyper-

Thermophilic Subtilisin-like Proteases
from *Thermococcus kodakarensis* and
Their Application . Extremophiles
Kyoto, September 12-16, 2016

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

