

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770219

研究課題名（和文） プリオンを制御する細胞システムの解析

研究課題名（英文） Cellular systems regulating prion propagation

研究代表者

倉橋 洋史（KURAHASHI HIROSHI）

東北大学・大学院医学系研究科・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も存在する。本研究では、細胞がプリオンを制御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、Rnq1のN末端領域の変異体、mRNAの成熟化や分解に関わるLsm4タンパク質、膜輸送タンパク質Dip5の変異体が、酵母プリオン[*PSI⁺*]を消失させることが判明した。*get3*変異体とGFP融合タンパク質の局在解析から、Dip5変異タンパク質が小胞体に局在することがプリオン消失に重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has prions that are infectious proteins. In this study, we found several proteins inhibited [*PSI⁺*] prion propagation. Some of them were *rnq1* N-terminal mutant proteins. Furthermore, Lsm4, which is one of Lsm proteins and involved in mRNA splicing and mRNA decay, also inhibited prion propagation. The others were C-terminal truncated transporter mutant proteins such as Dip5. The Dip5 mutant protein localized to ER. The localization and inhibition of prion propagation by Dip5 mutant protein were disturbed in *get3* mutant, suggesting that localization of the mutant proteins to ER is involved in prion elimination.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：プリオン、アミロイド、膜タンパク質、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。酵母がプリオンを保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、プリオン保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、プリオンを消失させる因子（プリオン消失因子）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消失因子を探索した結果、Rnq1Δ100 と Gpg1 を発見することに成功した。

2. 研究の目的

プリオンの形成・伝播の分子メカニズムは、まだ明らかにされていない部分が多い。プリオンの基礎研究材料として有用な酵母プリオンを利用して、プリオン制御に働く遺伝子の分子メカニズムを解析することと、新しい遺伝子を発見して、その遺伝子を解析することで、プリオンを制御する細胞システムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 過剰発現時に [PSI⁺] プリオン伝播を阻害する *rnq1* 突然変異を既に取得しており、その阻害動態を調べるために2通りの手段でプリオンの分子量を経時的に測定する。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、数千キログルトンの分子量をも分離できる SDD-AGE (Semi-Denaturing Detergent-Agarose Gel Electrophoresis) 法を利用する。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う。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する。

(2) 「non-Prion-selection 法」を用いて、プリオン伝播を負に制御する新しい遺伝子を発見する。ウラシル合成経路の酵素の一つをコードする *URA3* 遺伝子にナンセンス変異を持ち、且つ、酵母プリオン [PSI⁺] を持つ細胞に過剰発現系酵母遺伝子ゲノムライブラリーを導入する。[PSI⁺] プリオンが消失する酵母は、機能する *URA3* 遺伝子産物を持たないため、正常なウラシル合成を行える酵母に有毒な 5FOA 培地上で生育することができる。この培地で生育する細胞を選択し、その細胞が持つプラスミドを回収、挿入されている遺

伝子を DNA シーケンス解析によって明らかにする。

そして、その遺伝子産物のプリオン消失効果のあるドメインの決定、アミロイド形成能や細胞内局在を調べる。その他に、ストレスの有無や変異体の解析を行う。

4. 研究成果

(1) Rnq1 突然変異体発現時の [PSI⁺] 動態解析
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。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。

(2) プリオン消失因子の発見

non-Prion-selection 法を用いたスクリーニングを行うことにより、Lsm4 タンパク質と異常型膜タンパク質群 (Dip5, Mup1, Ptr2, Sit1 の変異タンパク質) が酵母プリオンの消失因子であることを明らかにした。Lsm4 タンパク質は mRNA のスプライシングや分解に関わる。また、異常型膜タンパク質は Dip5, Mup1, Ptr2, Sit1 の C 末端側が欠損している上、82 アミノ酸残基分のベクター配列が付加されている。この4個のタンパク質はいずれも複数回膜貫通型タンパク質であり、本来は細胞膜に局在している膜輸送タンパク質である。

(3) Lsm4 のプリオン消失活性ドメインの決定

Lsm4 の N 末端側は mRNA の成熟化、分解に関わることが知られている。C 末端側はグルタミンとアスパラギンに富み、アミロイド形成能を持つ。Lsm4 の N 末端側のみと、C 末端側のみを発現させたところ、C 末端側のみでプリオンを消失したため、プリオン消失には C 末端領域が重要であることが判明した。また、Lsm4 がアミロイドを多く作るほど、プリオン消失活性が強いことから、Lsm4 のアミロイドがプリオン消失に働くことが示唆された。

(4) Lsm4 発現時の [PSI⁺] 動態解析

蛍光相関分光解析から、Lsm4 の発現後にプリオンが親細胞内で肥大化し、娘細胞に伝達できなくなる伝播阻害が起きていることが明らかとなった。

(5) 他の Q/N-rich タンパク質のプリオン消失能解析

グルタミン (Q)、アスパラギン (N) を豊富に

含むタンパク質は[*PST*]プリオンを誘導する Pin⁺([*PST*] inducible)活性がある。Lsm4 もその一つである。Pin⁺活性を持つ他のタンパク質もプリオン消失活性があるか調べたところ、弱いながらも、10種類中7種類がプリオンを消失させることが判明した。このことから、Q/N-richタンパク質がプリオンの発生誘導と消失の両方を引き起こすことが示唆された。

