

ヌクレオチドと Cu^{2+} イオン共存下で誘導される PrP-(23-98) の凝集体の細胞傷害性

Aggregates produced from PrP-(23-98) in the presence of nucleotide plus copper ions are toxic to cultured cells.

白石則之, 平野義晃

Noriyuki SHIRAISHI, Yoshiaki HIRANO

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 Cu^{2+} イオン PrP-(23-98) 凝集体 細胞傷害性

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

要約

PrP の N 末端領域である PrP-(23-98) が, NADPH や ATP と Cu^{2+} イオン共存下で凝集することが報告されていることから, AMP, ADP, CTP, GTP そして UTP といったヌクレオチドで PrP-(23-98) の凝集が誘導されるか調べた。NADPH や ATP と同様に, CTP, GTP, そして UTP で PrP-(23-98) の凝集が誘導された。また, ADP でも凝集が誘導されたがその効果は少し弱かった。一方, AMP では凝集は全く認められなかった。これらの結果は, 凝集の誘導には 2~3 個のリン酸基が必須であることを示していた。次に, ADP, CTP, GTP そして UTP といったヌクレオチドと Cu^{2+} イオン共存下で生成した凝集体の細胞傷害性を Neuroblastoma N2a 細胞を使って調べた。 Cu^{2+} イオンとヌクレオチド共存下で生成した PrP-(23-98) の凝集体には, 細胞傷害性が認められた。加えて, NADPH と Cu^{2+} イオン共存下で生成した凝集体を使って dibutyryl cyclic AMP によって誘導される Neuroblastoma N2a 細胞の分化への影響を調べた。コントロールと比較して PrP-(23-98) で処理したグループでは, 神経突起の伸長が認められた (control, $50.5\mu\text{m}$; PrP-(23-98), $55.8\mu\text{m}$)。これと対照的に凝集体で処理された細胞では, 神経突起の伸長が抑制されていた ($2\mu\text{M}$ aggregates, $19.8\mu\text{m}$; $4\mu\text{M}$ aggregates, $10.7\mu\text{m}$)。

Abstract

It has been reported that PrP-(23-98), an N-terminal portion of PrP, aggregates upon incubation with NADPH or ATP plus copper ions. To extend these observations, we tested if AMP, ADP, CTP, GTP and UTP could induce aggregation of PrP-(23-98). Similar to two

nucleotides, CTP, GTP and UTP plus copper ions are also effective in provoking the aggregation of PrP⁻(23-98). ADP was also effective, but to a lesser extent. Since AMP did not induce aggregation, it is likely that the presence of three or two phosphate groups on the ribose is essential for the observed effect. The toxic effect of PrP⁻(23-98) aggregates were assessed in Neuroblastoma N2a cells. Similar to aggregates formed with ATP or NADPH, we found that aggregates formed with ADP, CTP, GTP or UTP plus copper ions were toxic. Next we assessed the effect of treatment with aggregates on initial morphological changes of Neuroblastoma N2a cells, as these cells extend neurites rapidly in response to serum withdrawal and by the addition of dibutyryl cyclic AMP. Neuroblastoma N2a cells treated with PrP⁻(23-98) produced numerous long neurites in a manner similar to that found in the control cells (control, 50.5 μ m; PrP⁻(23-98), 55.8 μ m). In contrast, Neuroblastoma N2a cells treated with the aggregates at 2 and 4 μ M failed to develop neurites as compared with cells treated with PrP⁻(23-98) (2 μ M aggregates, 19.8 μ m; 4 μ M aggregates, 10.7 μ m).

緒言

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機構解明の観点から興味もたれている (Leliveld et al., 2006)。

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もそ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も報告されている (Fioriti et al., 2007)。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。

プリオンタンパク質の領域と細胞傷害性の関係については、HuPrP⁻(23-141)を用いた研究から、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)。また、プリオンタンパク質の細胞傷害性には 106-126 と

127-146 の両方の領域が重要であることも示されている (Fioriti et al., 2007)。一方, PrP-(23-98) はこれらの特徴を欠く Cu^{2+} 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 あるいは ATP と Cu^{2+} 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その凝集体が細胞傷害性を示すことが報告されている (Shiraishi et al., 2006; Shiraishi et al., 2009; 白石 2012)。本研究では NADPH や ATP 以外のヌクレオチドの PrP-(23-98) の凝集への影響と生成した凝集体の細胞傷害性について調べた。

方法

1. PrP-(23-98) の精製

PrP-(23-98) の発現と精製は既に報告されている方法に従って行った (Shiraishi et al., 2006) PrP-(23-98) の濃度はトリプトファンとチロシンの 280nm での分子吸収係数から計算した $36,334\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて分光学的方法で求めた。

