

博士論文

ヒトプリオンタンパク質の C-端領域の構造と性質に関する
ペプチド化学的研究

(Chemical study on structure and property
of C-terminal region of human prion protein)
using synthetic fragment peptides

2019年9月

立命館大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

坂口 裕子

立命館大学審査博士論文

ヒトプリオンタンパク質の C-端領域の構造と性質に関する
ペプチド化学的研究

Chemical study on structure and property
(of C-terminal region of human prion protein)
using synthetic fragment peptides

2019年9月

September 2019

立命館大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

Doctoral Program in Pharmacy

Graduate School of Pharmacy

Ritsumeikan University

坂口 裕子

SAKAGUCHI Yuko

研究指導教員：豊田 英尚 教授

Supervisor: Professor TOYODA Hidenao

目次

1	序論	1
2	本論	
2.1	hPrP フラグメントペプチドの合成	6
2.2	hPrP180-192 に対する結合性の検討	8
2.2.1	Pull down assay による結合性の検討	
2.2.2	AFFINIX QN μ による分子間相互作用の検討	
2.3	hPrP180-192 の二次構造解析	16
2.3.1	至適濃度の検討	
2.3.2	Cu ²⁺ 濃度の検討	
2.3.3	二次構造に対する pH、Cu ²⁺ 及び時間の影響	
2.4	病的遺伝子変異ペプチド hPrP180-192 V180I との二次構造比較	22
2.4.1	二次構造と Cu ²⁺ の影響	
2.4.2	経時的な二次構造変化と Cu ²⁺ の影響	
2.5	AFFINIX QN μ による分子間相互作用の比較検討	28
2.5.1	Tris-HCl 緩衝液中での相互作用の検討	
2.5.2	生理的条件下における相互作用の検討	
2.6	Thioflavin T を用いた凝集性の検討	32
3	考察	36
4	結論	41
5	実験の部	42
	謝辞	62
	引用文献	63

略語表

CD:	circular dichroism
hPrP:	human prion protein
hPrP-CF:	human prion protein C-terminal region fragment peptide
MS:	mass spectrometry
MT-MMP	membrane type matrix metalloproteinase
PBS:	phosphate buffered salts
PrP:	prion protein
PrP ^C :	cellular prion protein
PrP ^{Sc} :	scrapie-type prion protein
QCM:	quartz crystal microbalance
ThT:	thioflavin T
Tris:	tris(hydroxymethyl)aminomethane

1 序論

プリオン病は特徴的な病理像から神経伝達性海綿脳症 (transmissible spongiform encephalopathies: TSE) と呼ばれ、種の壁を超えて伝播する人獣共通の神経変性疾患である。プリオン病における神経変性疾患の病因とされているプリオンタンパク質 (PrP) は細胞表面糖タンパク質である [1-4]。ヒトのプリオン病の発症率は、人口 100 万人あたりほぼ 1 人であり [5]、発症すれば平均約 1.5 年で急速にかつ 100 % 死に至る病気である [6]。特徴的な症状として、神経症状として痴呆、失調症状が、機能症状として視覚障害、運動障害などが挙げられる。病理学的所見としては、中枢神経系における脳の空胞化、神経細胞のアポトーシスやミスフォールドした PrP の蓄積が認められる [6-9]。

プリオン病の発症は、正常型プリオンタンパク質 (PrP^C) から異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) への構造変化が関与していると考えられている [1,2]。PrP^C と PrP^{Sc} は、アミノ酸の一次構造に違いは認められず、タンパク質分解酵素への抵抗性や界面活性剤への難溶性、凝集性などから区別されている。これらの性質の違いは、PrP^C の β -sheet 構造の割合が 3 % に対して、PrP^{Sc} では 43 % であることから、 β -sheet 構造が要因であると考えられている [10,11]。PrP^C から PrP^{Sc} への構造変化には Cu²⁺ を始めとする生体内微量元素との結合が関与する説 [12] や、未同定のタンパク質 (プロテイン X) がシャペロンとして機能するという説がある [13-15]。また、PrP^{Sc} の複製については、ヘテロダイマー説 [2]、と核依存重合説がある [16]。両説はいずれも PrP^{Sc} が鋳型となり、PrP^C

