

異常プリオン分解酵素の機能解明

長濱 善昭¹、岡部 正明²、叶内 宏明²、岡 達三²、満生 慎二³、境 正志³

Characterization of prion-degrading enzyme from *Nocardiosis* sp. TOA-1.

Yoshiaki Nagahama,¹ Masaaki Okabe,² Hiroaki Kanouchi,² Tatsuzo Oka,² Shinji Mitsuiki,³ and Masashi Sakai³

Prion diseases are characterized by conversion of the normal cellular form of the prion protein (PrP^C) into an insoluble, protease-resistant abnormal form (PrP^{Sc}). The aberrant isoform of PrP^C, PrP^{Sc}, which is characterized by relative resistance to proteolysis and insolubility in non-denaturing detergents, is a hallmark of prion diseases. There have been some reports of PrP^{Sc}-degrading enzymes, but these enzymes need additional chemical and physical treatments for the degradation of PrP^{Sc}. A keratinolytic alkaline serine protease (NAPase) from *Nocardiosis* sp. TOA-1 degraded a PrP^{Sc} without any chemical or physical treatment. Optimal temperature and pH were 50-70°C and above pH 10.0. The PrP^{Sc} was completely degraded within several minutes under optimal conditions. These results suggest NAPase have remarkable ability as PrP^{Sc}-degrading enzyme. The mechanism of PrP^{Sc}-degrading was investigated using PrP^{Sc}-model protein PSP (perchloric-acid soluble protein) from pig liver.

Key words: prion, protease, *Nocardiosis* sp.

1: 緒言

プリオンタンパク質は、牛のBSE、羊のスクレーピーおよびヒトのCJDなどのプリオン病の病原体“プリオン”を構成し、プリオン病の病態に深く関与する宿主タンパク質である。その原因として、本来生体内に含まれる正常プリオンタンパク質 (PrP^C) が、翻訳後修飾を受けてβ-シートの多い異常プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) に変化することにより起こると考えられている。異常プリオンタンパク質は高い感染性、抗熱性などの性質を有し、proteinase Kなどのプロテアーゼに対して極めて高い抵抗性を示すことが明らかとなっている。

本研究では、好アルカリ放線菌 *Nocardiosis* sp. TOA-1 由来プロテアーゼ (NAPase) が異常プリオンタンパク質を強力に分解することを明らかにし、その分解特性について検討を行った。さらに、異常プリオンタンパク質のモデルタンパク質である PSP (perchloric-acid soluble protein) を用い、異常プリオンタンパク質分解の作用機序について検討した。

2: 実験方法

2-1: 異常プリオン (PrP^{Sc}) 分解特性

2-1-1: PrP^{Sc} 基質の調製

スクレーピー由来プリオンタンパク質 (263 K) をハムスターに摂取し、脳をホモジネート処理後、50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.5) にて 15 % 濃度となるように調製し、PrP^{Sc} 基質とした。

2-1-2: PrP^{Sc} 分解特性

PrP^{Sc} 基質 50 μl に 0.5 M Glycine 緩衝液 (pH 11.0)、10 μl および NAPase 溶液 1 μL (0.1-20 μg) を添加し、50°C にて 30 分間インキュベート後、PMSF (最終濃度 1mM) の添加および 100°C、5 分間の熱処理により反応を停止した。分解産物については、SDS-PAGE (15%) にて分離後、SAF32 モノクロナール抗体を用いた ECL ウェスタンブロッティング法により解析を行った。異常プリオンタンパク質の定量は、NIH Image 1.62 を用いて行った。さらに、PrP^{Sc} 認識部位の異なる 3 種類のモノクロナール抗体 (14D11、3F4、12F10) を用いて、分解産物の解析を行った。PrP^{Sc} 分解に対する pH (5.0-12.0) および温度 (20-90°C) の影響についても検討を行った。

¹九州産業大学工学研究科

²鹿児島大学農学部獣医学科

³九州産業大学工学部

2-2: PSP 分解特性

2-2-1: PSP の精製

豚肝臓のホモジネート溶液を遠心分離 (9,000 rpm、30 min) し、上清へ過塩素酸を最終濃度が 5% になるように添加した。上清へ最終濃度が 25% となるようトリクロロ酢酸を添加し、析出した沈殿を乾燥後、0.9% 酢酸に溶解し、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて透析を行った。透析後、30–50 % で硫酸アンモニウム分画を行い、PSP 基質とした。

