

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06621

研究課題名（和文）「PrPC PrPSc」変換機構とプリオン構築原理のヘリックスモデルからの解析

研究課題名（英文）Investigation of the folding mechanism of PrPC to PrPSc and assembly of prion agents, and interpretation of the of the beta helix scaffold model

研究代表者

萩原 健一（Hagiwara, Ken'ichi）

国立感染症研究所・細胞化学部・主任研究官

研究者番号：40192265

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：プリオン病（伝達性海綿状脳症）は、神経細胞に存在する正常型プリオン蛋白質（PrPC）の立体構造が何らかの原因によって別の形へ変わり、生じた異常型プリオン蛋白質（PrPSc）が凝集して、神経細胞が損傷する難病である。PrPScの立体構造はよくわかっていないが、興味深いモデル構造が提唱されている。本研究はモデルを念頭に、PrPScの立体構造を理解するための生化学実験を進めた。その結果、研究代表者が当初に有望であると推察したモデルは、実験結果に必ずしも合致しないことがわかった。また、PrPCのアミノ酸配列の一部を欠失させたPrPC改変体が凝集体を形成しやすいことを見い出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PrPScのヘリックスモデルを念頭に、PrPSc凝集体の構築原理を理解するための研究を進めた。その結果、実験データは想定したヘリックスモデルに必ずしも合致せず、むしろ、近年解明されつつあるPrPSc以外の蛋白質（シヌクレイン、TDP-43、など）の凝集体構造やPrPScの新たに提唱されているモデルに概して矛盾しないものとなった。想定に反する結果だが、新たな視点が開けた。また、凝集体を形成しやすいPrPC改変体を新たに見出し、この改変体はPrPScモデル構造研究への応用が期待できる。プリオン病の有効な治療薬の開発は容易ではないが、PrPScの構造研究はその道筋に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Prion diseases (transmissible spongiform encephalopathies) are fatal neurodegenerative disorders characterized by conformational changes of the normal form of prion protein (PrPC) in neuronal cells to disease-associated form(s) (PrPSc), and cause neuronal degeneration. The structural analysis of PrPSc has been hampered by its insolubility and infectivity, but recent technical advances in the analysis have led to proposal of several intriguing models. The aim of this study was to enhance our understanding of the model structures of PrPSc. Taking the proposed beta-helix model into account, a series of insertional and deletional mutants of PrPC were prepared and their compatibility with the model was examined. The interpretation of the results did not fully support the beta-helix model. The additional outcome was the finding of a truncated mutant that potentially formed proteinase K resistant aggregates.

研究分野：生化学

キーワード：プリオン アミロイド ヘリックス 蛋白質凝集 感染症

1. 研究開始当初の背景

プリオン病(伝達性海綿状脳症)は、ヒトといくつかの動物が罹患することが知られている神経変性難病である。健常個体の神経細胞などに発現している正常型プリオン蛋白質(PrP^{C})の立体構造が異常型(PrP^{Sc})へ変化し、生じた PrP^{Sc} が凝集体となって脳などの神経組織などに沈着・蓄積する。 PrP^{Sc} の蓄積とともに神経細胞は損傷・脱落するが、神経細胞死に至るメカニズムなど未解明な点が多い。

プリオン病の病原体は PrP^{Sc} 凝集体である、という考えは広く受け入れられている。 PrP^{C} の立体構造はNMR解析により決定されている一方、 PrP^{Sc} は、その不溶性や病原性が障壁となり構造科学の直接的なアプローチが難しい。しかし赤外分光分析による初期の解析から、 PrP^{Sc} は他のアミロイド凝集体と同様に β シートに富むことが指摘され、以来、*in silico*のシミュレーションによる複数のモデルが提唱されてきた。その後、本研究の開始以前にはクライオ電子顕微鏡による解析が試みられ、クライオ電子顕微鏡像から β ヘリックスを骨格とする PrP^{Sc} の3量体が推定モデルとして提唱された[Govaerts *et al.*, *PNAS*, 101, 8342 (2004)]。ポリグルタミン病の原因蛋白質がもつ polyQ 鎖などにも β ヘリックス骨格が予測されており、この β ヘリックスモデルは PrP^{Sc} 凝集体の推定構造について新たな示唆に富むものであり、その実験的な検証が待たれていた。