の高次構造を変化させることで PrP^{Sc} を複製・増殖させるという考えに基づいている。正常な PrP^C の機能が喪失する、あるいは PrP^{Sc} が神経毒性を発現する、いずれかの経路によって神経細胞死を引き起こすと考えられているが、これらのメカニズムは明確にされておらず、多くの未解明な問題が残されている。

ヒトの正常型 PrP (hPrP^C) は、253 アミノ酸からなり、分子量は 27661 である。N 末端よりシグナルペプチドと 8 個のアミノ酸 (PHGGGWGO) の繰り返り配列 (OP-repeat) 領域を含む N-端領域、2 カ所の β -sheet 構造と 1 カ所の α -helix (H1) 構造を含む中間領域、2 カ所の α -helix (H2、H3) 構造とグリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカーシグナルからなる C-端領域から構成される (Fig. 1) [17, 18]。OP-repeat 領域の His 残基に 4 原子、中間領域の His 残基に 2 原子の Cu²⁺ を結合しており [19]、脳内における Cu²⁺ ホメオスタシスに働いていると考えられている。更に、Cu²⁺ 結合による抗酸化作用、抗アポトーシス作用、神経髄鞘の維持作用および免疫調節作用を有していること、また学習・記憶や体内時計などの脳の高次構造にも関与していることが報告されているが [20-37]、PrP^C の役割については未だに不明な点が多い。PrP は、GPI アンカーを介して細胞膜外側面に局在し [2,38,39]、細胞膜上に発現した PrP^C は、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、一部は分解されることなくリサイクルされ、一部はリソソームのタンパク質分解酵素によって分解される。

近年、核磁気共鳴 (NMR) および円二色性 (CD) スペクトルなどを用いたフラグメントペプチドの構造研究の結果、C-端領域は PrP^{Sc} の病原性に関係して

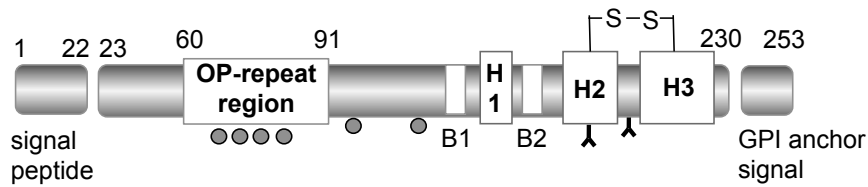
いると報告されている [40-50]。プリオンの全領域のうち、N-端領域のペプチドは全く線維を作らず、C-端領域の H2 と H3 領域のペプチドがアミロイド線維を形成したと報告されている [40]。PrP の C-端領域の H2 (173-195) は、16 時間で α -helix から β -sheet に変化することや [41]、hPrP180-195 は、中性 pH で β -sheet 構造をとり、この領域が全長の H2 の立体配座に強く寄与し、球状ドメイン全体の構造を決定する役割を果たしていると報告されている [42]。電子顕微鏡法およびコンゴレッド複屈折によって得られたデータによれば、hPrP180-193 および hPrP178-193 はアミロイド構造を形成すると報告されている [43]。また、H2 に対する pH の影響の検討では、H2 ペプチドが、直線状の長い原線維のフィブリル化および伝播の両方が可能であることを示し、溶液の pH に応じて特有の繊維に可逆的に変化することが報告されている [44]。このように、PrP^C から PrP^{Sc} への構造変化については C-端領域、特に H2 が大きく影響している可能性が高い。よって、この領域の構造変化に対する pH や Cu²⁺ の影響について検討することが重要である。

