

論文の内容の要旨

論文題目 酵母プリオンを用いたプリオン伝播機構の研究

指導教官 大海 忍 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 原 英之

[1] 序論

プリオン病は、ヒト及び動物に見られる一群の伝染性神経疾患の呼称である。ヒトにおけるクルーザ（kuru）、クロイツフェルトーヤコブ病（Creutzfeldt-Jakob Disease; CJD）、ヒツジのスクレイピー（scrapie）、牛海綿状脳症（Bovine Spongiform Encephalopathy; BSE, 狂牛病）などがこれに含まれる。近年、欧州においては狂牛病の拡大、また日本においては、ヒト乾燥硬膜移植後の医原性 CJD が深刻な問題を引き起こしたが、プリオン病の発症には、不明な点も多く、治療法も確立していないため、この発症機構の解明は急務である。特に以下の 2 点は基礎医学的見地からみても重要な点だと言える。

- (1) プリオンが伝播する際に、正常型 PrP (PrP^c) から異常型 PrP (PrP^{Sc}) への PrP の立体構造変換が起きる
 - (2) プリオン感染（伝播）には、異種間（例えばヒトからマウス）のプリオン伝播は極めて効率が悪いが、同種間の伝播は高効率に起こるといふ「種の壁（species barrier）」が存在する
- 上記がプリオン病の特徴であるが、これらの現象の分子機構は現在においても全く不明である。

酵母は単細胞生物であり、神経も病原性のタンパク質も存在しないが、Sup35 と呼ばれるタンパク質が [PSI] というプリオン様の表現型を示すことが、よく知られており、プリオン病の分子レベルの研究において、極めて有力な研究材料として期待されている。Sup35 と PrP には以下の

ような共通点が存在する。

- (1) 細胞内でプロテアーゼ耐性の凝集体を形成すること。
- (2) コンゴレッドで特異的に染色される繊維を形成すること。
- (3) 配列の異なる異種タンパク質との間で感染性の障壁「種の壁」が存在すること。
- (4) その一次構造においてペプチドリピートを持つことである。

Sup35 はタンパク質合成の終結反応に関わる、全真核生物に保存されているペプチド鎖解離因子 eRF3 と呼ばれる必須タンパク質であり、プリオンを規定する領域は、N 末端に接続し、翻訳反応における翻訳終結活性制御スイッチを形成していることも興味深い。

本研究では、機能解明が遅れている、プリオン伝播現象における「種の壁」の分子機構解明を目指し、*S. cerevisiae* 由来の Sup35 を中心に用い「種の壁」を規定している部位、及びその反応機構を、遺伝学的・生化学的手法による解析から解明することを目的とした。

[2] プリオン伝播における「種の壁」に必要な領域の検索

これまでプリオン伝播に必須の部位に関する知見は、プリオン伝播そのものを実験系に用いてはならず、皆無に近い状態であった。本研究では新たに *S. cerevisiae* 由来の Sup35 (Sup35_{SC}) と *K. lactis* 由来の Sup35 (Sup35_{KL}) において、真のプリオン伝播性における「種の壁」を規定している領域を同定することを目的とする実験系を構築した。具体的には、Sup35 のいわゆるプリオンドメイン (1-112 残基) が、リピート領域 (42-112 残基) とそれに付随する領域 (1-41 残基) に分けられることに注目し (図 1)、その部位を組み換えたキメラ体を作製した。酵母近縁種間では、リピート領域が特に高い相同性を持つため、N 末端に付随する領域の機能性解明がプリオン伝播において鍵になると考え、Sup35_{SC} の N 末端 41 アミノ酸領域 (以後、NQ 領域; N-terminal Q-rich region) の役割には特に注目した。プリオン伝播検出系にはプラスミドシャッフリング法 (図 2) を用い、Sup35_{SC} からのプリオン伝播の可否についての評価を行った。

その結果、Sup35_{SC} から Sup35_{KL} へのプリオン伝播は完全に不可能であるにも関わらず、Sup35_{KL} の NQ 領域のみを *S. cerevisiae* の NQ 領域に置き換えると、「種の壁」を超えてプリオン伝播が可能になる

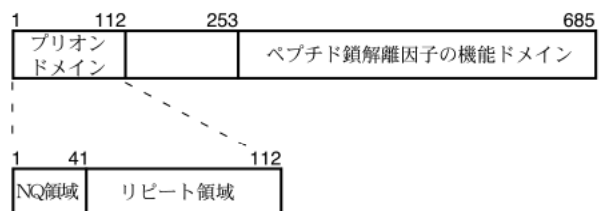


図1 *S. cerevisiae* の Sup35 の配列

ことを明らかにした。また、この NQ 領域の「種の壁」に対する役割の一般性を確認するために、近縁異種酵母である *C. albicans*、*C. maltosa*、*D. hansenii* のそれぞれの Sup35 についても、NQ 領域を Sup35_{SC} の NQ 領域に置き換えた株でも同様の性質を示すことに成功した。出芽酵母に近縁な種の Sup35 において、これまではその他の領域と未分離であった種の特異性を規

定する領域が特定されたことで、酵母 Sup35 以外のプリオンタンパク質全般においても NQ 領域に相当する種特異性機能領域が特定できる可能性が高まったと期待できる。

