

プリオン凝集体の代謝産物に着目した細胞機能制御

田中 元雅

理化学研究所 脳科学総合研究センター

1. 研究のねらい

プリオン病はこれまでに有効な治療薬のない神経難病であり、その治療・予防法の開発は、近年のウシからヒトへのプリオン感染からも、急務となっている。プリオン病は蛋白質が感染源であるという点でユニークであるが、同じプリオン蛋白質から異なる疾患症状を示す“プリオン株”が存在することが、その大きな特徴である。最近、プリオン感染がプリオン蛋白質の凝集体（アミロイド）に由来することがほぼ証明され、そのアミロイド構造が異なる表現型を示すプリオン株の物理的基盤になっていることが明らかになった。しかし、どのようなアミロイドの構造的、物理的特徴がプリオン株の異なる表現型を決定しているのかは、ほとんど理解されていない。同様に、同じモノマー状態のプリオン蛋白質から、どのようにして異なるアミロイド構造ができ、ひいては異なる表現型を導き出すのか、その分子機構の詳細には不明な点が多い。

本研究では、プリオン病におけるこれら重要な問題に対して、酵母プリオン[*PSI*]の系を用いる。プリオン化した酵母[*PSI*]は、酵母プリオン蛋白質 Sup35 の凝集形成によって生じ、ヒトのプリオン病と同様に、異なるプリオン株が出現する。その多様なプリオン株は、[*PSI*]の系では、白からピンク色の異なる色表現型で表される。酵母プリオンは扱いやすく、遺伝学的な解析も容易なこともあり、近年、プリオン研究の発展に多大な貢献をしてきている。本研究では、プリオンにおける重要な特徴の一つである“プリオン株”に着目し、酵母プリオン Sup35 モノマーから、凝集初期核（オリゴマー）、アミロイド、酵母表現型のグローバルな相関関係の全容解明を目指す。本研究成果は、プリオン病など蛋白質のミスフォールディングや凝集体形成に関わる他の神経変性疾患の分子機序解明や新規な治療法の開発にもつながると期待できる。

2. 研究成果

2-1) Sup35 アミロイドの特徴とそれが引き出すプリオン表現型との相関

これまでの研究から、Sup35 を 4 度で重合させた Sc4 アミロイドは、酵母のプリオン感染によって白色の[*PSI*]表現型を、一方で、37 度で重合させた Sc37 アミロイドはピンク色の[*PSI*]表現型を導くことが明らかになったが、その分子機構は不明である。白い表現型は、細胞内における Sup35 凝集体がより多いことを、一方で、ピンク色の表現型は、Sup35 凝集体が存在はしているが凝集量がより少ないことを示している。したがって、Sc4 アミロイドが白色のプリオン株を示す理由として、Sc4 アミロイドをもつ[*PSI*]酵母内において、その Sup35 アミロイド（凝集）量がより多くなる何らかの分子機構が存在すると考えられる。まず、これらプリオン株の解析から、異なる Sup35 アミロイド構造が異なる[*PSI*]表現型を導く分子基盤の解明を目指した。

プリオンの伝搬は、一般的に、プリオン凝集体の成長と分割という二つの基本的な過程の繰り返しによると考えられている。したがって、プリオン凝集体の成長速度と分割速度が細胞内プリオンの凝集量を制御する、ひいては細胞表現型を決定するパラメーターになる可能性がある。Sc4 アミロイドを感染させた白い[*PSI*]酵母では、Sup35 凝集体量がより多いことから、単純に、Sc4 アミロイドではアミロイドの成長速度が Sc37 アミロイドより速く、そのために細胞内の Sup35 凝集量が多くなり、白い表現型を示したのではないかと、という仮説をまず立てた。

そこで、上の仮説を検証するために、*in vitro* の系において、Sc4 アミロイドと Sc37 アミロイドの成長速度を原子間力顕微鏡を用いて測定した。その結果、予想とは反して、Sc4 アミロイドの成長速度は Sc37 アミロイドに比べて約 1/5 ほどに低下していることが明らかになった。この結果では、Sc4 アミロイドは弱い表現型（ピンク色）を示すはずであるが、実際はそうではない。そこで次に、細胞表現型を決定する二つめのパラメーターであると考えられる、アミロイドの分割速度に着目した。まず、*in vitro* におけるアミロイドの堅さ測定から、Sc4 アミロイドは Sc37

