

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870009

研究課題名（和文） プリオン維持の細胞システム研究

研究課題名（英文） Cellular systems of prion maintenance

研究代表者

倉橋 洋史 (KURAHASHI HIROSHI)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：60508357

研究成果の概要（和文）：

感染性タンパク質であるプリオンは単細胞真核生物の酵母に存在する。本研究では、細胞がプリオンを維持するシステムを解明することを目的に、遺伝学的手法に優れている酵母を利用した。そして、酵母のプリオンの一つである[RN<sup>Q</sup>]の変異型が自己のプリオン維持を不安定にし、他のプリオンである[PSI<sup>+</sup>]を消失させることを明らかにした。さらに、[PSI<sup>+</sup>]プリオンの消失過程では、プリオンの凝集体サイズが大きくなることも解明した。

研究成果の概要（英文）：

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has prions that are infectious proteins. In this study, we isolated single-amino-acid mutations in *rnq1* which are defective in the stable maintenance of the [RN<sup>Q</sup>] prion and inhibit [PSI<sup>+</sup>] propagation. The majority of these mutated residues are mapped to the surface of contiguous  $\alpha$ -helices of the nonprion domain of Rnq1, suggesting its involvement in interactions with a prion or a factor necessary for prion development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：プリオン、アミロイド、蛋白質、酵母、感染症、脳神経疾患

## 1. 研究開始当初の背景

狂牛病等で知られるプリオンは、タンパク質のみで感染性を持つ特異な感染体である。その実体は、プリオンタンパク質 PrP が作る特殊な構造のアミロイド線維である。同様に単細胞真核生物の酵母にも、タンパク質のみで感染性を持つタンパク質、つまり酵母プリオンが存在する。酵母プリオンは、基礎研究材料として優れているため、普遍的なプリオン機構の解明に有用である。

プリオン研究の最大の謎は、仮想分子プロテイン X を始めとするプリオン形成・伝播システムの分子メカニズムにある。プロテイン X とは、哺乳類プリオンが感染性を持つために必要な構造変換因子として仮想されたものである。in vitro で合成されたプリオンタンパク質はアミロイド線維を形成することはできるが、感染性を持たない。従って、プロテイン X やプリオン形成・伝播システムに必須な宿主システムや因子を発見することが、プリオンを理解する上で最も重要である。

国内外の酵母プリオンの研究者は、長年この課題に取り組んできたが、分子シャペロン Hsp104 以外には明確な構造変換因子の候補は特定されていない。明らかに、従来の方法論では不十分であった。そこで、2007 年に私は新規因子を取得するべく、酵母のプリオン状態を識別する新しい手法を開発した。酵母がプリオンを維持していない時のみ生育する「non-Prion-selection 法」である。この方法によって、プリオン維持不能な酵母を容易に選択することが初めて可能になり、プリオン維持を阻害する因子（プリオン阻害因子）を網羅的に探索できるようになった。実際に、酵母ゲノムからプリオン阻害因子をスクリーニングした結果、Rnq1 $\Delta$ 100 と Gpg1 を発見することに成功した。

## 2. 研究の目的

本研究では酵母プリオン、及び、新たに得られたプリオン阻害因子を利用し、細胞内でプリオンが維持される分子メカニズムを解明することを目的とする。具体的には以下の2点である。

(1) 酵母プリオンの一つである [RNQ] は、Rnq1 タンパク質のアミロイド線維から形成される。そこで [RNQ] プリオン維持に重要な役割を担う Rnq1 タンパク質のアミノ酸残基や領域を決定する。

(2) Rnq1 タンパク質の N 末端 100 アミノ酸欠損型 (Rnq1 $\Delta$ 100) タンパク質は、過剰発現時に他のプリオンである [PST] プリオン維持を阻害する。しかし、この阻害機構は不明である。

そこで、機構解明に近づくために、[PST] プリオン阻害を引き起こす Rnq1 タンパク質が必要なアミノ酸残基を決定する。また、阻害メカニズムを明らかにするためにプリオン消失過程のプリオン動態を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) [RNQ] プリオン維持に必要なアミノ酸残基を特定するために、RNQ1 遺伝子にランダムな突然変異導入を行い、その遺伝子を発現させ、[RNQ] プリオンを消失した酵母をスクリーニングする。突然変異の導入は PCR 増幅によって生じるランダムな DNA 複製エラーを利用した。この PCR 産物と酵母発現用のベクターを同時に酵母に導入し、自発的に起きる細胞内の組換えによって、rnq1 突然変異を恒常的に発現させるようにした。そして、様々な rnq1 突然変異の中から、[RNQ] プリオン維持不能な酵母をスクリーニングした。さらに、その酵母からプラスミドを抽出し、rnq1 突然変異の位置を DNA シークエンス解析によって決定した。

