

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07392

研究課題名(和文)高温proteolysisによる異常プリオンタンパク質コア構造の解析

研究課題名(英文) Analysis of abnormal prion protein core structure by proteolysis at high temperature

研究代表者

古賀 雄一 (Koga, Yuichi)

大阪大学・工学研究科 ・准教授

研究者番号：30379119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Tk-subtilisinによる分解がPrPScの感染性に与える影響を調べるために、高温条件下でPrPScにTk-subtilisinを作用させ、その酵素分解物を用いて感染性試験を行った。高温条件において、Tk-subtilisinによってRML感染脳ホモジネート由来のPrPを分解できることを確認した。分解産物を培養細胞に接種し、8日間培養したところ、80 30分でTk-subtilisin処理したサンプルを用いた細胞ライセートについて、PrP量に有意な減少が見られた。高熱処理とTk-subtilisin処理を組み合わせることが感染価の減少に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A hyperthermostable protease, Tk-subtilisin, can degrade PrPSc. Scrapie-infected mouse brain homogenate (RML strain) was degraded by Tk-subtilisin under high-temperature condition and the degradation products were inoculated into culture cell. At high-temperature condition, Tk-subtilisin degraded PrP from RML homogenate, whereas proteinase K (PK) hardly degraded. In addition, Western blotting of the cell lysate inoculated the degradation product showed that the amount of PrPSc decreased significantly. Moreover, the signals of PrPSc were not observed when the concentration of Tk-subtilisin was increased. These results suggest that the combination of heat treatment and proteolysis by Tk-subtilisin is effective in reducing the infectivity titer of PrPSc.

研究分野：農学

キーワード：プロテアーゼ 蛋白質工学

## 1. 研究開始当初の背景

プリオン蛋白質のコンフォメーション変化や異常型構造伝播のメカニズムを理解することは、プリオン特有のタンパク質レベルでの構造伝播現象の理解を促す。さらに、プリオン病の感染予防、治療につながると考えられる。そのためには、異常型プリオン蛋白質の構造学的情報が不可欠であるが、異常プリオンタンパク質の高精度な構造情報は得られていない。現在、異常プリオン蛋白質の構造として主に 3 モデルが提唱されている。Govaerts らは電子顕微鏡観察データをもとに、左巻きヘリックス構造のスタッキングモデルを提唱し (Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 101, 8342, 2004)、DeMarco らは MD シミュレーションから  $\beta$ -スパイラルモデルを提唱している (Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 101, 2293, 2004)、Surewicz らは質量分析をもとに、伸長シートモデルを考案 (Nat. Struct. Mol. Biol. 18, 504, 2011) している。しかし、いずれも解像度の低いデータをもとにしたモデルであるため、アミロイド形成メカニズムの詳細やプリオン蛋白質が持つ毒性の由来や構造伝播機構は未だ明らかにならなかったとは言えない。

Prusiner らは、プリオン病に感染した動物の脳に、Proteinase K で分解を受けないプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質を見出し、抵抗性プリオンタンパク質 (PrPres) とした。PrPres は比較的構造の固いと思われる C 末側の領域を残した部分分解産物で感染性が残っている。PrPres はプリオン特有の構造伝播に関わる構造的因子が残っていると考えられるが、PrPres は分子量も大きく、その構造因子は未だ同定されてはいない。申請者は、Proteinase K では分解できない PrPres を超好熱菌由来のプロテアーゼ (Tk-subtilisin) でさらに小さく酵素分解できることを見出した (Koga Y., et al. Appl Microbiol Biotechnol. 98(5):2113-20. 2014)。さらに、この分解物が感染性を保持していることを実験的に確認した (Koga Y., et al. in preparation)。これは、酵素処理した異常プリオンタンパク質に感染性を保持した分解断片が含まれていることを示唆しており、プリオン感染に関わる構造因子の抽出に適した材料であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では異常プリオンタンパク質の感染に関わるコア構造の単離と同定を目的とする。異常プリオン蛋白質の感染コア構造情報を明らかにすることは、構造伝播メカニズムの理解や、プリオン病の感染予防法の確立の上で極めて重大な関心事であるが、未だにその詳細な構造は明らかになっていない。先行研究において、超好熱菌由来プロテアーゼ (Tk-subtilisin, Tk-SP) は異常プリオンタンパク質を分解することができるが、一定の条件