2. 研究の目的

蛋白質のフォールディングのうち、 β バレルと β ヘリックスは β シートの主鎖が‘らせん’を巻く。 β ヘリックスは、当初、非アミロイド性の蛋白質で発見されたが、その後、 β ヘリックス構造とアミロイド形成との関連が指摘されている[Hayward, *Proteins*, 85, 1866 (2017)]。例えば固体NMR研究から、糸状菌 *Podospora anserina* のプリオンの Het-s 蛋白質は β ヘリックスの重層体から成るアミロイド凝集体を形成することが明らかになった [Wasmer *et al.*, *Science*, 319, 1523 (2008)]。

本研究は、他の蛋白質の β ヘリックスを人為的に PrP^{C} へ導入した‘ PrP^{C} 改変体’を作製し、改変体の凝集性を調べ、 PrP^{Sc} の β ヘリックスモデルについて実証的な検証を進めることを目的とした。また、凝集体形成能が亢進した PrP^{C} 改変体、あるいは逆に PrP^{C} から PrP^{Sc} への変換を競合的に阻害するドミナント・ネガティブ活性を持つ改変体を検索することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究には、これまでに最も性状が調べられているマウス・プリオン蛋白質を用いた。 PrP^{Sc} の β ヘリックスモデルによると、図1の赤色の点線枠内のアミノ酸配列(Gly⁸⁹—Phe¹⁷⁴)が、 PrP^{Sc} では4層の β ヘリックスへ転換すると想定されている[Hagiwara *et al.*, *J Biochem*, 153, 139 (2013)]。そこで、マウス PrP^{C} の当該領域および近傍のアミノ酸配列を取り除き、代わりに PrP^{C} 以外の蛋白質で同定されている β ヘリックスを形成するアミノ酸配列を移植した改変体のcDNAを系統的に作製した。

具体的には、図1に示すように、マウス・プリオン蛋白質のcDNAに糸状菌のアミロイド形成性蛋白質 Het-s (PDB: 2KJ3)、大腸菌の非アミロイド性蛋白質の LpxA 蛋白質 (UDP-N-アセチルグルコサミン O-アシル転移酵素; PDB: 1LXA)、昆虫の不凍蛋白質 (PDB: 1LOS) が有する β ヘリックスのアミノ酸配列のcDNAを組み込み、哺乳動物細胞での遺伝子発現用ベクターを作製した。その際、置換されるマウス・プリオン蛋白質部分と移植断片のアミノ酸配列の相同性や長さを考慮して人為的改変をデザインし、また、人為的移植に対してはある程度の許容性があると先行文献 [Choi *et al.*, *Structure*, 17, 1014 (2009)] から予想した。さらに、 β ヘリックス移植体の他に、cross- β スパイン構造をとることが明らかになっている(あるいは示唆されている) α シヌクレイン (SNCA, PDB: 6A6B) や膵臓ラ氏島アミロイドペプチド (IPPP, PDB: 8R4I) のアミノ酸配

列、あるいは酵母のプリオンとして知られる Sup35 蛋白質のアミノ酸配列‘GNNQQNY’ (PDB: 2OMM) を移植した改変体 cDNA を作製した。また、マウス PrP^C のアミノ酸配列欠失体あるいはマウス配列をニワトリ・プリオン蛋白質のアミノ酸配列に置換した改変体 cDNA を作製した。

これらの改変体 cDNA をプリオン持続感染細胞 (ScN2a 細胞 [Butler *et al.*, *J Virol*, **62**, 1558 (1988)] や非感染細胞 (N2a 細胞) に発現させ、①どのような改変体ならば PrP^{Sc} 様の凝集体形成が亢進するか、②他の蛋白質に由来する β ヘリックス配列を移植しても PrP^{Sc} 様の凝集体が形成可能か、③PrP^C から PrP^{Sc} への変換を競合的に阻害するドミナント・ネガティブ活性を持つ改変体があるか、という点を検討した。凝集体形成は、PrP^{Sc} と同じくプロテアーゼ K による消化への抵抗性の有無により判定した。

