

プリオン中間体と治療薬開発

分子感染機構と創薬制御

桑田一夫

1 今、なぜ、プリオン中間体か？

プリオンのフォールディング過程を調べることは、プリオンによる感染メカニズムの解明につながるであろうか？

プリオンのフォールディング過程は、おそらくその立体構造多形性と関連している。近年、日本で相次いで発見された若年発症タイプのウシ海綿状脳症 (BSE) は、プリオン株の違いによるものと考えられる。ハムスターでは立体構造および生物学的性状の異なる少なくとも8種類の株が確認されている¹⁾。株の違いが立体構造の差に基づくものであれば、プリオンのフォールディング過程で観測される複数の中間体は、神経細胞毒性そのものや生物学的性状の多様性と直接かかわっている可能性がある。

現在の状況をまとめてみよう。プリオンのフォールディング中間体は、塩酸グアニジンなどの変性剤存在下²⁾や低pH領域³⁾で、円二色性 (CD) スペクトルを用いて観測された。最近では速度論的フォールディング中間体に関する論文が発表されている⁴⁾。また、筆者らは高圧NMRを用いて、プリオン中間体の構造を残基レベルで特徴づけることに成功した⁵⁾。さらに、細胞型プリオンにおけるミリ秒オーダーの遅い構造ゆらぎが、プリオン中間体に至る反応経路に沿って生起していることを明らかにした⁶⁾。

病気を引き起こすプリオンの変異部位⁷⁾は詳細に調べられており、おもにヘリックスB、Cに集中している。一方、

プリオン中間体 (PrP^{*}) においても、ヘリックスB、Cに部分的な変性がみられる (図1)。とくに、 β シート部分と接触している部分が局所的な安定性が低いことがわかった⁵⁾。このことは、これらのプリオン中間体が、スクレイピー型 (PrP^{Sc}) への変換過程とかかわっている可能性を強く示唆している、といえるであろう。図1に示すように、PrP^{Sc}形成は、PrP^U形成反応に対してoff-pathwayである可能性が示唆されている (Kuwataら、未発表データ)。

2 疎水性クラスターとヘリックスとの関係は？

細胞型プリオン (PrP^C) のN末端側半分はほぼランダムコイルであるが、C末端側半分は β シートとヘリックスを形成している (図1参照)。静的構造だけを眺めれば、この2つの領域はあたかも独立に振る舞っているかのようにみえるが、「感染」という生物学的機能に着目すると、両者は切っても切れない関係にある。

PrP^CからPrP^{Sc}への構造変換過程はいまだ明らかではないが、PrP^{Sc}は単量体、もしくは2~6量体程度のオリゴマーであろうと考えられている^{8~10)}。ところがプリオン蛋白質の部分ペプチドPrP106-126はオリゴマーを形成し¹¹⁾、神経細胞死を誘導する¹²⁾。しかし、「感染」が成立するためには、この部分を含む疎水性クラスター部分とヘリックス部分とが必要である¹³⁾。

