

## プロテイナーゼ K 抵抗性を示す PrP-(23-98)凝集体の neuroblastoma N2a 細胞に対する細胞傷害性

Proteinase K-resistant aggregates of recombinant prion  
protein PrP-(23-98) are toxic to neuroblastoma N2a cell

白石 則之

Noriyuki SHIRAIISHI

東海学園大学 健康栄養学部 管理栄養学科

Department of Nutrition, School of Health and Nutrition, Tokai Gakuen University

キーワード：プリオンタンパク質 PrP-(23-98) 凝集体 細胞傷害性

Key words : prion protein, PrP-(23-98), aggregates, cytotoxicity

### 要約

タンパク質やペプチドから調製された可溶性オリゴマーが細胞傷害性を示すことが幾つかの研究で示されている。今回、私たちは ATP と銅イオンの共存下で PrP-(23-98) から非線維状の凝集体が生成することを明らかにした。生成した凝集体はプロテイナーゼ K 抵抗性を示し、コンゴーレッドやチオフラビン T の結合が認められるアミロイド様であった。また、この凝集体は neuroblastoma N2a 細胞に対して傷害性を示した。

### Abstract

Many studies have shown that soluble oligomer generated from a variety of proteins and peptides are cytotoxic. Here, we have shown for the first time that PrP-(23-98), which contains four highly conserved octarepeats (residues 60-91) and one partial repeat (residues 92-98), polymerizes into amyloid-like and proteinase K-resistant spherical aggregates in the presence of ATP plus copper ions. The non-fibrillar aggregates were toxic to neuroblastoma N2a cell.

## 序論

プリオン病感染動物の脳から分離精製された PrP<sup>Sc</sup> や合成ペプチド PrP-(106-126)を用いた研究からプリオンタンパク質の細胞傷害性が明らかにされている (Forloni et al., 1993; Brown et al., 1996; Giese et al., 1998; Gu et al. 2002; Hetz et al., 2003)。しかし、プリオンタンパク質の物理的状態と細胞傷害性の関係や実際にどの領域が細胞傷害性をもつのかといった点は不明のまま残されてきた。特に、PrP<sup>Sc</sup> はプリオンタンパク質から成るアミロイド線維やオリゴマー (Silveria et al., 2005)、さらには PrP<sup>Sc</sup> に強固に結合した非タンパク質成分などから成ることから (Appel et al., 1999; Zou et al., 2004)、細胞傷害性をもつ因子の特定や物理的状態を明らかにすることは困難とされてきた。

最近の研究からプリオンタンパク質の物理的状態と細胞傷害性の関係の一部が明らかにされている。Novitskaya らは培養細胞と初代培養神経細胞を用いた研究から、可溶性のモノマーと比較すると、オリゴマーとアミロイド線維の細胞傷害性が高いことを報告している (Novitskaya et al., 2006)。また、胚性テラトカルシノーマ NTERA2 細胞を用いた研究ではアミロイド線維のみが細胞傷害性をもつと報告されている (Novitskaya et al., 2007)。更に、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群の脳に認められアミロイド断片に相当する合成ペプチド PrP-(82-146) から調整された線維状タンパク質が細胞傷害性とアポトーシスを誘導することが報告されている (Fioriti et al., 2007)。この研究ではこれらの残基の中で特に 106-126 残基と 127-146 残基を含む領域が細胞傷害性に寄与していることが明らかにされている。しかし、プリオンタンパク質の物理的状態と細胞傷害性の関係について理解を深めるには更なる研究が必要と考えられている。

HuPrP-(23-141) を用いた研究からはプリオンタンパク質がアミロイド線維を形成するには 138-141 残基が重要であることが報告されている (Kundu et al., 2003)。加えてプリオンタンパク質の細胞傷害性には 106-126 と 127-146 の両方の残基が重要であることも示されている。PrP-(23-98) はこれらの特徴を欠く銅イオン結合領域を持つ N 末端の領域である。このような PrP-(23-98) が NADPH と銅イオンの共存下で、PK 抵抗性を示すアミロイド様の非線維状の凝集体に変化することや細胞傷害性を示すことが報告されていることから (Shiraishi et al., 2006; Shiraishi et al., 2009)、本研究では PrP-(23-98) の凝集への ATP の影響と生成した凝集体の細胞傷害性を neuroblastoma N2a 細胞を用いて調べた。

