

FIGURE 7: A sketch of the free energy landscape of a protein as a function of pressure (P) and temperature (T). Arrows on the right and left indicate the pressure and the temperature dependence, respectively, of the Gibbs free energy within the basic folded subensemble. The central arrow shows the effect of a fluctuation under physiological conditions occurring in a P/V plane.

ing the higher energy state occurs slowly.

Many intermediates in various proteins have been detected using high-pressure NMR (34). Why is pressure perturbation so sensitive for detecting intermediates compared to temperature perturbation? One reason may be that many intermediates are better defined in terms of volume than entropy. As long as protein folding occurs hierarchically with distinct volume changes, high-pressure NMR is quite useful to observe it. However, if an intermediate conformation has a volume similar to the native conformation, it may not be detected. Second, it must be noted that oligomers or aggregates, including amyloids, tend to dissociate into monomers under high pressure, while proteins generally tend to aggregate at high temperature. High-pressure NMR may prove advantageous for study of such intermolecular interactions.

CONCLUSIONS

Interaction between the C-terminal helical region and the hydrophobic cluster region of PrP^C was previously observed (11, 13), and both regions are required for the infectivity (38). As noted, the pressure-induced collapse of cavities probably accounts for the observed NMR signal changes in helices B and C and in the S2-B loop and the β -strand S2. Because the hydrophobic cluster is also in contact with S2 and helix B (11), as shown in Figure 4, conformational transitions in this region can transduce a switch to possibly involve most of the structural elements identified in rPrP-(90–231) in promoting the PrP^C \rightarrow PrP^{Sc} transformation. Pathogenicity itself must be directly related to the intermolecular interaction around the hydrophobic cluster regions, and the C-terminal helices may naturally prevent this intermolecular interaction. Modeling of PrP^{Sc} structure using electron microscopy has yielded models with intramolecular β -sheets while maintaining some helix structure (39). While progress on this difficult project is admirable, it is not possible at this stage to know with certainty whether the helices in PrP^{Sc} correspond precisely to those in PrP^C. PrP* presumably corresponds to an intermediate in the conversion process. Therefore, disease-causing mutations can increase the population of PrP*, which enables access to the hydrophobic cluster via the local conformational disorder of helices B and C. This may promote the conformational conversion process by intermolecular interaction at the hydrophobic

cluster, resulting in the intermolecular β -sheet formation characteristic of PrP^{Sc}.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Representative examples of the nonlinear curve fits of the relaxation dispersion data. This information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES

- Chazot, G., Broussolle, E., Lapras, C. I., Blättler, T., Aguzzi, A., and Kopp, N. (1996) New Variant of Creutzfeldt-Jakob Disease in a 26-Year-Old French Man. *Lancet* 347, 1181.
- Will, R. U., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., and Smith, P. G. (1996) A New Variant of Creutzfeldt-Jakob Disease in the UK. *Lancet*, 347, 921–925.
- Prusiner, S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136–144.
- Prusiner, S. B. (1991) Molecular Biology of Prion Diseases. *Science* 252, 1515–1522.
- Stahl, N., Baldwin, M. A., Teplow, D. B., Hood, L., Gibson, B. W., Burlingame, A. L., and Prusiner, S. B. (1993) Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 32, 1991–2002.
- Pan, K.-M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (1993) Conversion of α -Helices into β -Sheets Features in the Formation of the Scrapie Prion Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10962–10966.
- Riek, R., Flomenmann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., and Wüthrich, K. (1996) NMR Structure of the Mouse Prion Protein Domain PrP(121–231). *Nature* 382, 180–182.
- James, T. L., Liu, H., Ulyanov, N. B., Farr-Jones, S., Zhang, H., Donne, D. G., Kaneko, K., Groth, D., Mehlhorn, I., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. (1997) Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 10086–10091.
- Lopez Garcia, F., Zahn, R., Riek, R., and Wüthrich, K. (2000) NMR structure of the bovine prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8334–8339.
- Calzolari, L., Lysek, D. A., Guntert, P., von Schroetter, C., Riek, R., Zahn, R., and Wüthrich, K. (2000) NMR structures of three single-residue variants of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8340–8345.
- Liu, H., Farr-Jones, S., Ulyanov, N. B., Llinas, M., Marqusee, S., Groth, D., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., and James, T. L. (1999) Solution structure of Syrian hamster prion protein rPrP(90–231). *Biochemistry* 38, 5362–5377.
- Viles, J. H., Donne, D., Kroon, G., Prusiner, S. B., Cohen, F. E., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2001) Local structural plasticity of the prion protein. Analysis of NMR relaxation dynamics. *Biochemistry* 40, 2743–2753.
- Kuwata, K., Li, H., Yamada, H., Legname, G., Prusiner, S. B., Akasaka, K., and James, T. L. (2002) Locally disordered conformer of the hamster prion protein: a crucial intermediate to PrP^{Sc}? *Biochemistry* 41, 12277–12283.
- Luz, Z., and Meiboom, S. (1963) Nuclear Magnetic Resonance Study of the Protolysis of Trimethylammonium Ion in Aqueous Solution – Order of the Reaction with Respect to Solvent. *J. Chem. Phys.* 39, 366.
- Prusiner, S. B. (1996) Human Prion Diseases and Neurodegeneration. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 207, 1–17.
- Buevich, A. V., and Baum, J. (1999) Dynamics of unfolded proteins: incorporation of distributions of correlation times in the model free analysis of NMR relaxation data. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 8671–8672.
- Uversky, V. N. (2002) Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci.* 11, 739–756.
- Farrow, N. A., Zhang, O., Forman-Kay, J. D., and Kay, L. E. (1995) Comparison of the backbone dynamics of a folded and an unfolded SH3 domain existing in equilibrium in aqueous buffer. *Biochemistry* 34, 868–878.