下で感染性を残した画分を生成することを見出した。この異常プリオンタンパク質の分解残渣に、プリオンタンパク質の構造伝播に寄与し、感染を引き起こす構造因子が含まれることを示唆している。本研究では、異常プリオンタンパク質の Tk-subtilisin による分解断片を詳細に解析し、感染に関わると考えられるコア構造の単離、同定を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 感染性断片の探索

#### 酵素分解条件の検討

異常プリオン蛋白質は一般にプロテアーゼ耐性であるが、蛋白質変性条件下で、構造の不安定化を引き起こすことが分かっている。変性条件下でも活性を有するプロテアーゼを用いることで、これまで、解析が困難であったアミロイドを形成しているコア構造を部分的に分解することが可能であると考えられる。我々のこれまでの研究から、Tk-subtilisin による異常プリオン蛋白質の分解は、熱や SDS の添加によって促進されることが分かっている。また、酵素反応時の SDS の有無により分解プリオン蛋白質の感染性に明確な差があることが確認できている。これは、分解条件の違いが、感染性に関わる構造部分の分解の差に影響していることを示している。これを踏まえ、本研究では、ヒツジ由来スクレイピー (Chandler 株) を感染させたマウス (C57BL6/JJmsSlc) の脳ホモジネートに Tk-subtilisin を作用させ、PrP Sc を含む全タンパク質を分解したサンプルを調製する。マウス由来 PrP は熱に弱い性質があるため、酵素量、反応温度、反応時間、変性剤添加量などの条件を調製し、得られる PrP Sc 断片のサイズ、量との相関を検討する。Proteinase K での PrP 分解パターンを基準として、これよりも分解が進行する適切な分解条件を定める。ここで得られた Tk-subtilisin による分解条件や分解物の評価は、酵素分解による異常プリオン蛋白質の不活性化技術確立のための基礎的知見となる。

#### PrPSc の調製

脳ホモジネートに含まれる PrP Sc の量が微量であることから、分解後の検出が困難であることも考えられる。そこで、ペプチド断片の精製、免疫沈降、リンタングステン酸を用いた特異的沈降法 (Wadsworth JDF et al., Lancet, 2001, 358, 171) 超遠心分離を行い PrPSc を得て、酵素分解、検出を行う。マウス脳での実験が困難な場合には、熱に強く、サンプル量も多いことが期待される感染ハムスター脳ホモジネートを用いて PrP Sc の調製を行う。ハムスター脳はこれまでの実験に使っていない材料であるためデータの互換に問題があるが、これにより、100 倍程度の感度の向上が見込まれる。

#### 分解産物の検出

これまでの感染実験の結果 (発症日数の延長) から、酵素分解物の感染価は数 ng の PrP Sc で実験した場合と同じ程度と予想される。

分解産物をゲル電気泳動 (SDS-PAGE, 二次元電気泳動) で分離し、銀染色、ウエスタンブロット法により残留タンパク質、PrP を検出する。本酵素による分解で、ホモジネート中のタンパク質はほとんど分解されることが予想される。また、これまでの結果から、PrP<sup>Sc</sup> もウエスタンブロットでは検出できない程度に分解されると考えられるが、数 ng 程度の残留断片があれば銀染色によって検出が可能であると考えられる。

#### (2) 感染性断片の抽出・同定

PrP<sup>Sc</sup> 部分分解物について感染性のコア構造を含むと考えられる画分を、電位泳動ゲルからの直接抽出、または、生化学的濃縮法 (免疫沈降、リンタングステン酸との共沈) 後の精製を行う。感染性のコア構造を同定するために、ペプチドシーケンス、液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LC-MS/MS 日本ウォーターズ製 UPLC-SynaptG2HDMS) を用いて、分解産物中に含まれるペプチド断片の網羅的な解析を行う。