2. PrP-(23-98) の凝集

50mM MES 緩衝液中で, Cu^{2+} イオン存在下, 非存在下で $10\mu\text{M}$ PrP-(23-98) を 25°C で 30 秒間インキュベートした後, ヌクレオチドを加えて凝集の状態を吸光度 (A_{550}) の変化でモニターした。細胞傷害性の実験には 50mM MES 緩衝液中で, $160\mu\text{M}$ Cu^{2+} イオン, $40\mu\text{M}$ PrP-(23-98) そして $500\mu\text{M}$ ヌクレオチドを加えて 25°C で 30 分間インキュベートして生成した凝集体を希釈して用いた (Shiraishi et al., 2006; Shiraishi et al., 2009; 白石 2012)。

3. PrP-(23-98) の細胞傷害性

対数増殖期にある Neuroblastoma N2a 細胞を EDTA-トリプシン処理し, DMEM 培養液で細胞浮遊液を調製し ($1.5\sim 2.0 \times 10^4$ 細胞/ml), 96 穴ポリ-D-リシンコートマイクロプレート (Nalge Nunc) の各ウェルに細胞数が 3,000~4,000 になるように植えた。一晚培養後, 培養液を除き 137mM NaCl- 5.4mM KCl- 0.9mM CaCl_2 - 0.5mM MgCl_2 - 25mM glucose/ 30mM HEPES (pH 7.2) (Hepes-buffered saline, HBS) で洗浄後, 同一の緩衝液で希釈した凝集体を PrP-(23-98) を $1\sim 4\mu\text{M}$ 加えて 1 時間インキュベートした。その後, DMEM-2%FBS 培養液を加えて更に 24 時間培養した。24 時間後, 各ウェル内の培養液を取り除き DMEM 培養液-Cell Counting Kit 溶液 (同仁堂, 容量比 9:1) を $100\mu\text{l}$ 添加し, 更に 2 時間培養した。2 時間後, マイクロプレートリーダーを用い各ウェルの吸光度を 415nm で測定した (参照波長 630nm) (Shiraishi et al., 2009)。

4. Neuroblastoma N2a 細胞の分化

Neuroblastoma N2a 細胞を poly-D-lysine でコートされた 35 mm シャーレ (BD Biosciences)

で24時間培養した。培養後、HBSに懸濁した凝集体をシャーレに加えて37℃、5%CO₂の条件下で1時間インキュベートした。インキュベート後、培地を無血清DMEM-0.3mM dibutyryl cyclic AMPに交換して37℃、5%CO₂の条件下で24時間培養した。24時間後、Nikon TE300倒立顕微鏡で神経突起を観察し、CCDカメラで記録した。記録した画像を用いて神経突起の長さを計測した。

5. 統計学的処理

有意差の検定はDa Statsを用いて行った。

結果

1. PrP-(23-98)の凝集に及ぼす各種ヌクレオチドの影響

NADPHとATPによるPrP-(23-98)の凝集の促進作用が報告されていることから(Shiraishi et al., 2006; Shiraishi et al., 2009; 白石 2012), ADPやAMPなど他のヌクレオチドの凝集への影響を調べた。PrP-(23-98)とCu²⁺イオンまたはADPとの共存下では吸光度の変化はほとんど認められなかったが(図1A), Cu²⁺イオンとADP共存下では顕著な吸光度の上昇が認められた(図1A)。次に、リン酸基の数が違うAMPの凝集への影響を調べた。AMPの場合、高濃度の500μMでも凝集体の生成は認められなかった(図1B)。ADPでは高濃度ではATPと同じ程度に凝集体の生成が認められたが(図1B), 低濃度領域では僅かであった(図1B)。加えて、塩基の構造の異なるヌクレオチドのCTP, GTP, そしてUTPのCu²⁺イオン共存下での凝集への影響を調べた。100μMと500μMともにCTP, GTP, そしてUTPで凝集が認められた(図1C)。