19. Mulder, F. A. A., Spronk, C. A., E. M., Slijper, M., Kaptein, R., and Boelens, R. (1996) Improved HSQC Experiments for the Observation of Exchange Broadened Signals. *J. Biomolec. NMR* 8, 223–228.
20. van Tilborg, P. J., Mulder, F. A., de Backer, M. M., Nair, M., van Heerde, E. C., Folkers, G., van der Saag, P. T., Karimi-Nejad, Y., Boelens, R., and Kaptein, R. (1999) Millisecond to microsecond time scale dynamics of the retinoid X and retinoic acid receptor DNA-binding domains and dimeric complex formation. *Biochemistry* 38, 1951–1956.
21. Palmer, A. G., III, Skelton, N. J., Chazin, W. J., Wright, P. E., and Rance, M. (1992) Suppression of the effects of cross-correlation between dipolar and anisotropic chemical shift relaxation mechanisms in the measurement of spin spin relaxation rates. *Mol. Phys.* 75, 699–711.
22. Millet, O., Loria, J. P., Kroenke, C. D., Pons, M., and Palmer, A. G., 3rd. (2000) The Static Magnetic Field Dependence of Chemical Exchange Linebroadening Defines the NMR Chemical Shift Time Scale. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 2867–2877.
23. Davis, D. G., Perlman, M. E., and London, R. E. (1994) Direct measurements of the dissociation rate constant for inhibitor-enzyme complexes via the T1 rho and T2 (CPMG) methods. *J. Magn. Reson. B.* 104, 266–275.
24. Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blättler, T., Brandner, S., Götz, J., Rüllicke, T., Flechsig, E., Cozzio, A., von Mering, C., Hangartner, C., Aguzzi, A., and Weissmann, W. (1998) Expression of Amino-Terminally Truncated PrP in the Mouse Leading to Ataxia and Specific Cerebellar Lesions. *Cell* 93, 203–214.
25. Muramoto, T., DeArmond, S. J., Scott, M., Telling, G. C., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (1997) Heritable disorder resembling neuronal storage disease in mice expressing prion protein with deletion of an alpha-helix. *Nat. Med.* 3, 750–755.
26. Perrier, V., Kaneko, K., Safar, J., Vergara, J., Tremblay, P., DeArmond, S. J., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., and Wallace, A. C. (2002) Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 13079–13084.
27. Zhang, H., Stöckel, J., Mehlhorn, I., Groth, D., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B., James, T. L., and Cohen, F. E. (1997) Physical Studies of Conformational Plasticity in a Recombinant Prion Protein. *Biochemistry* 36, 3543–3553.
28. Hornemann, S., and Glockshuber, R. (1998) A scrapie-like unfolding intermediate of the prion protein domain PrP(121–231) induced by acidic pH. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6010–6014.
29. Apetri, A. C., and Surewicz, W. K. (2002) Kinetic intermediate in the folding of human prion protein. *J. Biol. Chem.* 277, 44589–44592.
30. Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C. M., Wallace, A. C., James, T. L., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (1997) Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 10069–10074.
31. Garcia, A. E., and Hummer, G. (1999) Conformational dynamics of cytochrome c: correlation to hydrogen exchange. *Proteins* 36, 175–191.
32. Karplus, M. (2000) Aspects of protein reaction dynamics: deviations from simple behavior. *J. Phys. Chem. B.* 104, 11–27.
33. Komatsuzaki, T., and Berry, R. S. (2001) Dynamical hierarchy in transition states: why and how does a system climb over the mountain? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 7666–7671.
34. Akasaka, K. (2003) Highly fluctuating protein structures revealed by variable-pressure nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 42, 10875–10885.
35. Akasaka, K., and Li, H. (2001) Low-lying excited states of proteins revealed from nonlinear pressure shifts in ¹H and ¹⁵N NMR. *Biochemistry* 40, 8665–8671.
36. Akasaka, K., Li, H., Yamada, H., Li, R. H., Thoresen, T., and Woodward, C. K. (1999) Pressure response of protein backbone structure. Pressure-induced amide ¹⁵N chemical shifts in BPTI. *Protein Sci.* 8, 1946–1953.
37. Tai, K., Shen, T., Borjesson, U., Philippopoulos, M., and McCammon, J. A. (2001) Analysis of a 10-ns molecular dynamics simulation of mouse acetylcholinesterase. *Biophys. J.* 81, 715–724.
38. Muramoto, T., Scott, M., Cohen, F., and Prusiner, S. B. (1996) Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 15457–15462.
39. Wille, H., Michelitsch, M. D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A., and Prusiner, S. B. (2002) Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 3563–3568.

BI0361230

蛋白質核酸酵素



*PROTEIN,
NUCLEIC ACID
AND ENZYME*

別刷

「蛋白質 核酸 酵素」編集部

共立出版株式会社

〒112-8700 東京都文京区小日向 4-6-19

Tel.03-3947-2515 FAX 03-3944-8182

E-mail : pne@kyoritsu-pub.co.jp

<http://www.kyoritsu-pub.co.jp/>

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、スクレイビー型 (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

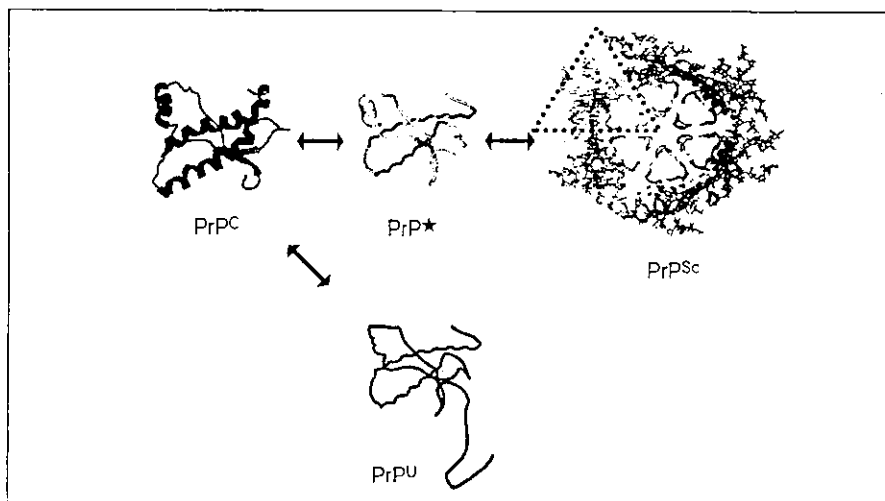


図1 プリオンの構造変換過程と中間体の役割⁵⁾

細胞型 (PrP^C)、中間体 (PrP^{*})、変性型 (PrP^U)、スクレイビー型 (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？

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、という問題はは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、分子感染がいかんして成立するか、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ようである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。

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}の構造ははまだ不明である。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？ あらういは他の細胞にも感染するがPrP^Cが存在(少ない)のためにPrP^{Sc}の形成・蓄積が起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⁾。

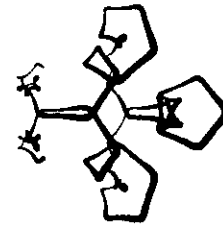
●文献

- 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)

素数とプリオン

21世紀における生命科学の新表現理論への挑戦



桑田 一夫

1. 21世紀における生命科学の表現理論を求めて

21世紀初頭、ヒトのゲノム配列がほぼ解読された。化学で言えば元素の周期律表に相当するものができたと言ってもよいだろう。メンデレーエフの時代には、周期律表の完成で科学は終わったと考える人もいた。しかし、実際に歴史を見てみれば、化学はまさにここから始まった、と言っても過言ではない。生命科学においても、ゲノム配列が解読されたことで、もう何もすることがないと悲観的に考える人がいるのは確かである。しかし本当は、これで漸く、生命科学がサイエンス（数理科学）の組上に乗った、と考えるべきではないだろうか？

20世紀初頭、アインシュタインはリーマン幾何学を用い、一般相対性理論を創った。また、同時期、ハイゼンベルクは作用素の非可換性を用いて、量子力学を創始した。21世紀は生命科学の時代であると言われる。プリオン病等の疾患治療を追及する医学は、人類の希望であり、生命科学の中核を形成している。では、生命科学を表現する言葉は何なのか？ 21世紀初頭に生きる我々に突きつけられた問題は、まさにここにあると言っても過言ではないだろう。

生物学的には、生命の実体は細胞を構成する蛋白質や核酸のネットワーク的な相互作用全体にある、と言える。しかし、厳密な言葉で語られなくては、生命機能の本質を理解することはできない。本稿では、素数を用い、生命を構成する蛋白質の構造ダイナミクスの表現に大胆に挑む。

2. 素数と生命とのマクロな関連

アメリカには姿・形・鳴き声の異なる「周期ゼミ」という複数の種類の蝉がいて、羽化する時期が、13年の周期と17年の周期を持つグループに分かれるらしい。これらの周期は、なぜ、素数でなければならないのか？ これに対する説明の一つは次のようなものである。

まず、同種の蝉で羽化する時期が同期する理由は、同期しない蝉は異性に巡り合うチャンスが減り、自然に絶滅したから、と考える。その周期が素数になる理由は、例えば異なる周期を持つ異種の蝉同士が交配すると、その子孫の同期性が減少し、生存に不利になるから、と考える。したがって、異なる周期を持つ異種の蝉同士はできるだけ交配しないほうが有利である。これを推し進めると、最小公倍数が最大である素数の周期を持つ蝉が生存に有利となり、その結果として生き残ったのが現在の姿である、という説明が可能となる¹⁾。

このように蝉の例は、素数と生命との関連を示す例として、極めて意義深い。このような現象が、生命を構成するミクロな分子レベルの現象として生起する可能性はあるのだろうか？

3. ミクロな熱力学モデル

周期の等しいグループ内では同期するけれども、周期の異なる他のグループとはできるだけ同期しない、というような不思議な現象が分子レベルで存在する可能性はあるだろうか？ R. Feynman²⁾ が提案した図1のモデルで考えてみよう。

