

## 論文内容の要旨

### 論文題目

酵母プリオン伝播を阻害する新規因子の探索と解析

(The molecular genetic study of novel antagonists of prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*)

氏名 石渡 昌雄

### 緒言

近年、BSEをはじめとしたプリオン病に非常に強い関心が集まっている。プリオンとはアミロイド線維状に凝集する感染性タンパク質である。このプリオンが脳内で凝集し、神経細胞がスポンジ状に変化する病気がプリオン病の特徴である。現在、プリオン病を治療する有効な手段は皆無であり、迅速な対応策が望まれている。出芽酵母にも哺乳類と同様なプリオン様の性質を示すタンパク質が数種類存在することが明らかになっており、その一つが翻訳終結因子の Sup35 である。Sup35 が凝集したプリオン型を [PSF] と表し、正常型を [psi] と表す。酵母を使ったプリオンの研究はマウス等をモデル生物とした研究よりも遺伝学的に容易かつ迅速な進行が期待できるため有用である。

当研究室で開発された、[psi] を効率良く選択する新しい系を利用して、[PSF] から [psi] へ過剰発現でプリオンを消失させる未知の因子を得るために、野生型酵母のゲノムライブラリーを作製し、スクリーニングを行った。取得した因子を詳細に解析することで、今までに明らかになっていないプリオン伝播機構解明につながる新たな知見を得るとともに、最終的には医学への応用・創薬という観点での哺乳類のプリオン病につなげるために研究を行った。

## 実験と結果

### I プリオン伝播阻害遺伝子の取得

酵母のゲノムの中から過剰発現すると[*PSF*]を回復させる因子を見つけるために、まずゲノムを *Sau3A*I で部分消化し、3~6kbp の部分を酵母内で多コピーに増えるベクターpRS423 (2 $\mu$ , *HIS3* マーカー) とライゲーションしてゲノムライブラリーを作製した。そのライブラリーと新選択系を使って[*PSF*]から[*psi*]に回復したものを選択した。本当に[*psi*]に変換されたのかを確かめるため、さらに完全培地の YPD 上でのカラーアッセイ ([*PSF*]は白色を示し、[*psi*]は赤色を示す) を行った。赤色を示したコロニーからプラスミドを回収し、挿入配列の塩基配列を決定したところ、4種類の遺伝子を取得した。本研究ではその中の一つである三量体 G タンパク質の $\gamma$ サブユニットをコードする *GPG1* を主として解析を行った。

次に未知因子の有効性の検証を酵母プリオン全般、そしてプリオン以外のアミロイド病へと広げた。まず他の[*PSF*]株、別の酵母プリオン株[*URE3*]、[*PIN<sup>+</sup>*]で検証したところ取得因子全てが有効であった。そこでプリオンと同様に凝集してアミロイドをつくるポリグルタミン (神経疾患であるハンチントン病の原因タンパク質) についても有効性を調べた。103 個のグルタミンが連続したポリグルタミン (Q103) は酵母内で過剰発現させると生育阻害を示すことが知られている。この系を利用して、取得因子を共発現させてプレート上での生育を観察したところ *GPG1* で毒性が抑えられた。また、Q103 の GFP 融合タンパク質でポリグルタミンの挙動を観察した。その結果 *GPG1* を共発現すると Q103 の凝集がなくなり、細胞質全体に拡散しているという興味深い結果が得られた。

### II Gpg1 の発現量と凝集能の検証

通常発現量を確認するため Gpg1 タンパク質を SDS-PAGE で分離し、Western Blot で検出した。その結果通常では Gpg1 は発現していないことがわかった。さらに *GPG1* の mRNA について Northern Blot を行った結果、この発現抑制が転写レベルの抑制であるということが判明した。また、Gpg1 を遠心によって分画したところ、そのほとんどが沈殿画分に移行し、非常に凝集しやすいタンパク質であることが明らかになった。

### III Gpg1 と Sup35 の酵母内における細胞内局在

[PSF]中で Gpg1-CFP と、Sup35 のプリオンドメインである NM ドメインの C 末端に YFP を付加させた NM-YFP を共発現させてそれぞれの細胞内局在を観察した(図 1)。その結果、Gpg1、NM ともに表現型は三日月形と dot 状の 2 種類見られ、その多くは一時的に細胞内で共局在することが判明した。このことから Gpg1 と Sup35 の間接的、あるいは直接的な相互作用が考えられる。

