

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：10101
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22658095
 研究課題名（和文）プリオン生成の新分子機構提案：膜インターフェースにおけるノネナル修飾を軸に
 研究課題名（英文）A possible mechanism for PrP^{Sc} formation through modification with a lipid peroxidation product hydroxynonenal at the membrane interface
 研究代表者
 稲葉 睦 (INABA MUTSUMI)
 北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
 研究者番号：00183179

研究成果の概要（和文）：プリオン病の病態は異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の蓄積から始まるが、内因性 PrP^C から PrP^{Sc} が形成される機序は未だに謎である。本研究では脂質過酸化産物＝アルデヒドにより生じる HNE の分子修飾の関与を想定した解析を行った。その結果、PrP^C は HNE 修飾を受けることが示されたが、生体における修飾の有無や PrP^{Sc} 形成との関係の実証には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：Pathogenesis of prion diseases involves transition of PrP^C into PrP^{Sc}. The purpose of this study was to examine if the lipid peroxidation product, 4-hydroxy nonenal (HNE) would modify the structure of PrP^C through formation of PrP^C-HNE adducts and trigger the formation of insoluble PrP^{Sc}. The mass spectrometry analysis showed that PrP^C was accessible to HNE modification when the cells expressing PrP^C were exposed to exogenous HNE. However, the content of proteinase K-resistant PrP bearing HNE adducts was negligible, indicating that HNE modification would not be a sole cause for PrP^{Sc} formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：脂質過酸化、ヒドロキシノネナル、膜、プリオン病、病態

1. 研究開始当初の背景

PrP^C は C 末端で GPI アンカーを介して脂質二重層(主に脂質ラフトドメイン)に結合する膜脂質結合型の蛋白質である。PrP^C→PrP^{Sc} 変換に関しては、ヘリックス構造をとる PrP^C の C 末端側領域に焦点を充て主に組換え PrP^C を利用した多くの研究が行われ、1) 感染性

PrP の存在を必要とし、2) 細胞膜上で生じる事が知られる。一方、Cu²⁺結合部位を 5 箇所もつ N 末端側領域も Cu, Zn-SOD 等酸化ストレス防御系への Cu²⁺供給原としての役割、神経細胞の保護役として注目されている。熱力学的に安定な PrP^{Sc} の分子モデルは十分に魅力的だが、“PrP^C 自身の分子構造の特性”と

“膜脂質や銅など PrP^C を取り巻く微小環境との相互作用” “という視点に立って生体蛋白質の多くは化学変化を受けている” ことを想起することはさらに有意義なはずである。

膜リン脂質の過酸化、特に多価不飽和脂肪酸の過酸化は 4-ヒドロキシノネナル (4-hydroxy-2-nonenal, HNE) を初めとする細胞毒性をもつ多様なアルデヒドを生じる。HNE は、求核反応により蛋白質分子上の Cys、His、あるいは Lys 残基と結合して蛋白質の架橋変性をもたらす、炎症や老化、様々な退行性疾患の基礎原因となるとされる。代表者らは、「赤血球寿命を決定する要因＝膜蛋白質の翻訳後修飾による機能変化」という仮説を検討する過程で、偶然、脂質膜直下に分布する膜骨格蛋白質スペクトリンの HNE 修飾を見出した。MALDI-TOF MS による質量分析の結果、生体由来の新鮮試料でも、Ile¹¹⁰---Lys¹¹⁸ を初めとする複数のアミノ酸残基に HNE 付加がみられ、さらに酸化剤や Cu²⁺、Fe²⁺ など遷移金属の存在で HNE 付加の増強とスペクトリン等の凝集が生じた。注目すべきことに、最近、アミロイド β (Aβ) も HNE 修飾を受けることが見出されているが、Aβ もまた膜に分布し、Cu²⁺ と親和性をもつ分子である。これらの知見を基にプリオン病と酸化・蛋白質凝集疾患の共通性を仮定して着想したのが本申請である。

2. 研究の目的

プリオン病の病態には異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の蓄積が中心的な役割を果たすが、内因性 PrP^C から PrP^{Sc} が形成される機序は未だに謎である。本研究は、脂質過酸化産物＝アルデヒドによる分子修飾を起点にした PrP^C から PrP^{Sc} への構造変化という新たな仮説を設定し、その検証を目的とする。本研究では、脂質過酸化反応産物、主に HNE による PrP^C の化学修飾と構造変化を検証し、その分子機構を明らかにするため、マウスの PrP^C を主たる対象に次の具体的課題に取り組む。

