

## 特別講演



## プリオン病に挑むアンフォルジン

金子清俊

東京医科大学生理学第二講座

**【要旨】** 正常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) からプリオン病に関わる感染型プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) への変換に際しては、未同定の因子 (X 因子) の関与により、PrP<sup>C</sup> が一旦解きほぐしを受けると予想される。我々はこのような解きほぐし機能を有する分子を出芽酵母から同定し (アンフォルジン)、その性質を解析した。次に、PrP<sup>C</sup> の細胞内輸送機構の検討を行い、PrP<sup>C</sup> の N 末端側断片は細胞内に取り込まれた後に、微小管上を順行性及び逆行性に移動していることを確認し、その輸送に関与するモーター分子を同定した。また、PrP<sup>C</sup> 過剰発現による神経細胞死機構について検討した結果、ミトコンドリアアポトーシスの関与を明らかにし、ミトコンドリアへの transporter 並びにミトコンドリア外膜上の受容体の同定と分子機構を明らかにした。これらの成果に加え、最後に人工合成プリオンについて紹介する。

## はじめに

プリオン病に関わるプリオン蛋白質には、正常型 (PrP<sup>C</sup>) と感染型 (PrP<sup>Sc</sup>) の2つのアイソフォームが存在し、PrP<sup>C</sup> の立体構造変換による PrP<sup>Sc</sup> の複製がその発症原因とされる。我々の研究目標は、(1) PrP<sup>Sc</sup> への立体構造変換に関与する分子群の同定、(2) PrP<sup>C</sup> の生理機能解明、(3) プリオンによる神経細胞死の分子機構解析、(4) プリオン病治療・予防法の開発である。本稿においては、これらのうちの (1)-(3) について概説した後、昨年報告された人工合成プリオンについても簡単に紹介する。

## アンフォルジン

プリオン病の原因となる PrP<sup>Sc</sup> の複製は、PrP<sup>C</sup> に由来すると考えられている。両者のアミノ酸配列は相同であるが、その立体構造が大きく異なっている。PrP<sup>Sc</sup>

が複製される際には、原料となる PrP<sup>C</sup> が一旦解きほぐしを受けた後に、PrP<sup>Sc</sup> 型に巻き戻されるとされ、PrP<sup>C</sup> の解きほぐしに関与すると考えられているのがいわゆる X 因子である<sup>1)</sup>。

こういった解きほぐし活性は、正常に巻かれた分子 (PrP<sup>C</sup>) を標的とすると考えられるため、異常に巻かれた蛋白質を標的とする一般的な分子シャペロンの範疇には該当しない。そこで我々は、正常分子に対し解きほぐし活性を発揮するこのような分子シャペロンが実際に存在するかどうかを、まず酵母のアッセイ系を確立した後に検討した。その結果、正常に巻かれた蛋白質を解きほぐす新規クラスの分子シャペロンを同定し、“アンフォルジン”と命名した。アンフォルジンを高純度に精製し電子顕微鏡を用いて一分子の形態を低角度回転蒸着法により観察したところ、直径約 10 nm、中央に約 2 nm のホールを持つリング状構造が観察された (図 1)。アンフォルジンは通常の分子シャ

2005年6月4日 第155回東京医科大学医学会総会における特別講演

キーワード: アンフォルジン、微小管依存性輸送、ミトコンドリアアポトーシス

(別冊請求先: 〒160-8402 東京都新宿区新宿6-1-1 東京医科大学生理学第二講座 金子清俊)