これらの実験事実は、一見独立に振る舞っているかにみ

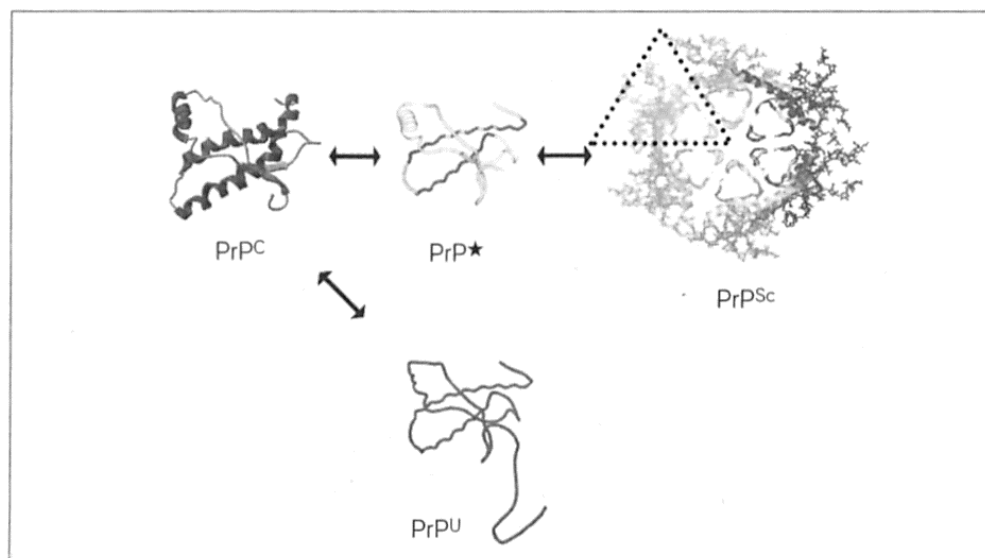


図1 プリオンの構造変換過程と中間体の役割⁵⁾

細胞型 (PrP^C)、中間体 (PrP^{*})、変性型 (PrP^U)、スクレイピー型 (PrP^{Sc}) の立体構造 (ハムスタープリオン、アミノ酸番号90から231番までを示す) と、立体構造変換にかかわる相互関係を示す。PrP^{Sc}はモデルにすぎない¹⁰⁾。

[口絵14 (p.812) 参照]

える疎水性クラスターとヘリックスとが、どこかで構造的に干渉し合っていることを示している。NMR実験の結果からも間接的に両者の相互作用が示唆されている⁵⁾。疎水性クラスターがアポトーシスを誘導するオリゴマーを形成するとすれば、ヘリックスはといったどのような役割を果たしているのだろうか？

3 認識なくして感染なし？

PrP^{Sc}がどのような機構で神経細胞死をもたらすか、という問題はいまだ解決していない。最近、アルツハイマー病、ポリグルタミン病、2型糖尿病などのいわゆるコンホーメーション病一般に対し、関連蛋白質のアミロイドにではなく、オリゴマー¹⁴⁾に毒性があると報告されている。しかし、これらがPrP^{Sc}と同様の「感染性」を有するかどうかについては、現段階では不明である。

蛋白質科学の観点からすると、分子感染がいかにして成立するか、という問題は、相当深い意味をもっている。天然立体構造が壊れ、感染因子の作用の下に異なる立体構造に巻き戻るといような反応が、本当に起こるのだろうか？

アミロイドの先端では、これに近い反応が生起している¹⁴⁾。律速段階は単量体における構造変換過程にある¹⁵⁾。しかし、現在ではどのような蛋白質でも、条件さえ整えばアミロイドを形成すると考えられている¹⁶⁾。

では、感染に必要なものは、何であろうか？ 電子顕微鏡画像から類推したPrP^{Sc}のモデル¹⁰⁾では、PrP^{Sc}はPrP^C構造が完全に崩壊したものではなく、ヘリックスの一部を残存している、と考えられている。つまり、PrP^{Sc}は、どうも立体構造が完全に壊れたものではなく、部分的にPrP^Cの構造を保持した、いわば中間体的な構造のようである。

つい最近、プリオンの構造変換を促進する物質として、RNAが報告されている¹⁷⁾。たとえばRNAを認識するためには、プリオンの側にも認識機構、すなわち何らかの立体構造が必要であろう。PrP^CからPrP^{Sc}への構造変換に際し、シャペロン様にはたらくと考えられている因子Xの結合部位^{*1)}は塩基性アミノ酸が多く、実際、DNAなどの核酸は非特異的にプリオンに結合し、構造を不安定化するのである¹⁸⁾。この意味で、RNAが因子Xに相当するかどうかの判断は注意を要する。

4 ダイナミクスに基づく創薬

構造に基づく創薬(structure based drug design: SBDD)が唱えられてから久しいが、華々しい成功は、おもに酵素阻害剤に限られている。プリオンでも、因子X結合部位に結合する薬物が探索された¹⁹⁾。しかし、その後、このようにして選ばれた薬剤は、「結局、効果がない」と評価されるに至った。実際、PrP^Cにおける因子X結合部位には、明瞭な結合ポケットは存在せず、結合定数もそれほど大きくない、と考えられる。

一方、先に述べたプリオン中間体(PrP^{*})の観測から、PrP^{Sc}は、変性型(PrP^U)からではなく、むしろPrP^{*}から生成される可能性がある(図1参照)。

PrP^{Sc}の構造はいまだ不明である。しかし、PrP^Cの構造を基にして、PrP^{*}への構造変換を選択的に抑制する薬剤をデザインすることは可能である。このような薬物は、PrP^Cの遅い構造揺らぎを抑制し、PrP^Cを安定化し、PrP^{*}のポピュレーションを減少させる。その結果としてPrP^{Sc}の生成を抑制する。別の言葉でいうと、「地震対策のできていない家の壁に、頑丈な柱を入れて、地震がきても簡単には倒壊しないようにする」、という地震対策に近い方法である。筆者はこれを、蛋白質のダイナミクスに基づく創薬(dynamics based drug design: DBDD)と名づけている。このような方法で、かなり強力な抗プリオン作用を有する物質が、現在、開発されつつある(本研究は長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 西田教行博士、片峰 茂 長崎大学副学長との共同研究である。論文投稿中)。

