

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657070

研究課題名(和文) 酵母プリオン研究に立脚した非伝播性アミロイドのプリオン化

研究課題名(英文) Mechanism underlying difference between transmissible and nontransmissible amyloids

研究代表者

田口 英樹 (Taguchi, Hideki)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：40272710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：プリオンのタンパク質としての実体はアミロイド凝集体であるが、プリオンが通常のアミロイドとちがうのは伝播性にある。つまり、ポリグルタミン病などの一般のアミロイドでは伝播(感染)性はない(とされている)。では、伝播性アミロイドであるプリオンと非伝播性アミロイドは分子レベルで何が違うのであろうか？ 私たちは、ポリグルタミンとプリオンの違いを出芽酵母をモデル生物として解析した。その結果、ポリグルタミンはプリオンとなるタンパク質よりも、アミロイド凝集が大きくなる傾向が強いこと、ポリグルタミンをプリオンにするペプチドが存在することもわかった。

研究成果の概要(英文)：The yeast prions are protein-based heritable elements, such as [PSI<sup>+</sup>]. N-terminal domain of Sup35 (Sup35N), the amyloids of which is the [PSI<sup>+</sup>] determinant, contains a glutamine and asparagine (Q/N)-rich sequence. When Sup35N is replaced with a polyglutamine (polyQ) stretch the polyQ-replaced Sup35 (polyQ-Sup35) forms amyloids in cells, but cannot be inherited as a prion. Since the mechanism underlying the difference remains to be elucidated, we explored the dynamics of both amyloids in single living cells. Single-cell imaging revealed that the visible large aggregates of polyQ-Sup35 fused with GFP maintained their sizes during cell growth. In addition, polyQ-Sup35 had an increased tendency to form aggregates compared to Sup35N. Then we searched peptides that convert polyQ-Sup35 from nontransmissible to transmissible amyloids when flanked with polyQ region, and identified at least 20 prionized peptides. PolyQ-Sup35 attached with the prionized peptide diffused faster in cells.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、構造生物科学

キーワード：酵母プリオン

## 1. 研究開始当初の背景

プリオンはタンパク質性の感染因子である。プリオンの概念は、羊のスクレイピーの感染機構を説明するために Prusiner が提唱した概念に端を発する。しかし、出芽酵母にもプリオンのような挙動をするタンパク質が複数あることがわかり、プリオンの概念は普遍的なものとなってきた。哺乳類プリオン・酵母プリオンともにタンパク質としての実体は分子間 $\beta$ シートで線維を形成したアミロイド凝集体である。そのような観点から、プリオンはアミロイドの一種であるが、プリオンが通常のアミロイドとちがうのは伝播性にある。この伝播性のために哺乳類プリオンは感染し、酵母プリオンはタンパク質性の遺伝因子となりうる。一方、ポリグルタミン病などの一般のアミロイドでは伝播(感染)性はない(とされている)。

では、伝播性アミロイドであるプリオンと非伝播性アミロイドは分子レベルで何が違うのであろうか? このちがいを理解することはプリオン現象の本質の解明のみならず、ポリグルタミン病などに代表されるアミロイドーシスがなぜ非感染性であるかの理解にもつながると期待できる。

ここで私は、既知の酵母プリオンがいずれもアミノ酸配列内にグルタミン(Q)かアスパラギン(N)が豊富な領域を持つこと、すなわちポリグルタミンによく似ていることに着目した。例えば、酵母プリオンの代表である Sup35 のプリオン決定ドメインは実に半分ほどのアミノ酸が Q/N である。実際、Sup35 のポリグルタミン類似性に着目して Sup35 のプリオンドメインをポリグルタミンに置換した研究が既に行われている (Osherovich, L. et al., *PLoS Biol.* 2004)。その研究によると、ポリグルタミン置換体は酵母内でアミロイドを形成するが、そのアミロイドは細胞間を伝播しないことが遺伝学的にわかっている。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、私たちが確立した酵母細胞内でのプリオン動態を調べる研究 (Kawai-Noma, et al, *Genes Cells*, 2006, 2009, *J. Cell Biol.* 2010) を軸としてポリグルタミンが伝播しない分子機構を明らかにするとともに、ポリグルタミンを伝播性にするペプチド(「プリオン化」ペプチド)の探索をすることで、プリオンとポリグルタミンの伝播性の差異の本質に迫ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 【研究1】

伝播性 Sup35 と非伝播性ポリグルタミンの酵母内での動態の差異の解明。

酵母プリオンの Q/N リッチな性質のポリ

グルタミンへの類似性を元に、代表的な酵母プリオン Sup35 の Q/N リッチ領域をポリグルタミンに置換する研究がなされている。例えば、Sup35 のポリグルタミン置換体 (Sup35-polyQ) は酵母内で凝集体を形成するものの遺伝学的にはプリオン表現型が伝播しない (Osherovich, L. et al., *PLoS Biol.* 2004)。しかし、Sup35-polyQ の細胞内での存在状態やタンパク質動態・構造は全く不明である。