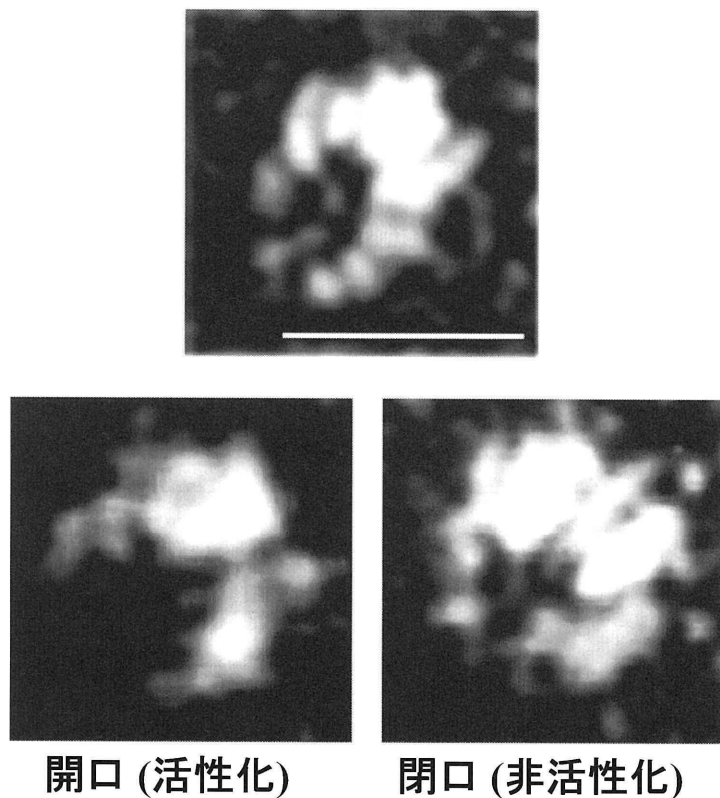


図1 アンフォルジンの電子顕微鏡写真  
ATP存在下で開口し(活性化)、ADP存在下では閉口する(非活性化)。スケールバー=10 nm。

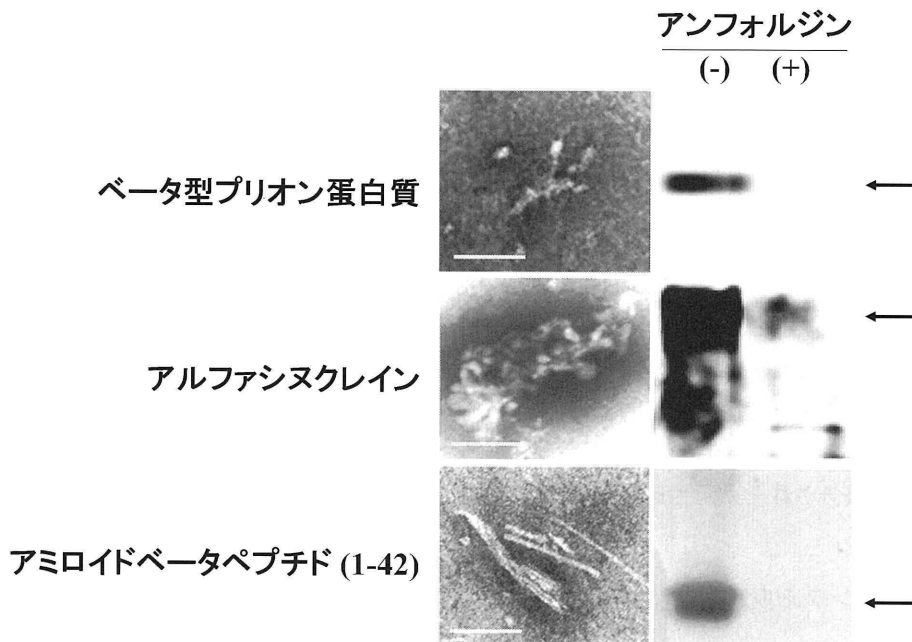


図2 アンフォルジンによる高度の解きほぐし活性  
アンフォルジンとの反応後、難溶性蛋白質である組み換えプリオン蛋白質(ベータ型)、アルファシヌクレイン、アミロイドベータペプチド(1-42)が、低濃度のトリプシン(200 ng/ml)にて容易に分解されている。繊維状の構造物は、難溶性蛋白質の電子顕微鏡写真に相当する(スケールバー=10 nm)。

