



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

α シヌクレインによるプリオン蛋白質の異常化抑制機構

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-05-09 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山下, 敬 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/82055

α シヌクレインによるプリオン蛋白質の
異常化抑制機構

**Inhibitory mechanism of α -synuclein upon
prion's pathogenic conversion reaction**

岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科
医療情報学専攻

山下 敬

令和3年度（2021年6月）

目 次

要旨	1
1. はじめに	2
1-1. プリオン病	2
1-2. プリオン蛋白質の異常立体構造変換反応	4
2. 本研究の概要	7
3. 実験方法	8
3-1. hPrP および α S の調製	8
3-2. 高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM)	8
3-3. 動的光散乱法 (DLS)	8
3-4. 核磁気共鳴 (NMR)	9
4. 結果	10
4-1. hPrP の分散型オリゴマー配置	10
4-2. α S モノマーのランダムな構造	16
4-3. hPrP と α S の相互作用	18
4-4. 動的光散乱法による分子サイズのポピュレーションの評価	23
4-5. hPrP と α S のヘテロ二量体の相互作用解析	25
5. 考察	28
謝辞	30
利益相反	30
文献	31

要旨

我々はこれまでの研究を通して、ヒト α シヌクレイン (α S) が一過性に蓄積されたヒトプリオン蛋白質 (hPrP) 中間体に結合することで、hPrP のアミロイド生成を抑制すると予想した。しかし、この仮説を支持する直接的なエビデンスはこれまで報告されていなかった。

本研究では、高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM)、動的光散乱法 (DLS) および核磁気共鳴 (NMR) を用いて、hPrP と α S との相互作用を観察することにより、これを事実として立証した。正常のプリオン蛋白質は、サイズの異なるオリゴマーを形成して存在していた。一方、 α S は、ランダムな構造を持つモノマーとして存在していた。hPrP に α S を添加すると、hPrP の多重分散性はすぐに失われ、hPrP と α S とのヘテロオリゴマー形成 (三量体、次いで二量体形成) がコヒーレントに開始された。しかし、オリゴマーよりサイズの大きい多量体形成、例えばアミロイド形成は観察されなかった。

さらに、ヘテロ核 NMR 分光法を用いて、最終産物である hPrP - α S 二量体の溶液構造を調べた。このヘテロ二量体では、hPrP の C 末端らせん領域はモルテングロビュール様の状態にあるが、 α S のホットスポットと C 末端領域は hPrP と選択的に相互作用していることがわかった。

これらの観察結果により、 α S は hPrP と安定なヘテロ二量体を形成することで hPrP 中間体を捕捉し、hPrP のアミロイド生成を抑制していると考えられた。

1. はじめに

1-1. プリオン病

プリオン病は、プリオン蛋白質の異常によって引き起こされる疾患の総称である。例えば、羊のスクレイピー、ウシ海綿状脳症（BSE）、クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）、ゲルストマン-ストライスラー-シャインカー病（GSS）、致死性家族性不眠症（FFI）、クールー[1,2,3]、変異型ヤコブ病[4,5]などの神経変性疾患などが知られている（表 1）。

いずれも長い潜伏期間（10～30 年）のあとに発症し、著明な海綿状脳病変をきたす特徴がある。CJD は初老期に発症し、痴呆や小脳機能障害などを主症状とする。CJD の疫学調査では、病因が特定できず、孤発的に発症（孤発性 CJD : sporadic CJD）するものがほとんどを占める（80%近く）。また、CJD のうち 15～20% は、プリオン遺伝子（PrP 遺伝子）に変異をもち、優性遺伝を呈する（家族性 CJD : familial CJD）。さらに、感染が原因であると明らかに特定できる感染性 CJD がある。その代表として、BSE から感染したと考えられる変異型 CJD（variant CJD）や、他にも医原性 CJD（iatrogenic CJD）があり、例えば CJD に汚染した成長ホルモンの投与や汚染した脳硬膜の移植が原因となる。またクールーは、パプア・ニューギニアに住んでいる Fore（フォア）族の子供と成人女性に主にみられた小脳失調症を呈する疾患で、食人慣習による経口感染が病因と考えられている。GSS と FFI は、遺伝性プリオン病であり、PrP 遺伝子に特定の変異をもつことが知られている。

CJD の一般的な臨床経過として、認知機能障害や運動機能障害で発症した後、数ヶ月で無動無言状態になり約 1～2 年で死の転帰をとる。以上のように、この疾患の特徴として、孤発性と遺伝性という 2 つのパターンがあること、さらに、患者の脳や脊髄といった神経組織に対して特に感染性（伝達性）を呈することが他の神経変性疾患群との相違点である。

プリオン病に対する消毒法としては、放射線、煮沸、化学薬品等を用いてプリオンを不活化する方法や、種々の手段により感染力を減衰させる方法などがある。しかし現時点において、プリオン病に対する有効な治療法は確立されていない。

以下に、まずプリオン蛋白質の異常化メカニズムについて概説する。続いて、 α S によるプリオン蛋白質の異常化抑制機構について述べる。

表1 プリオン病の分類[3]

Disease	Host	Mechanism of pathogenesis
Kuru	Fore people	Infection through ritualistic cannibalism
iCJD	Humans	Infection from prion-contaminated HGH, dura mater grafts, etc.
vCJD	Humans	Infection from bovine prions?
fCJD	Humans	Germ-line mutations in PrP gene
GSS	Humans	Germ-line mutations in PrP gene
FFI	Humans	Germ-line mutation in PrP gene (D178N, M129)
sCJD	Humans	Somatic mutation or spontaneous conversion of PrP ^C into PrP ^{Sc} ?
FSI	Humans	Somatic mutation or spontaneous conversion of PrP ^C into PrP ^{Sc} ?
Scrapie	Sheep	Infection in genetically susceptible sheep
BSE	Cattle	Infection with prion-contaminated MBM
TME	Mink	Infection with prions from sheep or cattle
CWD	Mule deer, elk	Unknown
FSE	Cats	Infection with prion-contaminated bovine tissues or MBM
Exotic ungulate encephalopathy	Greater kudu, nyala, oryx	Infection with prion-contaminated MBM

iCJD, iatrogenic CJD; vCJD, variant CJD; fCJD, familial CJD; sCJD, sporadic CJD; GSS, Gerstmann–Sträussler–Sheinker disease; FFI, fatal familial insomnia; FSI, fatal sporadic insomnia; BSE, bovine spongiform encephalopathy; TME, transmissible mink encephalopathy; CWD, chronic wasting disease; FSE, feline spongiform encephalopathy; HGH, human growth hormone; MBM, meat and bone meal.

1-2. プリオン蛋白質の異常立体構造変換反応

1960年代初頭、Christian B. Anfinsen は、蛋白質の三次構造はアミノ酸の一次配列により決定されるという、いわゆる“Anfinsen の仮説”を唱えた[1]。しかし、プリオン蛋白質をはじめとして多くの蛋白質の立体構造は、アミノ酸配列で一義的に定まるような単純なものではなく、ダイナミックでかつ不安定なことがその特徴であることを示唆している。

プリオン病の場合、具体的には、正常型プリオン (PrP^{C}) が構造変換し、アミロイド前駆体特殊構造 (PrP^*) を経由して感染型プリオン (PrP^{Sc}) を生成し、感染型プリオンが体内で正常型プリオンと結合して、正常型プリオンは感染型プリオンに次々に変換される[1,2,6,7]。現在、このようにプリオン蛋白質の異常がプリオン病の原因であり、本疾患の症状が進行するメカニズムであると考えられている。

模式図 (図 1) は、ギブズの自由エネルギー (縦軸) を構造空間 (横軸) の関数として表したものである。正常型プリオン (PrP^{C}) は、 $[\text{PrP}^{\text{C}}]_1, [\text{PrP}^{\text{C}}]_2, \dots, [\text{PrP}^{\text{C}}]_x$ で示すような複数の天然構造をとることが可能である。感染型プリオン (PrP^{Sc}) はエネルギー的に極めて安定で不可逆的な構造を取り、凝集体を形成するが、その前駆体としてエネルギー障壁の高い比較的不安定なフォールディング中間体 (PrP^*) が想定されている。

図 2 には、シャペロンが存在する条件下 (青) またはシャペロンの非存在条件下 (赤) における、立体構造空間の関数としてのプリオン蛋白質 (PrP^{C}) の自由エネルギープロファイルを示す。シャペロンがプリオンと結合すると、 PrP^{C} は安定化され、活性化自由エネルギー (ΔG^\ddagger) を増加させることにより PrP^{Sc} 形成への構造変化を防ぐ。低分子であれ、蛋白質のような高分子であれ、このような作用を有する物質を見つければ、プリオン病の治療薬となる可能性がある。