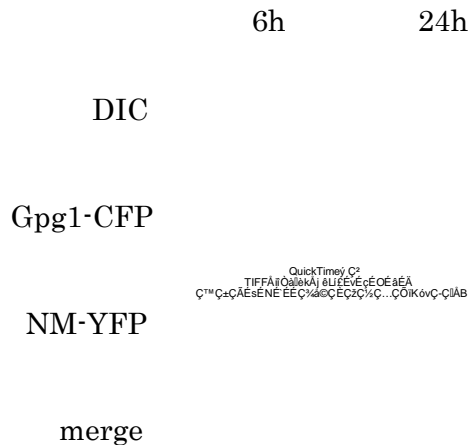


図 1

Gpg1-CFP と NM-YFP の酵母内での局在

銅イオンを加えてそれぞれの発現を誘導後 6 時間後と 24 時間後に観察した。6 時間後の表現型は三日月形(左)と dot 形(中央)の 2 種類が観察できた。また、24 時間後は NM は細胞質全体に拡散する。

### IV プリオン伝播阻害能の低下した *gpg1* 変異の解析

Gpg1 とプリオンとの相互作用部位の解明や、構造的解析を行うためにプリオン消失能の低下したミスセンス変異体をスクリーニングした。正確性の低い Taq ポリメラーゼを用いて PCR mutagenesis によって *GPG1* に変異の導入されたプラスミドを [PSF] に導入し、YPD 上で白くなるコロニーを探索した。最終的に、完全に YPD 上で白くなるコロニーから赤と白のヘテロな表現型を示すものまで 14 種類の 1 アミノ酸置換変異体を取得した。これらの変異体は [PSF] のみでなく、他の酵母プリオン株に対しても阻害能が低下した。

次に Gpg1 の配列の変異位置を構造的に検証した。Gpg1 のアミノ酸配列情報をもとに疎水性のプロットや、二次構造予測を行った結果、変異部位は比較的疎水性が高く、また、ほとんどの変異が  $\alpha$  ヘリックスに位置していることが判明した。さらに  $\alpha$  ヘリックスに存在する多くの変異が  $\alpha$  ヘリックスの同じ疎水性側面に位置しているという重要な知見が得られた。つまり、この部位がプリオンや、あるいはプリオン消失に関連する重要なタンパク質との相互作用部位である可能性が高いと考えられる。

## V トランス因子の解析

プリオン消失として既知の因子である Hsp104 と Gpg1 についての関連性を検証した。*HSP104* をノックアウトすると酵母プリオンが消失することが明らかになっている。このことを考慮に入れると、Gpg1 が Hsp104 の発現あるいは活性に負の抑制を行うためプリオンが消失するという可能性が考えられる。しかし、Gpg1 は Hsp104 の発現量、活性には影響を与えなかった。このことからプリオン伝播阻害機構の原因として Gpg1 は Hsp104 の阻害に働く可能性は低い。

Gpg1 は G タンパク質シグナル経路の構成因子であり、Gpg1( $\gamma$ ) と 3 量体を形成するパートナーとして Gpa2( $\alpha$ )、Gpb1( $\beta$ ) が知られている。Gpg1 によるプリオン消失能がこれらのパートナーの欠損によって影響を受けるのかどうかを調べた。[PSF] をもとに染色体上の遺伝子を破壊した *gpa2*  $\Delta$  株と *gpb1*  $\Delta$  株をそれぞれ作製した。これら両者の株は [PSF] を維持しており、これらの株において Gpg1 を過剰発現させて野生型の [PSF] と同様の消失能があるかどうかを検証した。その結果 Gpg1 は他の  $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニット欠損株でも野生型同様のプリオン消失能を有し、G タンパク質の複合体とは独立して Gpg1 単独でプリオン阻害に働くことが明らかとなった。

## 考察、展望

プリオン消失の原因の一つとして Gpg1 の過剰発現が *Saccharomyces cerevisiae* のグルコースシグナリング経路に影響を与え、下流のスイッチを on あるいは off にし、その結果間接的にプリオン伝播を阻害するというモデルが考えられる。しかし、*gpa2*  $\Delta$  と *gpb1*  $\Delta$  の両破壊株でもプリオン維持には影響がなく、Gpg1 によるプリオン阻害能にも影響は見られなかったことからこのモデルの成り立つ可能性は低い。しかし、Gpg1 と関連する因子が網羅的に解析されていないため、明らかになっていない新規シグナル経路の存在も考えられる。また、Gpg1 は通常発現されていないことが判明し、天然に存在するプリオン防御機構の存在も考えて、Gpg1 の発現が誘導される条件の検討が望まれる。

また、Gpg1 と Sup35 が共局在することや、プリオン消失のための重要な作用部位の存在も示唆された。Gpg1 とプリオンタンパク質が直接あるいは間接的に相互作用することが予想され、プリオン消失機構として、プリオンの伸長端に Gpg1 が結合し、不安定化することなどが考えられる。Gpg1 とプリオンタンパク質との *in vivo* や *in vitro* における相互作用の検証や、プリオン消失に関わる補因子の存在を考え、Gpg1 と相互作用する因子の探索が必要となる。