[3] プリオン伝播と共凝集の相同性と相違性

次に、特定した NQ 領域の性質を、旧来の研究での伝播性の評価の上で未分離であった、“準プリオン”状態における異種プリオンタンパク間相互作用という観点で検証した。Sup35_{SC} 由来の様々な長さのタンパク質と蛍光タンパク質 (GFP; Green Fluorescent Protein) とを融合させ、Sup35_{SC} がプリオン化した細胞内での融合タンパク質の挙動を調べた。この手法は、プリオン化した細胞内では、すでに Sup35_{SC} が凝集体を形成しているため、細胞内に蛍光タンパク質を融合させたタンパク質断片を発現させることによって、Sup35_{SC} の凝集体と異種タンパク質の“準プリオン状態”もしくは、“真の伝播によるプリオン化状態”における相互作用の有無を、実に簡便に測定することができる画期的なものである。すると、NQ 領域及び、リピート領域のみがそれぞれプリオン化した Sup35_{SC} と共に凝集体 (共凝集体) を形成することが明らかとなった (図 3)。この結果から、Sup35 同士はリピート同士の配列が同一であれば、両 Sup35 共存下において共凝集体を形成するが、さらにプリオン伝播を起こすためには、リピート領域に加えて NQ 領域の相互作用が必要であるということが明らかになった。

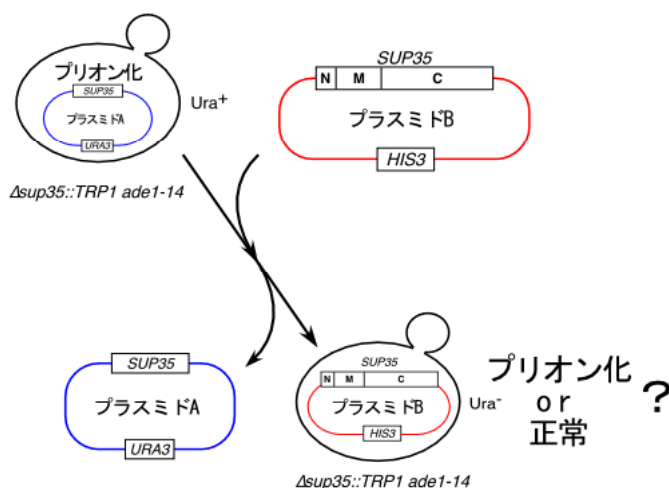


図2 プラスミドシャッフリングを用いたプリオン伝播検出系

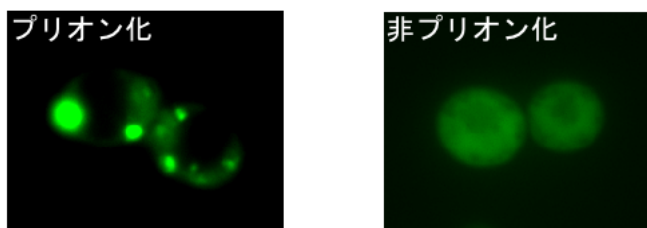


図3 蛍光タンパク質を利用した酵母プリオンの視覚化の位置と配列の重要性

ここまで、NQ 領域が「種の壁」を規定していることは明らかにしたものの、その反応の分子機構を理解するためには、NQ 領域のプリオン伝播における分子レベルの理解が必須であると考えられた。そこで、NQ 領域が N 末端に存在する意義と NQ 領域を構成する個々のアミノ酸の重要性について検討するために、Sup35_{SC} と Sup35_{KL} の NQ 領域の組み合わせ、4 種類すべてを、Sup35_{KL} の NQ 領域と置き換えた拡張体や NQ 領域に変異を入れた変異体を作製し、プリオン伝播の可否を検討した。その結果、NQ 領域は N 末端に存在することにより、プリオン伝播が可能となるという位置に関する情報が明らかになった。また、NQ 領域においては、チロシン (Tyr) がプリオン伝播において重要なアミノ酸として働いており、なかでも、その芳香族アミノ酸

としての特性が、プリオン伝播を可能にしていることが判明した。

以上の結果から、[PSI]の伝播において「種の壁」は、タンパク質から最も露出した N 末端に存在する NQ ドメインが、グルタミンに富んだ配列が形成する水素結合により、繊維状の構造を形成し、チロシンのスタッキング相互作用により、自己と他者の選別を行っていることが明らかになった。

[5] まとめ

本研究により *S. cerevisiae* の NQ 領域、中でもチロシンの芳香族アミノ酸としての重要性が明らかとなり、種の特異性を認識するアミノ酸の手がかりが得られた。また、プリオン伝播において、NQ 領域が種の特異性を決定しており、リピート領域はプリオンの維持に関与しているという機構を明らかにした。本研究の成果は「種の壁」を規定しているドメインのみならず、アミノ酸までも同定したことから、プリオン伝播における「種の壁」の分子機構の理解において大きな一歩となる。今後、明らかにされた領域をターゲットとし、化学架橋法による相互作用部位の詳細な決定等の実験によって、立体構造レベルでより高精度の分子間相互作用などが明らかにされることを期待できる。さらに、酵母プリオンをモデル研究として、ほ乳類プリオンのプリオン伝播の機構の解明から、プリオン病の治療・予防への発展が可能であると考えられる。