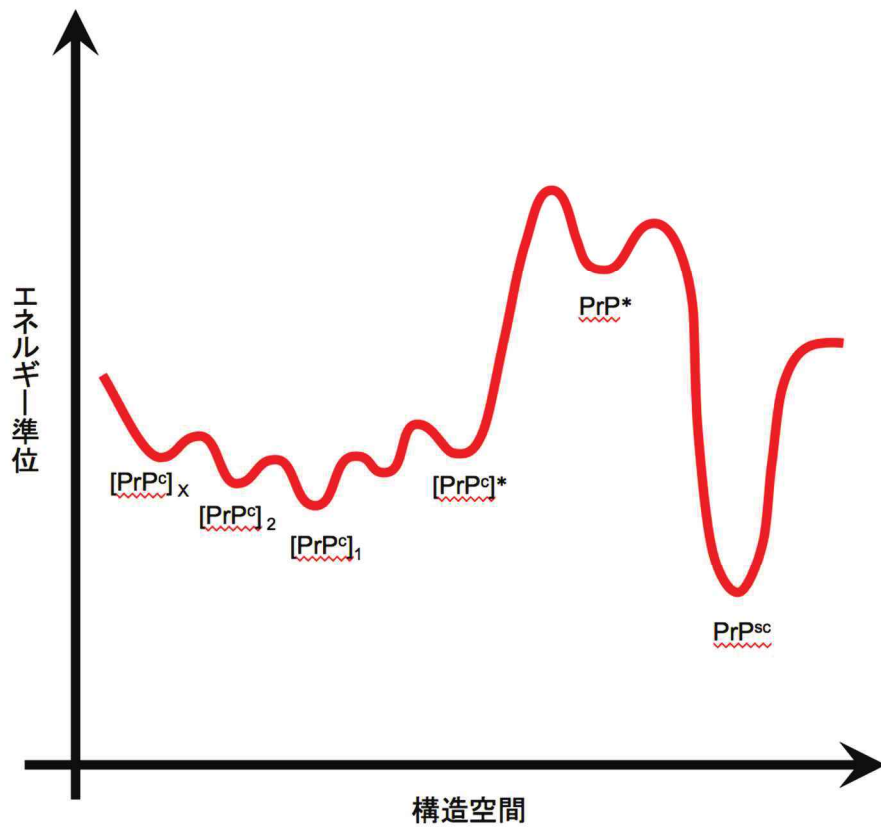


図 1 : プリオンの自由エネルギープロファイル

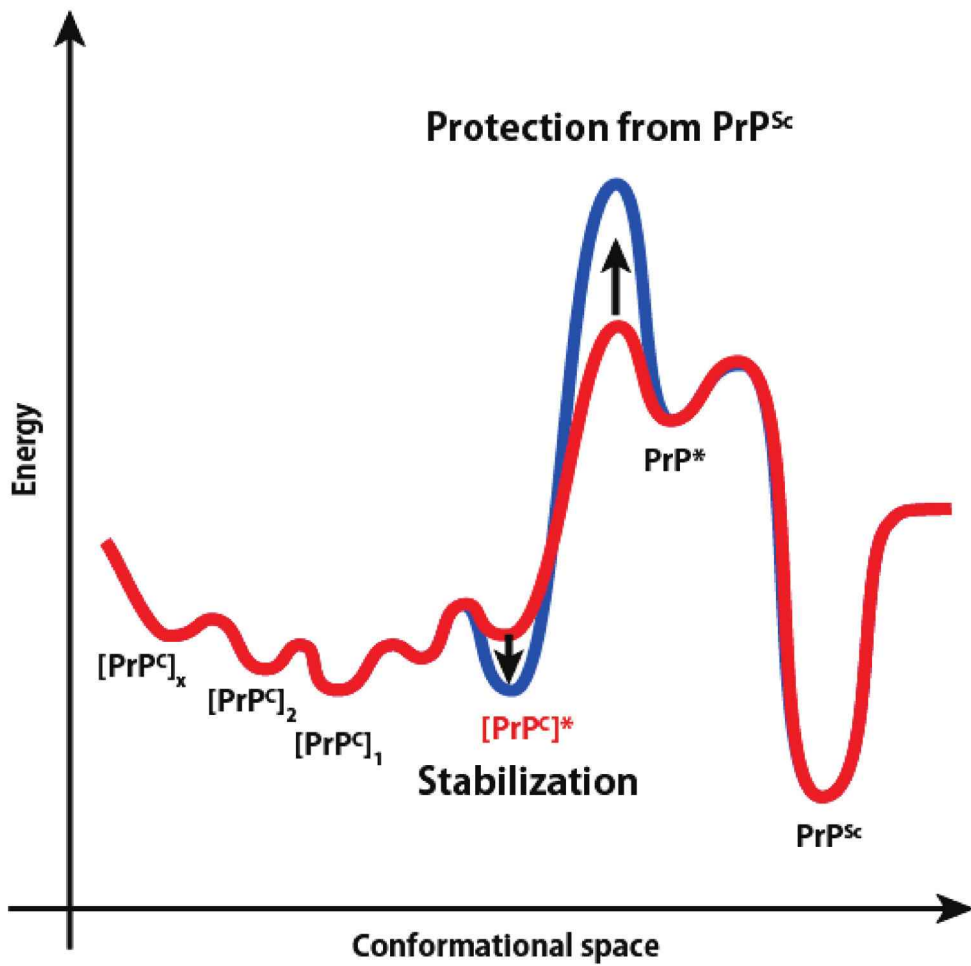


図 2 : プリオン異常化の抑制機構

2. 本研究の概要

分子間相互作用は、蛋白質のミスフォールディング病発症の重要な病理学的事象である[6,7]. アルツハイマー病のアミロイド β ($A\beta$) [8], パーキンソン病の α シヌクレイン (αS) [9], および伝達性海綿状脳症のプリオン蛋白質 (PrP) [2]などのそれぞれの疾患関連のアミロイド原性蛋白質は、分子間相互作用により凝集し、アミロイドを形成し、脳に沈着する. 最近、いくつかのアミロイド原性蛋白質が、別の疾患関連蛋白質と相互作用し、アミロイド発生に劇的な影響を与えることが示唆されている[10]. 例えば、ある特定の蛋白質からなるアミロイド線維が、異なるアミロイド原性蛋白質のアミロイド沈着を促進する例が報告されている[11].

その一方で、アミロイド形成蛋白質間の特異的な相互作用も報告されている. Laurenら[12]は、細胞表面のプリオン蛋白質 (PrP^C) がオリゴマー型アミロイド ($A\beta$) の受容体となり、 $A\beta$ が結合すると長期増強 (LTP) を阻害することを示唆しているが、その後、 PrP^C がなくても $A\beta_{42}$ が LTP を阻害することが報告されている[13]. また、 αS のシャペロン様活性[14-18]のように、アミロイド生成蛋白質をアミロイド生成に対して選択的に阻害することも報告されており、治療法の開発が期待されている.

近年、我々は、単量体のヒト αS がヒト PrP ($hPrP$) のアミロイド形成を抑制することを報告した[18]. αS アミロイドは $hPrP$ と相互作用し、プリオンの複製を阻害すると報告されている[19]が、我々の実験では $A\beta$ は $hPrP$ と強く結合したが、 αS アミロイドは結合しなかった. しかし、単量体の αS と $hPrP$ との直接的な相互作用を示す構造的な証拠はまだ得られていなかった.

この現象を解明するために、アミロイド形成の初期過程である分子間相互作用をリアルタイムで、かつ分子形状の分解能と原子レベルの分解能で明らかにすることを本研究の目的とした. そのために、まず高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) [20]を用いて $hPrP$ と αS の混合による分子形状の変化をリアルタイムで観察した. HS-AFM は、特に蛋白質の凝集過程の観察に有用であることが知られており[21], ここで紹介するようなリアルタイムの観察に適している.

次に、動的光散乱 (DLS) [22,23]を測定し、各段階での主要なコンフォーマーのポピュレーションの変化を検出し、上記 HS-AFM の観測結果と比較検討した.

さらに、多次元多核核磁気共鳴法を用いて様々な 1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定し、 $hPrP$ - αS 複合体の構造の特徴を解析し、 αS が $hPrP$ の病原性変換反応を阻害するメカニズムについて考察を行った.

3. 実験方法

3-1. hPrP および α S の調製

hPrP: アミノ酸残基 20~231 をコードするプラスミド[hPrP]を、既報のプロトコル[24]に従って調製した。組換え hPrP は、大腸菌発現系を用いて発現させ、既報のプロトコル[24]に従って精製した。

α S: 野生型ヒト α S (残基 1~140) をコードする pT7-7 ベクターを、Addgene (コード 36046) [18]から購入した。組換えヒト α S は、ECOS コンピテント大腸菌 BL21 (DE3) (日本ジーン, コード 312-06534) を用いて発現させ、既報のプロトコルに従って精製した[18]。

3-2. 高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM)

原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope : AFM) は、カンチレバーと呼ばれる微細な探針で試料の表面を走査し、ナノスケールの凹凸形状を三次元的に計測する手法である。レーザーをカンチレバーに照射し、反射したレーザーの位置を光位置検出器で測定し、振動の大きさを調べることで試料の形状を測定する。

高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) は、この AFM を高速化したものであり、金沢大学の安藤らの研究グループによって開発された。1 秒間に 20 枚までの高速撮影が可能となっており、蛋白質などの構造と動き (動態) を同時に観察することが可能である。電子顕微鏡が真空中でのみ観察が可能であるのに対し、HS-AFM は真空中のみならず大気中・溶液中でのナノスケールの動きを観察することができる。

HS-AFM は、NanoExplorer (生体分子計測研究所, 筑波市) を使用した。バネ定数 $k \sim 0.1$ N/m と共振周波数 $f = 1.5$ MHz の小型カンチレバー (BL-AC10FS-A2, オリンプス) を使用して、タッピングモードで、水溶液中・室温で行った。画像シーケンスは、ImageJ (imagej.nih.gov/ij/) を用いて処理した。

hPrP と α S の相互作用を観察するために、無塩の hPrP (30 nmol conc.) 溶液 2 μ L をガラス台上の雲母表面に滴下し、10 分間静置させた後、再度同量の溶液を滴下した。

最初に多分散状態の hPrP コンフォメーションの鮮明な画像を確認した後、 α S (30n mol conc.) を 2 μ L 添加し、1~5 秒の時間分解能で動画記録を開始した。

3-3. 動的光散乱法 (DLS)

溶液中に蛋白質のような微粒子 (1 μ m 以下) を懸濁 (分散) させると、浮力と重力が釣りあった状態であれば、粒子は沈降せずに自由に浮遊する。このときの浮遊状態は、溶液分子との各種の相互作用によって、液中微粒子特有の「ブラウン運動」と呼ばれるランダムな運動を始める。この運動は、小さな粒子ほど速く、大きな粒子ほど遅くなるということが知られている。

溶液中に懸濁している微粒子にレーザー光を照射すると、このブラウン運動の影響で粒子からの散乱光のシグナルは揺らぎ（時間変動）をもつ。この揺らぎの間隔とブラウン運動の速度には相関性がある。精度高く散乱光の揺らぎを計測した後、液中に分散した hPrP の大きさを見積もるため、「拡散定数」を求めた（粒子の大きさはその拡散定数に依存して計算できる）。