#### (3) 感染性試験

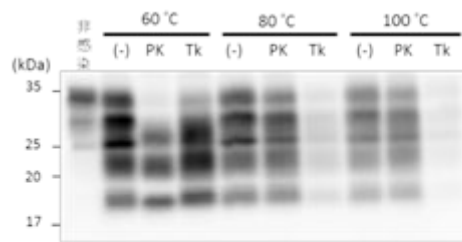
酵素分解によって調整された PrP の分解物を調製し、培養細胞を用いた感染性試験を行う。この手法によれば 2 週間で培養細胞中へのプリオンタンパク質の蓄積を確認して感染性を判定することができる。主に培養細胞による感染性の評価を行い、評価対象分解産物の数を絞り込む。

### 4. 研究成果

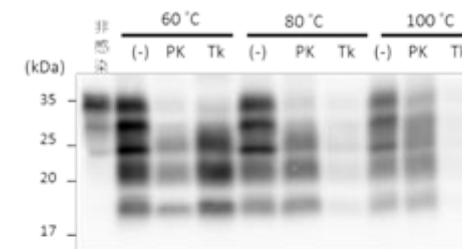
#### (1) 感染性断片の探索

Tk-subtilisin によるプリオンの分解条件を決定するため、酵素濃度や反応温度を変えて、羊のプリオン病であるスクレイピー感染型マウス脳ホモジネート (RML 株) を用いて分解実験を行った。60 °C で 1 時間処理したところ、Tk-subtilisin による分解産物にのみ、PrP の C 末端を含む 11kDa 以下の断片が検出された。この中間体は非感染脳ホモジネートを分解した際にも検出されたことから、Tk-subtilisin がその活性の強さから PrP を非特異的に分解した結果生じたものである可能性が示唆された。さらに、反応時間 30 分で 60 °C・80 °C・100 °C の 3 条件、酵素濃度は 5 µg/mg-protein、20 µg/mg-protein の 2 条件を検討した。酵素分解産物中の PrP を確認するため、抗 PrP 抗体である 6D11 を用いてウエスタンブロット法を行った (Fig.1)。この結果から、60 °C においては PK、Tk-subtilisin とともに PrP<sup>Sc</sup> の分解が進まないことが分かった。80 °C 以上では Tk-subtilisin による PrP<sup>Sc</sup> の分解が進んでいることが確認できた。

次に脳ホモジネートの脂質や夾雑タンパク質による不溶化物の影響を排除する目的で、界面活性剤存在下で PrP 分解を行った。キレート剤に耐性のある Tk-SP と、その比較対象として、汎用的に洗剤に配合される Novozymes 社製の Savinase Ultra を使用した。反応条件は Tk-subtilisin での分解試験結果から



(i) 5 µg protease / mg-protein



(ii) 20 µg protease / mg-protein

Fig.1 Western blotting of degradation products by Tk-subtilisin

ら 80 °C、20 µg/mg-protein を採用した。界面活性剤 4 種を含む条件で感染マウス脳ホモジネートを分解したところ、Tk-SP は界面活性剤の有無に関わらず PrP を高度に分解することが明らかになった (Fig.2)。高 pH 域では Savinase や PK によっても PrP 分解が進むが、界面活性剤存在下では PrP のシグナルが残っており、Tk-SP との差が顕著に見られた。

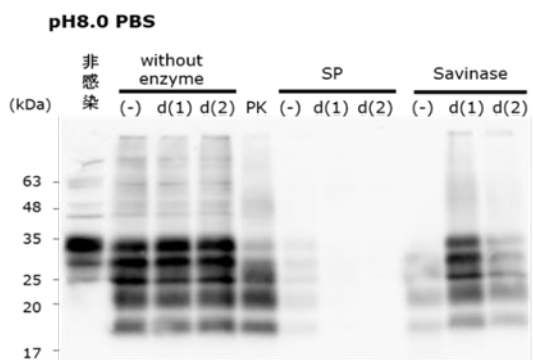


Fig.2 Western blotting of degradation products by Tk-SP

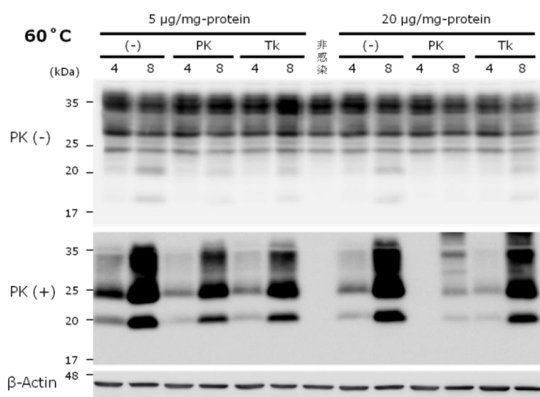
これらの結果から、界面活性剤存在下において好熱菌由来プロテアーゼは PrP を 10<sup>-3</sup> レベル以下に分解可能であることが明らかとなり、酵素洗剤処方を用いたプリオンの不活化に関する新たな知見が得られた。