プリオン病は、家族歴が無く突然発症する弧発性プリオン病が大部分を占め、次に病的な遺伝子変異の結果起こる遺伝性プリオン病がある。遺伝子変異は現在までに 30 種類以上の点変異が報告されている [51-53]。遺伝性プリオン病の中でも、C-端の H2 領域の hPrP180 Val から Ile (V180I) への変異は日本で最も多い [51]。V180I の遺伝性プリオン病は弧発性として発症し、遺伝子検査の結果判明する [54]。また、高齢で発症し、病状の進行が遅いことが知られている [55-57]。V180I 変異体では N-結合型グリコシル化欠損が膜結合性および細胞質

性の PrP の正確な局在化が損なわれていることや [58]、また、H2-H3 に動力学的な影響が生じて、タンパク質相互作用が変化し、B2 - H2 ループの相互作用を活性化することが全原子分子動力学シミュレーションを用いた研究により示されている [59]。しかし、未だ報告数は少なく、発症機序には不明な点が多い。

プリオン病に関する多くの研究にも関わらず、その発症メカニズムの解析が進まない理由として、まず研究試料としてのプリオンタンパク質の取り扱いの困難さが挙げられる。プリオン病では PrP^{Sc} が病原性因子として伝染するため、組み換え体のプリオンタンパク質を調製して使用することには感染などの危険が伴う。更に、PrP^{Sc} の立体構造の多様性に加え、難溶性や凝集性という性質が化学的・物理的解析を困難としており、凝集メカニズムの解析を妨げている。このようなプリオンタンパク質研究の問題点を回避する手段として、PrP フラグメントペプチド (hPrP-CF) を用いた研究が行われている。それらの報告によると、hPrP180-192 に Cu²⁺ が強く結合することや、C-端領域は脳内に発現している膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼ (MT-MMP) による切断を受け難いことを見出し、hPrP-CF の有用性が報告されている [60-62]。以上のことより C-端領域の二次構造変化が凝集に関与していることが考えられる (Fig. 2)。

本研究では、C-端領域の役割を評価するために、円二色性 (CD) スペクトル、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、AFFINIX QN μ 水晶振動子マイクロバランス、Pull down assay および Thioflavin T 染色を用いて hPrP180-192 と hPrP180-192 V180I の物理化学的性質と Cu²⁺ の影響を詳細に検討した。



B1 : β -sheet region (hPrP 128-131), B2 : β -sheet region (hPrP 161-164),
 H1 : α -helix region (hPrP 144-154), H2 : α -helix region (hPrP 173-194),
 H3 : α -helix region (hPrP 200-228)
 S-S : disulfide bond (hPrP179, 214)
 λ : N-type glycosylation (hPrP181, 197)
 \bullet : Cu^{2+} binding sites (hPrP61, 69, 77, 85, 96, 111)

Fig. 1 Domain structure of the hPrP.