今回 DLS には、Zetasizer NanoS (Malvern Panalytical, Egham, Surrey, UK) を用いた。hPrP 溶液 100 μ L (100 μ M) と α S 溶液 100 μ L (100 μ M) を調製した。hPrP と α S の相互作用を観察するために、そのうち 50 μ L の hPrP 溶液 (100 μ M) と同量の α S 溶液 (100 μ M) を混合した後、分子サイズを直ちに測定した。

3-4. 核磁気共鳴 (NMR)

一般に化学シフトマッピング法は、 ^{15}N でラベルした蛋白質を用い、 ^1H - ^{15}N Heteronuclear Single-Quantum Correlated (HSQC) スペクトルにおける、主に蛋白質主鎖の ^{15}N と ^{15}N に結合した ^1H との NH の相関ピークを、リガンドを加える前と後で比較し、化学シフトが変化した NMR シグナルを同定することにより、リガンドとの相互作用部位を調べる方法である。

蛋白質の一次構造では遠く離れているが、立体構造をとることにより空間的に近接しているいくつかのアミノ酸残基がリガンドと結合するため、すでにその蛋白質の立体構造が分かっていると、より正確に相互作用部位の推定が可能である。

NMR 実験による hPrP と α S の分子間相互作用を解析するために、 ^1H 周波数 800.15 MHz, ^{15}N 周波数 81.08 MHz で動作する Avance 800 分光計 (Bruker BioSpin) を用いて行った。3 軸勾配コイルを備えた 5 mm ^1H 逆検出極低温プローブをすべての測定に使用した。 ^1H - ^{15}N の HSQC スペクトルを 25°C で取得し、 ^1H では 4,096 点の complex point が 12,821 Hz をカバーし、 ^{15}N では 256 点の complex point が 2,108 Hz をカバーした。NMR データは、TopSpin NMR ソフトウェアパッケージ (Bruker BioSpin) を使用して処理した。

4. 結果

4-1. hPrP の分散型オリゴマー配置

図 3A は、30 nM の濃度での hPrP の高速原子間力顕微鏡像を示す。hPrP の粒子径は 2 nm~100 nm まで分布しており、それぞれモノマーから様々な大きさのオリゴマーまで対応していた。図 3B に示す代表的なオリゴマーの高さを測定したところ、胴部の高さは約 8 nm、尾部の高さは 2 nm と推定された。原子間力顕微鏡でのサイズ校正結果[25]によれば、これらはそれぞれヘキサマーとモノマーに相当する。様々な大きさのコンフォーマー（図 3C, 4A, 4B）に示す高さ分析から、オリゴマーの成長は、モノマーが seeds（核となるもの）に付着し続けてより大きな粒子を形成する成長モデル [26,27]に従わない可能性が示唆された。その代わりに、これらの基本的な成長単位が溶液中で衝突し（図 3,4）、合体してより大きなオリゴマーを形成する[25]。これらのオリゴマー間の相互作用は、図 4A に示すように、オリゴマーに付着した細い線維によって媒介される可能性がある。

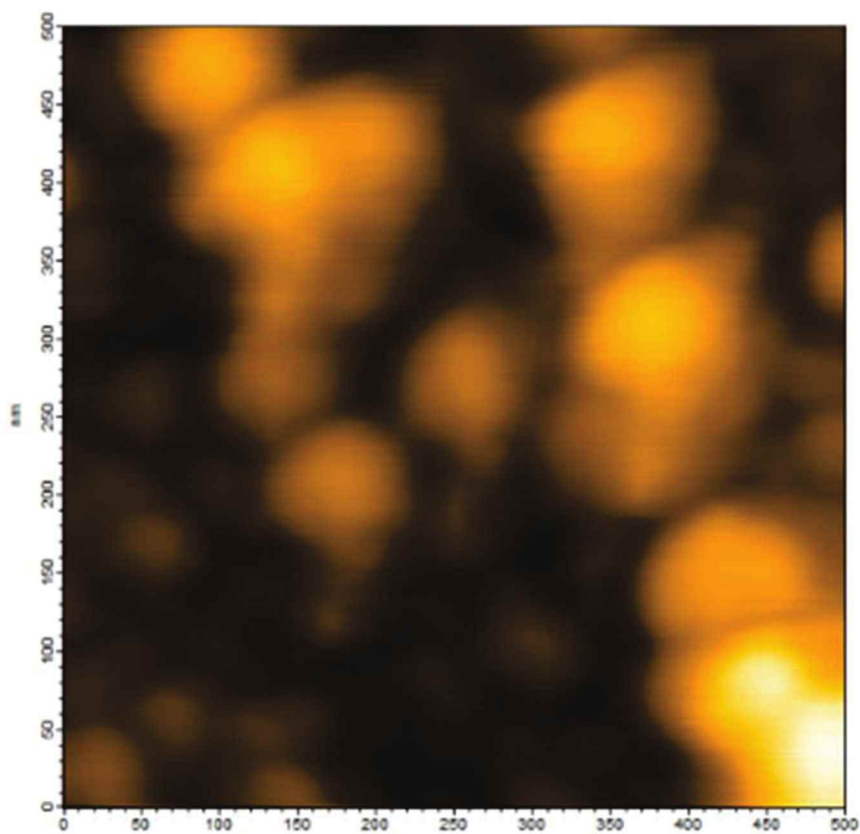


図 3. (A) 単量体から六量体まで分布する様々な不均一なオリゴマー状態を示す hPrP の HS-AFM 像.

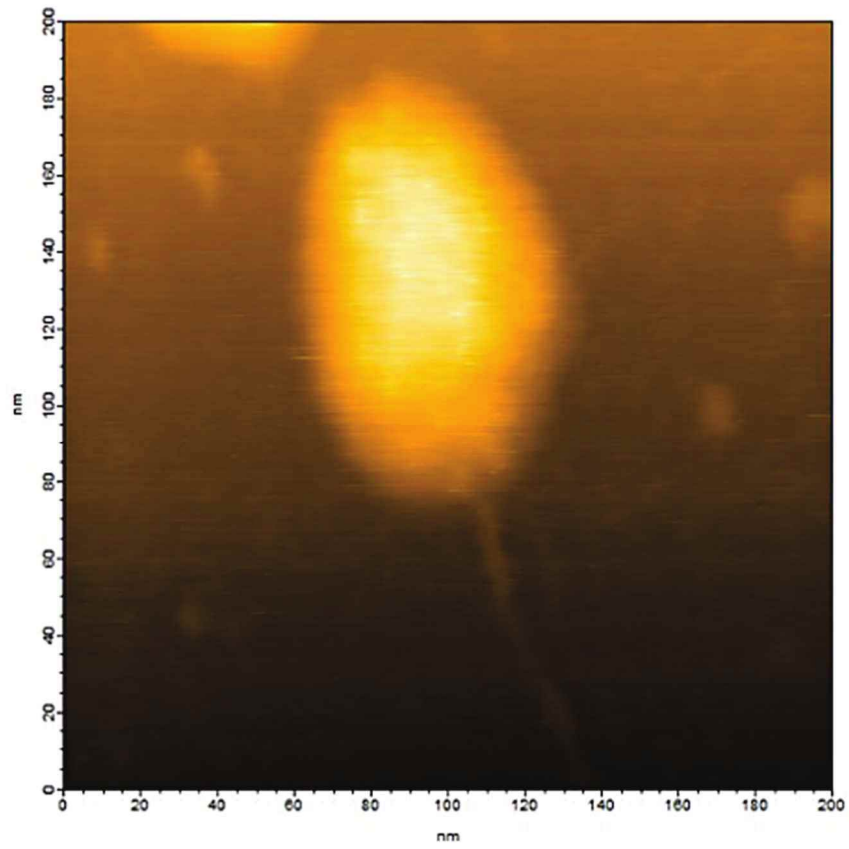


図 3. (B) 尾部を持つ hPrP の典型的な六量体オリゴマー.