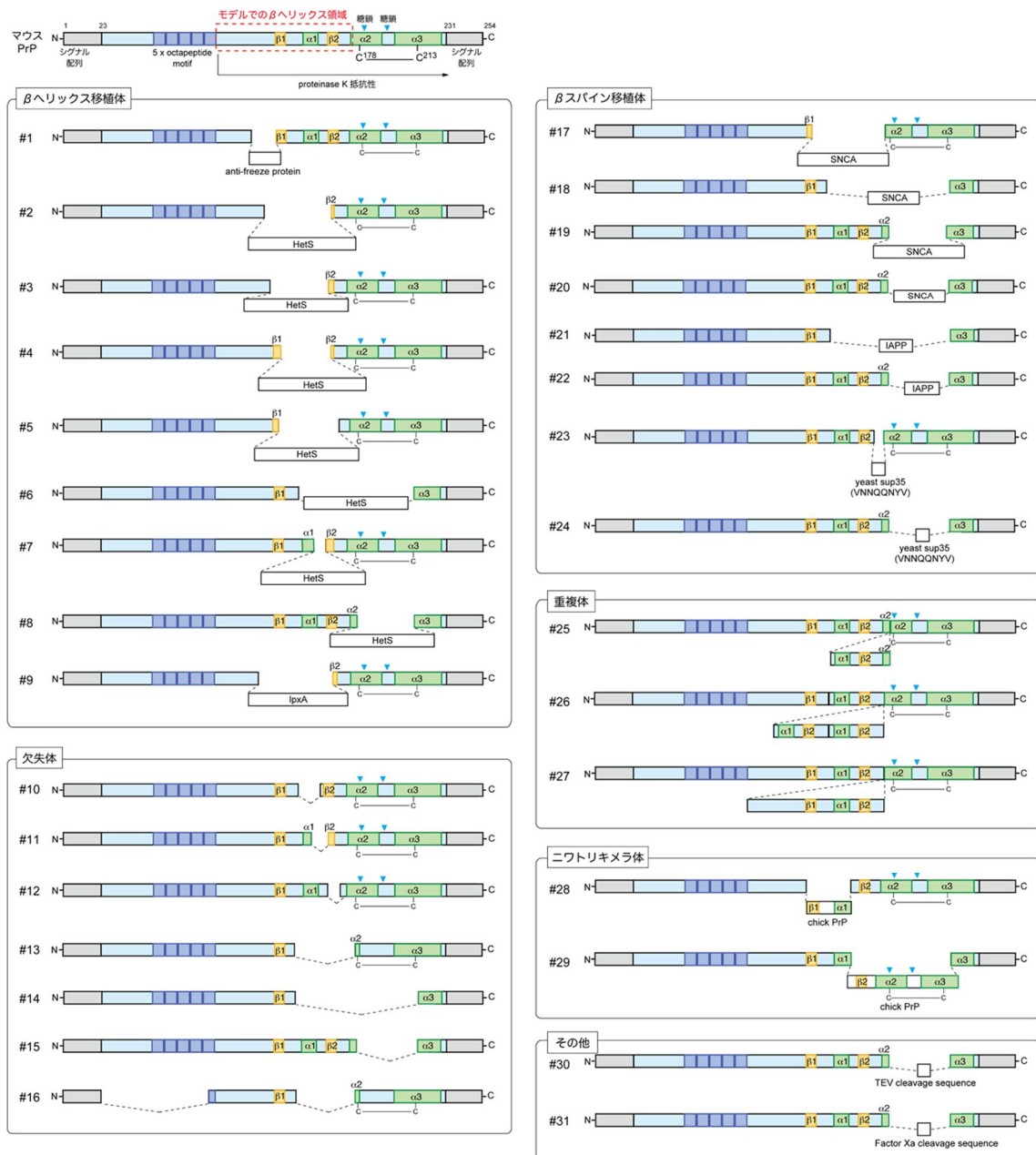


図1 マウス・プリオン蛋白質 (左上) および作製した改変体一覧

4. 研究成果

(1) プリオン持続感染細胞である ScN2a 細胞では、PrP^C から PrP^{Sc} への変換が恒常的に起きている。そこで図1に掲げる改変体 (β ヘリックス移植体、 β スパイン移植体、欠失体、置換体、

