

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03476

研究課題名（和文）高速原子間力顕微鏡によるプリオン立体構造変換反応のリアルタイム観測

研究課題名（英文）Real time imaging of prion conversion process using atomic force microscopy

研究代表者

桑田 一夫（Kuwata, Kazuo）

岐阜大学・大学院連合創薬医療情報研究科・教授

研究者番号：00170142

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）：高速原子間力顕微鏡を用い、プリオンの異常化過程を、リアルタイムかつ単分子立体形状レベルで解析した。まず正常型プリオンの立体構造が、ユニークではなく、オリゴマーを含むことを明らかにした。また、プリオン蛋白質が、シヌクレインと相互作用し、安定な二量体を形成することが明らかとなった。このことは、シヌクレインが、プリオン蛋白質の異常化を抑制する可能性を示している。また、プリオン蛋白質を、PMCA法を用い、プリオンの異常化を進めたところ、モノマーからオリゴマーに至る多彩な構造を示し、明確な感染性のある異常型構造においても、その構造は必ずしもユニークではなく、その形状が分布している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プリオンが発見されてから、40年経つが、プリオンの感染性構造は、未だに明らかにされていない。それはプリオンは水に溶けない、結晶化できないなど、これまでのタンパク質の構造解析では取り扱えないという方法論的な問題のためである、と考えられて来た。そこで我々は、分子一つ一つを直接、しかも水和した自然な状態で観測できる原子間力顕微鏡を用いて、プリオンの構造解析に挑戦した。その結果、プリオンは正常構造も異常構造も、モノマーからヘキサマーにまで分布していることが分かった。また、シヌクレインなどの他のタンパク質と相互作用することにより、安定なヘテロダイマー構造を撮ることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：High speed atomic force microscopy was applied to the elucidation of the pathogenic transformation process of a prion protein. Firstly we clarified that the normal prion protein structure is not unique but distributes from monomer to oligomer conformation. Secondly we found that normal prion protein interacts with the alpha-synuclein, and forms the stable hetero-dimer. Finally using PMCA method, we found that the generated abnormal structures distributes from monomer to hexamer. Interestingly monomer has a head and tail conformation, and interacts each other via tail structure, forming a interprotein network. Intriguingly, Hexamer also has a head and tail structure. These findings will help the elucidation of the final pathogenic structure of a prion.

研究分野：生物物理学

キーワード：プリオン 原子間力顕微鏡 異常型構造 オリゴマー シヌクレイン 感染性構造 安定2量体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クロイツフェルト・ヤコブ病の原因となる感染性タンパク質であるプリオンは、発見されてから約 40 年経つが、未だにその感染性立体構造が明らかになっていない。その原因は、プリオンが水に溶けず、また結晶化もしないため、従来の構造解析手法 (NMR、X 線解析) が適用できないためである。水に溶けなくても結晶化しなくても構造解析を行える方法として単粒子解析があるが、電子顕微鏡法では乾燥下で測定を行うため、試料調整段階で構造が変化してしまう。特にプリオンは、プリオン蛋白質の単量体ではなく、オリゴマーから多量体までの凝集体であると考えられることから、試料調整や構造測定ともに、凝集状態に摂動を与えない水和状態で実施出来るものでなくてはならなかった。

2. 研究の目的

高速原子間力顕微鏡を用い、水和状態において、プリオンの凝集状態に摂動を与えない方法で、その構造解析を行う。また、近年 PMCA 法の開発により、正常型プリオン構造が異常化するのに、プリオン蛋白質のみで良いことが判明した。従って正常型プリオンが、どのような相互作用を経て感染性構造に変化するのか、そのプロセスを視覚化し、リアルタイムで構造変化過程を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

まず、ペプチドの凝集過程を、高速原子間力顕微鏡を用いて、明らかにする。

次に、正常型プリオンの立体構造を、高速原子間力顕微鏡を用いて求める。正常型プリオンの立体構造は、NMR や X 線回折で、構造が解かれており、それと比較する。これにより、正常型の特性も、同時に解明することが出来るだろう。

次に、感染性プリオンを、PMCA 法を用いて増幅し、増幅された感染性プリオンの立体構造を求める。また、正常型プリオンがどのような相互作用を経て、異常型プリオンに至るのかを、自然な反応過程を追いかけることにより、リアルタイムで明らかにすることが出来る。

4. 研究成果

正常型プリオンは、NMR や X 線回折では単量体として、その立体構造が決定されていた。しかしながら、高速原子間力顕微鏡でみると、正常型においても、単量体からオリゴマーまで、分布していることが分かった。したがって、NMR や X 線回折で得られていた構造は、単量体からオリゴマーまでの、複数のヘテロな構造の平均値であることが判明した。実際、ヘテロな正常型プリオンに対して、シヌクレインの単量体を加えると、ヘテロダイマーとなることが分かった。このダイマーは、凝集せずに、均一な構造を形成した。