(2) これらの分解タンパク質を精製する目的で、超遠心分離、リンタングステンを用いた沈殿を行った。脳ホモジネートから得られる PrP 断片は非常に微量であること、夾雑タンパク質からの分離が困難であることから、単離精製は困難であった。そのため、質量分析による分析、ペプチドシーケンスによる断片の同定はできなかった。ただし、界面活性剤中での酵素分解によって得られた PrP 断

片から、脱塩カラム、界面活性剤除去カラムを用いた調製に成功したため、これらの断片を用いて感染性試験を行った。

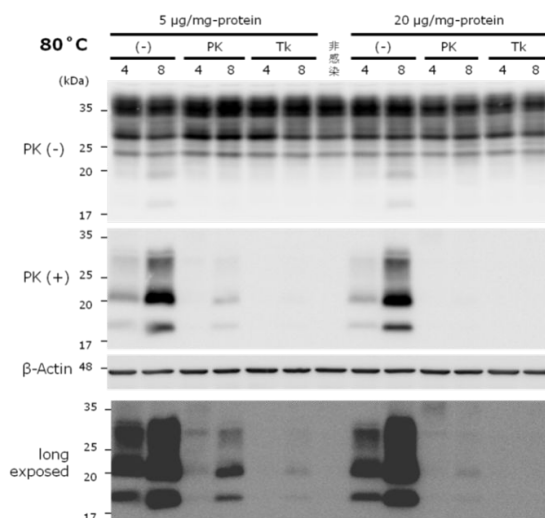
(3) マウス神経芽細胞を用いて感染性試験を行った。感染性は、感染後の培養細胞に蓄積した PrP<sup>Sc</sup> の量を WB 検出して判定した。コントロールとして熱処理・酵素処理を行っていない非感染ホモジネートについても同様に細胞に感染させた。PK(-), PK(+), -Actin のゲルはそれぞれ、細胞中の全 PrP 量、細胞中のプロテアーゼ耐性の PrPSc 量 (細胞ライセートを PK 処理)、内在性コントロールである -Actin 発現量を確認するため適切な抗体を用いて検出した。

60 における分解産物を感染させた細胞においては、培養 4 日後ですでに PrPSc が蓄積され始めており、その量は熱処理 > Tk-subtilisin > PK の順に減少していた。また、5  $\mu\text{g}/\text{mg-protein}$  では PK と Tk-subtilisin の分解産物について同程度の感染性がみられたが、20  $\mu\text{g}/\text{mg-protein}$  では PK 分解産物について感染性が減少することが分かった (Fig.3)。



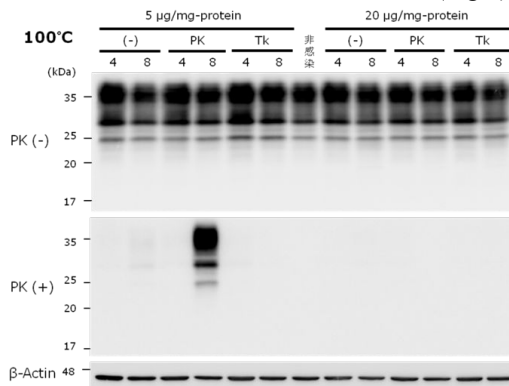
**Fig.3** Western blot of cell lysate infected by degradation product at 60 . PK(-), PK(+) means without/ with PK digestion of each cell lysate.