ペロンとは異なり、正常に巻かれた分子を幅広く認識しており、その解きほぐし活性はATP依存性であり、ADP存在下では活性が認められない。我々はまた、ア

ンフォルジンは細胞周期依存性にその解きほぐし活性を変化させることを見出した。この新規分子シャペロンは、正常分子の“解きほぐし”を通じて正常蛋白

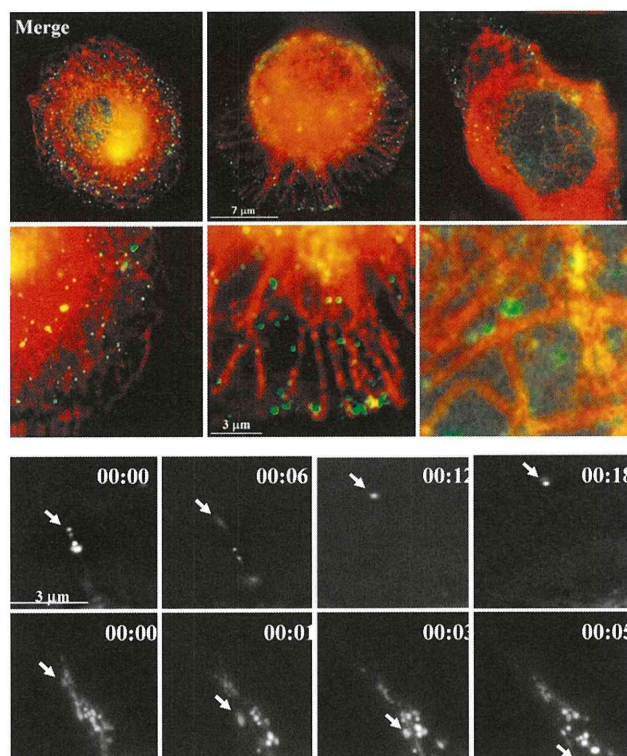
質の代謝制御に関与する可能性を示しており、従来知られていない新しい生体内分子制御機構の概念を形成する可能性も考えられる。

PrP<sup>Sc</sup>の分解には、加熱、加圧、焼却、強アルカリ処理といった非常に強力な不活法が要求されるが、これらの方法を生体内でのプリオン不活法として応用することは不可能である。現在我々は、アンフォルジンの治療への応用を目指している<sup>2-4)</sup>。試験管内でアンフォルジンがベータ型プリオン蛋白質、アルツハイマー病に関わるアミロイドベータペプチド (1-42)、パーキンソン病に関わるアルファシヌクレインなどの異常凝集蛋白質を解きほぐせるか否か、トリプシン感受性を用いたアッセイ系により検討した結果、予想通り ATP 存在下においてアンフォルジンはこれらの基質の立体構造を解きほぐし、トリプシン感受性をあげる事ができた (図2)。この活性を制御することができれば、プリオン病にとどまらず、他の神経変性疾患の有力な治療法となり得る可能性を秘めている。

### 正常プリオン蛋白質の微小管依存性細胞内輸送

PrP<sup>Sc</sup> についてのさまざまな研究成果の傍ら、PrP<sup>C</sup> についてはその生理的な機能はおろか、細胞内での動

態についてすらほとんど知られていない。そこで、まず細胞内可視化の系を用いて PrP<sup>C</sup> のマウス神経芽細胞腫由来 N2a 細胞内挙動を観察することにより、N2a 生細胞内での trafficking を解析し、以下に挙げる新しい事実を見出した<sup>5,6)</sup>。1) 微小管阻害剤であるノコダゾールにより、PrP<sup>C</sup> の細胞内局在パターンが明らかに阻害されたことから、PrP<sup>C</sup> の細胞内局在には微小管が関与していることを明らかにし、さらに試験管内の再構成実験により、PrP<sup>C</sup> と微小管との相互作用を確認した (図3)。2) N 末端に GFP を融合した PrP<sup>C</sup> を発現させ細胞内の動きをタイムラプスにて詳細に観察した結果、PrP<sup>C</sup> の微小管依存性順行性及び逆行性輸送を見出した。3) タイムラプス計測によって得られたデータから順行性及び逆行性輸送速度を計算し、さらに各阻害剤を添加した実験から、順行性輸送はキネシンスーパーファミリーの KIF4 によって、逆行性輸送はダイニンによって行われていることを明らかにした。4) PrP<sup>C</sup> のアミノ酸配列上、各輸送に関わる部分を同定した。さらに、5) N 末端、C 末端両方に蛍光蛋白質を融合したキメラプリオン蛋白質の N2a 生細胞による観察から、細胞内での PrP<sup>C</sup> 切断を可視化し、N 末端を含む切断断片と C 末端を含む切断断片では