次に、PMCA 法を用い、感染性構造を生成し、その構造解析を実施した。その結果、感染性構造は、オリゴマーを形成しており、主に 6 量体であることが判明した。

正常構造のプリオンは、オタマジャクシ様の構造をしており、頭部は C 端、尾部は N 端であった。これらは、尾部で相互作用し、相互作用ネットワークを形成した。このネットワーク的相互作用により、モノマーからオリゴマーへの成長が見られた。興味深いことに、この尾部構造は、6 量体においても存在しており、さらなる進化が可能となると考えられた。

尾部構造は、基本的にランダムなペプチド鎖であり、しっかりした立体構造を有する頭部構造とは、大きく異なる。このようなランダム構造は、特定の構造に接触すると、容易に構造を変えることができる。またランダム構造どうしが相互作用することにより、背後にある頭部構造の情報のある意味で伝達しあうことが可能となるだろう。より安定で強固な凝集体をできるだけ早急に作る事が出来れば、ユビキチンシステムにトラップされるのを防ぐことが出来るだろう。ランダム構造どうしがネットワークを作成することにより、これらの情報伝達がより組織的に行うことが出来、より頑丈で素早い凝集体形成が可能となる。ユビキチンシステムによる分解圧がかかった状態で、このような凝集体最適化システムが働けば、より強固な凝集体が出来上がるだろう。

プリオンの感染性は、時間とともに強くなるという、いわゆる、感染性の凝縮、または感染力の進化が観察されている。上記のようなメカニズムで形成された感染性構造は、ユニークである保証はなく、むしろ反応時間に依存した中間構造である可能性が高い。ある意味では、タンパク質のフォールディング反応に似ている。

NMR や X 線回折で決定された立体構造は、ユニークな単量体であることを仮定した平均構造に過ぎない。実際は、反応時間に依存した中間体のアンサンブルであるというのが、蛋白質の立体構造の真の姿であろう。

プリオンの立体構造も、基本的にユニークネスが保証されないものである。オリゴマーに含まれる単量体の数に分布があるためである。また、それぞれのオリゴマー構造はユニークというよりも、ユビキチンシステムによる分解圧の下で最適化された中間体に過ぎない。一つ一つのオリゴマーの立体構造を解明することは、大変興味深いものであるだろうが、それらの平均構造は、意味

のないものであろう、と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Satoshi Yamashita, Yuji O Kamatari, Ryo Honda, Ayumi Niwa, Hiroyuki Tomiata, Akira Hara, Kazuo Kuwata	4. 巻 15
2. 論文標題 Monomeric β -synuclein (S) inhibits amyloidogenesis of human prion protein (hPrP) by forming a stable S-hPrP hetero-dimer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Prion	6. 最初と最後の頁 37-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19336896.2021.1910176.	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 Toshinobu Shida, Yuji O Kamatari, Takao Yoda, Yoshiki Yamaguchi, Michael Feig, Yumiko Ohhashi, Yuji Sugita, Kazuo Kuwata, Motomasa Tanaka	4. 巻 16
2. 論文標題 Short disordered protein segment regulates cross-species transmission of a yeast prion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature chemical biology	6. 最初と最後の頁 756-765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-020-0516-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Jussara Amato, Tsukasa Mashima, Yuji O Kamatari, Kazuo Kuwata, Ettore Novellino, Antonio Randazzo, Concetta Giancola, Masato Katahira, Bruno Pagano	4. 巻 30
2. 論文標題 Improved Anti-Prion Nucleic Acid Aptamers by Incorporation of Chemical Modifications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acid Ther.	6. 最初と最後の頁 414-421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/nat.2020.0899.	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 該当する
1. 著者名 Yamaguchi K, Kamatari YO, Ono F, Shibata H, Fuse T, Elhelaly AE, Fukuoka M, Kimura T, Hosokawa-Muto J, Ishikawa T, Tobiume M, Takeuchi Y, Matsuyama Y, Ishibashi D, Nishida N, Kuwata K	4. 巻 3
2. 論文標題 A designer molecular chaperone against transmissible spongiform encephalopathy slows disease progression in mice and macaques.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Biomed Eng	6. 最初と最後の頁 206-219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41551-019-0349-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kakuda K, Niwa A, Honda R, Yamaguchi KI, Tomita H, Nojebuzzaman M, Hara A, Goto Y, Osawa M, Kuwata K.	4. 巻 165
2. 論文標題 A DISC1 Point Mutation Promotes Oligomerization and Impairs Information Processing in a Mouse Model of Schizophrenia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 369-378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy116	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 Shirasaka M, Kuwata K, Honda R.	4. 巻 521
2. 論文標題 -Synuclein Chaperone Suppresses Nucleation and Amyloidogenesis of Prion Protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 259-264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.10.120.	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------