

平成21年3月30日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500310

研究課題名（和文） プリオンイニシエーションに関する新規の生体成分分子の研究

研究課題名（英文） Research of a new biomolecule which participates in prion initiation

研究代表者

白石 則之（SHIRAISHI NORIYUKI）

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30133169

研究成果の概要：

in vitro 系で銅イオンとヌクレオチド（NADPHやATP等）の共存下でプリオンタンパク質の凝集が起こること、この凝集体は内在性のプリオンタンパク質の関与しない細胞傷害性を引き起こし、アポトーシスを誘導することを見出した。また、小胞体シャペロンであるCalreticulinが凝集体生成を抑制するだけでなく、生成した凝集体に作用してその解離を促す機能があることが明らかにされた。一方、同じシャペロンでもGRP78/Bip やGRP58/ERp57/ER-60ではCRTの結果と異なり、凝集体生成の抑制作用は認められなかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経変性疾患、プリオン

1. 研究開始当初の背景

クロイツフェルト・ヤコブ病や牛海綿状脳症といったプリオン病の原因は正常型プリオンタンパク質（PrP^C）の異常型プリオンタンパク質（PrP^{Sc}）への変換・凝集がその原因であり、異常型の生成機構には不明の点が多い。生成機構は prion initiation（鋳型となる PrP^{Sc} が存在しない条件下での PrP^C の PrP^{Sc} への変換）と prion propagation（鋳型となる PrP^{Sc} が存在する条件下での PrP^C の PrP^{Sc} への

変換）からなり、これらの反応への PrP^C 以外の生体成分分子の関与については、その機構の解明の観点から興味もたれるところである。現在までに、in vitro の系で RNA や sulfated glycan が propagation を促進することや、DNA が PrP^C を β -シート構造に富んだフォームへ変換させることが明らかにされている。

PrP^C への銅イオンの結合が PrP^C のタンパク質分解酵素耐性の獲得やその構造に影響

することが報告されている、そこで、銅イオンを結合したPrP^C と生体成分分子との相互作用による prion initiation の開始という仮説を提示し、その実証を試みた。その結果 NADPH と銅イオン共存下での N 末端 76 残基からなる リコンビナントタンパク質 (PrP-(23-98)) と全長 (PrP-(23-231)) の凝集とプロテイナーゼ K の分解に対する凝集体の抵抗性を見いだした。これらの結果からこの凝集体生成は prion initiation の初期の現象ではないかと考え、この研究をさらに進めるため、凝集体生成を促進する新たな生体成分分子の検索とその細胞毒性を調べる研究を計画した。

2. 研究の目的

前述した背景を基に、本研究では以下の項目について調べた。

- (1) NADPH 以外のヌクレオチドや生体成分の PrP-(23-98) の凝集への影響。
- (2) 生成した凝集体の細胞傷害性。
- (3) 凝集への小胞体シャペロンの影響。

3. 研究の方法

(1) タンパク質の精製

PrP-(23-98)、Bip、CRT そして ER-60 はそれぞれのタンパク質を発現した大腸菌から分離精製して実験に用いた。

(2) 凝集

凝集体の生成は 50 mM MES 緩衝液中で、銅イオン存在下、PrP-(23-98) を 25°C で 30 秒間インキュベートした後、ヌクレオチド (10 μM - 500 μM) や生体成分を加えて誘導した。凝集の状態は 550nm あるいは 450nm の吸光度の変化でモニターした。

カバースリップデッシュに凝集体を含む反応液を入れて倒立型顕微鏡で凝集体の明視野観察を行った。

(3) 色素結合

凝集体へのコンゴレッド (CR) とチオフラビン T (Th T) の結合は分光分析法と蛍光分析法により測定した。

(4) 細胞傷害性

細胞傷害性は一晚培養した Neuro-2a、Prnp-deficient neuronal HpL3-4 あるいは HpL3-4-PrP に緩衝液で希釈した凝集体を添加し、一定時間培養後、WST-1 法により調べた。また、アポトーシスは蛍光顕微鏡法や SDS-PAGE 後の免疫染色法により調べた。

4. 研究成果

(1) 主な成果

①ヌクレオチドの凝集への影響

PrP-(23-98) の凝集は Cu²⁺イオン共存下ならば、NADPH 以外の ADP、ATP、CTP、GTP、そして UTP でも 100 μM 濃度で凝集することが明らかにされた (図 1 A、B)。しかし、ADP に関しては、その凝集促進作用は他の 4 つのヌクレオチドと比較して、リン酸基の数が少ないことからその凝集促進作用は弱いことも示された (図 1 A)。また、AMP では凝集促進作用は全く認められなかった (図 1 A)。生成した凝集体は CR や ThT の結合性とプロテイナーゼ K による分解に対する抵抗性を示した。