80 における分解産物を感染させた細胞においては、5  $\mu\text{g}/\text{mg-protein}$  における Tk-subtilisin、20  $\mu\text{g}/\text{mg-protein}$  における PK、Tk-subtilisin の 3 条件について培養 8 日後に PrPSc の蓄積が確認できなかった。しかし露光時間を長くすると、5  $\mu\text{g}/\text{mg-protein}$  における Tk-subtilisin、20  $\mu\text{g}/\text{mg-protein}$  における PK の 2 条件については薄くシグナルが検出された。一方で 20  $\mu\text{g}/\text{mg-protein}$  の Tk-subtilisin ではシグナルが検出されなかったため、培養 8 日後時点で比較すると他の条件に比べ PrPSc の蓄積量が有意に減少していることが分かった (Fig.4)。



**Fig.4** Western blot of cell lysate infected by degradation product at 80 . The bottom membrane is long-exposure of PK(+)

また 100 における分解産物を感染させた細胞においては、5  $\mu\text{g}/\text{mg-protein}$  の熱処理にのみ PrPSc のシグナルが微量に検出されたが、20  $\mu\text{g}/\text{mg-protein}$  の熱処理のみでは、同条件であるにも関わらず検出出来なかった (Fig.5)。



**Fig.5** Western blot of cell lysate infected by degradation product at 100 .

80 と 100 の MBH 分解産物を感染させた細胞については、その後も継代を続け、同じく 20 dpi、29 dpi の細胞ライセートについても PrPSc 蓄積量を確認した。その結果、80、20 dpi では、8 dpi の細胞において PK・Tk-subtilisin 間で見られた差を保ちながら、PrPSc 量が徐々に増幅していることが明らかになった。しかし、その差は 29 dpi まで継代を続けると小さくなり、全ての条件についてほぼ同量の PrPSc が蓄積されていることが分かった。

100 の条件では 20 dpi、29 dpi のどちらにおいてもほとんど PrPSc が検出されなかった。20  $\mu\text{g}/\text{mg-protein}$ 、熱処理のみの条件では PrPSc の蓄積が確認できたが、8 dpi では PrPSc が微量に検出出来ていた 5  $\mu\text{g}/\text{mg-protein}$ 、熱処理では PrPSc が増幅されていないことが分かった。

M20 抗体により検出された Tk-subtilisin の PrP 分解産物に特異的に見られた 11 kDa より小さな断片については、非感染脳・感染脳に関わらず検出されていることから、必ずしも PrP の感染性に関わる部位であるとは言い切れない。また、酵素処理を行った 60 においては Tk-subtilisin よりも PK の方が高い活性を有するにも関わらず、Tk-subtilisin では PK の分解産物に見られた PrPSc 由来と思われる 3 本のシグナルが検出されていないことから、Tk-subtilisin は PK では切断できない部分を切断していると考えられ、PK とは異なる切断部位でより細かく PrP を分解している可能性が示唆された。

次に、酵素濃度と反応温度の検討の際、Tk-subtilisin の濃度をあげても分解が進まなかった原因として、溶液調製の際 Tk-subtilisin の自己分解・凝集が始まるとされている 0.1 mg/ml を超える濃度になってしまい酵素活性に影響を与えた可能性が考えられる。

分解産物の感染性について、80 ・感染 8 日後では熱処理・PK・Tk-subtilisin で有意な差が見られ、その関係性は 20 dpi においても同様に確認されたが、その後も培養を続けた 29dpi の細胞にはいずれも同程度の PrPSc が蓄積されていることが分かった。このことから、PK・Tk-subtilisin による MBH 分解産物をもとに増幅された PrPSc 量は、最終的に 29 dpi 以内に細胞中に蓄積可能な最大量に達するという可能性が示唆された。また、Tk-subtilisin により分解された分解産物は完全に感染性を失うわけではないが、PK よりもより分解が進んだことで PrP の感染性に関わる構造に何らかの影響を与え、感染初期における PrPSc 蓄積速度を減少させていることが示唆された。

## 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 1 件)

1. Hirata A., Sakudo A., Takano K., Kanaya S., Koga Y., Effects of surfactant and a hyperthermostable protease on infectivity of scrapie-infected mouse brain homogenate, J. Biotec. Biomat., 5(3), 1000194(1-4), 2015

[学会発表](計 14 件)