FIGURE 1. Immunofluorescence imaging of PrP-(23-98) aggregates. Mixtures containing 50 mM Mes (pH 7.2) and 40  $\mu$ M PrP-(23-98) were incubated at 25  $^{\circ}$ C for 30 s in the presence of 160  $\mu$ M copper ions, and 500  $\mu$ M NADPH or ATP was added to induce aggregation. Mixtures were incubated at 25  $^{\circ}$ C for 30 min. Four  $\mu$ M of aggregate was then diluted with HEPES-buffered saline and was incubated for 1 h at 37  $^{\circ}$ C in the absence (left panel) or in the presence of neuroblastoma N2a cells (right panel). The aggregates were stained using SAF 32 antibody followed by staining with secondary antibody labeled with Alexa 488 (green), and cell nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). The size of the scale bar is 10  $\mu$ m.

プリオンタンパク質やその断片から調製されたアミロイド線維やオリゴマーの細胞傷害性が報告されていることから (Novitskaya et al., 2006; Novitskaya et al., 2007; Fioriti et al., 2007; Shiraishi et al., 2009)、次に ATP と銅イオンの共存下で PrP-(23-98) から生成した凝集体の Neuroblastoma N2a 細胞への傷害性を調べた。対照と比較して、PrP-(23-98) による細胞傷害性は認められなかった (Fig. 2)。一方、ATP と銅イオン共存下で生成した凝集体は細胞傷害性を示した (Fig. 2)。ATP と銅イオン共存下で生成した凝集体による処理では 73% (2  $\mu$ M) と 36% (4  $\mu$ M) と濃度依存的であった。NADPH と銅イオン共存下で生成した凝集体と比較してその傷害性に大きな差は認められなかった。

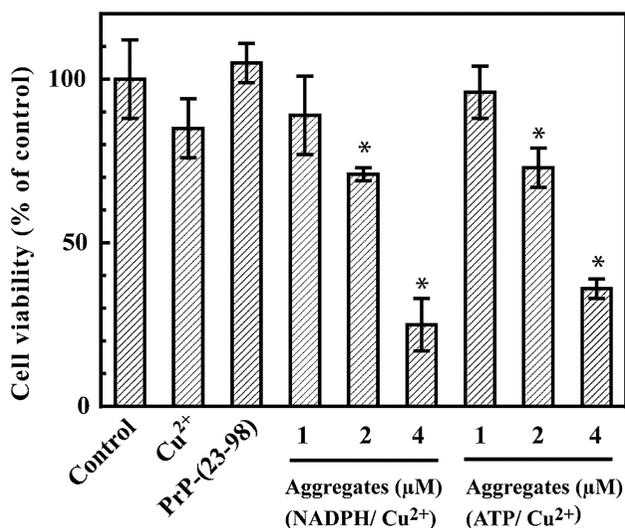


FIGURE 2. PrP-(23-98) aggregates are toxic to neuroblastoma N2a cells. Aggregates (1, 2, and 4  $\mu$ M) were prepared as described in Fig. 1, and were incubated for 1 h at 37  $^{\circ}$ C with Neuro 2a cells in HEPES-buffered saline. An equal volume of DMEM supplemented with 2 % FBS was added to the samples, and cells were cultured for 24 h at 37  $^{\circ}$ C. Cell viability was evaluated by measuring the cellular reduction of WST-1 to a formazan product. Error bars are S.D. of four independent experiments. Statistical significance was calculated using the unpaired Student's t test (\*p  $\leq$  0.01) from the experiment with untreated PrP-(23-98). Control indicates the incubation of cells alone. Cu<sup>2+</sup> indicates the incubation of cells with 16  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup>.