アミロイドに比べて脆弱である知見を得た。この結果は Sc4 アミロイドの分割速度がより速いことを示唆している。そこで、酵母内において、プリオン粒子の分割速度を測定したところ、Sc4 プリオン粒子は Sc37 プリオン粒子より速く分割されることが明らかになった。また、それが事実であれば、Sc4 プリオン粒子の細胞内におけるサイズは Sc37 プリオン粒子よりも小さいはずである。そこで、プリオン粒子の大きさをスクロース勾配実験やアガロースゲルを用いた電気泳動法で調べたところ、実際に Sc4 プリオンの粒子は Sc37 のプリオン粒子に比べてより小さいことが明らかになった。

Sc4 アミロイドが Sc37 アミロイドに比べてより脆い構造をとっていることは、これまでに得られているアミロイドの構造データによく一致している。アミロイド形成時にコアになるアミノ酸領域は、Sc4 では Sc37 に比べてそのコア領域が狭くなっていることが我々および他の研究グループの結果から明らかになっている。したがって、アミロイドのコアを形成するアミノ酸が少ないために、脆い Sc4 アミロイドは容易にシャペロンなどによって分断され、より多くの種を生じ、それがより多くの Sup35 モノマーをアミロイドへ取り込むことができるために酵母内での Sup35 凝集体量が増え、それによって白い[PSI⁺]表現型を出現させていることが明らかになった。

次に、上記の実験結果が理論的に妥当かどうかを調べるために、異なる表現型を示すプリオン株出現の解析モデルを構築した。プリオン凝集体の成長速度、分割速度、細胞の成長に伴うプリオン凝集体の希釈効果、Sup35 蛋白質の翻訳速度を考慮に入れ、定常状態における方程式から Sup35 アミロイドの成長および分割速度と細胞表現型の相関図を得た。この相関図によると、Sup35 の凝集量つまり細胞表現型は、Sup35 アミロイドの成長速度と分割速度でよく表されることを如実に示している。そこで、実験で得られた結果がこの相関図に当てはまるかを調べた。Sc4 アミロイドは Sc37 アミロイドに比べて成長速度は遅いものの、分割速度が Sc37 より速くなったために、ピンク色の Sc37 から白色になったと考えられた。このように、解析モデルは実験結果と非常に良い一致を示した。

2-2) 異なる構造をもつ Sup35 アミロイドを形成する分子機構の解明

次に、同じモノマー蛋白質が異なる Sc4 および Sc37 アミロイドという異なるアミロイド構造をもたらし分子機構について調べた。まず、Sup35 蛋白質のモノマー状態の構造の差異を分光学的に調べたが、温度に関わらず、不規則構造に富んでいることが明らかになった。しかしながら、フォールディングの度合いが4度と37度で異なることが、抗体との反応性の差から示唆された。

一方、異なる温度下において、Sup35 の会合状態に変化があるかをX線小角散乱法などで調べたところ、4度の Sup35 蛋白質は10-20量体からなるオリゴマーを形成していることが判明した。興味深いことに、そのオリゴマー形成は温度に依存し、37度ではモノマーのみが存在すること、そのオリゴマー形成は温度に対して可逆的であることが明らかになった(図1a)。また、そのオリゴマー形成の有無の境界となる温度を調べたところ、それは9-10度であった。

このオリゴマーがプリオン株の表現型に最終的にどのような影響を与えるかを明らかにするために、Sup35 を4-37度の様々な温度でアミロイド形成させ、そのアミロイドを酵母へプリオン感染させて、出現するプリオン株の表現型を解析した。その結果、9度以下で作成したアミロイドは主に白色の強いプリオン株を引き出し、10度以上で作成したアミロイドは主にピンク色の弱いプリオン株を引き出した。したがって、オリゴマー形成が、白色を示す強いプリオン株の出現と相関があることが明らかになった(図1b)。

次にオリゴマーが Sc4 アミロイドの形成途中(on pathway)に存在するかどうかを、プリオン感染実験で出現した強い/弱いプリオン株の比率に対する Sup35 蛋白質の濃度依存性の解析から検討した。その結果、明らかな濃度依存性が認められたことから、オリゴマーが Sc4 アミロイドの形成途中に存在することが明らかになった。そこで、このオリゴマーが連結して成熟したアミロイドになるのか、それがアミロイド形成の“足場”として働くだけであるかについて検討した。その結果、異なるアミロイド核存在下で生成したアミロイドがもたらすプリオン株表現型の解析から、オリゴマーはアミロイドの初期核の生成には必須であるが、その後のアミロイドの伸長には必要ないことが明らかになった。このことは、オリゴマーが連結してアミロイドになるというよりはむしろ、“足場”として、アミロイド伸長反応の場を与えていることを示唆している。