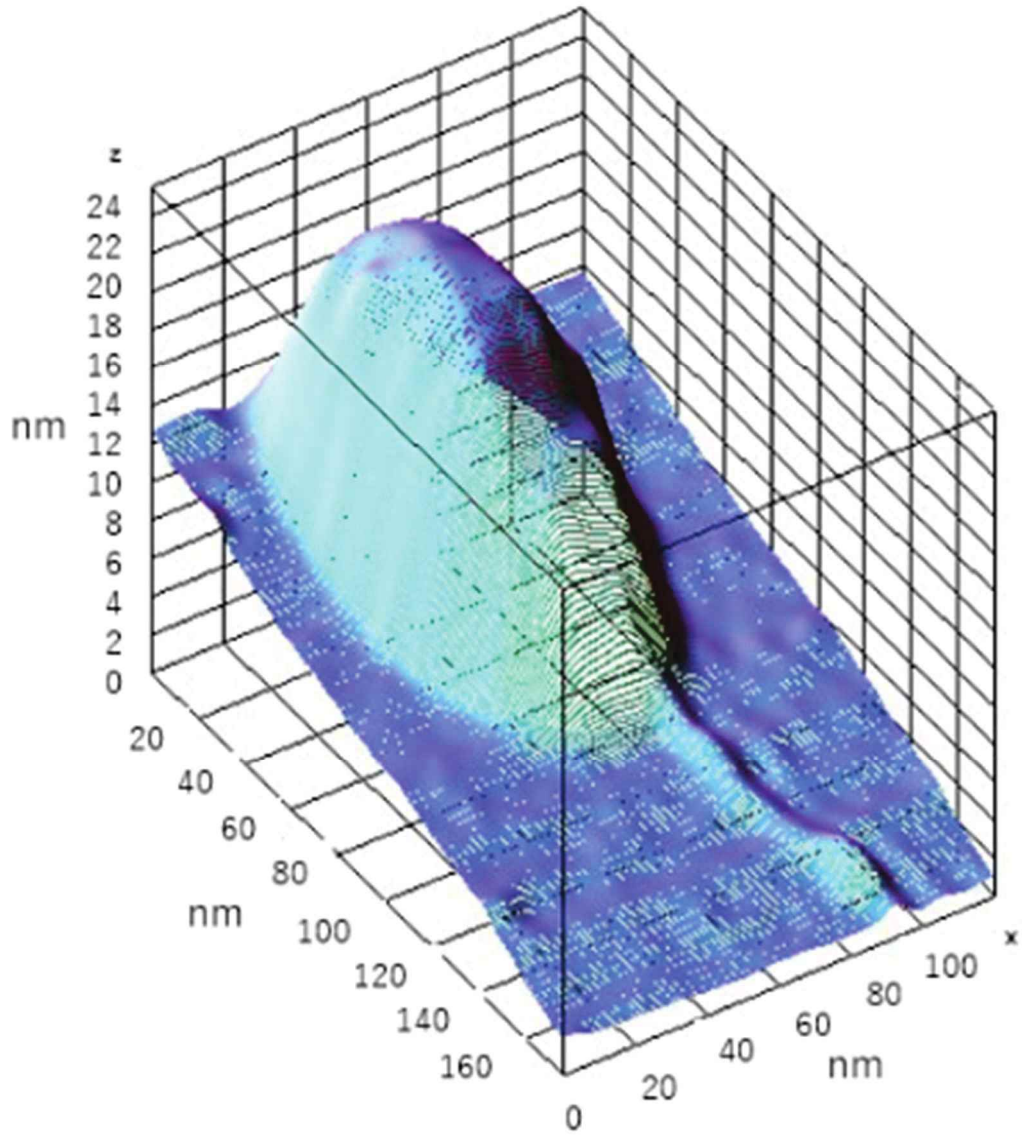


図 3. (C) 高さが約 8 nm であることを示すオリゴマーの高さ分析.

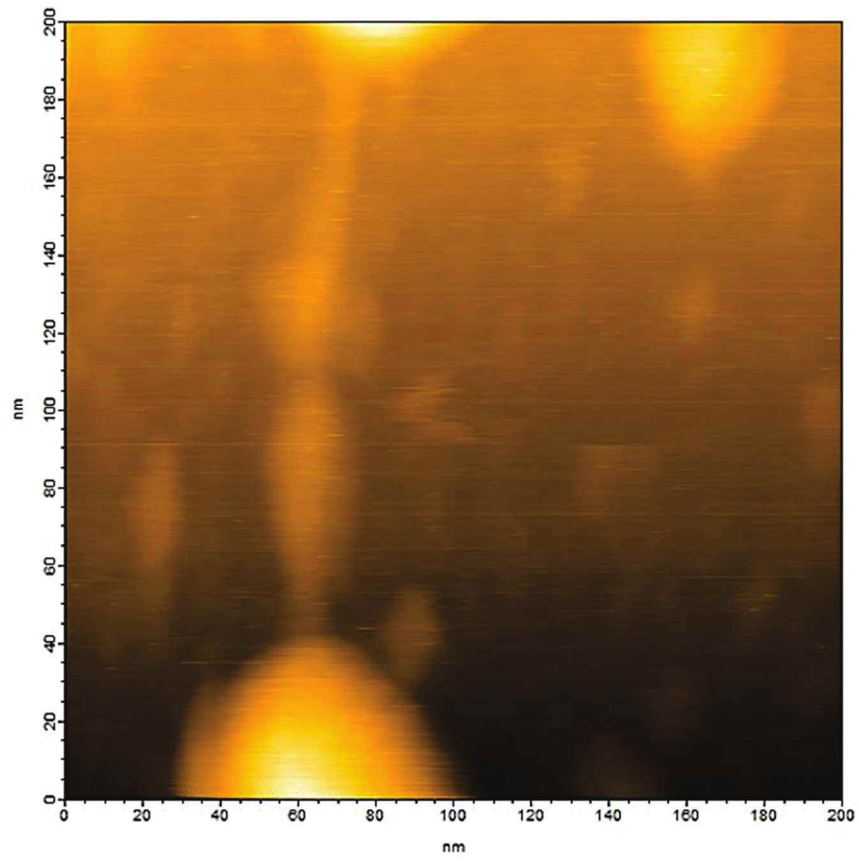


図 4. (A) 細い尾部を介したオリゴマーの相互作用.

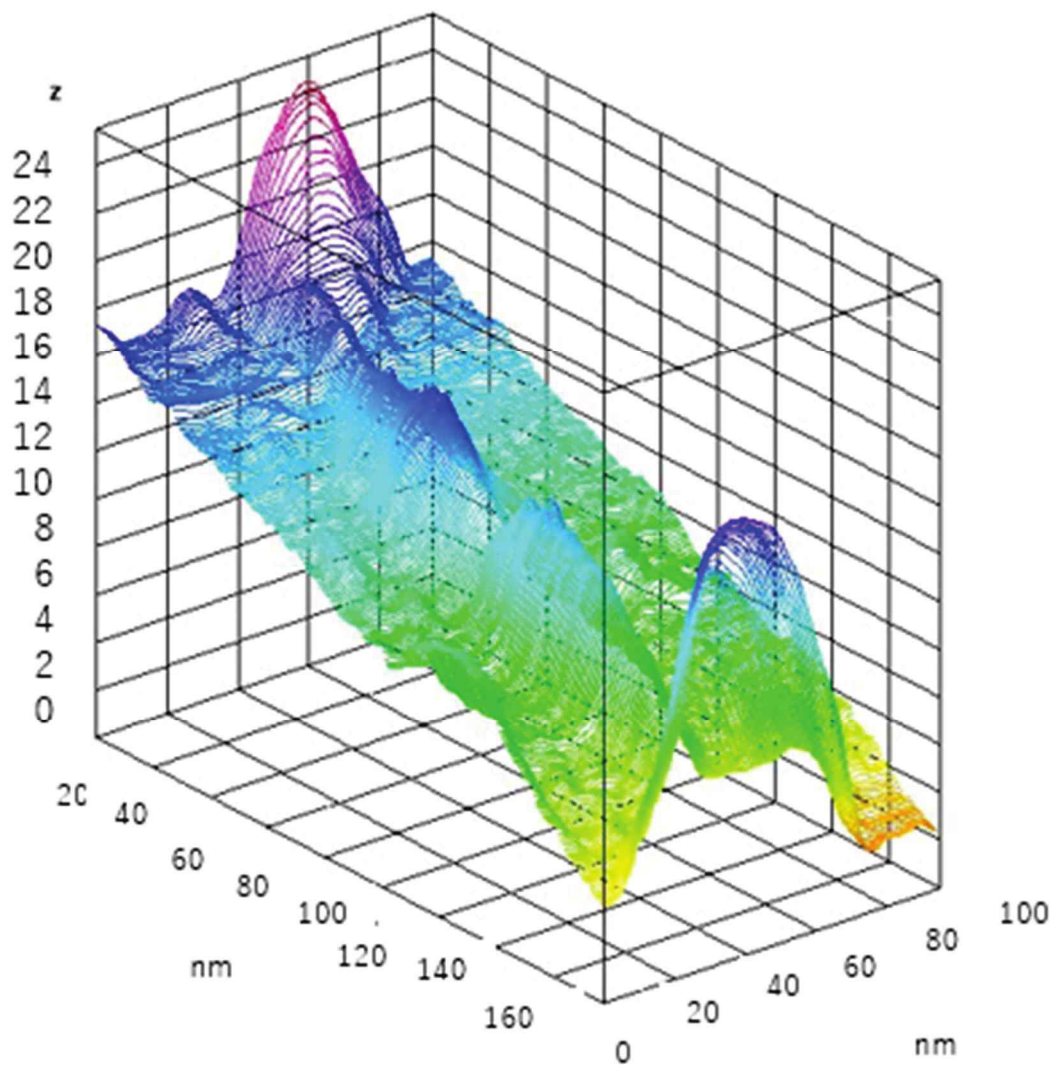


図4. (B) 相互作用している尾部の高さ分析.

4-2. α S モノマーのランダムな構造

α S の HS-AFM 画像を図 5 に示す。 α S の構造は、基本的には球状 (図 5A) から拡張型 (伸展型) (図 5B) の形状をとる。ただし、データの詳細は省くが、その他の形状をとるものも散見されている [28]。 α S は総じてランダムなモノマー[29,30]として存在しているといえる。

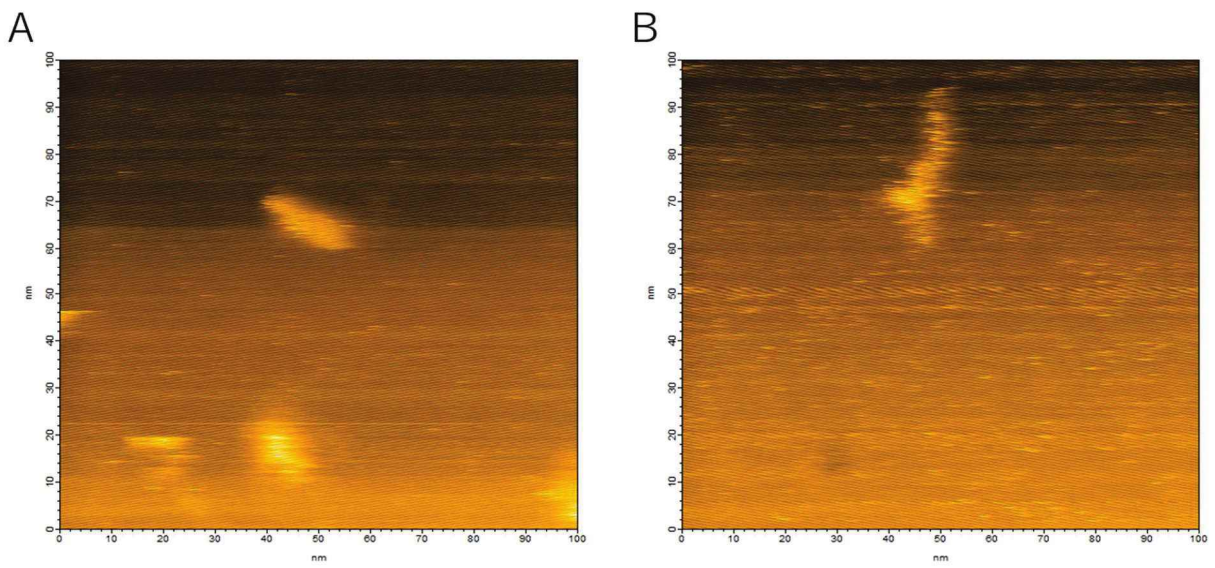


図5 α S の HS-AFM 画像は、(A) 球状の形状と (B) α S の拡張された形状を示す.