Q プリオンの感染は神経細胞に特異的でしょうか？ あるいは他の細胞にも感染するがPrP^Cが存在(少ない)ためにPrP^{Sc}の形成・蓄積が起こらないのでしょうか？

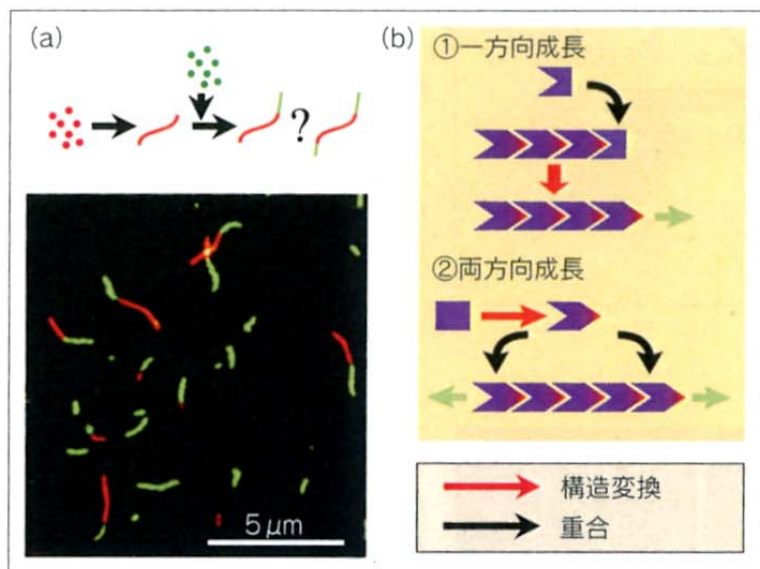
A PrP^{Sc}は、神経細胞以外の組織、たとえば白血球や脾臓組織にも蓄積しうるが、たとえ感染性を示したとしても、神経細胞以外の組織に対して明かな毒性を示すわけではない。驚くべきことに、細胞外PrP^{Sc}の蓄積自体が神経細胞に毒性を示すのでもない²⁰⁾。むしろ神経細胞内で形成されるさまざまな中間体構造が神経細胞毒性と直接かわっている可能性がある、という報告がなされている²¹⁾。このような意味において、プリオン中間体の立体構造決定、および中間体への構造転移を防止するための薬物デザインは、今後ますます重要になる、と考えられる。

*1 因子Xは、当初、仮想蛋白質で、PrP^CからPrP^{Sc}への構造変換反応の触媒としてはたらくと考えられた。その結合部位はヒトプリオンで、167, 171, 214, 218番目のアミノ酸残基に対応すると想定されている¹⁹⁾。しかし因子Xは必ずしも蛋白質である必要はなく、本文に示したようにRNAである可能性もある¹⁷⁾。

●文献

- 1) Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. : *Nature Med.*, **4**, 1157-1165 (1998)
- 2) Zhang, H., Stockel, J., Mehlhorn, I., Groth, D., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B., James, T. L., Cohen, F. E. : *Biochemistry*, **36**, 3543-3553 (1997)
- 3) Hornemann, S., Glockshuber, R. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6010-6014 (1998)
- 4) Apetri, A. C., Surewicz, W. K. : *J. Biol. Chem.*, **277**, 44589-44592 (2002)
- 5) Kuwata, K., Li, H., Yamada, H., Legname G., Prusiner, S. B., Akasaka, K., James, T. L. : *Biochemistry*, **41**, 12277-12283 (2002)
- 6) Kuwata, K., Kamatari, Y. O., Akasaka, K., James, T. L. : *Biochemistry*, in press (2004)
- 7) Prusiner, S. B. : *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **207**, 1-17 (1996)
- 8) Prusiner, S. B. : *Science*, **216**, 136-144 (1982)
- 9) Prusiner, S. B. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13363-13383 (1998)
- 10) Wille, H., Michelitsch, M. D., Guénebaut, V., Supattapone, S., Serben, A., Cohen, F. E., Agard, D. A., Prusiner S. B. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3563-3568 (2002)
- 11) Kuwata, K., Matumoto, T., Cheng, H., Nagayama, K., James, T. L., Roder, H. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14790-14795 (2003)
- 12) Forloni, G. *et al.* : *Nature*, **362**, 543-546 (1993)
- 13) Muramoto, T., Scott, M., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15457-15462 (1996)
- 14) Kaye, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., Glabe, C. G. : *Science*, **300**, 486-489 (2003)
- 15) Chen, S., Ferrone, F. A., Wetzel, R. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11884-11889 (2002)
- 16) Fandrich, M., Fletcher, M. A., Dobson, C. M. : *Nature*, **410**, 165-166 (2001)
- 17) Deleault, N. R., Lucassen, R. W., Supattapone, S. : *Nature*, **425**, 717-720 (2003)
- 18) Cordeiro, Y., Machado, F., Juliano, M. A., Brentani, R. R., Foguel, D., Silva, J. L. : *J. Biol. Chem.*, **276**, 49400-49409 (2001)
- 19) Perrier, V., Wallace, A. C., Kaneko, K., Safar, J., Prusiner, S. B., Cohen, F. E. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6073-6078 (2000)
- 20) Hill, A. F., Joiner, S., Linehan, J., Desbruslais, M., Lantos, P. L., Collinge, J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10248-10253 (2003)
- 21) Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klön, P-C., Brandner, S., Collinge, J. : *Science*, **302**, 871-874 (2003)