左側の爪車は温度 T_1 の熱浴に接しており、右側の羽根車は温度 T_2 の熱浴に接している。左側の歯止めが車の歯を越えるためには ϵ の仕事が必要である、とする。

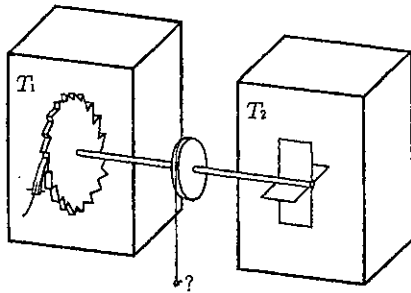


図1 Feynman のラチェットモデル。

このとき歯止めが偶然持ち上げられる確率は $e^{-\frac{\epsilon}{kT_1}}$ となる。仮に、 T_2 が T_1 より高いとする。羽根車から爪車の方向を見るとき、右向きの回転を考える。歯止めを持ち上げるために ϵ のエネルギーが必要である。また車をトルク L に対して θ 回転させるために、 $L\theta$ のエネルギーが必要となり、全体として必要なエネルギーは $\epsilon + L\theta$ である。この確率は、 $e^{-\frac{\epsilon + L\theta}{kT_2}}$ である。この駆動力は、右の熱浴 (T_2) から得るほうが確率としては高い。一方、左回転を考えると、羽根車を持ち上げられるのは、左の熱浴 (T_1) のみである。したがって、この確率は $e^{-\frac{\epsilon}{kT_1}}$ である。角速度は、 θ に 1 秒間歯が 1 つおき確率をかけたものであるから、比例定数を τ とすると、

$$\omega = \tau \theta \left(e^{-\frac{\epsilon + L\theta}{kT_2}} - e^{-\frac{\epsilon}{kT_1}} \right) \quad (1)$$

の角速度で回転することになる。 T_2 と T_1 の温度差を利用して、この装置は一方向に動くこととなり、分子モーターとなり得ることが分かる。

以上がラチェットモデルの概略である。さて、ここで素数との関連を考えてみよう。爪車の歯の数は整数である。これが I 個あったとしよう。 T_1 の温度が十分低いと、歯は 1 個ずつ刻むように進むだろう。また温度が高いと、爪車の歯は正確に認識されず、時々とばされるようになり、温度が高すぎると右回転か左回転かさえ区別できなくなるだろう。では、これらの中間だったら、どうだろうか？ ある確率で爪の歯がとばされるようになるだろう。

ここで、 I を素因数分解してみよう。 $I = p_1 p_2 \cdots p_i \cdots p_n$, ($p_{i-1} \leq p_i$) とする。温度が $p_1 p_2 \cdots p_{i-1} p_{i+1} \cdots p_n$, ($p_{i-1} \leq p_i$) 個とばすくらい高いが、 I 個全体をとばすほどは高くないとする。すると、この爪車は p_i という素数周期で回転する確率が高くなる。したがって、うまく、 T_1 と T_2 の値を調整すれば、素数周期で回転する可能性が存在することになる。しかし、非生命系では、素数周期を保存する機構が一般に見当たらない。

では生物の体内ではどうだろうか？ 例えば、ラチェット

トが細胞内蛋白質のような生命体の中の分子であったとする。特定の周期を有する構造ダイナミクスの中のある位相で酵素反応や情報伝達等の生命機能が果たされる場合、同じ機能に関与する分子同士は相互作用し合い、同期しなければ、細胞のようなマクロな生命体にとっては意味のある振動とはならないだろう。一方、周期の異なる分子同士が相互作用した場合、例えば p_i と p_j がミックスして、中間的な周期、 $\frac{p_i + p_j}{2}$ が生ずる可能性がある。すると本来の周期と同期することが困難となるため、両方の機能を果たすことができない。異なる周期を有する分子同士は、できるだけ相互作用しないほうが、生命機能にとって有利である。生命機能を的確に果たす生物が結果として生き残るため、素数周期を有する分子のダイナミクスが生命体の中で保存される可能性が出てくる。

次に、蛋白質という分子に関して、その具体的な姿を見てみよう。

4. 蛋白質のコンフォーメーションについて

BSE (狂牛病) やヒトのヤコブ病は、プリオンという蛋白質の構造変化が原因であると考えられている。正常プリオンは我々の脳の中に多く存在するが、外来性の異常プリオンに接触すると、正常プリオンが異常プリオンに変わる。このように異常プリオンがネズミ算的に増えることにより、脳内に異常プリオンが確実に蓄積していく。その結果、異常プリオンが臨界濃度を超え、神経細胞が死んでゆくと考えられている³⁾。

代表的な蛋白質分子であるプリオンを構成する粒子 (原子) の数は約 10000 個あり、それらは 1 本の開いた紐で結ばれている。それぞれの粒子が独立に運動していれば、統計的に扱う道が開けている (統計力学)。しかし蛋白質のような系では、一つ一つの原子の配置が特別な意味を持つようになり、統計平均するとその特徴が消えてしまう。

蛋白質のコンフォーメーションとは、蛋白質を構成する全原子の座標を意味している。ただし、あくまでも化学構造 (共有結合構造) は不変であり、化学結合に回転の自由度があるために生ずる座標の違いを、ここではコンフォーメーションと呼んでいる。物理的立場からすると、コンフォーメーションを規定する原子核のダイナミクスはほぼ古典的である。一方、電子のダイナミクスは量子力学的であり、実質上、原子間の相互作用ポテンシャルを形成する。蛋白質のコンフォー

メイシヨンの複雑さは、このように量子力学に立脚した上での原子配置という「組み合わせの複雑さ」に由来すると考えることもできる。またこれは一見、「見かけの複雑さ」のようにも見える。しかし、この複雑さはおそらく現存する数学や物理学の根本を揺るがすはずである。なぜなら、数論や量子論を産み出した我々の脳は蛋白質でできているからである。つまり、我々は、蛋白質の取り得る複雑さのキャパシティーの範囲内で情報を整理している、と考えることも可能である。

もし、3体問題のような多体問題の解の「複雑さ」を表す指標があれば、プリオンのような蛋白質の「複雑さ」もある程度表現できるだろう。このとき、ある体積の脳が表現することのできる「複雑さ」は同じ体積の蛋白質が取り得る「複雑さ」を超えることはない、と考えられる。これを「蛋白体仮説」と呼んでも良いだろう。

ところで、蛋白質のコンフォーメイシヨンは、連続的に分布しているのではなく、ほぼ離散的であり、せいぜい数個の決まった構造しか取らないことが、実験的に分かっている。つまり蛋白質のコンフォーメイシヨンは、量子化されている。これはおそらく、熱力学的に安定なコンフォーメイシヨンの少数しか生じないように、アミノ酸配列が進化してきた結果と考えられる。

ある蛋白質が2つのコンフォーメイシヨンの、A状態とB状態を交互に入れ代わるとする。これは図1のラチェットで、爪車の爪が2個の場合に相当する。ここで $\varepsilon_{ji}(t)$ が、コンフォーメイシヨンの i における、サイト j での非共有結合エネルギーを表すとすると、

$$\varepsilon_{ji}(t) = \begin{cases} \varepsilon_{jA}(t); & \text{時刻 } t \text{ において } A \text{ 状態に} \\ & \text{あるとき,} \\ \varepsilon_{jB}(t); & \text{時刻 } t \text{ において } B \text{ 状態に} \\ & \text{あるとき.} \end{cases} \quad (2)$$

蛋白質1分子全体の非共有結合エネルギーを測定したとき、観測量の期待値 $\theta_i(t)$ は

$$\theta_i(t) = \sum_{j=1}^n \langle \Psi_j(t) | O_{ji} | \Psi_j(t) \rangle \quad (3)$$

と表せる。ここで

$$|\Psi_j(t)\rangle = e^{-i\varepsilon_{jB}(t-t_m)} e^{-i\varepsilon_{jA}(t_m-t_{m-1})} \dots e^{-i\varepsilon_{jB}(t_2-t_1)} e^{-i\varepsilon_{jA}t_1} |\Psi_j(0)\rangle \quad (4)$$

であり、 O_{ji} は観測の演算子である。このような意味において、蛋白質のコンフォーメイシヨンは、量子力学的な波動関数に替えることもできる。

蛋白質のダイナミクスには、様々のタイムスケールが存在する。室温で溶液中の水分子は約1ピコ秒で回転しており、これに応えるかのように、水分子に接触する蛋白質の側鎖はピコ秒のオーダーで振動している。ナノ秒のタイムスケールで蛋白質全体が回転する。例えば、プリオンは約10ナノ秒で1回転する。このような、ピコ秒からナノ秒の速い運動は、蛋白質の基本物性として特徴付けられ、普遍的に存在している。一方、蛋白質には、マイクロ秒からミリ秒のタイムスケールで起きるゆっくりした運動が存在することが知られている。それは、譬えてみれば、24時間で回転している地球に時々地震が生ずるようなものであり、protein-quake と呼ばれている。現在では、蛋白質の生物学的に重要な機能あるいは病原性を特徴付けるのはこのような遅い揺らぎのモードである、と考えられている。

このような遅い揺らぎのモードは、蛋白質が、紐のように伸びた状態から、丸まった安定立体構造が形成される過程（フォールディング過程）に関与する、蛋白質の位相空間内軌道を含んでいる⁴⁾。

現在では、核磁気共鳴法（NMR）を用いると、そのような遅い運動を蛋白質の全原子において計測することが可能となっている。NMRでは原子核の遅い運動は電子による磁気遮蔽を観測しているため、原子核の運動に厳密に追従する。しかし、ポピュレーションの変動を観測しているため、ミリ秒の間に、稀に、ナノからピコの運動が起きるのか、マイクロからミリ秒かけてゆっくり運動するモードがあるのかは、未だ判明していない⁴⁾。しかし、最近の1分子計測を見ていると、後者に見られる本当に遅いモードも存在している、と考えざるを得ない状況にきている。このモードがやはり蛋白質機能（生命機能）の本態を表している可能性があるのである⁵⁾。

このような蛋白質の揺らぎを解析するのに核磁気緩和現象が用いられてきた。ところが、核磁気緩和現象は、久保⁶⁾やRedfield⁷⁾による線形応答理論や摂動論を用いて論じられてきた。現在でも、基本的にこの流れに沿って解析が行われている。しかし、蛋白質ダイナミクスの本質的複雑さを考慮した理論的枠組みというものは、未だ存在しない。

5. 原子核の運動状態

蛋白質のように数万の原子からなる多体系に関する実験結果を解析する場合、使用する理論式には多体効

果を直接入れない。例えば、核磁気緩和現象を扱う場合は、各原子核が独立に振る舞うものと考え、実験結果を理論式に当てはめて得られたパラメーターを評価することにより、多体効果、束縛力あるいは拘束力を推定するのが普通である。ここでも、そのような取り扱いを行う。既存の核磁気緩和理論との違いは、多体効果の導入ではなく、原子核のダイナミクスを記述する理論式に素数 (Riemann ゼータ関数を通じて) による記述を最初から取り入れたことにある。

d 次元の位相空間を動く質量 m の原子核を考える。 x を座標、 y を運動量としよう。そのハミルトニアンは、

$$H(x) = -\frac{\hbar^2}{2m} \sum_{j=1}^3 \frac{\partial^2}{\partial x_j^2} + V(x_1, x_2, x_3) \quad (5)$$

である。ここで V は座標 (x_1, x_2, x_3) に依存するポテンシャル関数を表す。シュレーディンガー方程式は、

$$H(x)\Psi_n(x) = E_n\Psi_n(x) \quad (6)$$

であり、その解は以下のグリーン関数で記述される。

$$G(x'', x'; E) = \sum_n \Psi_n(x'')\Psi_n(x')/(E - E_n). \quad (7)$$

ここで E_n はトレースの極を表している。

$$\begin{aligned} \text{Tr}G(E) &= \left(\equiv \int dx G(x'', x'; E) \right) \\ &= \sum_n \frac{1}{E - E_n}. \end{aligned} \quad (8)$$

グリーン関数は下記の時間推進プロパゲーターのラプラス変換でもあるので、ここで時間推進プロパゲーターを考えよう。

$$K(x'', x'; t) = \langle x'' | e^{-iHt/\hbar} | x' \rangle. \quad (9)$$

ファインマンの経路積分によれば、プロパゲーターは一般に

$$K(x'', x'; t) = \int_{x(0)=x'}^{x(t)=x''} D[x] \exp\{(i/\hbar)S[x]\} \quad (10)$$

と書ける。ここで L はラグランジアンであり、 S は作用を表す。

$$S[x] = \int_0^t L(x, \dot{x}) dt. \quad (11)$$

プロパゲーターは、また以下のようにも書ける。

$$K(x'', x'; t)$$

$$\begin{aligned} &= \lim_{N \rightarrow \infty} [mN/(2\pi i\hbar t)]^{3N/2} \int_{-\infty}^{\infty} \cdots \int_{-\infty}^{\infty} \prod_{i=1}^{N-1} dx_i \\ &\times \exp \left\{ \frac{i}{\hbar} \frac{t}{N} \sum_{i=1}^N \left[\frac{m}{2} \left(\frac{x_i - x_{i-1}}{t/N} \right)^2 - V(x_i) \right] \right\}. \end{aligned} \quad (12)$$

天然構造を中心とした基準振動の範囲内でのみダイナミクスを考える場合、近似的に系を可積分系と考えることもできるが、タイムスケールがフェムトからピコ秒の範囲に限定される。また上で述べたように、生命機能に必要な構造揺らぎは、マイクロからミリ秒にあるため、このようなグローバルな構造揺らぎを含んだ表現でなければならない。そこで、ここでは、我々は系を非可積分系として取り扱う。

半古典的取り扱いでは ($\hbar \rightarrow 0$)、 $\delta S[x] = 0$ となる鞍状点の周辺の軌道を数えればよいと考える。特に、蛋白質の構造が平均として天然状態にあるような場合、各原子は基本的に周期的 (再帰的) な運動を行うものと考えてよいだろう。このような場合、各原子の軌道は位相空間上、鞍状点の周辺を廻っている、と考えられる。このような非可積分系でも、鞍点法が適用できるとすれば、以下の式が成り立つ。

$$\begin{aligned} \frac{\partial S(x, x)}{\partial x} &\equiv \frac{\partial S(x'', x')}{\partial x''} + \frac{\partial S(x'', x')}{\partial x'} \Big|_{x''=x'=x} \\ &= 0. \end{aligned} \quad (13)$$

$x'' = x' = x$ という状態は、 $\text{Tr}G(E)$ に周期軌道のみが寄与することを意味する。したがって、 $\text{Tr}G(E)$ は周期軌道の和で表現される。

ここで、局所座標を導入し、周期軌道に沿った成分を $x_{//}$ 、それに直交する成分を x_{\perp} 、とする。

$$x = (x_{//}, x_{\perp 1}, x_{\perp 2}) = (x_{//}, x_{\perp}). \quad (14)$$

ハミルトン・ヤコビ方程式のエネルギー保存則より、

$$\begin{aligned} H(x, y) &= H\left(x, \frac{\partial S}{\partial x}\right) = E, \\ \left| \frac{\partial^2 S}{\partial x' \partial x''} \right| &= 0. \end{aligned} \quad (15)$$

したがって、

$$\begin{aligned} \hat{T} &= -\frac{\partial^2 S}{\partial E \partial x''_{//}} \frac{\partial^2 S}{\partial E \partial x''_{\perp}} \Big|_{\partial x'_{\perp} \partial x''_{\perp}} \\ &= (-1)^3 \frac{1}{\dot{x}'_{//} \dot{x}''_{//}} \det \left(\frac{\partial y'_{\perp}}{\partial x''_{\perp}} \right), \end{aligned} \quad (16)$$

$$S(x'', x', E)|_{x''=x'} = S_p(E) + (1/2) \sum_{i,j=1}^{d-1} R_{ij}(x_{//}) x_{\perp i} x_{\perp j}. \quad (17)$$