プリオンタンパク質の全長や断片から調製されたアミロイド線維とオリゴマーについての細胞傷害性が報告されている (Novitskaya et al., 2006; Novitskaya et al., 2007; Fioriti et al., 2007;

Shiraishi et al., 2009)。PrP-(23-98) はプリオンタンパク質の細胞傷害性に寄与していると考えられている 106-126 と 127-146 残基 (Kundu et al., 2003) 欠く断片であるが、NADPH と銅イオンの共存下で PrP-(23-98) から生成した凝集体が細胞傷害性を示すことが既に報告されている (Shiraishi et al., 2009)。今回、新たに ATP と銅イオンの共存下で生成した凝集体でも同様な細胞傷害性が明らかにされた。

複数のタンパク質やペプチドから調製されたオリゴマーによる細胞傷害性についての研究結果が Kaye 等により報告されている (Kayed et al., 2003)。彼らによって A $\beta$  42, A $\beta$  40,  $\alpha$ -synuclein, islet amyloid polypeptide, polyglutamine, lysozyme, human insulin, PrP-(106-126) などから調製された可溶性オリゴマーが細胞傷害性を示すことが明らかにされている。また、これらの傷害性がオリゴマー特異的抗体 A11 により抑制されることも同時に示されている。彼らの研究で用いられたタンパク質やペプチドに共通した領域はなく、生成したオリゴマーのもつ構造がその細胞傷害性に関与していると考えられている。しかし、その詳細な機構は不明である。今後、PrP-(23-98) から生成した凝集体とオリゴマー特異的抗体 A11 との反応性や A11 による細胞傷害性の抑制についての検討が必要と考えられる。

## 文献

- Appel TR, Dumpitak C, Matthiesen U, Riesner D, 1999. Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold. *Biol Chem* 380: 1295-1306.
- Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA, 1996. Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 380: 345-347.
- Fioriti L, Angeretti N, Colombo L, De Luigi A, Colombo A, Manzoni C, Morbin M, Tagliavini F, Salmona M, Chiesa R, Forloni G, 2007. Neurotoxic and gliotrophic activity of a synthetic peptide homologous to Gerstmann-Straussler-Scheinker disease amyloid protein. *J Neurosci* 27: 1576-1583.
- Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, Monzani E, Salmona M, Bugiani O, Tagliavini F, 1993. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362: 543-546.
- Giese A, Brown DR, Groschup MH, Feldmann C, Haist I, Kretzschmar HA, 1998. Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol* 8: 449-457.
- Gu Y, Fujioka H, Mishra RS, Li R, Singh N, 2002. Prion peptide 106-126 modulates the aggregation of cellular prion protein and induces the synthesis of potentially neurotoxic transmembrane PrP. *J Biol Chem* 277: 2275-2286.
- Hetz C, Russelakis-Carneiro M, Maundrell K, Castilla J, Soto C, 2003. Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *Embo J* 22: 5435-5445.
- Kayed R, Head E, Thompson JH, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG, 2003.

- Mechanism of pathogenesis common structure of soluble amyloid oligomers. *Science* 300: 486-489.
- Kundu B, Maiti NR, Jones EM, Surewicz KA, Vanik DL, Surewicz WK, 2003. Nucleation-dependent conformational conversion of the Y145Stop variant of human prion protein: structural clues for prion propagation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12069-12074.
- Novitskaya V, Bocharova OV, Bronstein I, Baskakov IV, 2006. Amyloid fibrils of mammalian prion protein are highly toxic to cultured cells and primary neurons. *J Biol Chem* 281: 13828-13836.
- Novitskaya V, Makarava N, Sylvester I, Bronstein IB, Baskakov IV, 2007. Amyloid fibrils of mammalian prion protein induce axonal degeneration in NTERA2-derived terminally differentiated neurons. *J Neurochem* 102: 398-407.
- Shiraishi N, Utsunomiya H, Nishikimi M, 2006. Combination of NADPH and copper ions generates proteinase K-resistant aggregates from recombinant prion protein. *J Biol Chem* 281: 34880-34887.
- Shiraishi N, Inai Y, Ihara Y, 2009. Proteinase K-resistant aggregates of recombinant prion protein PrP-(23-98) are toxic to cultured cells. *Protein Pept. Lett.* 16: 91-96.
- Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, Caughey B, 2005. The most infectious prion protein particles. *Nature* 437: 257-261.
- Zou WQ, Zheng J, Gray DM, Gambetti P, Chen, SG, 2004. Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1380-1385.

#### FOOTNOTES

The abbreviations used are: PrP, prion protein; PrP<sup>Sc</sup>, disease-associated PrP isoform; PrP-(23-98), recombinant PrP encompassing residues 23-98; PK, proteinase K; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; WST-1, 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium.