

酵母プリオン線維の構造と成長機構

田口 英樹（東大・新領域、JST さきがけ）

ある学会のシンポジウムで我々の酵母プリオンの研究を紹介したら、発表直後に「酵母にもプリオンがあるっていうのは本当ですか？記事にしたいので、ぜひ取材させてください」と有名新聞社の科学担当記者が興奮気味に近づいてきた。酵母の中に狂牛病のプリオン（PrP^{Sc}）が入っている、と勘違いしたらしい。だとすると、確かに特ダネだが、そんなことうかつに報道されたら社会不安を引き起こすだろう。実験もあえなく停止させられるかもしれないし、しゃれにならない。記者さんには丁寧に説明して結局記事になることはなかった。それは極端な例としても、生命科学の研究者の間でも「酵母のプリオン」は認知度がそれほど高いとは言えない。そこで本稿では、プリオンの概念がなぜ酵母の奇妙な遺伝現象に適用されるに至ったか、さらにそのモデルとしての妥当性、最後にプリオンやアミロイドなどの蛋白質凝集の生物学的な意義、について簡単にまとめてみたい。

1. 概念としてのプリオン

プリオンとは蛋白質性の感染因子である。プリオンの概念は、哺乳類の神経変性疾患（羊のスクレイピー、クロイツフェルトヤコブ病、狂牛病など）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。分子レベルでは、何らかの原因で生じた異常型蛋白質（これをプリオンという）が自己触媒的に正常型を異常型に転換して増殖する、というのがプリオン現象の本質と言える。この正常型の蛋白質は異常型さえなければ、そのままの立体構造を維持できるので、プリオン現象では蛋白質に2つの安定な立体構造が存在することになる（二次構造レベルでは、正常型が α ヘリックス、異常型が β シート豊富というのが典型である）。このことは、タンパク質の立体構造は一義に決まるという Anfinsen のドグマの例外とも言えるもので蛋白質科学としても非常に興味深い。筆者はシャペロンの研究を10数年行ってきている。シャペロンとは「蛋白質の構造を変化させうる蛋白質」、と定義してもよいかもしれないが、そう考えるとプリオン現象とは自己シャペロン現象と言い換えることもできるだ

ろう。そんなこともあり、90年代前半に哺乳類プリオンの論文を「ずいぶん不思議なことがあるものだ」、と思いながら読んでいた。できれば何か研究したいと思っても、非常に危険な感染物質である。そうたやすくは研究できない。そんなところに人類の長年の友である出芽酵母にもプリオンのような遺伝現象があるのでは、という提案がなされた(後述)。酵母のプリオンならば問題あるまい、ということで酵母プリオンの遺伝子および株をもらって東工大・吉田研で研究を開始した次第である(それぞれ、菊池韶彦博士、小野文一郎博士よりもらった)。酵母プリオンを理解するには、その歴史的な背景がどうしても必要である。まずは酵母の遺伝学の話からはじめよう。(ややこしくてうまく説明できる自信がないのだが、興味のある方はプロの遺伝学者の総説も参考にしてください(1)。)

2. 酵母の非メンデル性遺伝現象 [*PSI⁺*]、 [*URE3*]

遺伝学が古くから発達している出芽酵母の世界で、メンデルの法則に従わない奇妙な遺伝現象 (*[PSI⁺]*、 [*URE3*]) があることが40年近く前から知られていた ([]でくくっているのは細胞質性の遺伝因子の表記法)。*[PSI⁺]* (*[ψ]*) の表現型は翻訳終結異常であり、翻訳解離因子 (eRF3) である SUP35 遺伝子が関与する。また、 [*URE3*] は、ウレイドコハク酸の取り込みに関わる遺伝現象で、URE2 が責任遺伝子である。これらの遺伝現象は以下のような点で通常の染色体 DNA の遺伝とは異なっている。

