

異常プリオンタンパクを 分解する酵素の探索

プリオン病研究センター安全性技術開発研究チーム長

村山 裕一

MURAYAMA, Yuichi



三千年以上も前に古代エジプト人によって作られたミイラには、毛髪や爪、皮膚が残っている場合が多い。これは、これら組織が非常に丈夫なタンパク質、ケラチンから形成されているためである。しかし、ミイラも土葬にふされると、骨だけになってしまう土地もある。土壌中にケラチンまでも分解する細菌が生息している場合である。このような細菌はプリオン病の原因タンパク質である異常プリオンタンパク（以下プリオンタンパク=PrP）をも分解できるのではないかと考えた研究者がいた。ノースカロライナ州立大学の J. C. Shih である。彼がバチルス菌から分離していたケラチン分解に関わる酵素（ケラチナーゼ、PWD-1）では、異常 PrP の分解に、100 度以上の熱処理を酵素処理に先立って施す必要があった。

異常 PrP は通常の滅菌処理や消毒薬では完全に分解できない。その不活化には、130 度以上の高温や強いアルカリ薬剤などで処理する必要があり、このような方法を屠畜場や医療施設の消毒に応用することはむずかしい。また、屠畜用器具や医療機器の消毒に用いると、機具が破損してしまい、二度と使えなくなってしまうかもしれない。タンパク質分解酵素を用いる方法の利点は、比較のおだやかな条件で分解できることにある。しかし、熱処理が必要な酵素分解法は利用面での問題を克服したとはいえなかった。

正常 PrP から異常 PrP に変わるとなぜ分解されにくくなるのか、その理由はタンパク質の構造が変化することにある。異常 PrP では、正常 PrP に

比べてらせん状の α ヘリックスと呼ばれる構造が減少し、分子が一定の構造に折りたたまれた β シートの割合が増加している。一方、羽毛に含まれる β ケラチンも β シート構造に富んでおり、このためタンパク質分解酵素の作用を受けにくくなっている。PWD-1 が異常 PrP に対して期待どおりの分解力を示さなかったのはそう不思議ではない。 β シートを多く含んでいてもケラチンと異常 PrP の構造や性質は異なっており、ケラチナーゼ活性が高いからといって必ずしも異常 PrP も分解できるとは限らないからである。しかし、ケラチン分解活性はよい指標になることは確かで、これをもとにバチルス菌を選べば異常 PrP に対して、より効果的に働く酵素が見つかるかもしれない。その可能性を Shih のデータは示していた。

2002 年の春、明治製菓株式会社との共同研究、「異常プリオン蛋白質分解活性を有する酵素生産株の探索」が始まった。明治製菓には多くの微生物がストックされており、そのストックからバチルス属をはじめ、ストレプトマイセス属の菌株を選び、スクリーニングを開始した。細菌の培養液とケラチンと色素の化合物を混合すると、培養液中に分泌された酵素によってこの化合物が分解され、色素が遊離してくる。この色素量を測定することによってケラチン分解能を調べ、菌株の評価を行った。その結果、ひときわ高いケラチン分解力をもつ酵素を産生する細菌株を見つけた。MSK103 という登録名をもつバチルス菌である。MSK103 由来の酵素のケラチン分解力は PWD-1 と比べても格段に



高かった。

次に、異常 PrP に感染したマウスの脳を用いて異常 PrP に対する分解力について調べた。比較的高いケラチン分解力を示した細菌培養液と脳乳剤を混合し、酵素処理を行った後、どの程度異常 PrP が分解されたかをウエスタンブロット法で評価した。その結果、MSK103 酵素液で処理した場合、異常 PrP のバンドがほとんど検出されないレベルまで分解されていることを明治製菓の三輪岳宏が見いだした。一方、PWD-1 を含め他の菌株由来の酵素を用いると、異常 PrP に特徴的なバンドが残っていた。何度か追試を行ったが結果は同じであった。MSK103 酵素では、PWD-1 とは異なり、異常 PrP の分解に事前の熱処理は必要なかった。MSK103 酵素は PWD-1 に比べてより強力な分解酵素であるかも知れない、と我々は考えた。

培養液に含まれる MSK103 酵素を精製し、酵素の特性や分解条件などについて分析を進め、2002 年秋、動衛研と明治製菓との共同で特許出願を行った。精製酵素を用いた解析でも、MSK103 酵素の異常 PrP 分解能力は PWD-1 よりもはるかに高かった。しかし、問題点も浮かび上がってきた。異常 PrP を十分に分解しようと酵素量をあげていくと、一定の酵素量以上ではむしろ異常 PrP が分解されなくなってしまったのである。これは酵素量が多くなると、酵素もタンパク質であるから自己消化されてしまうためであると考えられた。他のタンパク質分解酵素でも同様なことは見られるが、MSK103 酵素の場合、酵素活性がきわめて高く、自

己消化が起りやすい。共同研究の目標は異常 PrP 不活化酵素としての MSK103 酵素の実用化であるが、そのためには、この酵素で異常 PrP が完全に分解でき、感染性がなくなっていることを示さなければならない。しかし、精製酵素を用いてこれを証明するにいたっていない。

酵素の自己消化という問題は、培養液を凍結乾燥して得た酵素を用いることで解決できそうである。このような酵素標品では、精製酵素とは異なり、酵素以外のタンパク質も多く含んでおり、これが保護剤として働くらしく、高い力価の酵素量を用いても異常 PrP が分解されなくなるということはない。現在、異常 PrP の分解に最も適した酵素標品の作製法について検討しているところである。このほかにも実用化にあたってクリアしなければならない課題は多い。例えば、マウスやハムスターと同様、牛やヒトの異常 PrP も分解できるのか、酵素処理によって器具が清浄化されたかどうかをどのようにして評価するのか。酵素処理後どのように酵素活性を中和したらいいのか、酵素自体に安全性の面で問題はないのか、などである。また、不活化法の開発とともに、異常 PrP が完全に分解されたかどうか評価できる高感度な検出法の開発も必要になってくる。これらは表裏一体として開発すべき技術であると考えている。正直いって、今までが順調だっただけでこれからが大変だという思いが強い。しかし、サイは投げられたのである。残された課題の解決に努めていく。