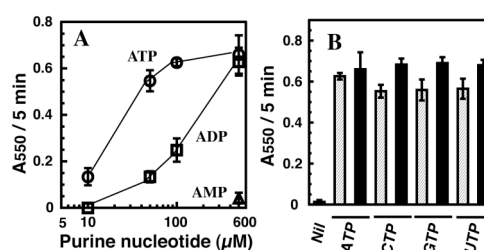


図 1 凝集へのヌクレオチドの影響

②血清と細胞可溶性の凝集への影響

PrP-(23-98) と Cu²⁺イオン存在下に血清や Neuro-2a の 10 万 g 上清を加えた場合、血清では球形の、上清では繊維状の凝集体が生成した。

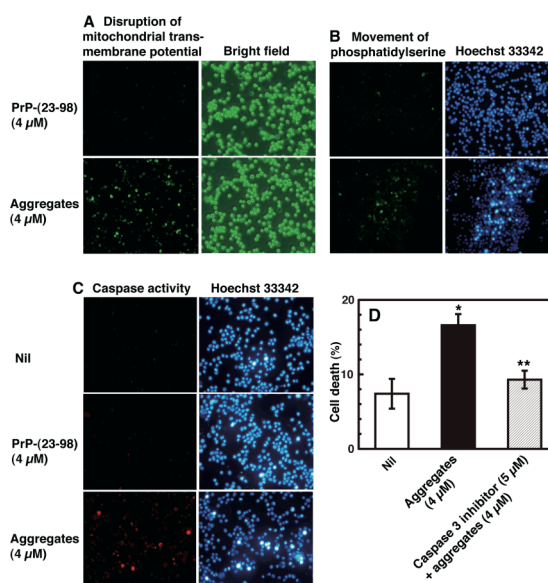


図 2 凝集体によるアポトーシスの誘導

③細胞傷害性

凝集体の細胞傷害性を調べた結果、PrP-(23-98)で、あるいはCu²⁺イオンとヌクレオチドで細胞を処理した場合と比較して、Cu²⁺イオンとヌクレオチド共存下（NADPH, ATP, CTP, GTP, UTP）で生成した凝集体で細胞を処理した場合、凝集体の濃度依存的に細胞の生存率の有意な低下が認められ、凝集体に細胞への傷害性があることが示された。

傷害を受けた細胞ではアポトーシスの特徴であるミトコンドリアの膜電位の消失（図2A）ホスファチジルセリンの局在化（図2B）やカスパーゼの活性化が認められた（図2C）。カスパーゼの阻害によって細胞の傷害性は軽減した（図2D）。

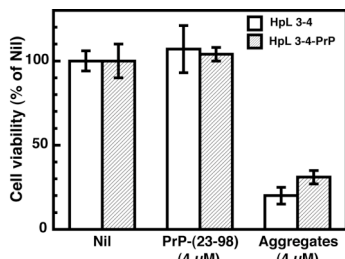


図3 傷害への内在性プリオンタンパク質の関与

また、プリオンタンパク質を欠損した細胞であるHpL3-4を用いた実験から、この細胞傷害には内在性のプリオンタンパク質は関与していないことも明らかになった（図3）。

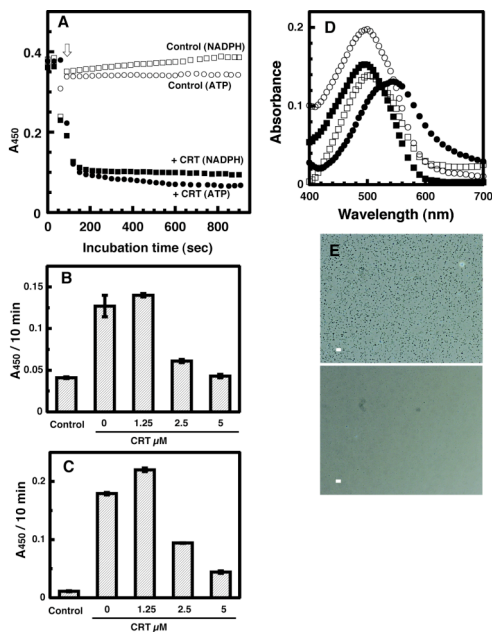


図4 CRTの凝集への影響

④プリオンタンパク質凝集への小胞体(ER)シャペロンの影響

銅イオンとヌクレオチド共存下で誘導されるPrPの凝集に対するERシャペロンの影響を吸光度変化で調べた。Calreticulin (CRT)を凝集開始前あるいは開始直後に反応液に添加した場合、いずれの場合にもCRTの濃度依存的に凝集が抑制された。また、PrPの凝集体を含む反応液へCRTを添加した場合には、速やかな凝集体の消失が認められた（図4A, B, C）。この現象は顕微鏡での明視野観察でも同様に確認された（図4E）。