1. 足立航平、上原了、Tannous E. Antonios、大政健史、古賀雄一、“Intein を利用した超好熱菌由来プロテアーゼ (Tk-SP) のインティンを用いたの発現系の構築” 日本農芸化学会 2016 年大会 3D034, 2016 年 3 月 27-30 日、札幌コンベンションセンター、札幌
2. 古賀雄一、清水七海、足立航平、大政健史、“超好熱菌由来 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来 subtilisin 様プロテアーゼとその利用”、第 68 回日本生物

工学会大会, 2016 年 9 月,

3. 杉田慎之介、大政健史、古賀雄一、“ケラチン分解酵素の機能不明 C 末端ドメインの機能解析”、第 68 回日本生物工学会大会 1P1p031、2016 年 9 月 28-30 日、富山国際会議場、富山
4. 古賀雄一、“極めて安定性の高いプロテアーゼの生産と活用”、大阪大学 EDGE CONNECT × SUNTORY、2016 年 12 月 16 日、サントリーワールドリサーチセンター、京都府相良郡精華町
5. 古賀雄一、清水七海、足立航平、“超好熱菌由来 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来 subtilisin 様プロテアーゼとその利用”、日本農芸化学会 2017 年大会 2J30p01、2017 年 3 月 17-20 日、京都女子大学、京都
6. 杉田慎之介、大政健史、古賀雄一、“ケラチン分解酵素の機能未知 サンドイッチドメインの機能解析”、日本農芸化学会 2017 年大会 2J30p02、2017 年 3 月 17-20 日、京都女子大学、京都
7. 来住秀憲、杉田慎之介、大政健史、古賀雄一、“サンドイッチドメインを用いた結合分子骨格の検討”、第 17 回日本蛋白質科学会年会 3P130、2017 年 6 月 20-22 日、仙台国際センター、仙台
8. 田口萌恵、大政健史、古賀雄一、“超好熱古細菌由来プロテアーゼ Tk0076 の成熟化機構解明を目指したプロペプチドの探索”、第 17 回日本蛋白質科学会年会 3P090、2017 年 6 月 20-22 日、仙台国際センター、仙台
9. 古賀雄一、“超好熱菌由来酵素の構造機能相関研究とその応用”、第 69 回日本生物工学会年次大会 3AAp01、2017 年 9 月 11-14 日、早稲田大学、東京
10. Maegawa D., Adachi K., Omasa T., Koga Y., “Construction of a novel expression system of toxic protease from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1”, Extremophiles 2016 P173, Kyoto, Japan, 2016 Sep 12-16
11. Koga Y., Uehara R., Takano K., “Hyper-thermophilic subtilisin-like proteases from *Thermococcus kodakarensis* and their application”, Extremophiles 2016 P174, Kyoto, Japan, 2016 Sep 12-16
12. Koga Y., “Subtilisin-like proteases from a hyper-thermophilic archaeon and their application”, BIOTEC-OSAKA Univ. Special Seminar, Bangkok, Thailand, 2017 Aug 3
13. Koga Y., “Protein engineering on a Subtilisin-like protease from a hyper-thermophilic archaeon”, The 29th Annual meeting of the Thai society for biotechnology and international conference EE-O-003, Bangkok, Thailand, 2017 Nov23-25

14. **Koga Y.**, “Protein engineering of subtilisin-like protease from a hyper-thermophilic archaeon”, 2018 KSBB Spring Meeting and International Symposium A101, Yeosu, Korea, 2018 Apr 19-20

〔図書〕(計2件)

1. **古賀雄一** 「微生物の利用事例紹介～森の中の微生物 柚子由来酵母の単離～」(分担執筆)「地方創生に関わる生物学のとりくみ地域生物資源産業化事例集」(**古賀雄一**、櫻谷英治、大政健史 編) 三恵社、128-129、2016年11月
2. Uehara R., Takano K., Kanaya S., **Koga Y.**, “Hyperthermophilic subtilisin-like protease from *Thermococcus kodakarensis*.” (分担執筆) “Biotechnology of Microbial Enzymes, production, biocatalysis and industrial applications” (Brahmachari G., Demain A., Adrio A. 編), Academic Press, 81-117, 2017年7月

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計1件)

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 フーパオ, 高野和文,  
古賀雄一  
権利者：国立大学法人大阪大学  
種類：特許  
番号：2319921  
取得年月日：2016年4月20日  
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

古賀 雄一 (KOGA, Yuichi)  
大阪大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：30379119