

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：37102

研究種目：基盤（C）

研究期間：2008 年 ～ 2011 年

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） Improve the specificity of a PrP^{Sc}-degrading enzyme and application for industry.

研究代表者

満生慎二（Mitsuiki, Shinji）

九州産業大学・工学部・教授

研究者番号：70320140

研究成果の概要（和文）：異常プリオン分解酵素（NAPase、E77）の作用機序の解明を行った結果、NAPase の Arg117 および Arg133 を含む領域が、難分解性タンパク質吸着能を有し、活性発現に寄与することを明らかにした。さらに NAPase 遺伝子を用いたランダム変異法により、特異性向上変異株を 3 株得た。また、異常プリオン分解酵素を用いた食肉清浄化に必須となる、特異的阻害剤をゴーヤ種子より単離し、実用性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The region concluding Arg 117 and 133 of NAPase had the keratin adsorbability, and was concerned with PrP^{Sc} -degrading activity. The specificity to hard-to-degrading protein of NAPase was improved by random mutagenesis. A specific inhibitor of NAPase adaptable for meet cleaner was discovered from bitter gourd.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 21 年度	600,000	180,000	780,000
平成 22 年度	600,000	180,000	780,000
平成 23 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,00,000	900,000	3,900,000

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、プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

近年、日本において海綿状脳症（狂牛病）に罹患した牛が33頭確認され、プリオン病発症機序の解明および治療・予防法の開発が緊

急課題となっている。しかし、異常プリオンタンパク質を大量に入手することは困難であること、また牛プリオンタンパク質を用いた研究が、P3以上の研究室レベルに限られてい

ることなど研究を進める上で限界がある。もし、異常プリオン様タンパク質の立体構造を持つタンパク質が存在すれば、通常レベルの実験室での研究が可能になるばかりでなく、研究の格段の進展が期待できる。

申請者らは、ラット肝臓から進化的に高度に保存された新規なタンパク質を発見した (*J. Biol. Chem.* 270, 30060-30067 (1995))。過塩素酸によって抽出される本タンパク質を **Perchloric acid Soluble Protein (PSP)** と名付けた。ドイツの **Dr. Carugo** との共同で PSP の立体構造を明らかにした結果、PSP の立体構造は2個の α ヘリックスと6個の β シートからなり、2個の α ヘリックスと4個の β シートからなる異常プリオンタンパク質と α ヘリックスと β シートの配置も含めて極めて類似した立体構造を示した。また、**proteinaseK** や熱に対する耐性も異常プリオンタンパク質と同様の性質を示したことから、PSP は少なくとも清浄化酵素の基質として異常プリオンタンパク質のモデルとなり得るとの着想に至った。

本研究では、PSP を基質として異常プリオンタンパク質を分解する新規なタンパク質分解酵素を微生物からスクリーニングし、ある種の放線菌が分泌する新規な異常プリオンタンパク質分解酵素 **E77** を発見した (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 45-50 (2004))。

また、先に発見した好アルカリ性放線菌 *Nocardiosis* sp. **TOA-1** の産生するケラチナーゼ (*Enzyme Microb. Technol.* 34, 482-489 (2004)) が、**E77** 同様の分解能を有することを明らかにした (*Biosci. Biotech. Biochem.* 70, 1246-1248 (2006))。

2. 研究の目的

異常プリオンタンパク質分解酵素については、**E77** および **NAPase** 以外には、オランダと

イギリスのグループが報告している。

オランダで発見された酵素は異常プリオンを100°Cで前処理しないと効果が無いこと、イギリスの酵素もプリオン分解に60°Cで30分以上かかることから、至適条件下で3分以内に異常プリオンを分解する酵素 **E77** および **NAPase** は、現在のところ世界で最も強い分解活性を示すことが示唆されている。

また、**NAPase** の立体構造の解析、化学修飾による特異性変化の解析結果をもとに、異常プリオン分解酵素は、活性部位とは別に、異常プリオン結合部位の存在が示唆されており、異常プリオン結合部位により分解能が発現する作用機序を提唱している。

一方、本酵素を用いた畜肉の清浄化（混入異常プリオンの分解）評価を行ったが、コラーゲンなど他の有用タンパク質の分解能の発現に伴う製品の劣化が確認されたため、特異性をさらに向上させた酵素への改変または新規酵素の発見が望まれている。

3. 研究の方法

E77 および **NAPase** は、現在までに報告された異常プリオンタンパク質分解酵素の中で最も強い活性を示す。本申請研究では、異常プリオンタンパク質へのさらなる特異性の向上を目指し、遺伝子シャッフリングなどに代表される新規タンパク質工学・進化分子生物学的手法を用いて、酵素の改変を行うことを目標とする。

さらには、畜肉の清浄化剤への応用など変異型異常プリオン分解酵素の実用化を図ることを目標とする。

4. 研究成果

本研究は、放線菌の産生する異常プリオン分解酵素 (**NAPase**, **E77**) の特異性の改変および食の安全への適応について研究を行い、以

下の4つの成果を得た。

(1) 菌の同定

異常プリオン分解酵素(NAPase)を生産する、好アルカリ性放線菌 TOA-1 株の同定を、形態学的、生理学的、および分子生物学的解析により行い、本菌株が *Nocardiosis* 属の新種であることを明らかにした。