次に、凝集体のもつアミロイドとしての性質がCRTの添加によりどのように変化するか調べた。凝集体の示すCRの結合（図4D）やプロテイナーゼKによる分解に対する抵抗性はCRTの存在下では消失した。これらの結果から、CRTはPrPに作用して凝集体生成を抑制するだけでなく、生成した凝集体に作用してその解離を促す機能があることが示唆された。

一方、GRP78/BipではCRTの結果と異なり、凝集体生成の抑制作用は認められず、逆にPrPと銅イオン共存下でBip添加により、濃度依存的に不規則な形状の凝集体の誘導が認められた（図5A, B, D）。PrPとBipから生成した凝集体にはCRの結合（図5C）やプロテイナーゼKによる分解に対する抵抗性は認められなかった。また、GRP58/ERp57/ER-60の場合も凝集体生成の抑制作用は認められなかった。

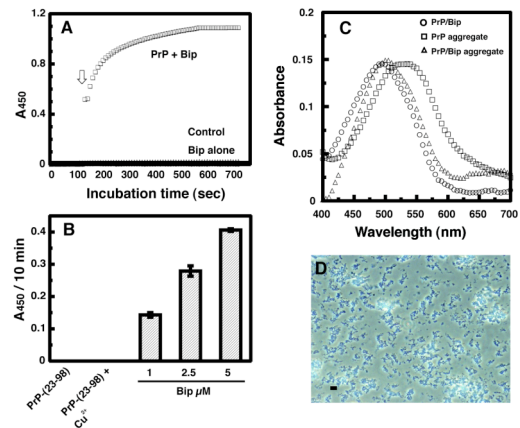


図5 Bipの凝集への影響

(2)位置づけとインパクト、今後の展望

in vitro系で銅イオンとヌクレオチド（NADPHやATP等）の共存下でプリオンタンパク質の凝集が起こること、この凝集体は内在性のプリオンタンパク質の関与しない細胞傷害性を引き起こし、アポトーシスを誘導することを見出した。これらの結果はプリオンタンパク質の凝集へ関与する因子についての新

知見である。

また、小胞体(ER)シャペロンの凝集への影響はCalreticulinが凝集体生成を抑制、一方、GRP78/Bip やGRP58/ERp57/ER-60では凝集体生成の抑制作用は認めらず、逆に凝集したことから、ERシャペロンの影響が二相性であることが示唆された。生体内でのプリオンタンパク質の凝集へのERシャペロンの関与を考える上での興味ある結果である。

今後これらの結果をin vivo の系で検証することが重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

N. Shiraishi, Y. Inai and Y. Ihara (2009)
Proteinase K-Resistant Aggregates of Recombinant Prion Protein PrP-(23-98) Are Toxic to Cultured cells. Protein & Peptide Letters 16, 91-96 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

① 白石則之、井内陽子、井原義人
銅イオンとヌクレオチド共存下で誘導されるプリオンタンパク質の凝集に対する ER シャペロンの影響

第 81 回日本生化学会大会、2008 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド、神戸

② 白石則之、井内陽子、井原義人
プリオンタンパク質 PrP-(23-98)の凝集に対する ER シャペロンの影響

第 8 回日本蛋白質科学会年会、2008 年 6 月 12 日、タワーホール船堀、東京

③ 白石則之、井内陽子、井原義人
ヌクレオチドと銅イオン共存下におけるプリオンタンパク質の凝集とその細胞傷害性
第 80 回日本生化学会大会、2007 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜、横浜

④ 白石則之、井内陽子、井原義人
プリオンタンパク質 PrP-(23-98)凝集体の細胞傷害性

2007 年プリオン研究会、2007 年 8 月 26 日、ニューグリーンピア津南、新潟

⑤ 白石則之、井内陽子
ヌクレオチドと銅イオン共存下におけるプリオンタンパク質 PrP-(23-98)の凝集

第 7 回日本蛋白質科学会年会、2007 年 5 月 24 日、仙台国際センター、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石 則之 (SHIRAISHI NORIYUKI)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30133169

(2) 研究分担者

井内 陽子 (INAI YOKO)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：20316087