- ◆課題 1 : PrP^C (あるいは PrP^{Sc}) の HNE 付加と架橋凝集体の形成を、生体由来材料と培養細胞発現系で検証し、さらに修飾部位の同定を行う。さらに HNE 修飾 PrP^{Sc} をマウスに接種し、伝達性をもつ PrP として働くか否かを検証する。
- ◆課題 2 : PrP^C (あるいは PrP^{Sc}) の HNE 付加における脂質過酸化と Cu²⁺ の役割を明らかにするために、種々の酸化条件下、培養細胞で Cu²⁺ 結合部位変異体の HNE 修飾を解析する。

3. 研究の方法

- ◆プリオン蛋白質と脂質過酸化産物との反応・修飾を検証するために、マウス生体由

来脳材料や培養細胞発現系、あるいは赤血球膜での PrP^C を対象に、生化学的・化学的手法で HNE 修飾の有無を解析し、また修飾部位の同定を試みた。同時に PrP^C に HNE による化学修飾を導入して PrP^C の性質、PrP との反応性に対する影響を検討した。特に、PrP^C への HNE 付加と分子内・分子間クロスリンクによる不溶性凝集体、proteinase K 抵抗性 PrP の解析を行った。

- ◆次いで、Cu²⁺ 結合領域変異体を用い、分子内 Cu²⁺ が PrP^C の HNE 修飾に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

<PrP の HNE 修飾の検出>

健常マウスと PrP^{Sc} 接種スクレイピーマウスから脳乳剤を調製し、プロテアーゼ分解フラグメントの FT-MS、あるいは MALDI-TOF MS 解析を行ったが、明らかな HNE 付加を示唆する質量変化は認められなかった。また抗 HNE 抗体でのイムノプロットではいくつかのシグナルが認められたが、PrP に相当するポリペプチドとの一致は認められなかった。

<PrP^C の HNE 修飾>

組換え PrP^C を安定発現する N2a 細胞における HNE 修飾を検討した。健常マウスと PrP^{Sc} 接種スクレイピーマウスから得た脳乳剤を N2a 細胞に添加し 1 2 ～ 1 5 回の継代後に PrP に一致した HNE 付加ポリペプチドのシグナルが検出された。これは PrP^{Sc} 摂取マウス脳乳剤を添加した細胞に特異的であったが、シグナルは低レベルであり、FT-MS による修飾部位の解析はできなかった。

そこで同細胞に HNE を直接作用させたところ、シグナル強度は著しく増加し、FT-MS による解析から複数箇所の Lys、His、Cys 各残基への HNE 付加が推定された。Cu²⁺ 結合領域を含む N 末端領域内の複数の His、Lys 残基における付加はキレート剤添加により増加傾向を示したが、特定のアミノ酸残基に限定した選択的な修飾は認められなかった。また、C 末端側のヘリックス構造部分にも複数の Lys、His、Cys 各残基にも同様に非選択的な HNE 付加が推定された。この HNE 修飾を受けた PrP^C は proteinase K を作用させると消失し、PrP^{Sc} 形成との関連性は実証できなかった。

同様に赤血球膜における HNE 修飾蛋白質との関連を検討した (Fig. 1)。新鮮なヒト赤血球膜ゴーストでは、スペクトリン (Sp) が HNE 修飾を受ける主要蛋白質であった (Arashiki et al., 2010)。赤血球に HNE を作用させた後に調製した膜ゴーストには多くの HNE 修飾