4-3. hPrP と α S の相互作用

HS-AFM でガラス台上に固定した雲母（マイカ）の表面に 1 μ L の hPrP (30 nM) を吸着させた後、ガラス台上に 1 μ L の α S (30 nM) を流すと不均一な hPrP のオリゴマー構成が確認された。この不均一な分布を示していた hPrP のオリゴマーは、速やかに（今回の実験で設定した HS-AFM の 1 フレームに相当する 5 秒以内）、均一な粒子に変化した（図 6C）。平衡状態での複合体の高さを計測すると、図 6B に示すように、約 2 nm であった。hPrP に対応する単量体構造も α S に対応する単量体構造も観察できず、より大きなオリゴマーも観察できなかった。

このことから、この複合体は hPrP と α S のヘテロ二量体であると考えられた。二量体形成前に、複合体は一時的に図 6C に示すように三量体形成を伴ったが、平衡状態では二量体であり、それ以上の変化は観察されなかった。

この段階で hPrP と α S の比率は不明であるが、このような緩やかではあるがコヒーレントなオリゴマー化により、 α S が hPrP の病原性変換を抑制していることが説明できると考えられる（図 6）。

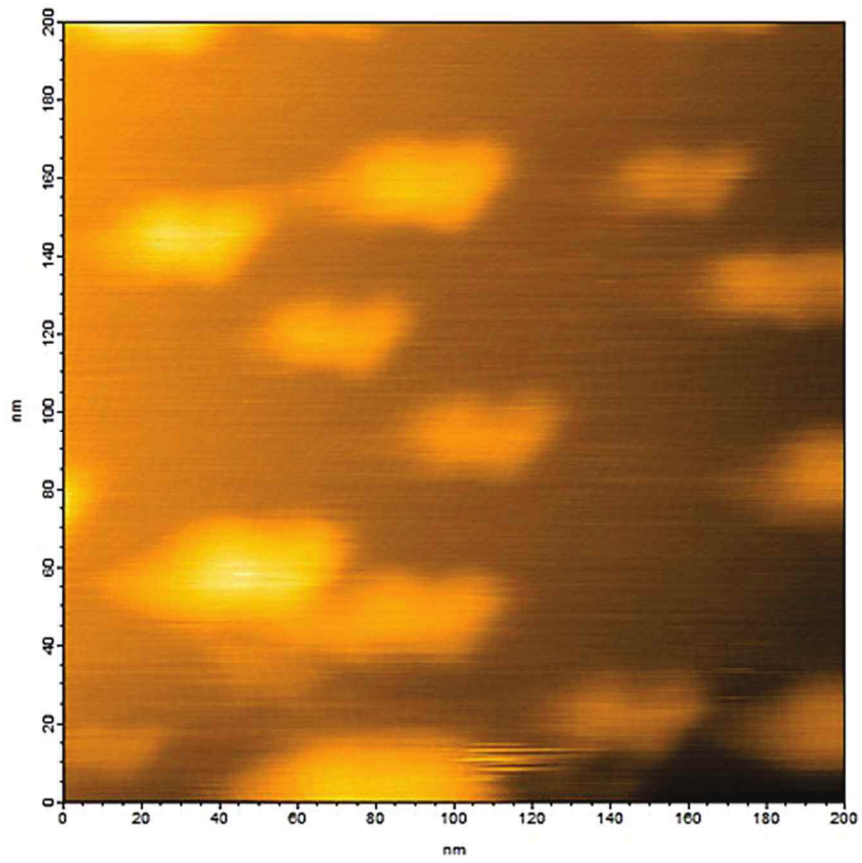


図6 (A) 平衡状態の hPrP と α S の複合体の HS-AFM 画像.

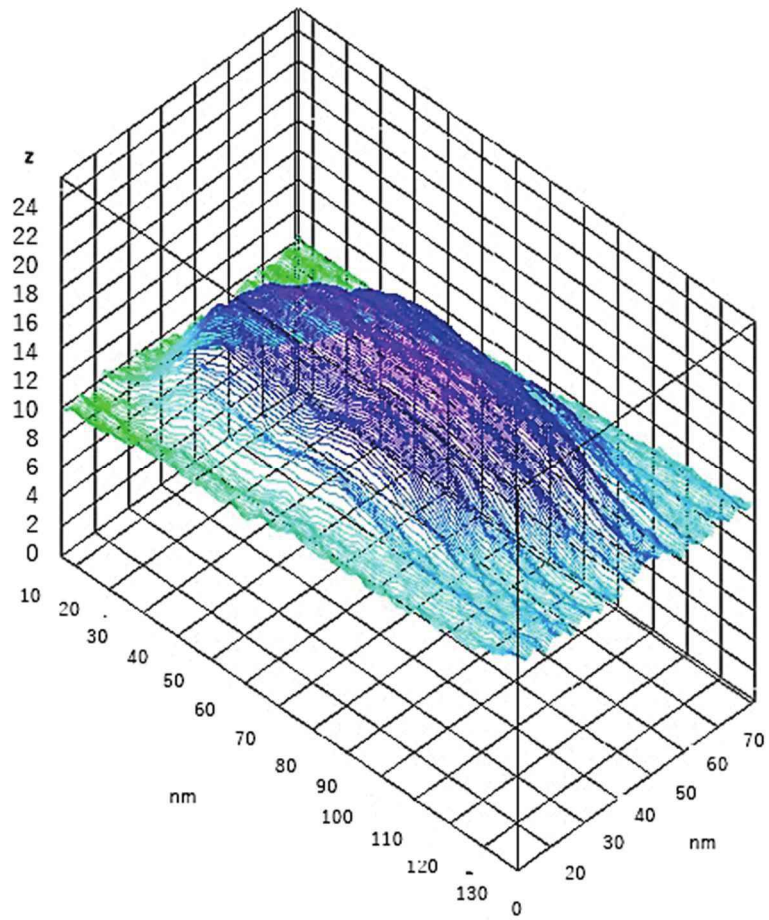


図 6 (B) 高さ分析の結果, 平衡状態での複合体は hPrP と α S のヘテロ二量体であることがわかる.

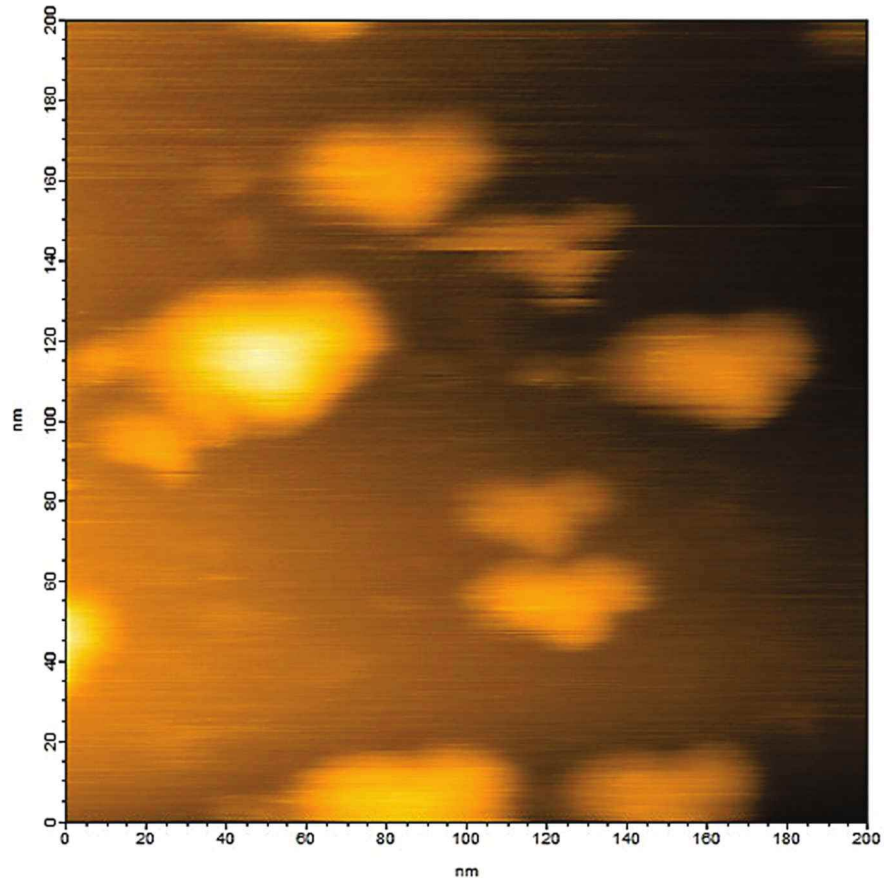


図 6 (C) 中間状態での hPrP と α S の複合体の HS-AFM 画像.