$S_p(E)$ はここで、周期軌道における作用である。

$$S_p(E) = \oint y dx, \quad (18)$$

$$R(x_{//}) = \left(\frac{\partial^2 S}{\partial x''_{\perp} \partial x''_{\perp}} + \frac{\partial^2 S}{\partial x''_{\perp} \partial x'_{\perp}} + \frac{\partial^2 S}{\partial x'_{\perp} \partial x''_{\perp}} + \frac{\partial^2 S}{\partial x'_{\perp} \partial x'_{\perp}} \right)_{x''_{\perp}=x'_{\perp}=0}. \quad (19)$$

グリーン関数に対するそれぞれの周期軌道の寄与は、

$$\delta \text{Tr}G(E) \propto \exp\{-i(S_p/\hbar - \mu_p \pi/2)\} \times \int |\hat{T}_p(x_{//})|^{1/2} |\det R(x_{//})|^{-1/2} dx_{//}. \quad (20)$$

ここで、 μ_p は一般化されたモース・マスロフ指数である。線形化されたポアンカレ写像、すなわちモノドロミー行列を用いることにより、我々は上記の積分を書き直すことができる。 $\partial S/\partial x'' = y''$, $\partial S/\partial x' = -y'$ という関係を用いることにより、 $\det R(x_{//})$ は以下のように書き直される。

$$\begin{aligned} \det R(x_{//}) &= \det \left(\frac{\partial y''_{\perp}}{\partial x''_{\perp}} - \frac{\partial y'_{\perp}}{\partial x''_{\perp}} + \frac{\partial y''_{\perp}}{\partial x'_{\perp}} - \frac{\partial y'_{\perp}}{\partial x'_{\perp}} \right)_{x''_{\perp}=x'_{\perp}=0} \\ &= -\det \left(\frac{\partial (y''_{\perp} - y'_{\perp}, x''_{\perp} - x'_{\perp})}{\partial (x''_{\perp} - x'_{\perp})} \right)_{x''_{\perp}=x'_{\perp}=0} \end{aligned} \quad (21)$$

一方、

$$|\hat{T}_p(x_{//})| = \frac{1}{\dot{x}_{//}^2} \left| \frac{\partial y'_{\perp}}{\partial x''_{\perp}} \right|_0 = \frac{1}{\dot{x}_{//}^2} \left| \frac{\partial (y'_{\perp}, x'_{\perp})}{\partial (x''_{\perp}, x'_{\perp})} \right|_0 \quad (22)$$

0 は $x''_{\perp} = x'_{\perp} = 0$ を意味する。

$$|\hat{T}_p(x_{//})|^{-1/2} |\det R(x_{//})|^{1/2} = |\dot{x}_{//}| \left| \frac{\partial (x''_{\perp} - x'_{\perp}, y''_{\perp} - y'_{\perp})}{\partial (x'_{\perp}, y'_{\perp})} \right|_0. \quad (23)$$

ここで、 $2(d-1)$ 次元のベクトル $\xi_{\perp} = (x_{\perp}, y_{\perp})$ を導入すると、最後の項は $2(d-1) \times 2(d-1)$ 次元の周期軌道のモノドロミー行列 M_p を用いて以下のように書き直すことができる。

$$\begin{aligned} & \left| \frac{\partial (x''_{\perp} - x'_{\perp}, y''_{\perp} - y'_{\perp})}{\partial (x'_{\perp}, y'_{\perp})} \right|_0 \\ &= \left| \frac{\partial (\xi''_{\perp} - \xi'_{\perp})}{\partial \xi'_{\perp}} \right|_0 = |\det(M_p - I)|. \end{aligned} \quad (24)$$

以下の点を考慮すれば、

$$\int \frac{1}{\dot{x}_{//}} dx_{//} = \int_p dt = T_p. \quad (25)$$

$\text{Tr}G(E)$ は、それぞれの周期軌道のグローバルな特徴により表現される。個々の周期軌道は基本周期軌道あるいは素な軌道を表す自然数 (素数) から構成される。 T_p は、 p の周期である。

もし、すべての周期軌道からの寄与を数え上げることができれば、 $\text{Tr}G$ を計算できるだろう。ここでは、基本周期軌道 p と自然数 l_p とからなる、不安定な周期軌道を考える。作用 p と周期をそれぞれ $S_p(E)$, $T_p(E)$ とする。そこで、Gutzwiller のトレース形式が得られる。

$$\begin{aligned} & \text{Tr}G_{scf}(E) - \text{Tr}G_0(E) \\ &= (i\hbar)^{-1} \sum_p T_p \sum_{l_p=1}^{\infty} \{ \det(M_p^{l_p} - I) \}^{-1/2} \\ & \quad \times \exp\{il_p(S_p/\hbar - \mu_p \pi/2)\} + O(\hbar^0), \end{aligned} \quad (26)$$

$$\begin{aligned} & \text{Tr}G_0(E) \\ &= (\pi/i)(2\pi\hbar)^{-3} \iint dy dx \delta(H(x, y) - E) \\ & \quad + O(\hbar^{-2}). \end{aligned} \quad (27)$$

モノドロミー行列は、軌道に対して垂直な成分の微分、 $\delta x_{\perp}^{(n)}$ の時間発展を記述する。 M_p の固有値、 Λ_p は、不動点の種類に依存する。 $\Lambda_p = \exp(+u_p)$ および $\exp(-iu_p)$ は、それぞれ不安定および安定軌道に対応する ($u_p > 0$)。特に、双曲型の不動点を有するホモクリニック軌道に対しては、リャプノフ指数 ($u_p > 0$) を用いて、

$$\det(M_p^l - I) = 4 \sinh^2(lu_p/2) \quad (28)$$

と書ける。この式を収束させるため、以下のように変形する。

$$[2 \sinh(lu_p/2)]^{-1} = \sum_{k=0}^{\infty} \exp\left[-l\left(k + \frac{1}{2}\right)u_p\right] \quad (29)$$

このとき、

$$\text{Tr}G_{scf}(E) - \text{Tr}G_0(E) \cong -\frac{d}{dE} \ln \zeta(E) \quad (30)$$

と表せるが、ここで $\zeta(E)$ は Ruelle の力学系ゼータ関数であり、Riemann ゼータ関数の友達である。

$$\zeta(E) = \prod_p \prod_{k=0}^{\infty} (1 - t_p \Lambda_p^{-k})^{-1},$$

$$t_p = |\Lambda_p|^{-1/2} \exp[i(S_p/\hbar - \mu_p \pi/2)]. \quad (31)$$

一方、周期軌道の和と Riemann ゼータ関数が等しいことは次のようにして分かる。Riemann 階段関数は次のように定義される。

$$N(\omega) = \sum_{k=1}^{\infty} \Lambda(\omega - \omega_k). \quad (32)$$

ここで Λ は von Mangoldt 関数 ($n = p^a$ が素数のべき乗であるとき、 $\Lambda = \ln(p)$ 、それ以外は $\Lambda = 0$) を表す。Riemann 階段関数の振動部分は次のように書ける。

$$N_{osc}(\omega) = -\frac{1}{\pi} \lim_{\eta \rightarrow \infty} \text{Im} \ln \zeta \left(\frac{1}{2} - i(\omega + i\eta) \right)$$

$$= -\frac{1}{\pi} \text{Im} \sum_p \sum_{m=1}^{\infty} \frac{1}{mp^{\frac{m}{2}}} e^{i\omega m \ln(p)}. \quad (33)$$

一方、Riemann 零点の間隔は

$$\rho_{osc} = \frac{dN_{osc}}{d\omega} = \frac{d \ln \zeta}{d\omega} = -\frac{1}{\pi} \text{Im} g(\omega). \quad (34)$$