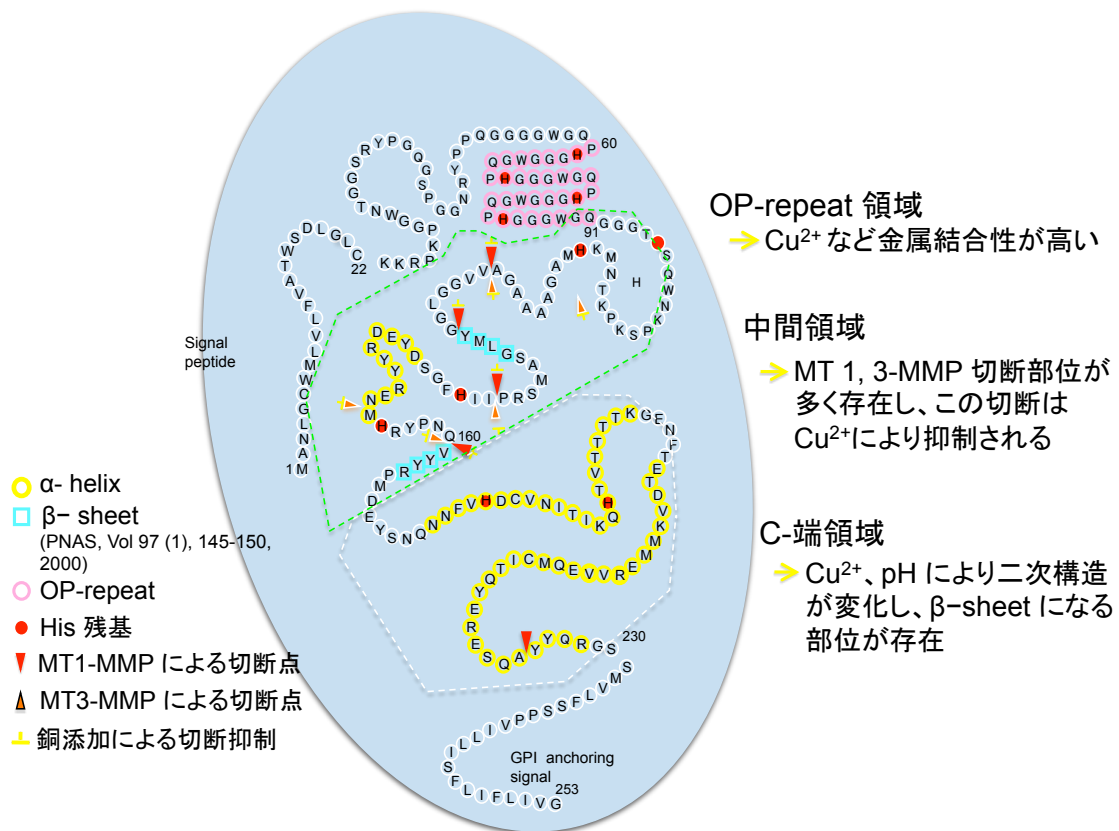


Fig. 2 Structure of hPrP and character of each domain.

2 本論

2.1 hPrP フラグメントペプチドの合成

C-端領域は 2 個の α -helix (H2、H3) を含んでいる (Fig. 1)。特に H2 は凝集に関与しているという報告があり [40-44]、2 個の His を含んでいる。本研究では、177 His と 187 His を共に含み H2 全長に該当する 24 残基の hPrP169-192、177 His を含む hPrP169-183 と hPrP175-183、187 His を含む hPrP180-192、及び 180 Val を Ile に置換した病的遺伝子変異体である hPrP180-192 V180I の 5 種類のペプチド (hPrP-CF) を、自動固相ペプチド合成機を用いて F-moc ケミストリーにより合成した。定法により脱保護、レジンからの切り出しを行った後、分取用逆相 HPLC を用いて精製した。得られたペプチドの純度を分析用 HPLC により確認した結果、各ペプチドとも高純度に精製されていることが明らかとなった (Fig. 3)。また、質量分析測定装置 (MS) を用いて分子量を確認した結果、目的のペプチドが得られていることは明らかとなり (Table 1)、凍結乾燥した後、使用直前まで 4 °C で保存した。