Tubulin (赤) 依存性の  
PrPC (緑) 細胞内輸送

順行性輸送: 140-160 n m/sec

逆行性輸送: 1.0-1.2 μ m/sec

図3 微小管依存性細胞内 PrP<sup>C</sup> 局在と輸送

PrP<sup>C</sup> の N 末端側断片は細胞内に取り込まれた後に、微小管上に局在し、順行性 (KIF-4 依存性) 及び逆行性 (ダイニン依存性) に移動している。

各々の分布が異なっていることが明らかになった。この両端に蛍光分子を持つ PrP<sup>C</sup> 可視化の系により、細胞内で PrP<sup>C</sup> 切断に関わる酵素の同定などが可能になると期待され、今後さらに PrP<sup>C</sup> の生理機能解析が進展するものと考えられる。

**プリオン蛋白質過剰発現によって引き起こされる細胞死メカニズムの解明**

プリオン感染に際しての神経細胞死には、PrP<sup>Sc</sup>のみならず、PrP<sup>C</sup> の存在が必須であることが知られているため、次に我々は、PrP<sup>C</sup> 過剰発現による細胞死機構：過剰発現トランスジェニックマウス脳を用いた検討を行った。その結果、加齢に伴い PrP<sup>C</sup> は最終的にミトコンドリアへ標的化されアポトーシスを起こすことを見出した<sup>7)</sup>。さらに、N2a 細胞を用い、proteasome 阻害剤ラクタシスチンを添加することで PrP<sup>C</sup> が細胞内に蓄積する系を構築し、同様の現象が生じることを見出した<sup>7,8)</sup>。この系において PrP<sup>C</sup> のミトコンドリアへの標的化機構に関与する細胞質因子を調べたところ、

PrP<sup>C</sup> がミトコンドリアへ標的化するときの 14-3-3 蛋白質のアイソフォームを同定した。さらに 14-3-3 蛋白質を経由した標的化機構におけるミトコンドリア外膜上のレセプターも同定した (論文準備中、図 4)。

実際にプリオン病における神経細胞死とこれらの知見との関連を探るために、遺伝性プリオン病の一種である GSS with Y145STOP、すなわち PrP コドン 145 にアンバー変異が入ったプリオン病の細胞培養モデルを作成し検討したところ、Y145STOP を発現した細胞は、ミトコンドリアアポトーシスによる細胞死を来していることが確認された<sup>9)</sup>。このことは、ミトコンドリアアポトーシスが、プリオン病の神経細胞死、ひいては海綿状変化に、幅広く関連している可能性を示している。今後さらに、こういった他のプリオン病との関連について注目していく必要がある。