2-2-2: PSP 分解特性

PSP 基質溶液 100 μ l に 0.75 M Glycine 緩衝液 (pH 11.0) を 40 μ l および NAPase 溶液 10 μ L (2.4–0.048 mg) を添加し、30°C にて 10 分間インキュベート後、PMSF (最終濃度 1 mM) の添加および 100°C、5 分間の熱処理により反応を停止した。分解産物については、SDS-PAGE (15 %) にて分離後、recombinant PSP 抗体を用いた。ウエスタンブロッティング解析を行った。

2-2-3: PSP 分解産物の解析

PSP 基質 1 ml に 0.75 M Glycine 緩衝液 (pH 11.0) を 400 μ l および NAPase 溶液 100 μ l (24–0.48 μ g/ml) を添加し、30°C、10 分間インキュベート後、PMSF にて反応を停止させた。分解産物は Intersil C₁₈ (GL Sciences) カラムを用い、HPLC にて解析した。

3: 結果および考察

異常プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) に対する分解能を検討した結果、NAPase は 4 μ g 以上の酵素濃度にて PrP^{Sc} のバンドを消失させた (50°C、30 分間) (Fig. 1)。

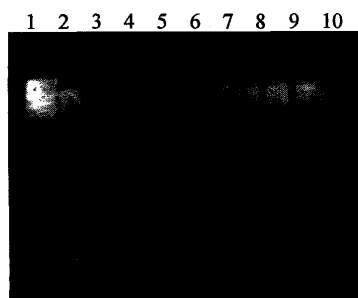


Fig.1 PrP^{Sc} 分解に与える酵素量の影響

Lane 1 : control ; lane 2 , proteinase K ;
lane 3-10 NAPase 酵素量 20 , 10 , 4 , 2 , 1 , 0.5 , 0.25 μ g

至適条件下 (60°C、pH 10.0) にて PrP^{Sc} 分解のタイムコースを解析した結果、3 分間で完全分解することが明らかとなった (Fig. 2)。

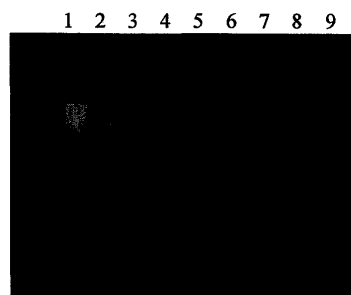


Fig.2 PrP^{Sc} 分解のタイムコース
Lane 1-10 : 0 , 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 10 , 30 , 60 min

豚肝臓より PSP の精製を行った結果、電気泳動的にほぼ単一の PSP (14 kDa) を得た。精製 PSP は、NAPase により分解されたが、PrP^{Sc} 同様に proteinase K では分解されないことが明らかとなった (Fig. 3)。

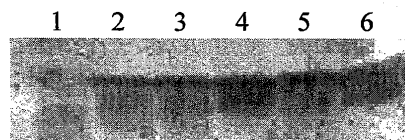


Fig.3 PSP 分解に与える酵素量の影響
Lane 1-6, NAPase 酵素量 24 , 4.8 , 2.4 , 1.2 , 0.96 , 0.48 μ g/ml

PSP 分解産物を HPLC により解析した結果、PSP の分解に伴って生じたペプチドフラグメントによるピークを得た (Fig. 4)。

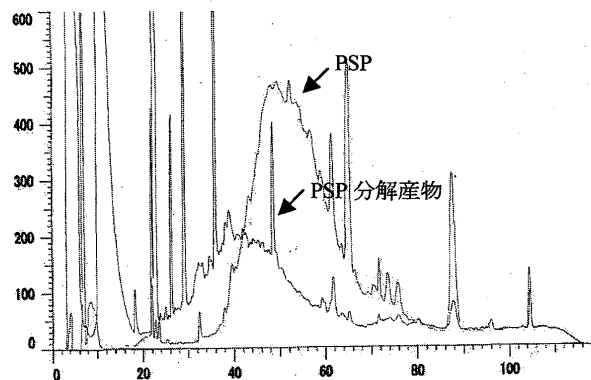


Fig.4 PSP 分解産物の HPLC 解析結果

今後は、今回得られた PSP 分解フラグメントの LC-MASS 解析を行うとともに、遺伝子工学的手法を用い、変異型 NAPase の特異性の解析を行い、異常プリオン分解酵素の作用機序を早急に明らかにしていく予定である。

参考文献

Mitsuiki S. *et al.* Purification and some properties of keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. TOA-1. *Biosci. Biochem. Biochem.* 2002; 66: 164-167.