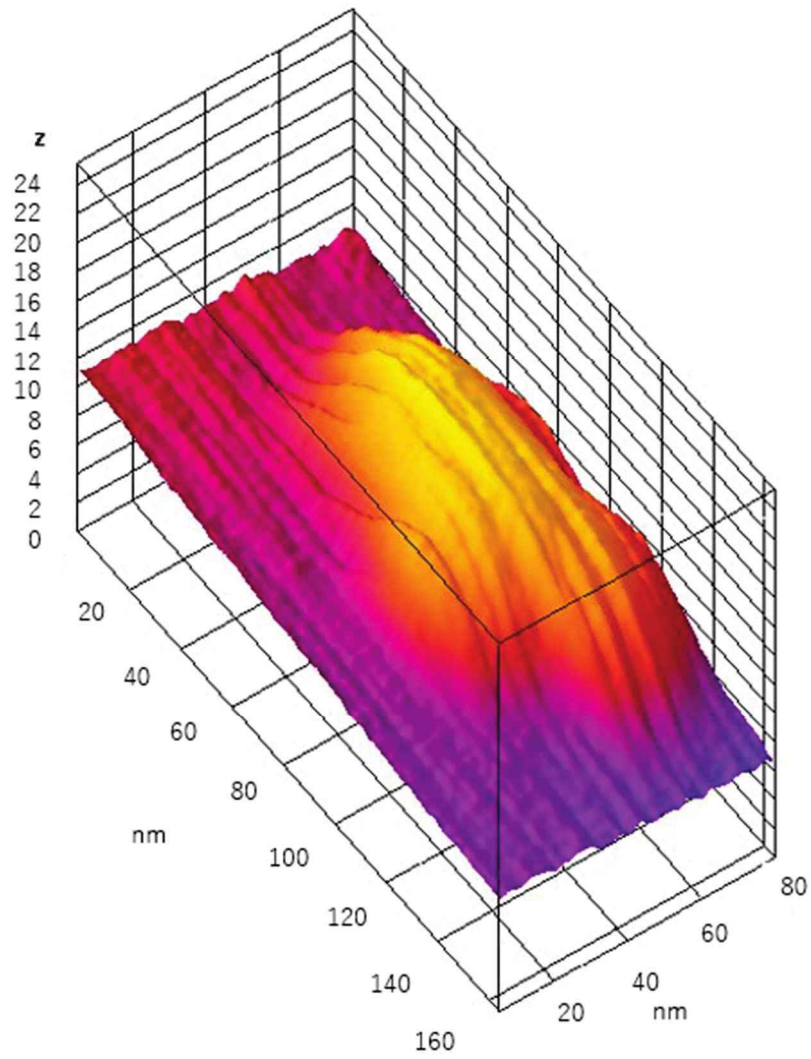


図 6 (D) 高さ分析は、中間状態でのオリゴマーが三量体であることを示している。

4-4. 動的光散乱法による分子サイズのポピュレーションの評価

HS-AFM は分子の形状にはかなり敏感であるが、その反面、分子サイズのポピュレーションを評価するには不向きである。そこで、補完的な測定方法として DLS（動的光散乱法）を用いた。

最初に、我々は hPrP 溶液中で多く存在する粒子の直径を観察したが、それは 24 nm であり（図 7A）、hPrP は主にオリゴマーとして存在していることを示唆している。hPrP オリゴマーは頭部と尾部で構成されているため（図 3）、球状の六量体に比べて拡散定数が非常に遅くなる。

次に、 α S 溶液中に主に存在する粒子の直径を観察したところ、1.7 nm（図 7B）となり、 α S が主にモノマーとして存在していることが分かった。 α S は天然で変性しているため（図 5）、その拡散定数は球状粒子を想定した場合よりも遅くなる。

同量の hPrP と α S を溶液中で混合すると、hPrP のオリゴマーピークは消失し、直径 1.7 nm のピークが検出された（図 7C）。これは hPrP と α S の安定なヘテロオリゴマーに相当すると推察された（図 6）。これらのヘテロオリゴマーは、明らかな尾部（無秩序領域）を持たないコンパクトなものであることに注目すべきである。

このように、無秩序領域の拡散定数とコンパクトな hPrP と α S のヘテロオリゴマーの拡散定数は同程度であり、見かけの直径も同程度であることが分かった。

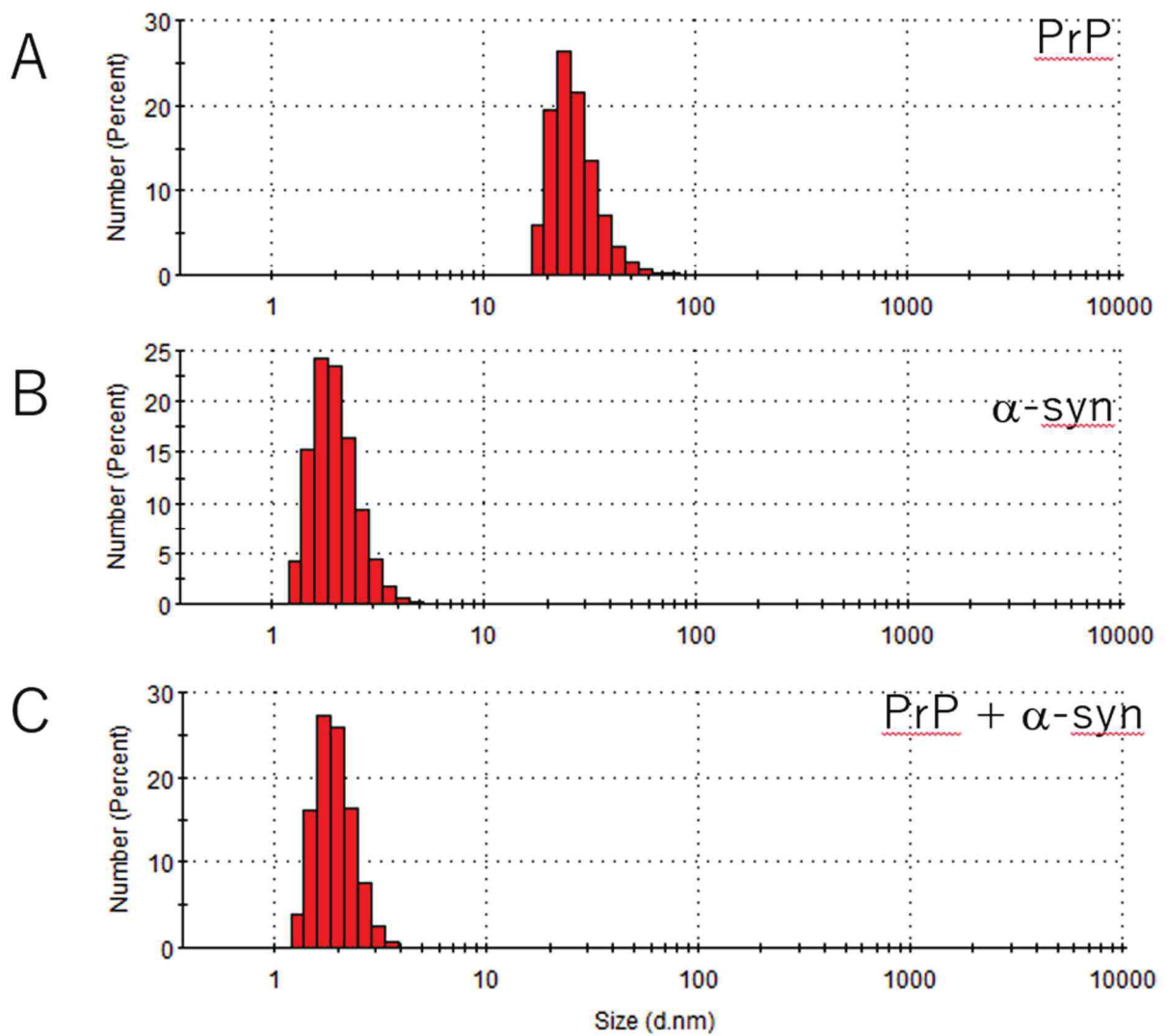


図7 オリゴマーを示唆する 24 nm にピークを持つ (A) hPrP 溶液, (B) モノマーを示唆する 1.7 nm の直径を持つ α S 溶液, および (C) hPrP および α S のヘテロオリゴマーに対応する 1.7 nm の直径にピークを持つ hPrP と α S の混合物における粒子径 (直径) の関数としての粒子の数 (集団) の動的光散乱 (DLS) 測定.

4-5. hPrP と α S のヘテロ二量体の相互作用解析

NMR 測定のために 4 種類の溶液, すなわち, ^{15}N で標識した hPrP と, 標識していない hPrP を調製し, さらに ^{15}N で標識した α S と標識していない α S をそれぞれ調製した.

図 8A は, ^{15}N 標識した hPrP のみ (青), 及び非標識の α S と混合した場合 (赤) の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを示す. ヘテロ二量体では, ネイティブな hPrP の C 末端側半分の領域に由来するシグナルはほとんど消失し, 残ったピークは α S との相互作用によって線幅が広がっていることから, モルテングロビュール状態となっていることを示している.

図 8B は, ^{15}N 標識した α S のみ (青), 及び非標識の hPrP と混合した場合 (赤) の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを示している. ネイティブな α S は無秩序状態 (IDP) [31]であったが, 13 残基, すなわち L8, V37, L38, V40, E83, V95, A107, Q109, D121, N122, S129, G132 および A140 の化学シフトは, hPrP の結合時に起きており, α S が hPrP と特定の領域で相互作用することを示唆している.

hPrP との結合による α S の化学シフトの変化とピーク体積の変化を図 9 に示した. α S の 40 番目の残基周辺 (ホットスポットと呼ばれる領域) および 60 残基付近の化学シフトが大きく変化した (図 9A, 9B). これらは, 選択的な結合を現している. 一方, C 末端領域 (105 残基~120 残基) のピーク強度が著しく低下していた (図 9C). この変化は hPrP との非特異的な結合によるものと推定される.