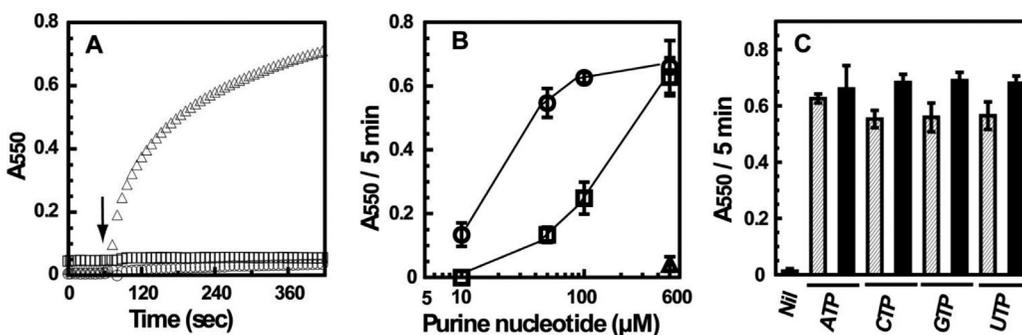


図1 ヌクレオチドとCu²⁺イオン共存下におけるPrP-(23-98)の凝集

A, 凝集に伴う吸光度変化。50mM MES緩衝液(pH 7.2), 40μM CuCl₂, 10μM PrP-(23-98)と500μM ADPから成る反応液を25℃でインキュベートした。矢印はADPあるいはCu²⁺イオンを加えた時点。○, Cu²⁺イオンを除いた反応液; □, ADPを除いた反応液; △, 全て加わった反応液。B, 濃度依存性。濃度以外はAと同じ条件。○, ATP; □, ADP; △, AMP。データは平均値±標準偏差(n=3)。C, 塩基の構造と凝集。ヌクレオチド以外はAと同じ条件。Nil, PrP-(23-98)のみの反応液; hatched bars, 100μMヌクレオチドを加えた反応液; closed bars, 500μMヌクレオチドを加えた反応液。データは平均値±標準偏差(n=3)。

以上の結果から、リン酸基の数が一個では凝集促進作用はなく二個以上で認められることや、低濃度領域ではリン酸基の数が二個より三個の方が PrP-(23-98) の凝集促進作用が強いことが明らかになった。さらに、リン酸基の数が三個であれば、塩基の構造が異なっても凝集促進作用は同程度であることがわかった。

2. PrP-(23-98) の凝集体の細胞傷害性と神経分化抑制

各種のヌクレオチドで生成した凝集体の Neuroblastoma N2a 細胞への傷害性を調べた (図 2)。コントロールと比較して $16\mu\text{M}$ Cu^{2+} イオン処理群で僅かではあるが細胞傷害性が認められた。一方、 $4\mu\text{M}$ PrP-(23-98) の処理群では細胞傷害性が認められなかった。 $4\mu\text{M}$ PrP-(23-98) 処理群と比較して、PrP-(23-98)- Cu^{2+} イオン処理群では細胞傷害性が認められた (図 2)。この傷害性は Cu^{2+} イオンによるものと考えられた。 Cu^{2+} イオンとヌクレオチド共存下で生成した凝集体で細胞を処理した群では、PrP-(23-98) 処理群と比較して、どの群も細胞の生存率は顕著に低下していた (図 2)。以上の結果から、NADPH や ATP と同様に、 Cu^{2+} イオン共存下で ADP、CTP、GTP そして UTP で誘導された凝集体に細胞への傷害性があることが明らかになった。

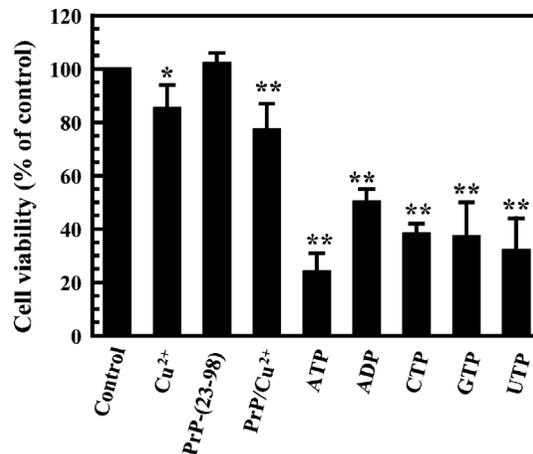


図 2 各種ヌクレオチド共存下で生成した PrP-(23-98) 凝集体の Neuroblastoma N2a 細胞への傷害性

HBS で稀釈した凝集体を Neuroblastoma N2a 細胞を培養した 96 穴マイクロプレートの各ウェルに加えた。凝集体での処理 1 時間後、DMEM-2% FBS 培養液を加えて更に 24 時間培養した。培養後、WST-1 を用いて細胞の生存率を測定した。Control, HEPES-buffered saline 処理; Cu^{2+} , $16\mu\text{M}$ Cu^{2+} イオン処理; PrP-(23-98), $4\mu\text{M}$ PrP-(23-98) による処理; PrP/ Cu^{2+} , $4\mu\text{M}$ PrP-(23-98) と $16\mu\text{M}$ Cu^{2+} イオン処理; 他のカラム, ヌクレオチドと Cu^{2+} イオン共存下で生成した凝集体による処理。データは平均値 \pm 標準偏差 ($n=3\sim 4$)。* $p \leq 0.05$ (コントロールに対しての有意差)。** $p \leq 0.01$ (PrP-(23-98) 処理群に対しての有意差)。