**人工合成プリオン**

コッホの四原則をプリオン説に引用すれば、(1) ある特定の感染症に罹った個体はその病変部において

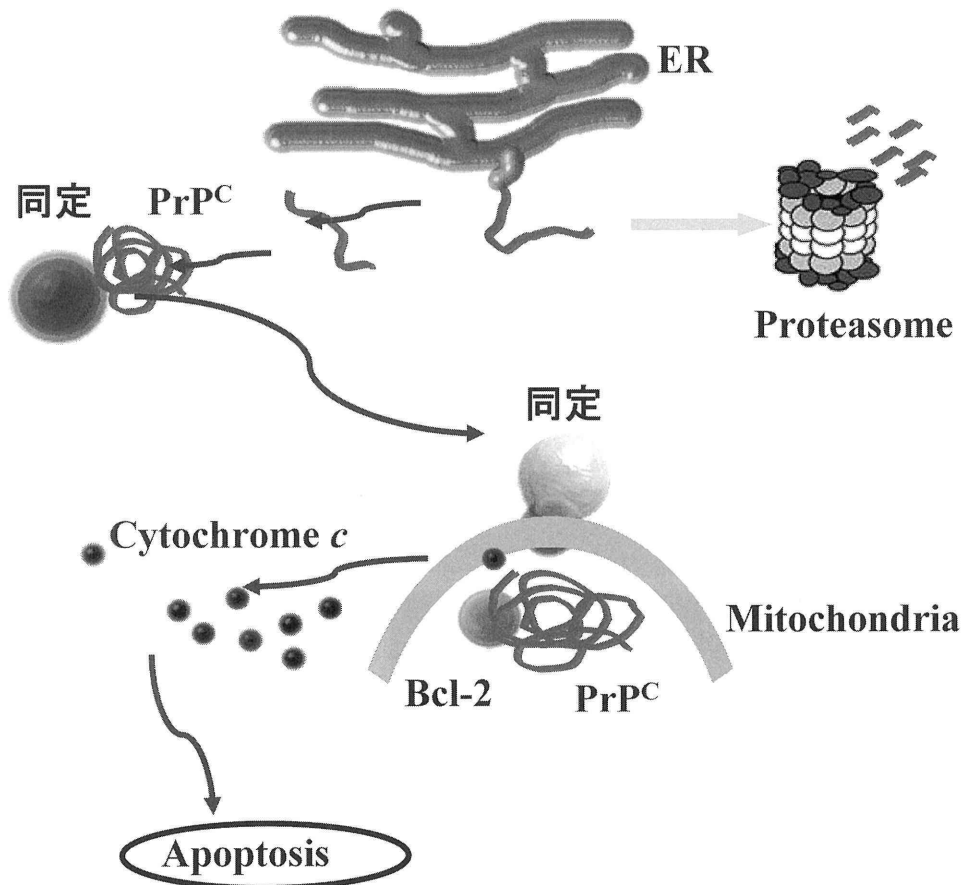


図 4 PrP<sup>C</sup> 過剰によるミトコンドリアアポトーシス  
PrP<sup>C</sup> 過剰発現による神経細胞死には、ミトコンドリアアポトーシスが関与することを明らかにし、その経路に存在する 2 つの新しい因子を同定した。この経路の活性化には、加齢等に伴うプロテアゾーム系の活性低下も重要な因子である。



特定の微生物が常に見出されなければならない、(2) その微生物は感染個体から純粋に分離培養されなければならない、(3) その純粋培養は感受性宿主（実験動物）へ接種されると同一の感染症にならない、(4) 感染動物から再び同一の微生物が分離されなければならない、のうち、(1) をプリオンそのものと捉えた場合、(2) 以降が問題とされてきた経緯がある。感染動物から分離精製された PrP<sup>Sc</sup> を他の感染動物で増殖させることは当初から可能であり、その意味ではコッホの四原則は達成されていたと考えてよいが、contamination の問題が大きく立ちはだかってきたのである。プリオン説の発表当初から、核酸がプリオンの本体であるとの意見が強く、あるいは例えば核酸でなくとも感染動物を出発材料とする限り、contamination という疑問に答えるには不十分であるとみなされた。いくら PrP<sup>Sc</sup> を精製しても、感染脳を出発材料とする限り、どうしても微量の核酸の混入を防ぐことは出来ないからである。