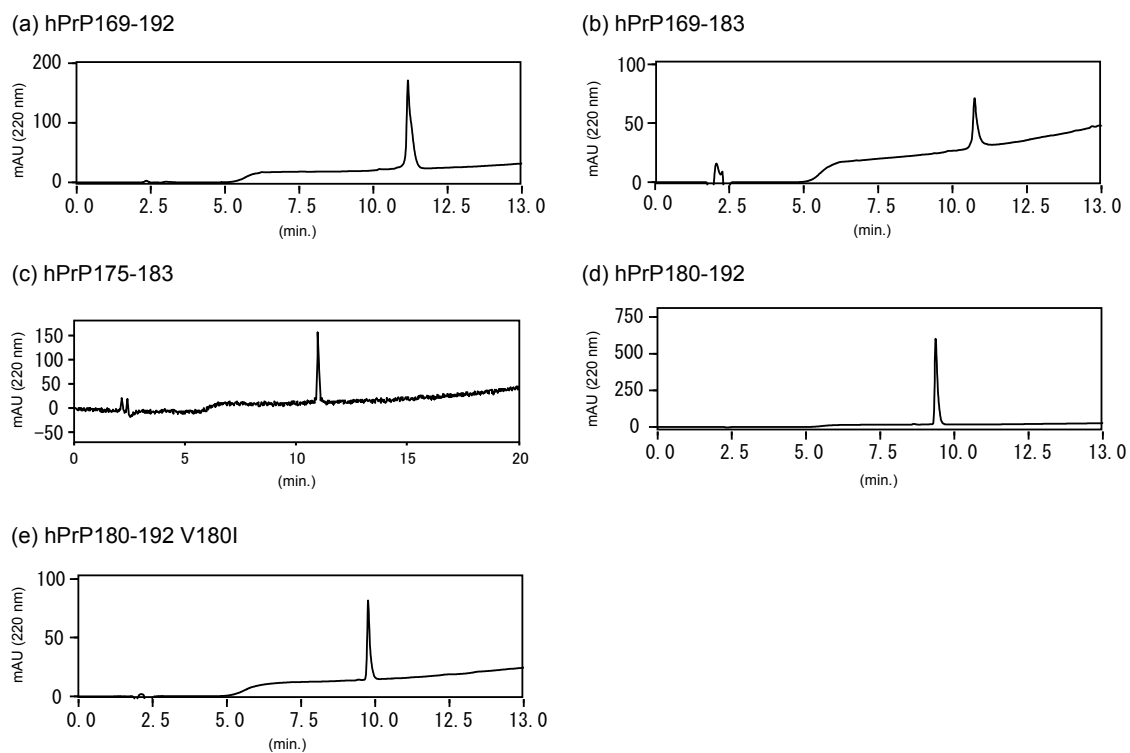


Fig. 3 Purity confirmation of each hPrP-CF.

Table 1 Amino acid sequence of each hPrP-CF and identification of each molecular weight.

hPrP-CF	Sequence	Detected ion m/z	Experimental Mass	Theoretical Mass
hPrP169-192	YSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTT	$[M + 4H]^{4+}$	2776.73	2776.32
hPrP169-183	YSNQNNFVHDCVNIT	$[M + 2H]^{2+}$	1766.80	1766.77
hPrP180-192 V180I	INITIKQHTVTTT	$[M + 3H]^{3+}$	1468.41	1468.83
hPrP180-192	VNITIKQHTVTTT	$[M + 3H]^{3+}$	1454.84	1454.81
hPrP175-183	FVHDCVNIT	$[M + 2H]^{2+}$	1046.50	1046.49

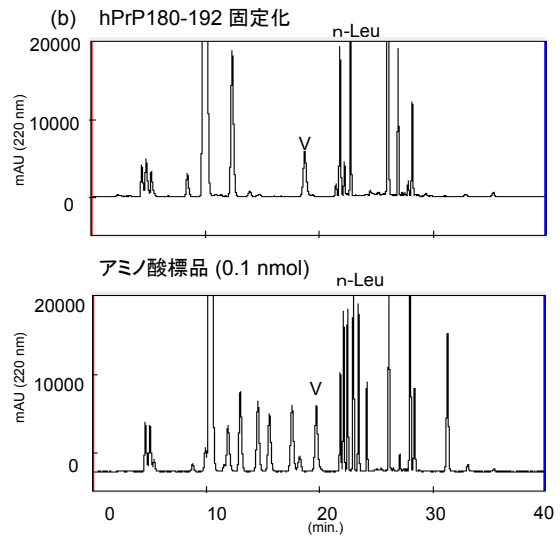
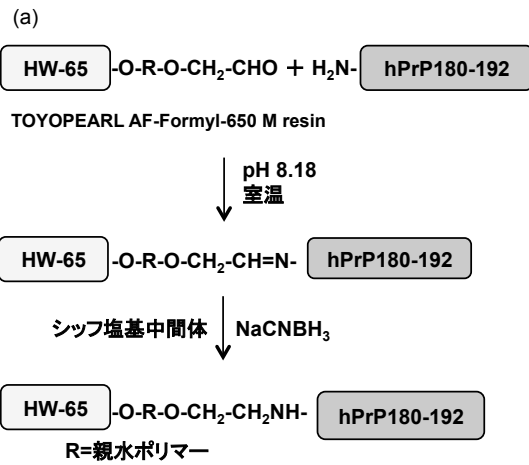
2.2 hPrP180-192 に対する結合性の検討