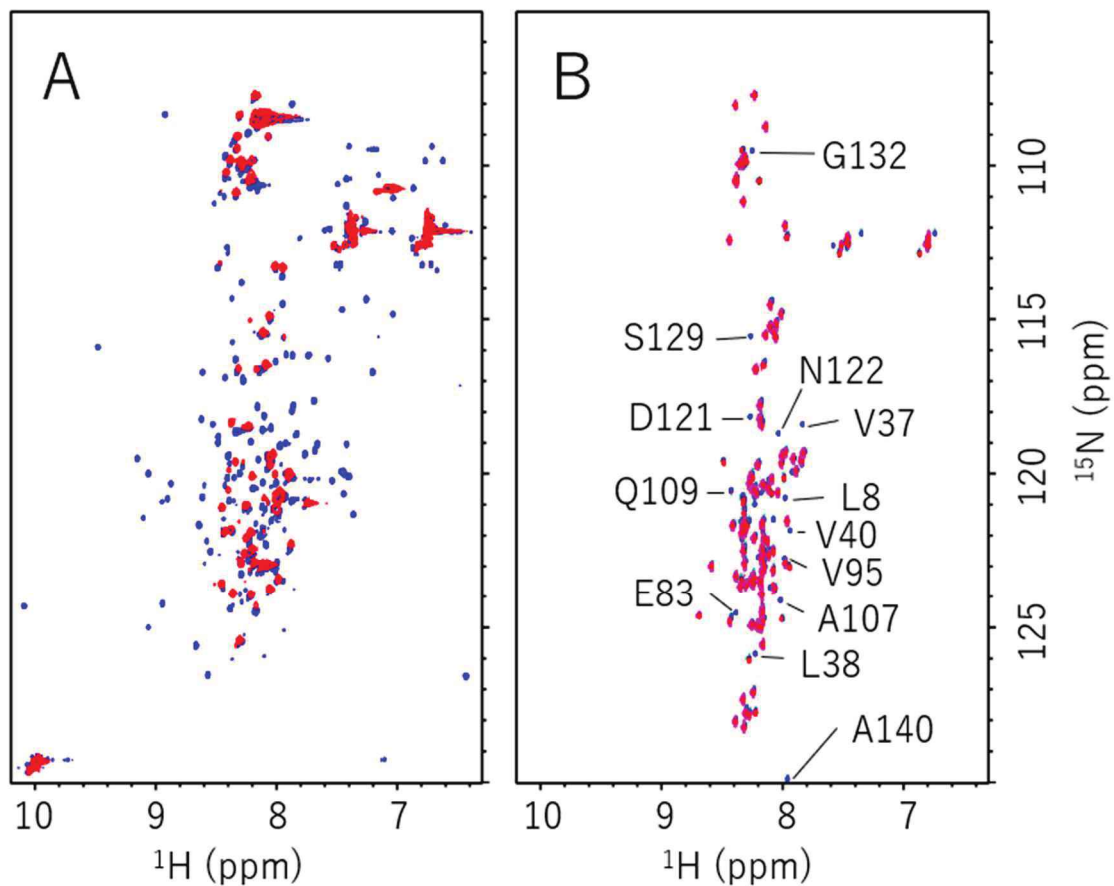


図8 hPrP と α S の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル

- (A) pH 6.1 の 99% H_2O /1% D_2O 溶液中において、200 μM の ^{15}N で標識した hPrP 単独の場合（青）と、非標識の 220 μM α S を混ぜた場合の hPrP（赤）の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル
- (B) pH 4.6 の 99% H_2O /1% D_2O 溶液中において、206 μM の ^{15}N で標識した α S 単独の場合（青）と、173 μM 非標識 hPrP を混ぜた場合の α S（赤）の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル

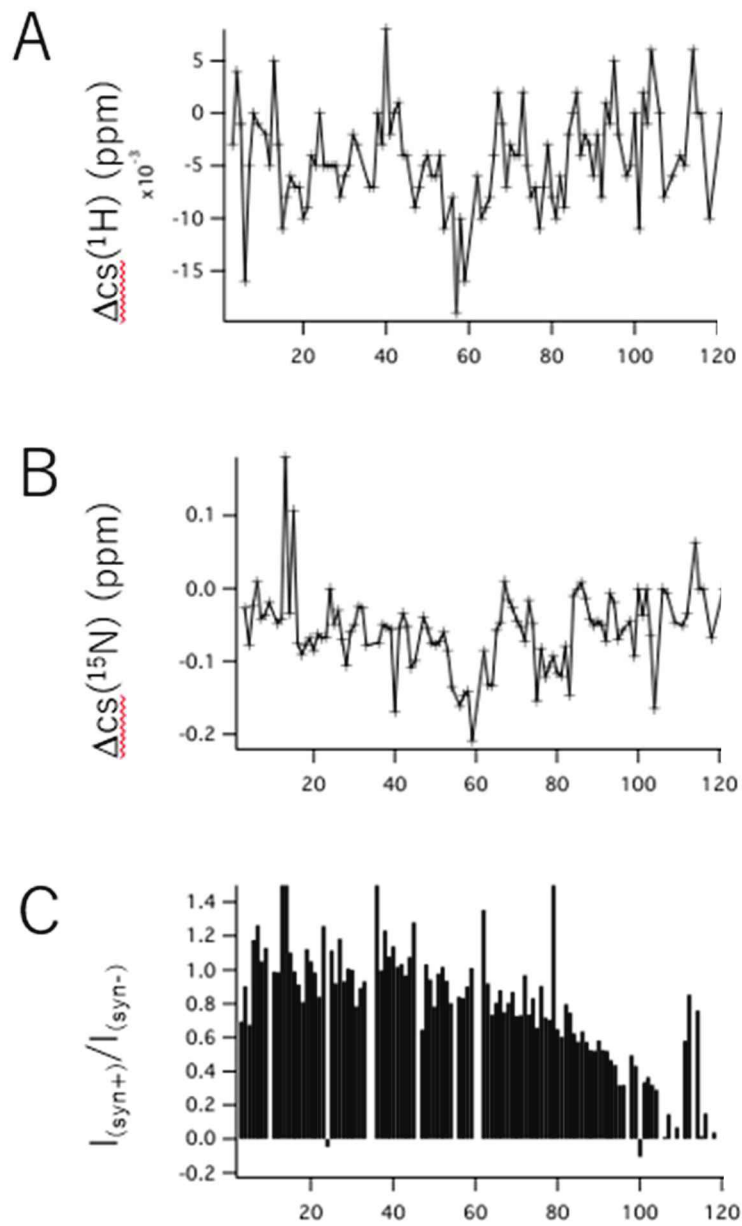


図 9

- (A) hPrP がある場合, ない場合に関する αS の ^1H 化学シフト差, 横軸はアミノ酸残基を表す.
- (B) hPrP がある場合, ない場合に関する αS の ^{15}N 化学シフト差, 横軸はアミノ酸残基を表す.
- (C) hPrP がある場合, ない場合に関する αS の各ピークボリュームの比率. 横軸はアミノ酸残基を表す.

5. 考察

我々は以前、単量体の αS が PrP のアミロイド化を抑制することを報告したが、完全に折り畳まれた PrP やフィブリル化した PrP には結合しなかった[18]. そこで我々は、単量体 αS が、部分的に折りたたまれていない PrP の疎水性領域に結合し、ミスフォールドした凝集体への構造変化を防いでいるのではないかと考えた[18]. この仮説は、単量体の αS が、オリゴマー化しやすい部分的に折りたたまれていない状態（またはモルテングロビュール）の PrP を捕捉できることを示唆している（図 10）.

本研究では、モノマー αS が異種の hPrP オリゴマーを溶解し、コンパクトな二量体複合体を形成することを発見した（図 3）. この hPrP と αS のヘテロ二量体は、むしろ均一で安定しており、安定した二量体形成は、病原性変換に利用可能なモノマー hPrP 分子を効率的に枯渇させ[32], その結果、PrP のミスフォールディングを抑制し、さらなる病原性のコンフォメーション変換を不可能にする、と考えられる. この発見は、モノマーの αS がシャペロンのような活性を持っていることと関連し得る. そして我々の先行研究および複数のグループが *in vivo* および *in vitro* で異なる蛋白質のミスフォールディングを抑制することを報告している[15,33,34,35].

NMR スペクトルを用いて、hPrP と αS の安定したヘテロ二量体の構造を解析した. hPrP は、 αS との結合により、ネイティブな構造からモルテングロビュール状態へと変化した. 一方、 αS では、hPrP との相互作用により、ホットスポット（アミノ酸残基 38~45）、60 番台のアミノ酸残基、C 末端領域（アミノ酸残基 120~140）を含む領域からのシグナルの化学シフトが選択的に変化し、特異的な相互作用があることが示唆された. 興味深いことに、これらの領域は、paramagnetic relaxation enhancement (PRE) 実験による αS または αS との分子間相互作用に関与する領域にほとんど含まれている [36].

αS と部分的に折り畳まれた蛋白質との詳細な相互作用を明らかにするには、速度論的な方法を用いてさらに研究する必要がある[37]が、今回の結果は、 αS が伝達性海綿状脳症 (Transmissible Spongiform Encephalopathy: TSE) の病理に関与している可能性を示唆している. 最近の研究で αS 遺伝子をノックアウトしても、マウスの脳内プリオン増殖の潜伏期間に影響を与えないことが示された[38]. αS シャペロンは、部分的に折りたたまれた蛋白質やオリゴマーと相互作用し、アミロイド形成の核生成段階を抑制することから、 αS は感染性プリオンの伝播ではなく、自然発生や進化[39]を抑制する可能性がある. これまでに免疫沈降法や免疫蛍光法により、 αS と PrP が生体内で相互作用しているという報告[19]はあったが、生体のアミロイド形成において核が出来てくる段階を選択的に阻害していることを示した報告はない.