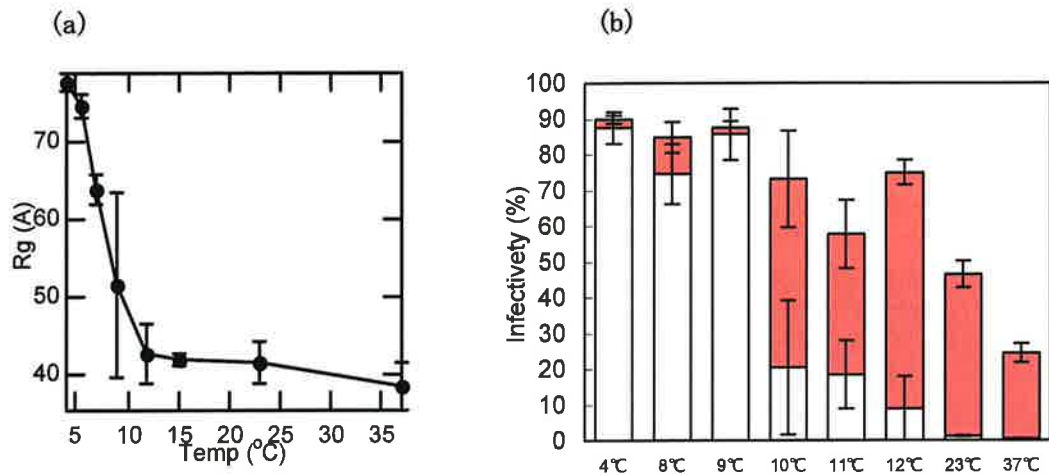


図1 オリゴマー形成は強いプリオン株をもたらす

(a)オリゴマー形成の温度依存性 (b)プリオン株表現型のアミロイド形成温度依存性 白、ピンク色はそれぞれ強い、弱いプリオン株の割合を示す。

実際に、オリゴマーの直径は 10-15nm であり、それは最終的に生成するアミロイドの直径 (4-5nm) と一致しないことも上記のことを支持する。また、このオリゴマーは、アミロイドに見られるようなβシート構造はほとんど含まず、モノマーに類似して、不規則構造に富んでいることが分光学的な解析から明らかになった。このことは、このオリゴマーが、βシート構造に富んでおり、アミロイドの直接的な前駆体としての“プロトフィブリル”とは異なる性質をもっていることを示している。以上から、Sup35 オリゴマーは、強い[PSI⁺]表現型を出すアミロイド形成途中において、その核形成に必須であり、その後のアミロイド伸長反応の足場として働いていることが明らかになった。

Sc4 アミロイドでは、Sup35 の最初の 35 アミノ酸がそのアミロイドのコアになっていることが報告されている。そこで、Sc4 アミロイド形成前に生成するオリゴマーも、そのような最初の 35 アミノ酸がコアになっているか検討した。アミノ酸を部位特異的にプロリンへ置換した Sup35 変異体を作成し、そのオリゴマー形成能を X 線小角散乱の強度を測定することで、オリゴマー形成に関わるアミノ酸領域を調べた。その結果、最初の 35 アミノ酸だけでなく、最初の 120 アミノ酸ほどの幅広いアミノ酸領域 (プリオンドメイン) が、また、特に、その中の数多くのチロシン残基がオリゴマー形成に深く関与していることが明らかになった (図 2)。