小嶋らは hPrP180-192 がプリオンタンパク質凝集の核となり得る可能性を報告している [60-62]。本稿では hPrP180-192 と他の C-端由来のフラグメントペプチド (hPrP-CF) との結合性を検討した。

2.2.1 Pull down assay による結合性の検討

hPrP180-192 固定化レジン (R-hPrP180-192) を調製し、反応時間を 1 日として hPrP-CF との結合性を 25 °C で検討した。加えてペプチド間の結合性に対する Cu^{2+} の影響も検討した。

hPrP180-192 の HW-65 レジンへの固定化は、使用マニュアルに従って行なった (Fig. 4-a)。レジンへの hPrP180-192 固定化量は、アミノ酸分析法により算出した (Fig. 4-b)。アミノ酸標準溶液である n-Leu 含有 H 型標準品 (standard) を基準として、試料中のアミノ酸 (Val) のピーク高さの比から算出した結果、固定化量は、160 pmol/ μL (resin 50 % suspension) であった (Fig. 4-c)。



(c)

Val より hPrP180-192 固定化量算出 (inject Vol. 4 μL)

$$\frac{\text{Val ピーク高さ (n-Leu 補正後)} \times 25 \text{ (サンプル } 100 \mu\text{L 中)} \times 0.1 \text{ (nmol)}}{\text{アミノ酸標品の Val のピーク高さ} \times \text{含有アミノ酸 (V) 数} \times 5 \text{ (レジン } 5 \mu\text{L を加水分解)}}$$

Fig. 4 Preparation of hPrP180-192 immobilized resin.
 (a) Procedure of immobilization. (b) Chromatogram of amino acid analysis.
 (c) Calculating immobilized amount of hPrP180-192.

次に、hPrP-CF との結合性を検討した。R-hPrP180-192 (3.2 nmol) に対し、4 等量の hPrP-CF (12.8 nmol) を添加し、1 日反応させた。反応液を遠心分離後、レジンを加水分解して hPrP-CF の結合量を算出した (Fig. 5)。非特異的な結合を排除するために、コントロールとして活性基を Tris によりブロッキングしたレジン (R-Tris) を用いて同様の検討を行った。R-hPrP180-192 と hPrP180-192 の反応について、クロマトグラムを Fig. 6 に示した。バリリン (V) のピーク高さを比較すると、 Cu^{2+} の存在下でピーク高さが低く、結合性が低下していることが明らかだった。結果を Table. 2 に示す。評価方法は、R-Tris の結合量と比較して、2 倍以上あれば結合性 +、4 倍以上であれば結合性 ++、2 倍未満であれば結合性 - と判断した。その結果、 Cu^{2+} 非存在下で結合性が認められたのは、hPrP169-183、hPrP180-192 であった。特に hPrP180-192 は R-Tris と比較して 4 倍以上の結合量があり、最も高い結合性がみとめられた。一方、 Cu^{2+} の存在下ではいずれのペプチドも結合性がみとめられなかった。hPrP169-183、hPrP180-192 の結合性について、 Cu^{2+} がペプチドの結合性を低下させていることが明らかとなった。