ここで

$$g(\omega) = i \sum_p \sum_{m=1}^{\infty} \frac{\ln(p)}{p^{\frac{m}{2}}} e^{i\omega m \ln(p)}. \quad (35)$$

一方、Gutzwiller の周期軌道量は

$$\rho_{osc}(E) = -\frac{1}{\pi} \text{Im} \sum_{p_0} A_{p_0} e^{iS_{p_0}}. \quad (36)$$

(35) と (36) を比較すると、次のように類推できる。

$$A_{pm} = i \frac{\ln(p)}{p^{\frac{m}{2}}}, \quad S_{pm} = m\omega \ln(p). \quad (37)$$

あるいは、(26) と (35) とを比較して、

$$T_p \sim \ln(p), \quad \det(M_p^m - I) \sim p^m,$$

$$im \left(\frac{S_p}{\hbar} - \mu_p \frac{\pi}{2} \right) \sim i\omega m \ln(p). \quad (38)$$

結論的に言えば、Ruelle のゼータ関数と Riemann ゼータ関数とは、基本周期の物理的単位を実験的に決定することができれば、物理的には等価な表現である、と考えてよいだろう。

一方、動的感受率はトレース形式を用い、以下のよ

うに書き表せることが分かっている⁸⁾。

$$\chi'' = -\frac{\omega}{2\pi} \int dt \int \frac{d^f x d^f y}{(2\pi\hbar)^f} \delta(E - H) A_W(x, y)$$

$$\times [e^{(i\omega - \hat{L}_{cl})t} B_W](x, y) + O(\hbar^{-f+1})$$

$$- \frac{\omega}{2\pi\hbar} \delta(E_F - \hat{H}) \sum_{p,r} \frac{\cos\left(\frac{r}{\hbar} S_p - r \frac{\pi}{2} \nu_p\right)}{|\det(m_p^r - I)|^{1/2}}$$

$$\times \int dt e^{i\omega t} \oint_p d\tau A_W(\tau) B_W(t+\tau) + O(\hbar^0)$$

$$\cong A - \frac{d}{ds} \ln \zeta(s) \int dt e^{i\omega t} \oint_p d\tau A_W(\tau) B_W(t+\tau)$$

$$+ O(\hbar^0)$$

$$\cong A - B \frac{\zeta'(s)}{\zeta(s)}. \quad (39)$$

ここで、 f は自由度、 \hat{L}_{cl} はリウヴィル演算子、 S_p は作用、 ν_p は Maslov 指数、 m_p は周期軌道 p のモノドロミ行列であり、 r は繰り返し数を表す。

一方、Titchmarsh E.C.⁹⁾ によれば、

$$\frac{\zeta'(s)}{\zeta(s)} = b - \frac{1}{s-1} - \frac{1}{2} \frac{\Gamma'(1+s/2)}{\Gamma(1+s/2)}$$

$$+ \sum_{\text{Im} \rho < 0} \left(\frac{1}{\rho} + \frac{1}{\rho^*} + \frac{1}{s-\rho} + \frac{1}{s-\rho^*} \right)$$

$$\cong -\frac{1}{1/4 + \omega^2} + \frac{1}{2} \sum_{\omega_\rho > 0} \left(\frac{1}{(1/4)^2 + (\omega + \omega_\rho)^2} \right.$$

$$\left. + \frac{1}{(1/4)^2 + (\omega - \omega_\rho)^2} \right). \quad (40)$$

動的感受率は、横緩和時間 T_2 と以下のように関連している。

$$\chi'' = \frac{\gamma M_0}{2V} \frac{T_2}{1 + (\omega - \omega_0)^2 T_2^2}. \quad (41)$$

したがって、我々は周期軌道という観点から、上記の Riemann ゼータ関数を用い、蛋白質における原子核の振舞いを評価することができるだろう。

図 2 は、(40) を、現在までに分かっている Riemann ゼータ関数の零点を用いて評価したものである。感受率の逆数は、周波数のほぼ二乗に比例することが分かる。当然のことではあるが、周期軌道に対してのみ成り立つ。また、素数の 2 に相当する物理的な単位は実験的に決める必要がある。これがどのエネルギーレベルに存在するのか、は大変興味深いところである。

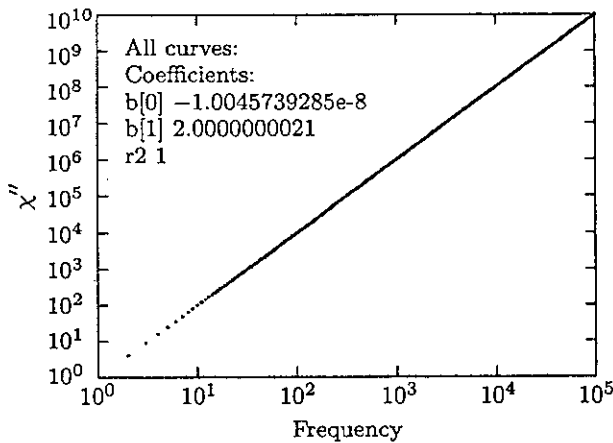


図2 半古典的モデルにおける Susceptibility の周波数依存性.

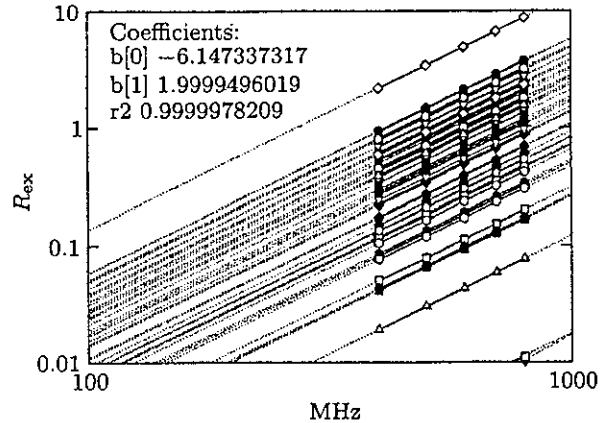


図3 安定な球状蛋白質における原子核のマイクロ秒からミリ秒オーダーにおける遅い緩和速度成分の分布.

6. 蛋白質内部における 原子核ダイナミクスの実測

高分解能核磁気共鳴法を用いて、実際の蛋白質内部における原子核ダイナミクスの測定を行った結果を図3に示す。p8^{MTCP1} という球状蛋白質を用い¹⁰⁾、磁場の強さを変え、 T_2 緩和時間の共鳴周波数依存性が調べられた。詳細は省くが、実験的には、縦緩和速度 (R_1)、横緩和速度 (R_2)、核オーバーハウザー効果 (NOE) という3種類のパラメーターを測定する。これらのパラメーターから、蛋白質の調和振動 (ピコ秒) と蛋白質全体の回転 (ナノ秒) からの寄与を、 R_2 実験値から差し引く。その残差を、遅い揺らぎからの寄与と考える。この揺らぎは、化学交換によるもので、化学シフト揺らぎの二乗、したがって共鳴周波数の二乗に比例するはずである。一方、(40) および図2によれば、もし、周期軌道が成り立つのであれば、周波数の二乗に比例することになる。

図3に見られるように、球状蛋白質において、遅い揺らぎは共鳴周波数の二乗に比例している。それぞれの直線は、一つ一つの ^{15}N 原子の振舞いを表しているので、この蛋白質を構成する原子は、天然構造を中心とする鞍状点の周りを、均質に遅い揺らぎを行っている、と考えられる。すなわち、基準振動の外側においても、やはり周期軌道が形成されており、マイクロ秒からミリ秒のタイムスケールで、蛋白質分子が安定的に鞍状点の周辺をダイナミックに揺らいている様子が、よく理解できる。

では、プリオンではどうだろうか？ プリオンでは、蛋白質の調和振動 (ピコ秒) と蛋白質全体の回転 (ナ

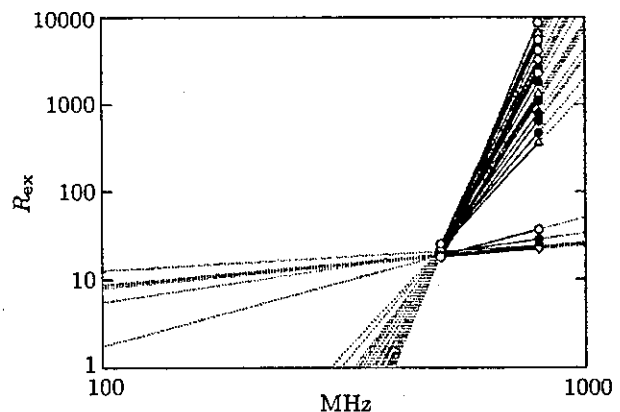


図4 プリオンにおける遅い緩和速度成分の分布.