(2) 新規異常プリオンタンパク質分解酵素の探索

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、新たに土壌より分離した好アルカリ性細菌 K-35 株の産生する新規アルカリセリンプロテアーゼ(分子量 18.5 kDa)が、NAPase および E77 とほぼ同等のケラチンおよび異常プリオンモデルタンパク質 PSP の分解能を有することを明らかにした。

(3) 異常プリオン分解酵素に対する新規阻害剤の探索

畜肉の清浄化剤への応用を目指して、異常プリオン分解酵素(NAPase, E77)を効果的かつ特異的に阻害する食品成分由来の異常プリオン分解酵素阻害剤のスクリーニングを行った結果、ゴーヤ種子の新規タンパク質(分子量 9.8 kDa)が特異的阻害能を有する事を明らかにした。本阻害剤の羊腸清浄工程への応用検討を行い、異常プリオン分解酵素の触媒能の制御が可能であることを見出した。

(4) 異常プリオン分解酵素の作用機序の解明

化学修飾法により Arg 残基を修飾した NAPase のケラチン分解能が特異的に低下することを見出した。

放線菌を宿主とした NAPase 遺伝子の発現

系を構築し、機能解明を試みた結果、活性部位とは離れた位置に存在する Arg117 と Arg133 の両アミノ酸が、異常プリオン分解能に関与する可能性が示唆された。

大腸菌を宿主とした活性型 NAPase 遺伝子発現系を構築し、プロ領域との共発現による活性型組換え NAPase の取得を検討した結果、リフォールディング緩衝液(50 mM Tris-HCl buffer at pH 7.0, 0.5M (NH₄)₂SO₄, 1 mM CaCl₂, 1M L-arginine, 5 mM 2-mercaptoethanol)を用いた希釈法を用いたインビトロリフォールディングにより、高効率で活性型酵素が得られることを明らかにした。本発現系を用いて、Arg117Ala, Arg133Ala 変異体を作製し、それら酵素の特異性を検討した結果、両 Arg 残基を含む領域が難分解性タンパク質分解能の発現に必須であることを明らかにした。本領域は、難分解性タンパク質の吸着能発現に寄与することより、本領域が他の難分解性基質加水分解酵素と同様、活性部位とは独立した機能ドメインを形成していると推察した。

また、ケラチン培地を用いた特異性向上変異株取得系を確立し、ランダム変異法を用いて様々な部位の改変を行い、ケラチン分解能の向上した変異体を3株得ることに成功した。

5. 主な発表論文等

(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3件)

- ① Zhao Hui, Shinji Mitsuiki, Mikako Takasugi, Masatoshi Goto, Hiroaki Kanouchi, and Tatsuzo Oka. Decomposition of insoluble and hard-to-degrade animal proteins by enzyme E77 and its potential

applications. 166(7), 2012, p.1758-68、
査読有り

- ② Shinji Mitsuiki, Mikako Arai, Mami Kurose, Takeomi Take, Keisuke Kito, Yasushi Moriyama, Masatoshi Goto, Hiroaki Kanouchi, and Tatsuzo Oka. Identification of an alkaliphilic actinomycetes that produces a PrP^{Sc}-degrading enzyme. 60(2), 2010, p.349-353、査読有り
- ③ Shinji Mitsuiki, Masatoshi Goto, Masashi Sakai, Hiroaki Kanouchi, Kensuke Furukawa and Tatsuzo Oka. Prion degrading enzyme and application for food safety Shinji Journal of Biotechnology, Vo.1 136/S, 2008, p.S339、査読有り

[学会発表] (計7件)

- ① Shinya Miyasue, Shinji Mitsuiki, Masatoshi Goto, masashi Sakai. Functional analysis of genetic variation in PrP^{Sc} degrading enzyme (NAPase): effects on structure and enzyme activity. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011.9.8, Sapporo city.
- ② Ayano Miyasako, Shinji Mitsuiki, Masashi Sakai. Screening for novel enzymes degrade insoluble and hard-to-degrade animal proteins, The 23rd International Symposium on Chemical Engineering, 2010.12.4,

Fukuoka city.

- ③ Shinya Miyasue, Shinji Mitsuiki, Masashi Sakai. Construction of an expression system of prion protein degradation enzyme in *Escherichia coli*, The 23rd International Symposium on Chemical Engineering, 2010.12.4, Fukuoka city.
- ④ 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, 化学関連支部合同九州大会・外国人研究者交流国際シンポジウム大会, 2009.7.11, 北九州市.
- 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, 日本生物工学会・九州支部大会, 2008.12.6, 熊本市.
- ⑥ 青谷浩司, 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, 日本生物工学会・九州支部大会, 2008.12.6, 熊本市.
- ⑦ 叶内宏明, 陳田洋介, 岡達三, 満生慎二, プリオンと同様な性質を有する過塩素酸可溶性タンパク質. 日本生化学会大会, 2008.12.9, 神戸市.

6. 研究組織

(1)研究代表者

満生 慎二(MITSUIKI SHINJI)

九州産業大学・工学部・教授

研究者番号：70320140

(2)研究分担者

後藤 正利(GOTO MASATOSHI)

九州大学・農学研究院・寄付講座教員

研究者番号：90274521

岡 達三 (OKA TATSUZO)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：50116795

(注) 平成 20→21 年度

叶内 宏明 (KANOUCHI HIROAKI)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：10351884

(注) 平成 22→23 年度