(6) Dip5 変異タンパク質のアミノ酸透過機能解析

プリオン消失能を持つ Dip5 変異タンパク質が Dip5 本来の機能であるアミノ酸透過機能を有するか確認するために、トランスポーター解析を行った。その結果、Dip5 変異タンパク質にはアミノ酸透過機能を持たないことが判明した。

(7) Dip5 変異タンパク質の細胞内局在

Dip5 の正常型タンパク質は本来、細胞膜に局在している。変異型の局在を調べるために、GFP との融合タンパク質を発現させて、局在を調べた。その結果、Dip5 変異タンパク質は細胞膜には存在しなく、細胞内に存在していた。この細胞内局在がどの細胞小器官と一致するか調べるために、各種細胞小器官マーカーと共局在性を確認したところ、Dip5 変異タンパク質は小胞体に局在することが判明した。

(8) Dip5 変異タンパク質のストレス誘導

Dip5 変異タンパク質が小胞体に局在するので、Dip5 変異タンパク質が異常な立体構造をとって小胞体ストレスを起こしていることが予想された。そのため、小胞体ストレスマーカーを利用して、小胞体ストレス応答を調べた。しかし予想に反して、Dip5 変異タンパク質発現時には小胞体ストレスが起きていなかった。次に熱ショック応答が起きているか調べたところ、弱いながらも応答が起きていることが判明した。

(9) *get3* 変異体における Dip5 変異タンパク質の細胞内局在

GET 経路は TA 膜タンパク質の膜挿入に重要な役割を持つことが知られている。この GET 経路の一つの遺伝子、*GET3* の破壊株において Dip5 変異タンパク質の局在を調べたところ、小胞体への局在が乱れ、細胞質に点在していた。また、*get3* 破壊株において、Dip5 変異タンパク質はプリオン消失活性を失った。このことから、Dip5 変異タンパク質が小胞体に局在することがプリオン消失に重要な役割を持つことが示唆された。また、GET 経路は TA 膜タンパク質だけではなく、複数回貫通型膜タンパク質の膜挿入に必要であることも

示唆された。

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4件)

(1) Keita Oishi, Hiroshi Kurahashi, Chan-Gi Pack, Yasushi Sako, Yoshikazu Nakamura: A bipolar functionality of Q/N-rich proteins: Lsm4 amyloid causes clearance of yeast prions. *MicrobiologyOpen*, 印刷中 (2013) 査読有 doi: 10.1002/mbo3.83.

(2) Chie Arai, Hiroshi Kurahashi, Masao Ishiwata, Keita Oishi, Yoshikazu Nakamura: Clearance of yeast prions by misfolded multi-transmembrane proteins. *Biochimie*, 95:1223-1232 (2013) 査読有 doi: 10.1016/j.biochi.2013.01.009.

(3) Hiroshi Kurahashi, Keita Oishi, Yoshikazu Nakamura: A bipolar personality of yeast prion proteins. *Prion*, 5:305-310 (2011) 査読有 doi: 10.4161/pri.18307.

(4) 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 doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01511.x.

[学会発表] (計9件)

(1) 大石 圭太, 倉橋 洋史, 白 燦基, 佐甲 靖志, 中村 義一: Q/N-rich 蛋白質の二重人格性: Lsm4 による酵母プリオン消失現象の機序解析. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日(福岡)

(2) Hiroshi Kurahashi, Katsumi Doh-ura: Applicational research from yeast prion to mammalian prion with Gpg1 and Rnq1Δ100 that inhibit propagation of yeast prion. Asian Pacific Prion Symposium (APPS) 2012, 2012年7月29日(横浜)

(3) Keita Oishi, Hiroshi Kurahashi, Chan-Gi Pack, Yasushi Sako, Yoshikazu Nakamura: Lsm4 is a general prion inhibitor in yeast *Saccharomyces*

cerevisiae. 第12回日本蛋白質科学会年会, 2012年6月22日(名古屋)

(4) Chie Arai, Masao Ishiwata, Keita Oishi, Hiroshi Kurahashi, Koichi Ito, Yoshikazu Nakamura: A yeast membrane perturbation selected as loss-of-prion mutants induces heat shock response and ER stress. 第12回日本蛋白質科学会年会, 2012年6月20日(名古屋)

(5) Hiroshi Kurahashi: Anti-prion genes in yeast. FURANO CONFERENCE "Advanced Bioregulation and RNA", 2012年3月6日(富良野)

(6) Hiroshi Kurahashi, Chan-Gi Pack, Shoichiro Shibata, Keita Oishi, Yasushi Sako, Yoshikazu Nakamura: 酵母における *rnq1* の非プリオンドメインの変異は[*PST*]プリオン凝集体を増大してプリオン消失を引き起こす. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月16日(横浜)

(7) Hiroshi Kurahashi, Chan-Gi Pack, Shoichiro Shibata, Keita Oishi, Yasushi Sako, Yoshikazu Nakamura: [*PST*] aggregate enlargement in *rnq1* nonprion domain mutants, leading to a loss of prion in yeast. Asian Pacific Prion Symposium (APPS) 2011, 2011年7月10日(軽井沢)

(8) Keita Oishi, Hiroshi Kurahashi, Yoshikazu Nakamura: Lsm4p is a novel anti-prion agent in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. RNA 2011 Kyoto, 2011年6月17日(京都)

(9) Chie Arai, Hiroshi Kurahashi, Yoshikazu Nakamura: A novel epigenetic regulation of yeast translation termination factor (eRF3) prion. RNA 2011 Kyoto, 2011年6月17日(京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉橋 洋史 (KURAHASHI HIROSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 60508357