そこで本研究では、私たちがこれまでに Sup35 で確立してきた酵母細胞内でのプリオンの動態の解析法、細胞内でのアミロイド凝集の電顕での構造 (図2、Kawai-Noma, et al, *Genes Cells*, 2006, 2009, *J. Cell Biol.* 2010, Tsuji et al, *BBRC* 2011) を存分に活かして、Sup35-polyQ の細胞内での性質を調べる。これにより、ポリグルタミンが酵母内でなぜプリオンとして伝播しないのかを分子レベルで理解できる。

具体的には、生きた酵母内で Sup35-polyQ の GFP 融合体 (Sup35-polyQ-GFP) の動態を 1 細胞経時観察法や蛍光相関分光法 (FCS) で調べる。

### 【研究2】

ポリグルタミンに伝播性を付与する「プリオン化」ペプチドのスクリーニング

出芽酵母内でポリグルタミン (PolyQ97) に Sup35 の機能ドメイン (MC) を融合したタンパク質はアミロイドを一時的に形成するものの、継代すると消失、すなわち伝播しないことが知られている。そこで、PolyQ97 と MC ドメインの間に酵母遺伝子ライブラリーの配列 (X) をランダムにつなげ、プリオンとして伝播する配列をスクリーニングする。スクリーニングは Sup35 の機能ドメインがアミロイドを伝播しているときだけ生育できる表現型スクリーニングを活用する。

このスクリーニング系で取れてきた X 配列は、非伝播性のアミロイド(ここではポリグルタミン)を伝播性に変えるので、「プリオン化」ペプチドと呼ぶ。

ペプチドが取れてきた後に以下の解析を行い、プリオン化ペプチドの最小配列、非伝播性アミロイドをプリオン化した分子機構を調べる。

- ・プリオン化ペプチドの部位特異的変異、トランケート作成によるプリオン化ホットスポットの同定と最短配列の決定。

- ・プリオン化ペプチドがポリグルタミンをプリオン化する理由として、Sup35 プリオンの伝播に必須のシャペロン (Hsp104) との相互作用が関連している可能性が指摘されている。そこで、ポリグルタミンと Hsp104 との相互作用を、蛍光タンパク質を使った *in vivo*、組換えタンパク質を用いた *in vitro* の両面から調べる。

以上の解析により、伝播するプリオンと非

伝播アミロイドのちがいを浮き彫りにすることでタンパク質科学の異端であるプリオンの理解につなげる。

#### 4. 研究成果

##### 【研究 1】

伝播性 Sup35 と非伝播性ポリグルタミンの酵母内での動態の差異の解明。

生きている出芽酵母細胞内での Sup35-polyQ-GFP の動態を FCS で解析した。[1 細胞経時観察法] Sup35-polyQ-GFP は酵母細胞内で直径数  $\mu\text{m}$  に及ぶ大きなドット状の凝集体を形成する。これはポリグルタミンを持たない Sup35-GFP で形成されるドット状凝集体と形状的には同等である。1 細胞経時観察法でドット凝集体の経時変化を観察したとき、Sup35-GFP ではドット状凝集体が徐々に小さくなって、最終的には細胞質全体に GFP 蛍光が拡散するのに対して、Sup35-polyQ-GFP ではドット状凝集体の大きさは時間が経っても変化せず維持されることがわかった。

[蛍光相関分光法 (FCS)] 続いて、FCS にてより詳細に GFP 融合タンパク質の動態を解析した。

FCS 解析の結果、Sup35-polyQ-GFP は、Sup35-GFP と比較して、細胞内でより大きな凝集体を形成する傾向が強いことがわかった。また、プリオンの伝播に必要な親細胞から娘細胞への伝播が、Sup35-polyQ-GFP では、Sup35-GFP より効率が悪いことも明らかとなった。

過去の私たちの Sup35-GFP の細胞内動態解析の結果 (Kawai-Noma et al., *Genes to Cells* 2006, 2009) から、Sup35 がプリオンとして細胞間を伝播していくためには、凝集の形成と脱凝集が平衡、すなわち、動的であることが必要であることを見出している。ポリグルタミンを含んだ Sup35 ではこの平衡が凝集形成の方向に偏っているために、ドット状凝集体の大きさに変化が見られず、親細胞から娘細胞へも伝播しにくくなっており、そのために、ポリグルタミンはプリオンとして伝播できないと考えられる。

##### 【研究 2】

ポリグルタミンに伝播性を付与する「プリオン化」ペプチドのスクリーニング

ポリグルタミンに「プリオン」的な性質を付与する配列を探索したところ、予備的なスクリーニングだけで 10 種類以上のプリオン化ペプチド配列が同定された。このプリオン化ペプチドは最小 11 アミノ酸長からなり、酵母全ペプチドのアミノ酸含有率に比べて疎水性アミノ酸が多いという特徴をもっていたが、特有なアミノ酸配列モチーフは見出

せなかった。このプリオン化ペプチドを導入した Sup35-polyQ-GFP にて、研究 1 で行ったようなタンパク質の細胞内動態を解析し。その結果、プリオン化ペプチドを含む Sup35-polyQ-GFP は Sup35-GFP と同様の性質、つまり、ドット状凝集体が小さくなる、凝集と脱凝集の平衡が凝集形成に偏っていない、という性質をもつことがわかった。