- 1) 非メンデル性の遺伝をする。
- 2) [*URE3*] の出現・消失が可逆的。すなわち、ゲノムの DNA 変異の頻度よりもずっと高く [*URE3*] が出現する ($\sim 10^6$)。また数 mM の塩酸グアニジンで [*URE3*] が「治って」 [*ure*] になる。
- 3) [*URE3*] の維持には、URE2 遺伝子が必要であるが、ここに奇妙なパラドックスが生じる。URE2 DNA の変異株、欠損株の表現型は、 [*URE3*] と区別が付かない。ということは、野生型 (*[ure]*) と [*URE3*] は同じ URE2 の DNA を持つのに表現型が異なるというパラドックスが起こる。
- 4) Ure2 蛋白質の大量発現で [*URE3*] の出現頻度が 100 倍程度高まる。

以上のような性質をもつ遺伝現象の謎を解く重要な示唆を与えたのが、酵母

の遺伝学者 Reed Wickner である。彼は上記の項目すべては、これらの遺伝現象を「プリオン」と仮定するとすべて説明が付く、ということをも 1994 年に提案した(2) (上記の[URE3]は[PSI⁺]と読み替えてもらっても成り立つ。実際には、Wickner の論文では [URE3]だけで話を展開しており、最後に[PSI⁺]でもプリオンが成り立つはずだ、と予言した)。その論文をきっかけにして、堰を切ったようにこのプリオン仮説を支持する論文が次々に出た。*in vivo* で Hsp104 が[PSI⁺]の維持に重要な役割を果たしていること、[PSI⁺]、[URE3]株で Sup35、Ure2 蛋白質は凝集を形成していること、さらには *in vitro* で精製した Sup35 や Ure2 が典型的なアミロイド様線維を形成することなど、一気に酵母プリオンが認知されていった (図 1)。酵母プリオンが登場するまで、プリオンというと哺乳類の変性疾患 (PrP の関与するプリオン病、以下、狂牛病プリオン) しか知られておらず、非常に特殊なものだと考えられていたわけだが、この酵母プリオンで「プリオン」という概念が他の生物学的な現象に拡張されたことに意義がある。また、酵母はとても扱いやすいことから、プリオン研究のよいモデル系ができたとも言える。たとえば、狂牛病プリオンでは大腸菌の組換え体から精製したプリオン蛋白質からは感染性を未だ証明できていないが (これはプリオン仮説の「最終証明」と言われている)、酵母プリオンでは証明された(3)。他にも、狂牛病プリオンで問題になっている牛からヒトなどへの「種間の壁」の問題が、酵母でも知られており、その分子機構が詳細に研究されている(4,5)。

4. プリオン線維成長

Sup35 には N、M、C と呼ばれる 3つのドメインが存在する (図 2)。Sup35 の解離因子としてののはたらきは C 末ドメインだけで十分である。そして[PSI⁺]の維持には N 末ドメインだけが必須である (中間の M ドメインは機能未知)。この N ドメイン、もしくは N と M ドメイン (NM ドメイン) の組換え精製蛋白質は、適当な条件で自発的に線維状の凝集体を形成する。この線維は、Congo Red 染色により緑色の偏光を呈し、電顕観察で幅が約 10nm、など典型的なアミロイド様線維である (図 3)。また、Sup35 の NM ドメインは線維になる前の可溶性の状態ではランダムコイル様だが、線維になると β シートが豊富になる (例えば 6)。すなわち、線維形成過程においてプリオン現象で本質的な構造変換が起こっている。

我々は、この Sup35 線維の形成機構を調べる端緒として、蛍光顕微鏡下で線維の成長をライブで観察する系を構築した。その結果、この線維の成長は片側に伸びやすい傾向にあることがわかった(7) (Ure2 も同じ傾向にある(8))。これは、Sup35 の構造変換が線維の末端で起こることを意味し、プリオンの自己触媒能力をよく説明する。(その後、Weissman らは AFM でより精細に線維成長を調べ、方向を持った成長が大多数だが、両側に伸びるものも有意な割合で存在することを示した。彼らは、Sup35 線維はヘテロな集団であることに意味があるのではないかと示唆している(9))。

