

## 自己評価報告書

平成 23 年 4 月 30 日現在

機関番号：37102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2011

課題番号：20580106

研究課題名 (和文) 異常プリオン分解酵素の特異性改変による実用化

研究課題名 (英文) Improvement of the specificities of PrP<sup>Sc</sup>-degrading enzyme for industrial applications.

研究代表者 満生 慎二 (SHINJI MITSUIKI)

九州産業大学 准教授

研究者番号：70320140

研究分野：応用微生物

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：異常プリオン、ケラチナーゼ、ケラチン

## 1. 研究計画の概要

(1) 異常プリオン分解酵素の特異性改変

①タンパク質工学的手法を用いた異常プリオン分解酵素の特異性向上

NAPaseの立体構造をもとに、活性部位および異常プリオン結合部位を中心にアミノ酸残基を置換し、異常プリオン特異性の改変を図る。

②進化分子工学的手法を用いた異常プリオン分解酵素の特異性改変

進化分子工学の手法として DNA shuffling が用いられている。先に行った random Priming in vitro recombination 技術を用いて、E77 および NAPase に適応させ、これら酵素の異常プリオン特異性の改変を図る。

(2) PSP 分解能を指標とした新規異常プリオン分解酵素の探索

我々がこれまでに発見した異常プリオン分解酵素はいずれも放線菌由来である。そこで、プロテアーゼ産生能の高い Bacillus 属細菌に焦点を絞り、新規かつ最強の異常プリオン分解酵素の探索を行う。

## 2. 研究の進捗状況

(1) 化学修飾体の特異性解析により NAPase の Arg 残基が異常プリオンの分解能に関与する可能性が示唆されたため、部位特異的変異法により Ala 変異体を作成し、異常プリオンモデルタンパク質である PSP を用いて特異性を検討した。Arg117 および Arg133 以外の Arg 残基は特異性に変化が無く、両残基は NAPase の活性部の周辺領域に並んで存在することより、Arg117 および Arg133 が異常プリオン分解能に寄与すると推定した。放線菌を宿主とした発現系により両残基の変異体の取得を試みたが、活性型の取得には至らなかった

ため、大腸菌を用いた活性型変異体の取得を行った結果、リフォールディング条件を変化することにより活性型変異体を取得することが明らかとなった。現在この発現・リフォールディング系を用いて様々な変異体の取得および特異性解析を進めている。一方、ランダム変異体法による異常プリオンに対する特異性向上変異酵素のスクリーニング系を構築し、スクリーニングを進めている。

(2) 異常プリオン分解能を有する新規酵素のスクリーニングを行った結果、土壌由来の好アルカリ性グラム陰性細菌の産生するアルカリセリンプロテアーゼが、NAPase および E77 と同等かそれ以上の分解能を有することが明らかになった。現在本酵素の精製および構造解析を進めている。

## 3. 現在までの達成度

③やや遅れている

異常プリオン分解酵素の分解能発現に必須と推定している領域の活性型変異体の取得条件の構築が困難であった。また、特異性向上変異酵素の効率的なスクリーニングが困難で、数多くの変異体を作成しなければならなかった。一方、新規酵素の取得においては、NAPase 産生株である好アルカリ性放線菌に絞って研究を進めたため、有望酵素産生菌の単離に時間を要してしまった。

## 4. 今後の研究の推進方策

(1) Arg117 および Arg133 の種々変異体の特異性の解析により、異常プリオン分解能発現領域の特定さらには作用機序の解明を行う。さらに、大量のランダム変異体を作成し、特異性向上株のスクリーニングを行う。

(2) 新規酵素の精製を完了し、異常プリオ

ン分解特性を既知酵素と比較検討を行う。有用性が明らかになれば構造解析を行い、新規酵素をコードする遺伝子のクローニングを行う。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① 満生慎二, 後藤正利, 叶内宏明, 岡達三, Identification of alkaliphilic actinomycetes that produces a PrPr<sup>Sc</sup>-degrading enzyme, *Annals of Microbiology*, 60, 349-353, 2010, 査読有
- ② 満生慎二, 岡部正明, 境正志, 森山康司, 叶内宏明, 岡達三, Prion degrading enzyme and application for food safety, *Journal of Biotechnology*, 1, 136/S, 2008, 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 宮迫綾乃, 満生慎二, 境正志, Screening for novel enzymes degrade insoluble and hard-to-degrade animal proteins, The 23<sup>rd</sup> International Symposium on Chemical Engineering, 2010, 九州産業大学
- ② 宮末慎弥, 満生慎二, 境正志, Construction of an expression system of prion protein degradation enzyme in *Escherichia coli*, The 23<sup>rd</sup> International Symposium on Chemical Engineering, 2010, 九州産業大学
- ③ 森明日香, 満生慎二, 後藤正利, 叶内宏明, 岡達三, 難分解性タンパク質分解酵素阻害剤の精製と特性, 第46回化学関連支部合同九州大会, 2009, 北九州国際会議場
- ④ 叶内宏明, 陳田洋介, 岡達三, 満生慎二, 過塩素酸可溶性タンパク質の高次構造の多様性, 第31回日本分子生物学会年会第81回生化学会大会合同大会, 2008, 神戸ポートアイランド
- ⑤ 森明日香, 満生慎二, 後藤正利, 叶内宏明, 岡達三, 難分解性タンパク質分解酵素阻害剤の精製と特性, 第15回日本生物工学会・九州支部熊本大会, 2008, 崇城大学
- ⑥ 青谷弘司, 満生慎二, 後藤正利, 叶内宏明, 岡達三, 難分解性タンパク質分解酵素の機能と応用, 第15回日本生物工学会・九州支部熊本大会, 2008, 崇城大学

[図書] (計0件)

[産業財産権]

出願状況 (計0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.ip.kyusan-u.ac.jp/J/kougaku/tc/mitsuki/index.html>