次に、細胞の分化への影響について、NADPH と Cu^{2+} イオン共存下で生成した凝集体を用いて調べた。Neuroblastoma N2a 細胞は、無血清下で dibutyryl cyclic AMP の添加により急激に神経突起を伸長させる。PrP-(23-98) で処理された細胞では、コントロールと同じように、細胞は

たくさんの神経突起を伸長させていた (Control, 50.5 μ m ; PrP-(23-98), 55.8 μ m) (図 3A, B ; 表 I)。一方, 凝集体で処理された細胞では, 神経突起の伸長が著しく抑制されていた (2 μ M aggregates, 19.8 μ m ; 4 μ M aggregates, 10.7 μ m) (図 3C, D ; 表 I)。

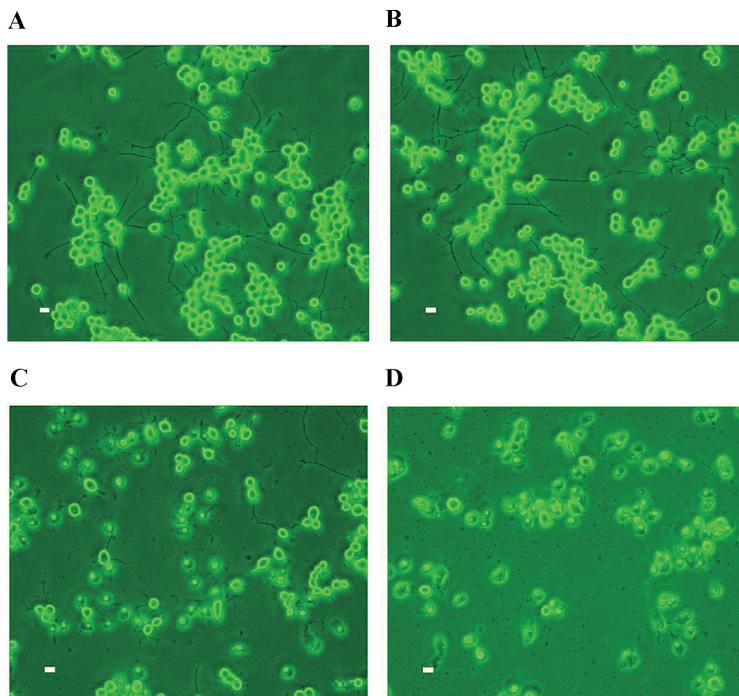


図3 Dibutyryl cyclic AMP によって誘導される Neuroblastoma N2a 細胞の分化への凝集体の影響

Neuroblastoma N2a 細胞を培養後, HBS に懸濁した凝集体をシャーレに加えて 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ の条件下で 1 時間インキュベートした。インキュベート後, 培地を無血清 DMEM-0.3 mM dibutyryl cyclic AMP に交換して 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した。図中のスケールバーは, 10 μ m。A, Control ; B, 4 μ M PrP-(23-98) での処理 ; C と D, NADPH と Cu²⁺ イオン共存下で生成した 2 μ M 凝集体での処理 (C) と 4 μ M 凝集体での処理 (D)。

表 I 凝集体処理後の神経突起の長さ

	神経突起の長さ (μ m)
	平均値 \pm 標準偏差
Control	50.5 \pm 12.9
PrP-(23-98)	55.8 \pm 13.0
2 μ M Aggregate	19.8 \pm 11.8
4 μ M Aggregate	10.7 \pm 3.0

考 察

本研究より, Cu²⁺イオン共存下で PrP-(23-98)の凝集が, ADP, CTP, GTP, そして UTP で誘導されることが明らかにされた。現在までに報告されているヌクレオチドの凝集促進効果と今回の結果について表 II に示した (Shiraishi et al., 2006 ; Shiraishi et al., 2009 ; 白石 2012)。凝集を効果的に進める作用が認められたのは, NADPH, NADPH の類似体 nicotinamide adenine dinucleotide 3'-phosphate, nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP), ATP, CTP, GTP, UTP の 7 種のヌクレオチドであった。以上の 7 種のリン酸基の数は三個であった (表 II)。一方, 効果は認められるが, その作用が弱かったのは ADP と NADP の 2 種で, この 2 種のリン酸基の数は二個と三個であった (表 II)。また, NADH, NAD, AMP には全く効果が認めらず, この 3 種のリン酸基の数は二個であった (表 II)。