(2) 過剰発現時に [PST] プリオン維持を阻害する rnq1 突然変異を取得するために、(1) の方法と同様に PCR 増幅によるランダムな突然変異導入を行った。そして、この PCR 産物と、酵母発現用のベクターを同時に酵母に導入し、rnq1 突然変異を ADH プロモーターによって過剰発現させた。さらに、様々な rnq1 突然変異の中から、[PST] プリオン維持不能な酵母をスクリーニングした。その後、その酵母からプラスミドを抽出し、rnq1 突然変異の位置を DNA シークエンス解析によって決定した。

また、rnq1 突然変異発現時に起きるプリオンの消失過程を調べるために、2通りの手段でプリオンの分子量を経時的に測定した。第1の方法は、生化学的アッセイでプリオンの凝集体が壊れない半変性条件で電気泳動を行い、数千キロダルトンの分子量をも分離できる SDD-AGE (Semi-Denaturing Detergent-Agarose Gel Electrophoresis) 法を利用した。第2の方法は、光学的手法を用いて生細胞の状態を観察した。プリオン形成タンパク質と GFP の融合タンパク質の発現状態で、蛍光相関分光法測定を行った。微小空間のみの蛍光を検出し、その強度や揺らぎから蛍光分子の大きさや数を測定した。

## 4. 研究成果

(1) [RNQ] プリオン維持不能な酵母をスクリーニングするためには、[RNQ] プリオン状態を簡便に検出するシステムが必要であるが、今までそのようなシステムは存在しなかつ

た。そこで、本研究では[*RNQ*]依存的[*PSI*]プリオン維持阻害因子である Rnq1Δ100 を利用して、[*RNQ*]プリオン状態の簡易検出システムを開発した。[*PSI*]プリオンは培地上のコロニーの色で簡便に区別できるが、この[*PSI*]プリオンを Rnq1Δ100 タンパク質が[*RNQ*]の時のみ阻害するため、[*RNQ*]状態をコロニーの色で判別することができる（このシステムは他の[*RNQ*]プリオン研究にも応用可能であり、今後、国内外の研究で利用されることが期待できる）。

[*RNQ*]プリオン維持が不安定になる *rnq1* 突然変異を上記スクリーニングにより取得し、突然変異の位置を決定したところ、Rnq1 タンパク質の N 末端領域に突然変異が集中していた（図 1 の黒字と緑字の突然変異）。Rnq1 タンパク質は C 末端側にグルタミン・アスパラギンリッチ(Q/N rich)なアミロイド形成領域を有することが知られているが、グルタミン・アスパラギンリッチでない(non-Q/N rich)非アミロイド形成領域である N 末端領域もプリオン維持に重要な役割を担うという興味深い知見が得られた。また、Rnq1 タンパク質の二次構造予測によると、突然変異は  $\alpha$ ヘリックス上に位置しており、プリオン維持に関わる因子がこの部位で Rnq1 タンパク質に作用している可能性が考えられる。

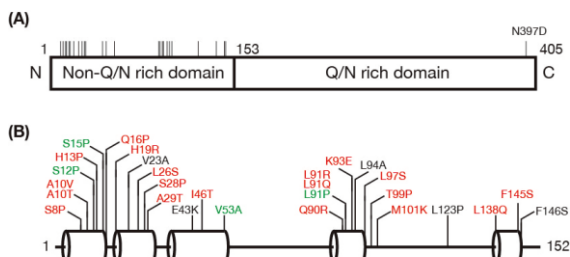


図 1 自己と他者のプリオン維持を阻害する *rnq1* 突然変異。(A) Rnq1 全長。N397D は自己プリオン維持を阻害する変異。(B) Rnq1 の非アミロイド形成領域。L94A を除く黒字と緑字は自己プリオン[*RNQ*]維持を阻害するスクリーニングとして取得された突然変異。赤字と緑字は他者プリオン[*PSI*<sup>+</sup>]維持を阻害するスクリーニングとして取得された突然変異。

(2) [*PSI*]プリオン維持阻害活性を有する *rnq1* 変異体を取得し、突然変異の位置を決定したところ、Rnq1 タンパク質の N 末端領域に突然変異が集中しており（図 1 の赤字と緑字の突然変異）、非アミロイド形成領域である N 末端領域が異種のプリオン維持に重要な役割を担うという興味深い知見が得られた。また、これらの突然変異は(1)の突然変異同様に、 $\alpha$ ヘリックス上に位置していた。さらに、これらの突然変異の中には(1)の実験で得られた突然変異が 4 種類含まれていた（図 1 の

緑字）。このことから、通常量の発現では自己の[*RNQ*]プリオン維持が不安定になる突然変異は過剰発現すると他者の[*PSI*]プリオン維持を阻害する可能性を考え、そこで、(1)の実験で取得された突然変異を過剰発現したところ、C 末端側の突然変異 N397D を除く全ての突然変異が[*PSI*]プリオン維持を阻害することが明らかとなった。また、逆に(2)の実験で取得された突然変異の中から 4 種類を選択して通常発現を行ったところ、[*RNQ*]プリオン維持が不安定になることが明らかとなった。