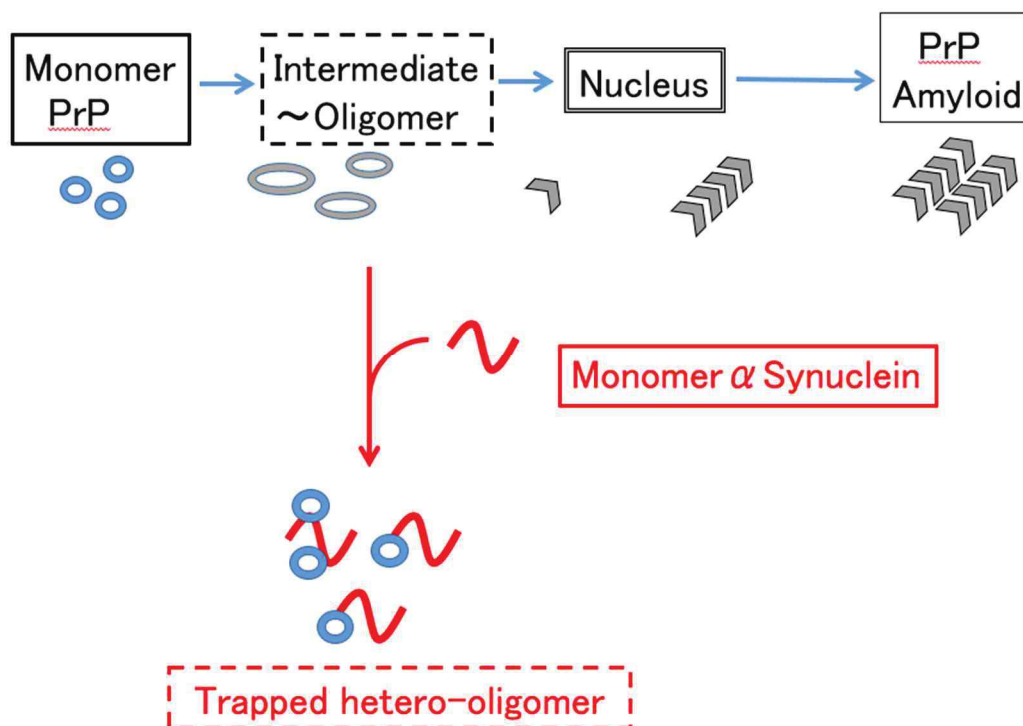


図 10 予想される hPrP の病原性変換に対する α S の抑制機構. モノマー α S は中間状態の hPrP をトラップして安定なヘテロオリゴマーを形成するため, 病原性変換のために利用可能なモノマーhPrP を枯渇させることができる.

謝辞

本論文を作成するにあたり，いつの時も丁寧かつ熱心なご指導をいただきました，岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科教授 桑田一夫先生，助教 本田諒先生に深謝致します。また，鎌足雄司先生，丹羽亜弓先生，富田弘之先生，原明先生に厚く御礼申し上げます。

利益相反

本研究の実施において，潜在的な利益相反と解釈される可能性のある商業的または金銭的關係がない状態で研究が実施されたことを宣言する。

文献

- [1] S.B.Prusiner, Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216, 136-144 (1982)
- [2] S.B.Prusiner, Molecular biology of prion diseases. *Science*, 252, 1515-1522(1991)
- [3] S.B.Prusiner, Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 13363-13383 (1998)
- [4] G.Chazot et al., The epidemiology of variant Creutzfeldt–Jakob disease in Europe. *Lancet*, 347, 1181-1181(1996)
- [5] R.G.Will et al., Prion protein gene analysis in new variant cases of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 347, 921-925(1996)
- [6] Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 2006; 75:333-66.
- [7] Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, et al. Synthetic mammalian prions. *Science* 2004; 305:673-6
- [8] Riek R, Guntert P, Dobeli H, Wipf B, Wuthrich K. NMR studies in aqueous solution fail to identify significant conformational differences between the monomeric forms of two Alzheimer peptides with widely different plaque-competence, A beta(1-40)(ox) and A beta(1-42)(ox). *Eur J Biochem* 2001; 268:5930-6.
- [9] Shtilerman MD, Ding TT, Lansbury PT, Jr. Molecular crowding accelerates fibrillization of alpha-synuclein: could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease? *Biochemistry-U S A* 2002; 41:3855-60.
- [10] Morales R, Moreno-Gonzalez I, Soto C. Cross-seeding of misfolded proteins: implications for etiology and pathogenesis of protein misfolding diseases. *PLoS Pathog* 2013; 9:e1003537.
- [11] O'Nuallain B, Williams AD, Westermark P, Wetzel R. Seeding specificity in amyloid growth induced by heterologous fibrils. *J Biol Chem* 2004; 279:17490-9.
- [12] Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 2009; 457:1128-U84.
- [13] Kessels HW, Nguyen LN, Nabavi S, Malinow R. The prion protein as a receptor for amyloid-beta. *Nature* 2010; 466:E3-4; discussion E-5.
- [14] Kim TD, Paik SR, Yang CH, Kim J. Structural changes in alpha-synuclein affect its chaperone-like activity in vitro. *Protein Sci* 2000; 9:2489-96.
- [15] Souza JM, Giasson BI, Lee VM, Ischiropoulos H. Chaperone-like activity of synucleins. *FEBS Lett* 2000; 474:116-9.

- [16] Ahn M, Kim S, Kang M, Ryu Y, Kim TD. Chaperone-like activities of alpha-synuclein: alpha-synuclein assists enzyme activities of esterases. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346:1142-9.
- [17] Manda KM, Yedlapudi D, Korukonda S, Bojja S, Kalivendi SV. The chaperone-like activity of alpha-synuclein attenuates aggregation of its alternatively spliced isoform, 112-synuclein in vitro: plausible cross-talk between isoforms in protein aggregation. *PLoS One* 2014; 9:e98657.
- [18] Shirasaka M, Kuwata K, Honda R. alpha-Synuclein chaperone suppresses nucleation and amyloidogenesis of prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2020; 521:259-64.
- [19] Aulic S, Masperone L, Narkiewicz J, Isopi E, Bistaffa E, Ambrosetti E, et al. alpha-Synuclein Amyloids Hijack Prion Protein to Gain Cell Entry, Facilitate Cell-to-Cell Spreading and Block Prion Replication. *Sci Rep* 2017; 7:10050.
- [20] Ando T, Uchihashi T, Kodera N, Yamamoto D, Miyagi A, Taniguchi M, et al. High-speed AFM and nano-visualization of biomolecular processes. *Pflugers Arch* 2008; 456:211-25.
- [21] Kakuda K, Niwa A, Honda R, Yamaguchi KI, Tomita H, Nojebuzzaman M, et al. A DISC1 point mutation promotes oligomerization and impairs information processing in a mouse model of schizophrenia. *J Biochem* 2019; 165:369-78.
- [22] Kakuda K, Yamaguchi KI, Kuwata K, Honda R. A valine-to-lysine substitution at position 210 induces structural conversion of prion protein into a beta-sheet rich oligomer. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 506:81-6.
- [23] Streets AM, Sourigues Y, Kopito RR, Melki R, Quake SR. Simultaneous measurement of amyloid fibril formation by dynamic light scattering and fluorescence reveals complex aggregation kinetics. *PLoS One* 2013; 8:e54541.
- [24] Yamaguchi K, Kamatari YO, Ono F, Shibata H, Fuse T, Elhelaly AE, et al. A designer molecular chaperone against transmissible spongiform encephalopathy slows disease progression in mice and macaques. *Nat Biomed Eng* 2019;3:206-19.
- [25] Cho KR, Huang Y, Yu S, Yin S, Plomp M, Qiu SR, et al. A multistage pathway for human prion protein aggregation in vitro: from multimeric seeds to beta-oligomers and nonfibrillar structures. *J Am Chem Soc* 2011; 133:8586-93.
- [26] Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Madsen AO, Riekkel C, Grothe R, et al. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 2005; 435:773-8.
- [27] Knowles TP, Waudby CA, Devlin GL, Cohen SI, Aguzzi A, Vendruscolo M, et al. An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science* 2009; 326:1533-7.
- [28] Zhang Y, Hashemi M, Lv Z, Williams B, Popov KI, Dokholyan NV, et al. High-speed atomic force microscopy reveals structural dynamics of alpha-synuclein monomers and dimers. *J Chem Phys* 2018; 148:123322.

- [29] Fauvet B, Mbefo MK, Fares MB, Desobry C, Michael S, Ardah MT, et al. alpha-Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and Escherichia coli exists predominantly as disordered monomer. *J Biol Chem* 2012; 287:15345-64.
- [30] Bhattacharya S, Xu L, Thompson D. Long-range Regulation of Partially Folded Amyloidogenic Peptides. *Sci Rep* 2020; 10:7597.
- [31] Wu KP, Baum J. Backbone assignment and dynamics of human alpha-synuclein in viscous 2 M glucose solution. *Biomol NMR Assign* 2011; 5:43-6.
- [32] Kamatari YO, Hayano Y, Yamaguchi K, Hosokawa-Muto J, Kuwata K. Characterizing anti-prion compounds based on their binding properties to prion proteins: implications as medical chaperones. *Protein Sci* 2013; 22:22-34.
- [33] Chandra S, Gallardo G, Fernandez-Chacon R, Schluter OM, Sudhof TC. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 2005; 123:383-96.
- [34] Rekas A, Adda CG, Andrew Aquilina J, Barnham KJ, Sunde M, Galatis D, et al. Interaction of the molecular chaperone alphaB-crystallin with alpha-synuclein: effects on amyloid fibril formation and chaperone activity. *J Mol Biol* 2004; 340:1167-83.
- [35] Park SM, Jung HY, Kim TD, Park JH, Yang CH, Kim J. Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of alpha-synuclein, a molecular chaperone. *J Biol Chem* 2002; 277:28512-20.
- [36] Janowska MK, Wu KP, Baum J. Unveiling transient protein-protein interactions that modulate inhibition of alpha-synuclein aggregation by beta-synuclein, a pre-synaptic protein that co-localizes with alpha-synuclein. *Sci Rep* 2015; 5:15164.
- [37] Arosio P, Michaels TC, Linse S, Mansson C, Emanuelsson C, Presto J, et al. Kinetic analysis reveals the diversity of microscopic mechanisms through which molecular chaperones suppress amyloid formation. *Nat Commun* 2016; 7:10948.
- [38] Bistaffa E, Rossi M, De Luca CMG, Cazzaniga F, Carletta O, Campagnani I, et al. Prion Efficiently Replicates in alpha-Synuclein Knockout Mice. *Mol Neurobiol* 2019; 56:7448-57.
- [39] Hashimoto M, Ho G, Takamatsu Y, Wada R, Sugama S, Waragai M, et al. Understanding Creutzfeldt-Jakob disease from a viewpoint of amyloidogenic evolvability. *Prion* 2020; 14:1-8.