5. 酵母プリオンと Hsp104

シャペロン研究者としてこの酵母プリオンが魅力的な理由の一つが、[PSI⁺]の維持に Hsp104 が関わっていることだ。シャペロンの関与も、この非メンデル性遺伝因子が蛋白質性の遺伝因子であることを示唆している。ただ、Hsp104 の関与は少々複雑なものである。Hsp104 の欠損と過剰発現はともに[PSI⁺]の消失という同じ表現型となる。つまり、適量の Hsp104 があるときだけ、[PSI⁺]は維持されていくのだ (図4)。そのメカニズムがどうなっているかは酵母プリオン研究者たちの間で共通の疑問である。Hsp104 は脱凝集に関わるシャペロンであることから説得力のある仮説が提案されている(10) (図4)。Hsp104 のはたらきは Sup35 線維を切断することではないかという考えだ (線維は規則正しく並んだ凝集である)。この仮説によると、Hsp104 がなければプリオン線維は切断されず、したがって次世代に増殖していかない。また、Hsp104 が過剰にあると、線維の切断が究極まで進行し、ついにはモノマーにまで解離する (ので[psi]⁻になる)。よって、適度の Hsp104 が線維を適度に切断することがプリオンの増殖・伝播には必要なのだ、という説である。この説に対する筆者の疑問としては、Hsp104 過剰でモノマーにまでなるとは言え、Hsp104 は (プリオンになるのとは逆向きの) 構造変換まで触媒することができるのだろうか、というものである。いずれにせよ、この仮説の検証は *in vivo*、*in vitro* さまざまなレベルから行われており、1, 2年のうちに決着が付くかと思う (一部は田口の学会報告記を参照)。

狂牛病プリオンでも増殖のためには、「分裂」がどうしても必要であり、実際、感染因子の実体である PrP^{Sc} を超音波で砕くと、感染能が大幅にアップするという。哺乳類プリオンで、「分裂」に関わる因子がシャペロンなのかどうか興味の

あるところだ。(Protein X と呼ばれる未知の因子がそれに相当するのだろうか)

6. 酵母プリオンはポリグルタミン蛋白質である

Sup35 の N ドメインは 120 残基程度のうちの半分弱がグルタミン (Q) かアスパラギン (N) である (図2)。また、Ure2 のプリオンドメインもアスパラギンの長いストレッチをもつ。この Q/N リッチ領域の点変異ですら [PSI⁺]、[URE3] の表現型に影響を与える場合が知られており、Q/N 領域はプリオン伝播に必須である。そのような観点から、酵母のプリオンはポリグルタミンによるアミロイドとしての性質をもつとよい (つまり、分子レベルでは狂牛病 PrP 蛋白質には似てなくて、ポリグルタミン病蛋白質に近い)。

ゲノム解析の結果から真核細胞には Q/N が相当数並んだ部分を含む遺伝子が全体の数%も存在するらしい(11)。Lindquist らは、その中の一つ、Rnq1 蛋白質 (Rich in N and Q の頭文字から命名) が実際にプリオンの振る舞うことを示した(12)。酵母プリオンは [PSI⁺]、[URE3] だけではないのだ。しかも次に示すようにもっともっとあるらしい。

7. 酵母プリオンは別の酵母プリオンを誘発する

もう一度話を遺伝学に戻す。Sup35 を過剰発現させると [PSI⁺] になりやすくなるが、酵母の中には、そうやって *de novo* で [PSI⁺] になりやすいもの ([PSI⁺] inducibility から [PIN] と呼ばれる) とそうでないもの ([pin⁻]) があり、その表現型の遺伝自体が [PSI⁺] のようにプリオンの基準にすべて当てはまる。[PIN] の実体を突き止めたところ、意外なことに Rnq1、Ure2 などを含む 10 数種類の PolyQ 蛋白質のどれかがプリオン化したものが [PIN] の実体であることを突き止めた(13)。すなわち、Rnq1 や Ure2 などのプリオンが [PSI⁺] プリオンに遺伝学的に関わるということだ。そのメカニズムを単純に考えると、例えば、Ure2 アミロイド線維は Sup35 の線維形成の直接の鋳型となる、というのがわかりやすい説明である (heterologous seeding model)。が、直接の証拠は今のところない。もう一つの考え方は、*de novo* で [PSI⁺] が出現するのを阻害する因子があり、その因子が別のプリオン (Ure2 など) の方に動員されると、[PSI⁺] になりやすくなる、というものである (titration model)。いずれにせよ、真核細胞内に多数ある PolyQ 蛋白質どうしがお互いの凝集状態に影響をあ