など)を ScN2a 細胞に発現させたところ、PrP^C の 112 から 155 番目のアミノ酸配列をニワトリ・PrP^C の 126 から 169 番目のアミノ酸を配列で置換したキメラ体 (図 1 #28) が、弱いながらプロテアーゼ K (PK) 消化に対する抵抗性を示した。また、PrP^C の 141 から 213 番目のアミノ酸配列を IAPP の cross-β スパイン配列 (20 アミノ酸) で置換した移植体 (#21) が PK 消化に対して比較的強い抵抗性を示したが、同じ部分を SNCA の cross-β スパイン配列 (32 アミノ酸) で置換した移植体 (#18) は PK により消化された。また先行研究において PrP^C の欠失体である #16 を ScN2a 細胞に発現させると PK 消化に対して抵抗性を示すことが報告されている [Muramoto *et al.*, *PNAS*, 93,15457 (1996)] が、本研究で作製した #14 が同様に PK 抵抗性を持つことを新たに発見した。また、#16 は N2a 細胞 (非感染細胞) に発現させても PK 抵抗性のアミロイド繊維状の凝集体を形成すると報告されているが、N2a 細胞に発現させた #14 も同様に PK 抵抗性を示した。#16 はアミロイド繊維状の凝集体を形成することが明らかにされており、#14 の形態解析は未だ進めていないが、おそらく #14 もアミロイド繊維状の凝集体を生じているのではないかと推定している。#16 は 'ミニプリオン' と命名され、プリオン研究における 1 つのモデル蛋白質としてこれまでに構造化学的な解析対象となっている。今回見出した #14 は、#16 よりもプリオン蛋白質の全長に近い長さであり、この分子の生化学・構造化学的な研究を今後進めたいと考えている。

(2) 一方、「PrP^{Sc} の β ヘリックスモデルを参考にして、他の蛋白質に由来する β ヘリックスをプリオン蛋白質へ移植した改変体は、凝集体を形成するのではないか」という本研究の当初の予想は、#1 から #9 の β ヘリックス移植体を調べた限り、PK 抵抗性は認められず、予想に対して否定的な結果となった。この点に関しては、本研究とは逆の発想から、大腸菌 LpxA 蛋白質の既知の β ヘリックス構造の一部を PrP^{Sc} の推定 β ヘリックス配列に置換した実験が行われている [Choi *et al.*, *Structure*, 17, 1014 (2009)] その実験では、LpxA 蛋白質の β ヘリックス構造の一部を PrP^{Sc} の推定 β ヘリックスのアミノ酸配列に置換しても LpxA 蛋白質の酵素活性は保たれ、このことから PrP^{Sc} の β ヘリックスモデルの妥当性を論じている。しかし、本研究の結果から、PrP^{Sc} 凝集体の構築・骨格は、研究代表者が本研究開始以前に予想していたほどには単純ではないことがわかった。

(3) 作製した一連の改変体の中に PrP^C から PrP^{Sc} への変換を競合的に阻害するドミナント・ネガティブ活性を持つものがあるかを調べたが、ドミナント・ネガティブ活性をもつ改変体は見つからなかった。

(4) 研究の途上で、当初の計画には無かった光架橋反応による PrP^{Sc} の解析を進めた。その結果、PrP^{Sc} のアミノ基側の領域 (マウス・プリオン蛋白質のアミノ酸配列のおよそ 90 ~ 110 番目) が PrP^{Sc} 単量体同士の境界面に位置するらしい、という実験結果を得た。この結果の解釈は難しいが、β ヘリックスモデルの立場をとるならば、この領域間に架橋が起こることは空間トポロジー的にやや無理があるのではないか思われた。

総括すると、本研究で得た実験結果は、上記 (2) (4) のとおり β ヘリックスモデル構造を全面的に支持するものではないと考察された。当初の想定に反する結果であるが、新たな視点が開けた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hagiwara Ken'ichi, Sato Yuko, Yamakawa Yoshio, Hara Hideyuki, Tobiume Minoru, Okemoto-Nakamura Yuko, Sata Tetsutaro, Horiuchi Motohiro, Shibata Hiroaki, Ono Fumiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Tracking and clarifying differential traits of classical- and atypical L-type bovine spongiform encephalopathy prions after transmission from cattle to cynomolgus monkeys	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0216807
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0216807	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okemoto-Nakamura Yuko, Tanida Isei, Yamaji Toshiyuki, Hanada Kentaro, Hagiwara Ken'ichi	4. 巻 2
2. 論文標題 A PRNP-disrupted human neuroblastoma cell line and its stable transformants expressing prion protein variants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 73-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpbreports.2.5_73	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Okudaira, T., Shibata, H., Tobiume, M., Nakano, N., Sato, Y., Hagiwara, K., Kimura, N., Hanari, K., Ogawa, H., Ohto, K., Terao, K., Sata, T. and Ono, F.
2. 発表標題 Elucidation of the mechanism of prion disease progression by comparison of histopathological lesions in transmission of atypical (L-type) BSE prions to cynomolgus macaques before and after the onset of the disease.
3. 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Classical型と非定型L型ウシ海綿状脳症プリオンを牛からカニクイザルへ伝播させた後の解析
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/virology/8900-virology-2019-7.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------