カリフォルニア大学サンフランシスコ校 (UCSF) の Dr. Stanley B. Prusiner の研究室では、人工合成したペプチドや組み換え蛋白質の立体構造を体外で人為的に感染型に変換し、それを用いてプリオン病を引き起こそうとする研究を継続して行ってきた。その過程で筆者らは、プリオン病を発症しやすい遺伝型プリオン病に認められる変異を導入した合成ペプチドをネズミに投与し、プリオン病の発症を加速させることができた<sup>9)</sup>。その際、変異を導入した合成 PrP ペプチドを用いて効率良い伝達を期待するためには、宿主マウスの PrP<sup>C</sup> にも同じアミノ酸変異を導入する必要があるが、変異導入 PrP<sup>C</sup> の発現量を上げ過ぎてしまうと、このマウスはプリオン病を自然発症してしまう。そこで、筆者らは内在性 PrP<sup>C</sup> と同程度の変異発現量を有するトランスジェニックマウスを、実験に用いた（このマウスはプリオン病の症状を呈さない）。このマウスは発症ぎりぎりの、まさに閾値をやや下回る程度の状態にあると考えられ、些細なトリガーにより発症する、極めて鋭敏な検出系であったと考えられ、この変異導入マウスに同じ変異を持つベータシート型合成ペプチドを投与したところ、すべてのマウスがプリオン病を発症したが、ベータシート型に構造変換しなかったものは投与しても変化を認めなかった。しかしこの実験系では、宿主側のプリオン遺伝子にも同様の突然変異を導入した点が議論となり、あくまでも突然変異を有さない野生型のアミノ酸配列による検討が

必要とみなされた経緯がある。

その後 2004 年になり、まさにこの点に進展を与えた成果が発表された<sup>10)</sup>。野生型のアミノ酸配列を有する組み換え PrP を用い、その立体構造をベータ型に変換した後にトランスジェニックマウスに投与し、それらの動物にプリオン病を発症させることに成功したのである。さらにこの論文中では、アミロイドを形成しやすいものとそうでないものの 2 系統の人工合成プリオンの比較検討もなされており、プリオン研究に残された strain (株) の課題にも大きな示唆を与えている。この成果が真にプリオン説の最終証明といえるかどうか、あらゆる他の可能性が除外されているかどうか、今後更に検討が続けられるであろうが、今後プリオンの人工合成が可能になるとすれば、基礎研究のみならず、診断・治療法の開発等にも大きく寄与するであろう。

## 終わりに

アンフォルジンには試験管内での基質特異性が認められないにもかかわらず、細胞内においては細胞周期依存性に活性調節機構が存在しており、それには ATP の結合が関与していると示唆された。この ATP 結合調節には、おそらく未知の因子が関与していることが推測される。これらのアンフォルジン活性調節機構を踏まえることで、プリオン病のみならずいわゆるタンパク質凝集病における、従来のアプローチ<sup>11-13)</sup>とは異なる新しい治療法開発の可能性が示唆される。

またアンフォルジンの高度の解きほぐし活性は、様々な分野に応用が可能である。LC-MS/MS 解析を例に取れば、膜タンパク質等の可溶化、断片化の困難なタンパク質群の効率的な解析が可能となれば、タンパク質の網羅的解析（プロテオーム解析）における飛躍的な進展が期待されるであろう。さらに、アンフォルジンを用いた種々の疾患における異常凝集体の構成成分を一括して解明することができれば、疾患の本体に迫る大きな手がかりとなる。また X 因子の同定に向けて、現在我々は哺乳動物細胞からアンフォルジンアッセイ系を応用し、新規解きほぐし活性の同定を行っている。今後 X 因子の同定が可能となれば、プリオン複製の機構解明に向けて、PrP<sup>Sc</sup> ないし PrP<sup>C</sup> の発見に匹敵するプリオン研究における大きなブレイクスルーとなるであろう。

神経機能分子と蛍光性タンパク質のキメラタンパク質は機能分子の動態・構造変化をリアルタイムで観

察するうえで極めて有効であり、この方法によって従来は見落とされていた現象として、プリオンタンパク質の順行性並びに逆行性輸送の詳細を明らかにすることが出来た。今後さらに PrP<sup>C</sup> と神経細胞死との関連に関する理解を深めることができれば、例え PrP<sup>Sc</sup> の増殖が防ぎきれなくとも、神経細胞死を抑制し、生存させることが可能となるかもしれない。すなわち、プリオン病の発症予防という観点からも、全く新しい治療戦略を構築することが可能となる。