たえているらしいのだ。まだ、これが何を意味するのか不明だが、新しい現象が潜んでいる可能性が高い。

8. まとめ：凝集－脱凝集で細胞現象のスイッチ？

以上、酵母のプリオンは、プリオンの概念を拡張するだけでなく、ポリグルタミンなどの蛋白質凝集体のよいモデル系にもなっている。

さて、真核細胞では PolyQ を含む遺伝子が多数存在する。PolyQ は非常に凝集になりやすい性質を有しており、普通に考えると蛋白質にとって不利だと考えられる。なぜそのような一見都合の悪い性質が進化の過程で保存されてきたのだろうか。[PSI⁺]に関して興味深い報告があり、示唆に富むので最後に紹介したい。Lindquist らは、[PSI⁺]酵母は環境条件（薬剤、重金属、アルコールなど）によっては野生型 ([psi⁻]) よりも生育に有利な場合があることを示した(14)。これは、[PSI⁺]の表現型である翻訳終結異常で説明できる。すなわち、Sup35 が凝集になって不活性型になることで、野生型では翻訳されなかった蛋白質が多数でき、そのために生育が有利になるのである。

このように、蛋白質の凝集が必ずしも有害ではなく、細胞内現象のスイッチになっている可能性は他にもあると思われる。しかも、Hsp104 のような脱凝集を促進するシャペロンがうまく制御できれば、凝集による不活性型から活性型へスイッチを切り替えることも可能かもしれない。プリオンは哺乳類の深刻な病気、という特異な「表現型」があるから研究が進んできた。これまでは、凝集は悪、というのが常識であった。が、そうでもないのでは、と考えることで蛋白質のもつ我々の知らない世界に踏み込めるかもしれない・・・。そんなことを最近は夢想している。

1. Tuite, M. F., and Cox, B. S. (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 878-890
2. Wickner, R. B. (1994) *Science* **264**, 566-569
3. Sparrer, H. E., Santoso, A., Szoka, F. C., Jr., and Weissman, J. S. (2000) *Science* **289**, 595-599
4. Santoso, A., Chien, P., Osherovich, L. Z., and Weissman, J. S. (2000) *Cell* **100**, 277-288
5. Nakayashiki, T., Ebihara, K., Bannai, H., and Nakamura, Y.

- (2001) *Mol Cell* **7**, 1121-1130
6. Kishimoto, A., Hasegawa, K., Suzuki, H., Taguchi, H., Namba, K., and Yoshida, M. (2004) *Biochem Biophys Res Commun*, in press
 7. Inoue, Y., Kishimoto, A., Hirao, J., Yoshida, M., and Taguchi, H. (2001) *Journal of Biological Chemistry* **276**, 35227-35230
 8. Fay, N., Inoue, Y., Bousset, L., Taguchi, H., and Melki, R. (2003) *J Biol Chem* **278**, 30199-30205
 9. DePace, A. H., and Weissman, J. S. (2002) *Nat Struct Biol* **9**, 389-396
 10. Kushnirov, V. V., and Ter-Avanesyan, M. D. (1998) *Cell* **94**, 13-16
 11. Michelitsch, M. D., and Weissman, J. S. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11910-11915
 12. Sondheimer, N., and Lindquist, S. (2000) *Mol Cell* **5**, 163-172
 13. Derkatch, I. L., Bradley, M. E., Hong, J. Y., and Liebman, S. W. (2001) *Cell* **106**, 171-182
 14. True, H. L., and Lindquist, S. L. (2000) *Nature* **407**, 477-483