ノ秒) の寄与だけでは、先ほどの実験結果を説明できないことが分かっている⁴⁾。そこで、遅い揺らぎを測定するのに、CPMG 緩和時間分散法を用いた。この緩和速度も化学シフトの揺らぎの二乗、すなわち周波数の二乗に比例する。したがって位相空間において、もし基準振動の外側がやはり鞍状点の周りを廻る周期軌道で構成されていれば、全体として周波数の二乗に比例するはずである。

ところが、図4に見られるように、プリオンの遅い揺らぎは、通常の球状蛋白質とは大きく異なっている。ここでは、分かりやすいように、500 MHz の周波数での遅い揺らぎがほぼ等しい原子核を選んだ。この図によれば、緩和時間は少なくとも2種類のカテゴリーのグループに分けられる。また、それらは共鳴周波数の二乗には比例せず、原子一つ一つが異なった振舞いを示している。これは、プリオンのダイナミクスが、鞍状点を中心とした周期軌道では説明できない異常性を含むためであろう、と考えられる。すなわち、プリオンの

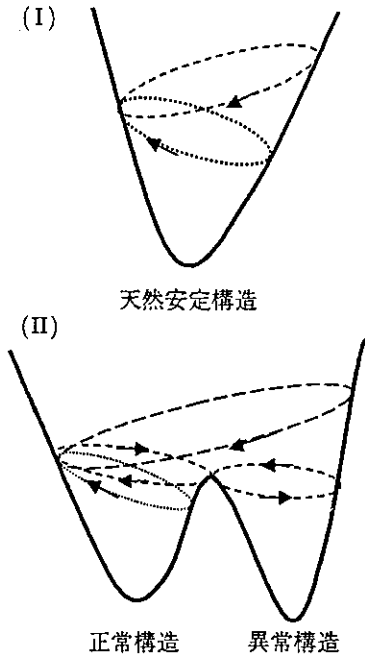


図5 位相空間における蛋白質の (I) 周期軌道と (II) 非周期 (分岐) 軌道.

ダイナミクスは、天然構造を中心とする周期軌道では構成されず、分岐等や特異点を含んでいる。これを敢えて図示すると、図5のようになるだろう。図5(II)のようなプリオン蛋白質ダイナミクスの異常性が、その異常構造への変換に一役買っている可能性がある、と言えるだろう。

7. Langevin モードと Hecke 代数

ここでは、不規則な力が働く確率過程が、素数を用いてどのように表現できるか、考えてみよう。これを素数過程と呼んでもよいだろう。

一般化された Langevin 方程式は以下のように書ける。

$$\frac{dA(t)}{dt} = i\omega_0 A(t) - \int_0^t d\tau M(\tau) A(t-\tau) + f_1(t). \quad (42)$$

ここで、 A は観測量、 M はメモリーカーネル、 f は不規則な力を表す。

ここで、 $f_0(t) \equiv A(t)$, $L_0 \equiv L$, $\Sigma_0 \equiv \Sigma(t) \equiv (f_0|f_0)^{-1}(f_0|f_0(t))$ とすると、

$$\frac{d\Sigma_0(t)}{dt} = i\omega_0 \Sigma_0(t) - \delta_1 \int_0^t d\tau \Sigma_1(\tau) \Sigma_0(t-\tau). \quad (43)$$

ここで、

$$\begin{aligned} \delta_1 &\equiv (f_0|f_0)^{-1}(f_1|f_1), \\ \Sigma_1(t) &\equiv (f_1|f_1)^{-1}(f_1|f_1(t)) \end{aligned} \quad (44)$$

である。また、ラプラス変換により、次式が得られる。

$$\Sigma_0(z) = [z - i\omega_0 + \delta_1 \Sigma_1(z)]^{-1}, \quad \vdots \quad (45)$$

$$\Sigma_j(z) = [z - i\omega_j + \delta_{j+1} \Sigma_{j+1}(z)]^{-1}$$

となる。このようにして、次のような森の連分数式¹¹⁾が得られる。

$$\begin{aligned} \Sigma_0(z) &= \frac{1}{z - i\omega_0 + \frac{1}{\delta_1 \left(z - i\omega_1 + \frac{1}{\delta_2 \left(z - i\omega_2 + \frac{1}{\delta_3 \left(z - i\omega_3 + \dots \right)} \right)} \right)} \\ &= \frac{1}{z - i\omega_0 + \frac{1}{\frac{\delta_1}{z - i\omega_1} + \frac{1}{\frac{\delta_2}{z - i\omega_2} + \frac{\delta_3}{z - i\omega_3 + \dots}}} \end{aligned} \quad (46)$$

ここで以下の式を定義する。

$$k_i = \frac{z - i\omega_i}{\delta_1 \delta_2 \dots \delta_i}. \quad (47)$$

k_i は、代数的整数を表す。さらに、次のパラメーターを定義する。

$$p_n = [k_0, k_1, \dots, k_{n-1}], \quad (48)$$

$$q_n = [k_1, k_2, \dots, k_{n-1}]. \quad (49)$$

ここで

$$\begin{aligned} [k_0] &= k_0, \\ [k_0, k_1] &= k_0 k_1 + 1, \\ &\vdots \\ [k_0, k_1, \dots, k_n] &= [k_0, k_1, \dots, k_{n-1}] k_{n-1} [k_0, k_1, \dots, k_{n-2}] \end{aligned} \quad (50)$$

である。

この観点から、森の表現形式¹¹⁾はモジュラー群を形成する。なぜなら、以下の式が成り立つからである。

$$p_n q_{n-1} - p_{n-1} q_n = (-1)^n. \quad (51)$$

また、

$$M(n) = \left\{ z \rightarrow \frac{az+b}{cz+d} : ad-bc = n; a, b, c, d \in \mathbb{Z} \right\}. \quad (52)$$

あるいは次のように書くこともできるだろう。

$$M(n) = \left\{ z \rightarrow \frac{az+b}{d} : ad = n; a, b, d \in \mathbb{Z} \right\}. \quad (53)$$

このようにすれば、我々は Langevin モードの中に、Hecke 作用素を定義することができる。

$$(T(n)f)(z) = n^{-\frac{1}{2}} \sum_{ad=n} \sum_{b \pmod d} f\left(\frac{az+b}{d}\right). \quad (54)$$

これは Hilbert 空間を形成するため、Hecke 固有空間を定義できる。

$$T(n)\psi_j = t_j(n)\psi_j. \quad (55)$$

Hecke の L 関数は、Riemann ゼータ関数の仲間であり、Hecke 固有値で構成される。

$$H_j(s) = \sum_{n=1}^{\infty} t_j(n)n^{-s} = \prod_{p=1}^m (1 - t_j(p)p^{-s} + p^{-2s})^{-1}. \quad (56)$$