次に、SDD-AGE 法を用いて *rnq1* 突然変異発現時の[*PSI*]プリオンの動態を調べたところ、[*PSI*]プリオンが大きくなることが判明した（図 2）。蛍光相関分光法による解析でも同様に[*PSI*]プリオンの増大が見られた。また、酵母が分裂する際に、大きな[*PSI*]プリオンが母細胞に残り、娘細胞には[*PSI*]プリオンが存在していない細胞が観察できた。このことはプリオンの消失は娘細胞から始まることを示唆する。

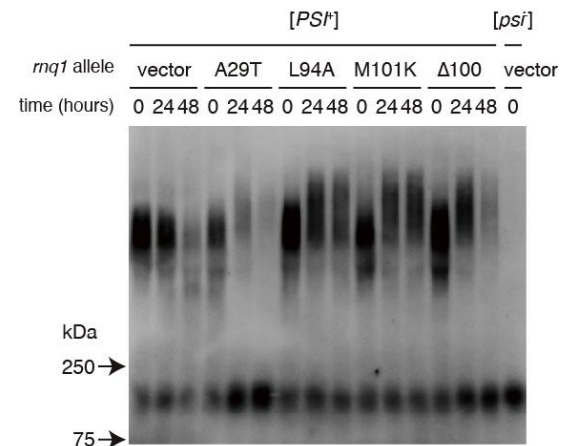


図 2 SDD-AGE 解析による *rnq1* 突然変異過剰発現時の[*PSI*]プリオン動態。*rnq1* 突然変異をガラクトース誘導系のプロモーターにより誘導発現し、0, 24, 48 時間後の細胞を回収、タンパク質を抽出し、SDD-AGE 解析を行った。

本研究課題によって、通常量の発現で自己の[*RNQ*]プリオン維持が不安定になる *rnq1* 突然変異が、過剰発現では他者の[*PSI*]プリオン維持を阻害することが明らかになった。この現象から、Rnq1 突然変異タンパク質が不安定な[*RNQ*]を維持するために[*PSI*]プリオンの維持に必要な宿主因子を奪うというモデルが考えられる。そして、Rnq1 突然変異タンパク質の相互作用因子を解析することにより、プリオン維持に必要な宿主因子の発見が期待できる。また、Rnq1 突然変異タンパク質により、プリオンが増大してから消失することが判明したことは、今後のプリオン病の治療開発に新たな戦略を導くだろう。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

(1) Hiroshi Kurahashi, Chan-Gi Pack, Shoichiro Shibata, Keita Oishi, Yasushi Sako, Yoshikazu Nakamura: [*PST*] aggregate enlargement in *rnq1* non-prion domain mutants, leading to a loss-of-prion in yeast. *Genes Cells*, 16:576-589 (2011) 査読有

(2) Shoichiro Shibata\*, Hiroshi Kurahashi\*, Yoshikazu Nakamura: Localization of prion-destabilizing mutations in the N-terminal non-prion domain of Rnq1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prion*, 3: 250-258 (2009) 査読有 (\* equal contribution)

[学会発表] (計7件)

(1) 大石 圭太, 倉橋 洋史, 中村 義一: 出芽酵母のプリオン動態における Q/N-rich 領域の“二重人格性“. BMB2010, 2010年12月9日(神戸)

(2) Hiroshi Kurahashi, Shoichiro Shibata, Yoshikazu Nakamura: LOCALIZATION OF AMYLOID-DESTABILIZING MUTATIONS IN THE N-TERMINAL DOMAIN OF RNQ1 IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE. The 4th International Symposium of Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, 2010年12月1日(大津)

(3) Keita Oishi, Hiroshi Kurahashi, Yoshikazu Nakamura: A novel prion antagonist in yeast. A FEBS Advanced Lecture Course: Analysis and Engineering of Biomolecular Systems, 2010年9月13日(Island of Spetes, Greece)

(4) Chie Arai, Hiroshi Kurahashi, Keita Oishi, Yoshikazu Nakamura: The mechanism of yeast prion elimination. A FEBS Advanced Lecture Course: Analysis and Engineering of Biomolecular Systems, 2010年9月13日(Island of Spetes, Greece)

(5) Hiroshi Kurahashi, Shoichiro Shibata and Yoshikazu Nakamura: Alterations in predicted  $\alpha$ -helices of non-prion domains of Rnq1 affect homologous and heterologous prion propagations in yeast. The 3rd International Symposium on Protein

Community, 2010年9月13日(奈良)

(6) 倉橋 洋史, 柴田勝一郎, 中村 義一: Rnq1 の非プリオンドメインの変異は、同種と異種のプリオン維持阻害を引き起こす. 第10回日本蛋白質科学会年会, 2010年6月18日(札幌)

(7) Shoichiro Shibata, Hiroshi Kurahashi, Yoshikazu Nakamura: Localization of prion-destabilizing mutations in the N-terminal non-prion domain of Rnq1 in *Saccharomyces cerevisiae*. 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月10日(横浜)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉橋 洋史 (KURAHASHI HIROSHI)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号: 60508357