### 謝 辞

本発表を終えるに当り、今までご支援いただきました方々、共に研究に携わっていただいた方々に厚く御礼申し上げます。とりわけ、アンフォルジンの同定をはじめ、本発表データの大部分をまとめられた八谷如美講師に深謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Kaneko K, Zulianello L, Scott M, Cooper CM, Wallace AC, James TL, et al.: Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10069-10074, 1997
- 2) Hachiya NS, Sakasegawa Y, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Interaction of d-lactate dehydrogenase protein 2 (Dld2p) with F-actin: implication for an alternative function of Dld2p. *Biochem Biophys Res Commun* **319**: 78-82, 2004
- 3) Hachiya NS, Sakasegawa Y, H. S, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Oligomeric Aip2p/Dld2p forms a novel grapple-like structure and has an ATP-dependent F-actin conformation modifying activity *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* **320**: 1271-1276, 2004
- 4) Hachiya NS, Sakasegawa Y, H. S, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Oligomeric Aip2p/Dld2p modifies the protein conformation of both properly-folded and misfolded substrates *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* **323**: 339-344, 2004
- 5) Hachiya NS, Watanabe K, Sakasegawa Y, Kaneko K: Microtubules-associated intracellular localization of the NH(2)-terminal cellular prion protein fragment. *Biochem Biophys Res Commun* **313**: 818-823, 2004
- 6) Hachiya NS, Watanabe K, Yamada M, Sakasegawa Y, Kaneko K. Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* **315**: 802-807, 2004
- 7) Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Sano K, et al.: Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP<sup>C</sup>. *Neurosci Lett* **374**: 98-103, 2005
- 8) Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Kozuka Y, Sakasegawa Y, et al.: Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* **327**: 894-9, 2005
- 9) Kaneko K, Ball HL, Wille H, Zhang H, Groth D, Torchia M, et al.: A Synthetic Peptide Initiates Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) Disease in Transgenic Mice. Running title: A peptide causes Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *J Mol Biol* **295**: 997-1007, 2000
- 10) Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, et al.: Synthetic mammalian prions. *Science* **305**: 673-676, 2004
- 11) Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, et al.: Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* **412**: 739-743, 2001
- 12) Perrier V, Kaneko K, Safar J, Vergara J, Tremblay P, DeArmond SJ, et al.: Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 13079-13084, 2002
- 13) Kishida H, Sakasegawa Y, Watanabe K, Yamakawa Y, Nishijima M, Kuroiwa Y, et al.: Nonglycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant-negative mutation inhibits PrP<sup>Sc</sup> replication *in vitro*. *Amyloid* **11**: 14-20, 2004

## Novel therapeutic challenge with unfoldin for the prion disease

Kiyotoshi KANEKO, MD

Second Department of Physiology, Tokyo Medical University

### Abstract

To examine the protein unfolding activities against collectly folded structure exist, we constructed an assay system and purified a novel molecular chaperone, Unfoldin, from *S. cerevisiae*. Unfoldin consists of oligomeric ring-like structure with the central cavity and has an ATP-dependent protein unfolding activity with broad specificity *in vitro*. Unfoldin may belong to an unusual class of molecular chaperones, which can target both properly-folded and misfolded proteins in an ATP-dependent manner *in vitro*. By utilizing double-labeled fluorescent PrP<sup>C</sup>, we revealed that the microtubules-dependent intracellular trafficking of NH<sub>2</sub>-terminal PrP<sup>C</sup> fragment and the kinesin family (KIF4)-driven anterograde and the dynein-driven retrograde movement of GFP-PrP<sup>C</sup>. We also demonstrated mitochondria-mediated apoptosis in aged transgenic mice overexpressing wild-type PrP<sup>C</sup> via a novel 14-3-3 isotype transports PrP<sup>C</sup> to a mitochondrial outer membrane receptor. The same system is also involved in the apoptosis of N2a cells expressing PrP residues 1-144, a heritable human prion disease model with Y145STOP. Following cell culture studies confirmed that decrease in the proteasomal activity is fundamental for the PrP<sup>C</sup>-related, mitochondria-mediated apoptosis. Hence, the age-dependent neurotoxic property of PrP<sup>C</sup> could be explained by the mitochondria-mediated neuronal apoptosis, at least in part. Finally, a recent paper on the mammalian synthetic prions was briefly mentioned.

---

<Key words> Unfoldin, Microtubules-dependent trafficking, Mitochondria-mediated apoptosis

---