ここで t_j は Hecke 固有値である。

このように、素数を用いることにより、生物を構成する生体高分子の水中における確率過程を、量子力学のように Hilbert 空間で議論する道が開けている。

8. まとめ

以上、素数や Riemann ゼータ関数の生命科学への応用を考え、蛋白質のダイナミクスや Langevin モードの素数表現を考えた。前半で述べたような機構が生物で実際に働いていれば、特定の素数モードが現実には原子・分子レベルで利用されている可能性が高い。今後、蛋白質ダイナミクスの素数モードの厳密な測定、あるいはプリオンに見られるように単純な鞍状点では記述できない異常な軌道の数論的表現方法の開発、および実験的な確定が課題となるであろう。理論面では、生物に応用可能な Hecke 代数の表現論が焦点となると予想される。

ところで、セミのような生命体の基本周期は素数 p

であるが、分子の場合、その基本周期は $\ln(p)$ となっている。量子カオス系のエネルギーレベルが基本的に $\ln(p)$ で表現される、と考えた場合、統計集団の数は $\frac{1}{p}$ となる。集団の基本周波数が $\frac{1}{p}$ であれば、その基本周期は p となる。生命体においては、進化圧が特定の基本周期にコヒーレントになるように働くのかもしれない。競争せず、棲み分けるためには、確かに、素数周期が有利である。それもできるだけ大きい素数が良い。21 世紀における生命科学の核心は、最も身近な数、その中でも素数ということになるのかもしれない。

参考文献

- 1) Jin Yoshimura: The evolutionary origins of periodical cascades during ice ages, *The American Naturalist* Vol.149, No.1, 112-124 (1997).
- 2) 『ファインマン物理学』第二巻, 第 21 章, 284 頁, 岩波書店 (1994).
- 3) Stanley B. Prusiner: Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144 (1982).
- 4) Kazuo Kuwata, Yuji O. Kamatari, Kazuyuki Akasaka, Thomas L. James: Slow conformational dynamics in the hamster prion protein. *Biochemistry*, 43, 4439-4446 (2004).
- 5) Dmitry M. Korzhnev, Xavier Salvatella, Michele Vendruscolo, Ariel A. Di Nardo, Alan R. Davidson, Christopher M. Dobson, Lewis E. Kay: Low-populated folding intermediates of Fyn SH3 characterized by relaxation dispersion NMR. *Nature* 430, 586-590 (2004).
- 6) Ryogo Kubo, Kazuhisa Tomita: A general theory of magnetic resonance absorption. *J. Phys. Soc. Japan*, 9, 888-919 (1954).
- 7) A.G. Redfield: The theory of relaxation processes. *Adv. Mag. Reson.* 1, 1 (1965).
- 8) Sudhir R. Jain and Arun K. Pati: Adiabatic geometric phases and response functions. *Phys. Rev. Lett.* 80, 650-653 (1998).
- 9) E.C. Titchmarsh, The theory of the Riemann zeta-function. Clarendon Press, 1986.
- 10) Daniel Canet, Philippe Barthe, Pierre Mutzenhardt, and Christian Roumestand: A comprehensive analysis of multifield ^{15}N relaxation parameters in proteins: Determination of ^{15}N chemical shift anisotropies. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 4567-4576 (2001).
- 11) Hazime Mori, A continued-fraction representation of the time-correlation functions. *Prog. Theor. Phys.* 34, 399-416 (1965).

(くわた・かずお, 岐阜大学大学院医学研究科)

**14-3-3 protein, total tau and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of patients
with Creutzfeldt-Jakob disease and neurodegenerative disease in Japan**

Katsuya Satoh, MD¹, Susumu Shirabe, MD^{1,7}, Hiroto Eguchi, MD¹, Akira Tsujino, MD¹,
Katsumi Eguchi, MD¹, Akira Satoh, MD², Mitsuhiro Tsujihata, MD², Masami Niwa,
MD, PhD³, Shigeru Katamine, MD, PhD⁴, Saiko Kurihara, MD⁵, and Hidenori Matsuo,
MD⁶

RUNNING TITLE: Tau protein and 14-3-3 protein in CJD

KEY WORDS: tau; phosphorylated tau; 14-3-3 protein; diagnosis; cerebrospinal fluid;
Alzheimer' disease; Creutzfeldt-Jakob disease.

¹ The First Department of Internal Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences,
Nagasaki University

² Nagasaki Kita Hospital

³ Pharmacology, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

⁴ Department of Molecular Microbiology and Immunology, Graduate School of
Biomedical Science, Nagasaki University

⁵ Matsue Red Cross Hospital

⁶ Kawatana National Hospital

⁷ To whom correspondence should be addressed

(E-mail: shirabe@nagasaki-u.ac.jp)

Summary

1. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) is a rapidly progressive and fatal disease. Patients with CJD usually become akinetic mutism within approximately six months. In addition, clinical signs and symptoms at early stage of sporadic CJD may not be easy to discriminate from other neurodegenerative diseases by neurological findings. However, diagnostic biochemical parameters including 14-3-3 protein, S100, neuron specific enorase in cerebrospinal fluid (CSF) have been used as diagnostic markers, elevated titers of these markers can also be observed in CSF in other neurodegenerative diseases. Therefore, we examined other biochemical markers to discriminate CJD from other neurodegenerative diseases in CSF.
2. We analyzed one CSF samples derived from one hundred patients with various neurodegenerative disorders by western blot of 14-3-3 protein, quantification of total tau (t-tau) protein and phosphorylated tau (p-tau) protein. All patients with CJD in this study showed positive 14-3-3 protein and elevated t-tau protein (>1000 pg/ml) in CSF. We also detected positive 14-3-3 protein bands in two patients with non-CJD patients (patients with Alzheimer' disease; AD) and also detected elevated t-tau protein in three

patients in non-CJD patients. Elevated t-tau protein levels were observed in two patients with AD and in one patient with cerebrovascular disease in acute phase.

3. To distinguish patients with CJD from non-CJD patients with elevated t-tau protein in CSF, we compared to ratio of p-tau and t-tau protein. The p/t-tau ratio was dramatically and significantly higher in AD patients rather than in CJD patients.

4. Therefore, we concluded that the assay of t-tau protein may be useful as 1st screening and the ratio of p-tau protein/ t-tau protein would be useful as 2nd screening to discriminate CJD from other neurodegenerative disease.

Introduction

Prion diseases, or transmissible spongiform encephalopathy (TSE), are a group of invariably fatal neurodegenerative disorders affecting both human and animals. These diseases include Creutzfeldt-disease (CJD), Gestmann-Straussler-Scheinker syndrome (GSS), fatal familial insomnia (FFI) and Kuru in human.

Diagnosis of sporadic CJD is made based on neurological findings of progressive dementia, myoclonus and cerebellular ataxia. The progression of clinical signs and symptoms are typically subacute. Akinetic mutism usually appears approximately within 3 months. About 70% of cases die within 6 months. Clinical findings at the early stage of sporadic CJD may resemble the symptoms of other neurodegenerative diseases including Alzheimer' disease (AD). The diagnosis of CJD is made based on the clinical features, clinical course and electroencephalogram (EEG) analysis. The biochemical detection of 14-3-3 protein in CSF samples (Zerr I et al., 1998) and the diffusion-weighted MRI (DW-MRI) (Demaerel P et al., 1999) are recently reported as useful diagnostic tools for CJD.

However, detection of 14-3-3 protein in CSF sample is useful as a diagnostic marker to discriminate CJD from other neurodegenerative diseases, 14-3-3 protein results showed false positive results in few cases among other neurological disorders.

Also 14-3-3 protein could not be detected in two cases of CJD in early phase of disease progression in this study. In the late phase of disease progression, these cases showed positive result with 14-3-3 protein, which suggested that 14-3-3 protein is not a good marker for diagnosis at early stage.

Therefore, we need to search for other biomedical markers except 14-3-3 protein in CSF to discriminate CJD from other neurodegenerative diseases.

Otto et al. reported the t-tau protein in CSF as a new diagnostic marker in the patients with CJD (Otto M et al. 2002).

We designed to compare the efficiency of the 14-3-3 protein, total tau (t-tau) protein and phosphorylated tau (p-tau) of CSF samples as diagnostic markers in CJD patients in Japan.