Kuwata Kazuo, 岐阜大学大学院医学研究科医科学専攻 分子・構造学講座 蛋白高次機能学分野 E-mail : kuwata@cc.gifu-u.ac.jp
Intermediate conformer of prion and Dynamics Based Drug Design (DBDD)

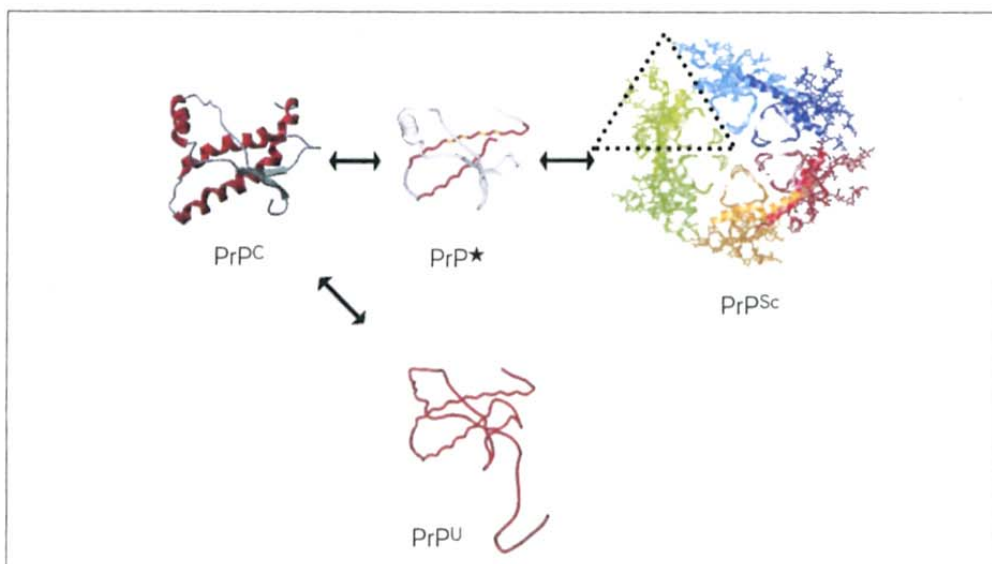


口絵 13 プリオン線維が構造変換を触媒する

(a) 赤で蛍光標識した Sup35NM 線維を緑で蛍光標識した Sup35NM で成長させたところ、大部分が一方方向成長を示した。緑だけの線維もあるがこれは後から加えた緑の Sup35NM が新たに線維形成したものである。

(b) もし構造変換の後で重合が起こるならば線維成長は両方向のはずである②。反対に、一方方向成長であるなら、構造変換は線維の末端に付加してから起こったことを示す①。

[井上雄嗣・吉田賢右, p.1108]



口絵 14 プリオンの構造変換過程と中間体の役割⁵⁾

細胞型 (PrP^c)、中間体 (PrP^{*})、変性型 (PrP^u)、スクレイピー型 (PrP^{Sc}) の立体構造 (ハムスタープリオン、アミノ酸番号 90 から 231 番までを示す) と、立体構造変換にかかわる相互関係を示す。

PrP^{Sc} はモデルにすぎない¹⁰⁾。

[桑田一夫, p.1110]