ポリペプチドが検出されたが (Fig. 1A)、と一致する HNE アダクトの明瞭なシグナルは認められなかった (Fig. 1B)。

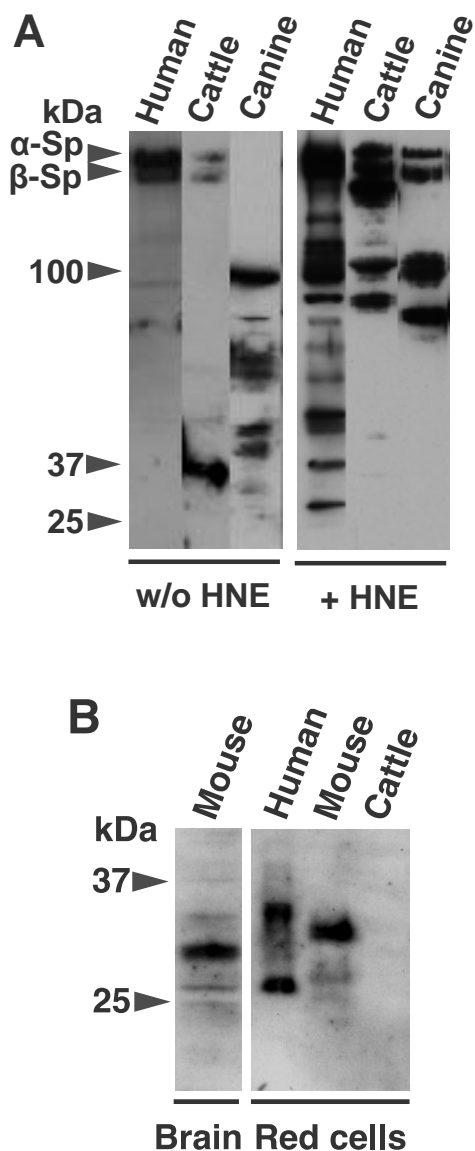


Fig. 1 Polypeptides modified with HNE did not involve PrP^C in red cell membranes from various animals. Membrane proteins in the ghosts prepared from red cells incubated with (+HNE) or without (w/o) 0.1 mM HNE were detected for HNE adducts by immunoblotting (A). Likewise, PrP^C proteins in the ghosts were detected with the antibody (B).

<課題と展望>

これらの結果から、PrP^C は脂質過酸化産物である HNE による修飾を受け得ることが示されたが、脂質過酸化との直接の関連性は不明である。また、proteinase K 処理により HNE

修飾を受けたと推定される PrP は消失したことから、HNE 修飾と PrP^{Sc} 形成との関連は否定的であった。しかし、長期的に生じる低レベルな HNE 修飾と、これら強制的修飾とが同一か否かは不明であり、今後の検証が必要である。

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 5 件)

Wang, C.-C., Sato, K., Otsuka, Y., Otsu, W., and Inaba, M. (2012)

Clathrin-mediated endocytosis of mammalian erythroid AE1 anion exchanger facilitated by a YXXΦ or a noncanonical YXXXΦ motif in the N-terminal stretch. *J. Vet. Med. Sci.* **74**, 17-25

Asano, H., Deguchi, Y., Kawamura, S., and Inaba, M. (2011)

A simple method for enrichment of polychromatic erythroblasts from rat bone marrow and their proliferation and maturation in vitro. *J. Toxicol. Sci.* **36**, 435-444

Wang, C.-C., Sato, K., Otsuka, Y., and Inaba, M. (2011)

Cell-surface expression and internalization of the murine erythroid AE1 anion exchanger tagged with an extracellular FLAG epitope. *Jpn. J. Vet. Res.* **59**, 157-164

Komatsu, T., Sato, K., Otsuka, Y., Arashiki, N., Tanaka, K., Tamahara, S., Ono, K., and Inaba, M. (2010)

Parallel reductions in stomatin and Na,K-ATPase through the exosomal pathway during reticulocyte maturation in dogs: stomatin as a genotypic and phenotypic marker of high K⁺ and low K⁺ red cells. *J. Vet. Med. Sci.* **72**, 893-901

Arashiki, N., Otsuka, Y., Ito, D., Yang, M., Komatsu, T., Sato, K., and Inaba, M. (2010)

Covalent modification of spectrin in red cell membranes by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1543-1547

〔学会発表〕(計4件)

大津 航、桂嶋勇輔、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉 睦：R664X 変異 anion exchanger 1 (AE1)の小胞体関連分解：AE1 と小胞体蛋白質の相互作用. 日本膜学会第33年会. 2011年5月, 産業技術総合研究所

王 振吉、佐藤耕太、大津 航、大塚弥生、稲葉 睦：アニオン交換輸送体 AE1 のクラスリン依存性エンドサイトーシスを規程する N 末端領域配列の同定. 日本膜学会第33年会. 2011年5月, 産業技術総合研究所

王 振吉、佐藤耕太、大津 航、大塚弥生、稲葉 睦：アニオン交換輸送体 AE1 のクラスリン依存性エンドサイトーシスを規程する N 末端領域の YXXΦあるいは YXXXΦシグナル配列モチーフ. 第84回日本生化学会大会. 2011年9月, 京都国際会議場

大津 航、安達啓一、桂嶋勇輔、宮園耕介、大塚弥生、稲葉 睦：R664X 変異 anion exchanger 1 (AE1)のアグリソーム非形成性小胞体関連分解. 第84回日本生化学会大会. 2011年9月, 京都国際会議場

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 睦 (INABA MUTSUMI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：00183179

(2) 研究分担者

佐藤 耕太 (SATO KOTA)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：50283974