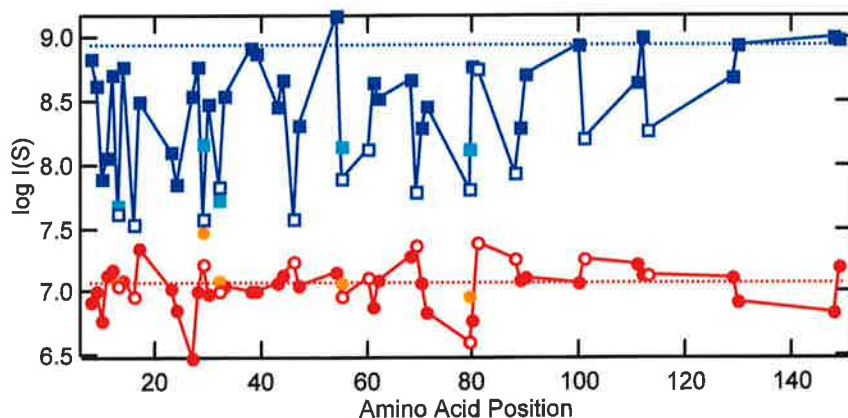


図2 オリゴマー形成に関わるアミノ酸の同定

X, Y 軸はそれぞれ X 線小角散乱強度、プロリンまたはロイシンへ置換したアミノ酸の位置を示す。青、赤はそれぞれ、4 度、37 度での測定結果を、白抜きは野生型 Sup35 においてチロシンが存在することを示す。シアン、オレンジは、それぞれ 4 度、37 度でのロイシンへの変異体の散乱強度を表している。青、赤の点線は、それぞれ、野生型 Sup35 の 4 度、37 度での散乱強度を示す。

一方、プリオンドメインにおいてトリプトファンを導入した変異体はオリゴマー形成を促進させたことから、芳香環のオリゴマー形成への役割が明らかになった。また、オリゴマーを増大させる変異体は、そのアミロイドを酵母へプリオン感染させると強いプリオン株を引き出し、オリゴマーを減少させる変異体は、そのアミロイドが弱いプリオン株をもたらしたことから、オリゴマー形成とプリオン株表現型との強い相関が再確認された。

さらに、オリゴマーのコアとなるアミノ酸領域を、蛍光分子でラベルした Sup35 蛋白質を用いて、その蛍光を測定することで調べた。その結果、アミロイドのコア領域(1-35 アミノ酸)とは全く異なり、80-110 番目のアミノ酸領域がコアになることが明らかになった。つまり、一見、アミロイド内には存在しないような非天然な相互作用を巧妙に利用することで、オリゴマー形成を促進させ、それによって、アミロイド生成を効率よく進行させていることが明らかになった。つまり、本結果は、Sup35 が核形成とアミロイドの伸長反応に必要なアミノ酸領域を蛋白質内でうまく使い分けることで、効率的にアミロイドを形成させていることを示している。

一方、Sc37 アミロイドを形成する場合は、上記に述べたように、4 度で観測されたようなオリゴマーは形成されず、Sup35 のモノマー蛋白質が構造変化し、それが“核”になってアミロイドが形成されていくことが示唆された。このように、37 度では、Sc4 アミロイドとは全く異なる経路でアミロイドが生成することが明らかになった。

以上、本研究によって、酵母プリオン[PSI⁺]の系を用いて、異なる表現型を示すプリオン株に着目することで、Sup35 モノマーから、凝集初期核(オリゴマー)、アミロイド、[PSI⁺]表現型のグローバルな相関関係の詳細を明らかにすることができた。このように、モノマー蛋白質の微妙な構造の違いが凝集初期核や凝集経路を大きく変え、異なるアミロイド構造、ひいては異なる[PSI⁺]表現型を引き出す基礎になっていることが明らかになった。したがって、モノマー蛋白質や凝集初期核の性質や構造が最終的な病理的結果へもたらす影響は非常に大きく、逆に、これらの制御が、原因蛋白質のアミロイド形成を伴う神経変性疾患の治療戦略を考える上で非常に重要であることが示唆された。

3. 主な発表

論文

- ・ Tanaka M, Collins SR, Toyama BH, Weissman JS, The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature*, 442, 585-589 (2006).
- ・ Krzewska J, Tanaka M, Burston SG, Melki R Biochemical and Functional Analysis of the Assembly of Full-length Sup35p and Its Prion-forming Domain. *J. Biol. Chem.*, 282, 1679-1686 (2007).
- ・ 田中元雅、プリオン病の感染・伝搬におけるプリオン仮説の現状、実験医学増刊号、脳神経疾患の分子病態と治療への展開、25, 115-121 (2007)
- ・ 田中元雅、酵母プリオン[PSI⁺]システムにおけるプリオン株出現の物理的基盤、細胞工学 2 月号、26, 145-150 (2007).

招待講演

- ・ 田中元雅、The physical basis of strain diversity in the yeast prion [PSI⁺] system、第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会合同大会、2007. 5. 28.
- ・ 田中元雅、酵母プリオンを用いたプリオン株出現の分子機構解明、第 8 回日本蛋白質科学会、2008. 6. 11.
- ・ 田中元雅、Molecular basis of prion strain phenotype in yeast prion、第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会、2008. 12. 10.

4. 受賞

- ・ 平成 20 年度文部科学大臣表彰若手科学者賞 (2008 年 4 月 15 日)