酵母プリオンの伝播にはシャペロン Hsp104 が必須であるので、プリオン化ペプチドと Hsp104 は親和性を調べたところ、プリオン伝播の度合いとプリオン化ペプチドと Hsp104 との親和性には相関があることがわかった。この結果、ポリグルタミンにプリオンの性質を付与した要因として、Hsp104 との親和性の上昇が考えられた。

#### 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 7 件) (全て査読有り)

1. Ohta, S., Kawai-Noma, S., Kitamura, A., Pack, C-G., \*Kinjo, M. & \*Taguchi, H.: The interaction of Hsp104 with yeast prion Sup35 as analyzed by fluorescence cross-correlation spectroscopy., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 442, 28-32 (2013)

2. Yamakawa, K., Furuki, T., Furuta, T., Hatanaka, R., Kikawada, T., Niwa, T. Taguchi, H., Furusawa H., Okahata, Y., and Sakurai, M.: Experimental study on the mechanism underlying the anti-aggregation function of a group3LEA peptide., *Cryobiol. Cryotechnol.* 59, 95-99 (2013)

3. Biswas, S., Kinbara, K., Niwa, T., Taguchi, H., Ishii, N., Watanabe, S., Miyata, K., Kataoka, K., \*Aida, T.: Biomolecular Robotics for Chemomechanically Driven Guest Delivery Fueled by Intracellular ATP., *Nature Chemistry* 5, 613-620 (2013)

4 \*Nojima, T., Konno, H., Kodera, N., Seio, K., Taguchi, H. and Yoshida, M.: Nano-scale alignment of proteins on a flexible DNA back-bone., *PLoS One* 7, e52534 (2012)

5. Nojima, T., Ikegami, T., Taguchi, H. and Yoshida, M.\*: Flexibility of GroES mobile loop is required for efficient chaperonin function., *J. Mol. Biol.* 422, 291-299 (2012)

6. Niwa, T., Kanamori T., \*Ueda, T., \*Taguchi, H.: Global Analysis of Chaperone Effects Using a Reconstituted Cell-Free Translation System., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 8937-8942 (2012)

7. \*Fujiwara K, Taguchi, H.: Mechanism of

methionine synthase overexpression in chaperonin-depleted *Escherichia coli.*, *Microbiology* 158, 917-924 (2012)

〔学会発表〕（計 10 件）（招待講演のみ）

1. Taguchi, H.: Non-amyloid oligomer-based phenotype switch in yeast Sup35. 65<sup>th</sup> Mosbacher Kolloquium on Molecular quality control in health and disease. Mosbach Germany (2014)

2. Taguchi, H.: The chaperonin GroEL and its substrates: key features that define the GroEL dependency, Protein Folding, in and out of Anfinsen's closet, Arolla, Switzerland (2014)

3. 田口英樹: 酵母プリオンの恒常性維持機構: 第 65 回 日本細胞生物学会大会シンポジウム「プロテオスタシス: 細胞内タンパク質の恒常性 (オーガナイザー: 田口英樹、稲葉謙次)」2013.6.19-21 ウィンク愛知 (名古屋)

4. 田口英樹 蛋白質フォールディングの「理想」と「現実」: 凝集形成とシャペロンの役割: 第 13 回 日本蛋白質科学会 公募型シンポジウム, 2013.6.14 鳥取

5. Taguchi, H.: In vivo structure and dynamics of yeast prion protein: SPIE 2013: Nano-Bio Sensing, Imaging & Spectroscopy., 2013.2.20-22 Jeju-do, Korea

6. Taguchi, H.: In vivo structure and dynamics of yeast prion Sup35. 1st Bioscience and Biotechnology International Symposium: Biomolecular assemblies from Nano to Micro., 2013.1.30 Tokyo Institute of Technology

7. 田口英樹: 蛋白質ワールドの理想と現実: シャペロンの細胞内での役割: 大阪大学蛋白研セミナー「分子シャペロンの機能発現の新展開と細胞制御」2012.11.15-16 大阪大学

8. 田口英樹: 酵母プリオンの細胞内での構造と伝播機構 大阪大学蛋白研セミナー「神経科学と構造生物学の融合研究会」2012.10.4-5 大阪大学

9. Taguchi, H.: Global analyses of protein aggregation and chaperone effects: SFB 3<sup>rd</sup> International symposium "Molecular Machines in Protein Folding and Protein Transport" 2012 年 7 月 23 日~25 日 Munich, Germany

10. 田口英樹: 大腸菌のシャペロニン GroEL の細胞内での役割: 日本蛋白質科学会年会ワークショップ「ここまでわかったシャペロニン: 作動機構と細胞内での役割」2012.6.20-22

名古屋国際会議場

〔図書〕（計 1 件）

田口英樹 「学んでみると生命科学はおもしろい」 (ベレ出版) 2014年、231p

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

該当無し

○取得状況（計 0 件）

該当無し

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.taguchi.bio.titech.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田口英樹 (TAGUCHI, Hideki)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号: 39172121