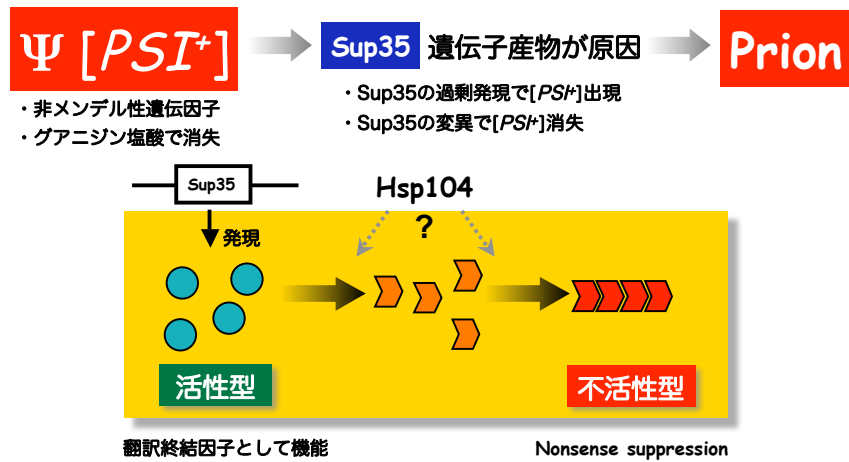


図1. 酵母のプリオン [PSI⁺] と原因遺伝子 Sup35

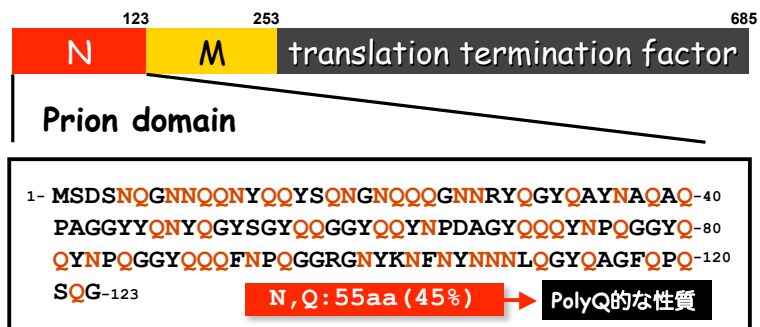


図2. 酵母のプリオンSup35のアミノ酸配列

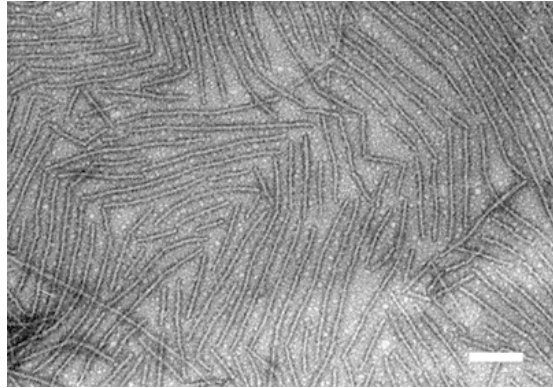


図3. Sup35線維の電顕像 (bar: 100nm、東工大・岸元愛子撮影)

Hsp104の発現レベル	プリオン[PSI ⁺]への影響
—	消失
+	維持 (伝搬)
+++	消失

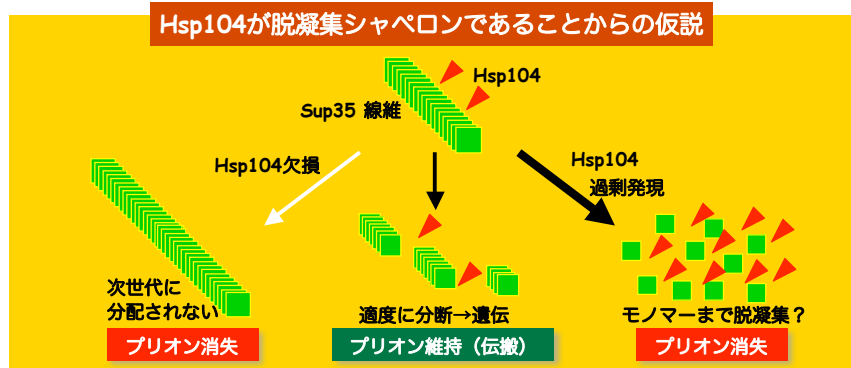


図4. Hsp104の発現レベルとプリオンの関連