表 II 各種ヌクレオチドによる PrP-(23-98)の凝集効果

ヌクレオチド	リン酸基の数	凝集促進効果
ATP ^a , GTP ^a , CTP ^a , UTP ^a	3	+ ^c
ADP ^a	2	± ^c
AMP ^a	1	- ^d
NADPH ^b	3	+ ^c
NADP ^b	3	± ^c
NAADP ^b	3	+ ^c
Nicotinamide adenine dinucleotide 3'-phosphate ^b	3	+ ^c
NADH ^b	2	- ^d
NAD ^b	2	- ^d

今回の実験結果^aと Shiraishi et al. 2006 の報告^bをもとに, 100μM の濃度での凝集促進効果が顕著なヌクレオチドは+, 効果が弱いヌクレオチドは±と表記した^c。500μM の濃度で効果がないヌクレオチドは-と表記した^d。

これらの結果から, Cu²⁺イオン共存下で PrP-(23-98)の凝集が効果的に起こるには条件としては, 複数のリン酸基が必要であること, 塩基部分の還元状態は必ずしも大きな影響を与えないこと, また, 塩基部分の構造は効果に関与しないことなどが明らかになった。

タンパク質の凝集体の形成に関しては, Fink によって仮説が出されている (Fink, 1998)。正常な状態ではタンパク質は, その折り畳みの過程で, タンパク質の疎水性領域が, 親水性領域に包まれるように折り畳まれてネイティブな構造に至る。一方, 凝集体が形成されるような場合には, タンパク質の疎水性領域が, 何らかの原因により露出した状態になり, 疎水性領域間の非特異的な相互作用によって, 分子の会合が進み凝集体が形成される。

PrP-(23-98)のアミノ酸の構成は、疎水性アミノ酸の Pro(P), Trp(W)そして Gly(G)などで59%を占め、疎水性アミノ酸の割合は高いものとなっている (Westaway et al., 1987)。また、リン酸基と Cu^{2+} イオンについては、アデニンヌクレオチドと Cu^{2+} イオンが錯体を形成することが報告され、ヌクレオチドのリン酸基は Cu^{2+} イオンに配位することが明らかにされている (Cohn, 1971)。前述したように凝集体の形成にはタンパク質の疎水性領域が重要であることから、 Cu^{2+} イオンとヌクレオチドの共存下で起こる PrP-(23-98)の凝集は、ヌクレオチドのリン酸基と PrP-(23-98)の4つの Cu^{2+} イオン結合領域 (PHGGGWGQ) が Cu^{2+} イオンに配位したときに PrP-(23-98)の疎水性領域が露出した状態になり、疎水性領域間の非特異的な相互作用によって、PrP-(23-98)の会合が進み凝集体が形成されるのではないかと推定された。

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やオリゴマーの細胞傷害性が報告がされている (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やATPと Cu^{2+} 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; 白石 2012)。今回の結果から、新たに Cu^{2+} イオンと ADP, CTP, GTP そして UTP 共存下で誘導された凝集体に細胞傷害性があることや NADPH と Cu^{2+} イオン共存下で生成した凝集体に神経分化抑制作用があることが明らかになった。これらの結果も、以前の結果と同様に PrP-(23-98)から生成したオリゴマーが細胞傷害性を持つことを支持するものであった。

文 献

- Cohn M, Hughes Jr TR, 1962. Nuclear magnetic resonance spectra of adenosine di- and triphosphate. II. Effect of complexing with divalent metal ions. *J Biol Chem* 237:176-180.
- Fink AL, 1998. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des* 3:R9-R23.
- 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.
- 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.
- Leliveld SR, Dame RT, Wuite GJL, Stitz L, Korth C, 2006. The expanded octarepeat domain selectively binds prions and disrupts homomeric prion protein interactions. *J Biol Chem* 281: 3268-3275.
- 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.
- 白石則之, 2012. プロテイナーゼ K 抵抗性を示す PrP-(23-98)凝集体の neuroblastoma N2a 細胞に対する細胞障害性. 東海学園大学研究紀要 自然科学研究編 第 17 号 : 39-45.
- Westaway D, Goodman PA, Mirenda CA, McKinley MP, Carlson GA, Prusiner SB, 1987. Mouse (with short incubation period) prion protein (PRNP) gene, complete cds. GenBank: M18070.1