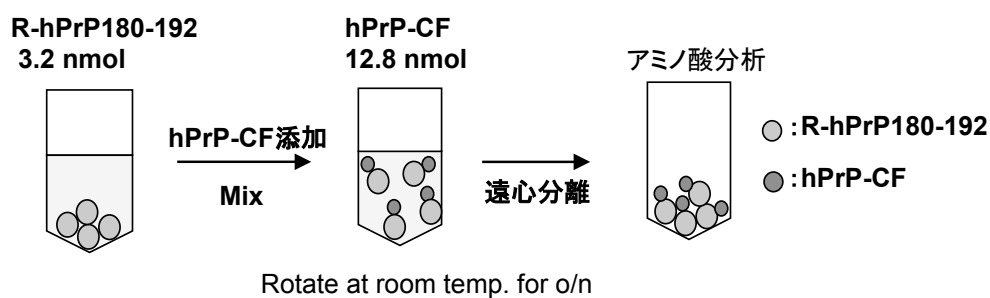


Fig. 5 Method of pull down assay using R-hPrP180-192.

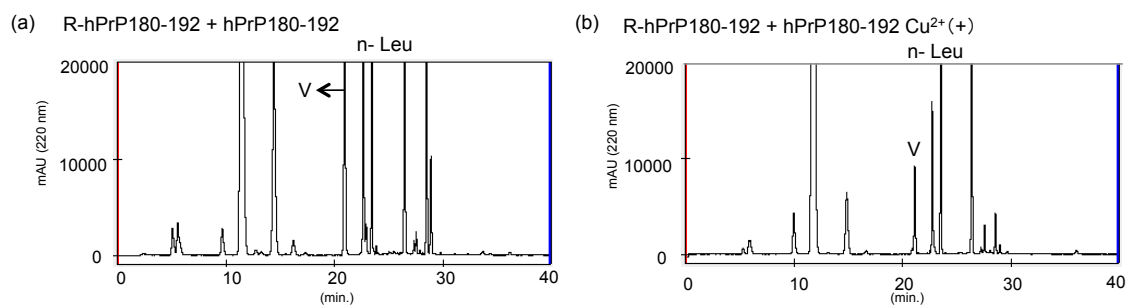


Fig. 6 The effects of Cu²⁺ on affinity between R-hPrP180-192 and hPrP180-192. (a) In the absence of Cu²⁺ and (b) in the presence of Cu²⁺.

Table 2 Summary of pull down assay.

	Pull down assay (nmol)					
	Cu ²⁺ (-)			Cu ²⁺ (+)		
	R-Tris	R-hPrP180-192	結合性	R-Tris	R-hPrP180-192	結合性
hPrP169-192	1.7 ± 0.2	1.9 ± 0	-	2.1 ± 0.1	3.0 ± 0.2	-
hPrP169-183	1.3 ± 0.2	2.7 ± 0.2	+	1.3 ± 0	0.8 ± 0.1	-
hPrP175-183	1.1 ± 0.2	N.D.	-	2.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1	-
hPrP180-192	1.0 ± 0	4.8 ± 0.2	++	1.0 ± 0	0.3 ± 0.1	-

++: R-Tris × 4 ≤, +: R-Tris × 2 ≤, -: R-Tris × 2 >

2.2.2 AFFINIX QN μ による分子間相互作用の検討

前項の Pull down assay による検討では反応時間が 1 日と長いため、短時間の結合性は測定できない。そこで、AFFINIX QN μ を用いて短時間での相互作用を検討した。分子間相互作用は、分子間相互作用測定装置 (AFFINIX QN μ) を用いて水晶振動子マイクロバランス (quartz crystal microbalance : QCM) 法により検討した。水晶振動子とは、水晶の結晶を極薄い板状に切り出した切片の両側に金属薄膜を取り付けた構造をしたもので、それぞれの金属薄膜に交流電場を印加するとある一定の周波数 (共振周波数) で振動する。分子が振動している水晶振動子に結合すると、振動周波数は表面に存在する分子の量に比例して減少する (Fig. 7-a)。この性質を利用して、AFFINIX QN μ を用いて固定化分子と注入分子との間の親和性を定量した [63]。比較対象として、ペプチドを水晶振動子に固定化せずにプロッキング剤を固定化したものを用いた (Fig. 7-b)。

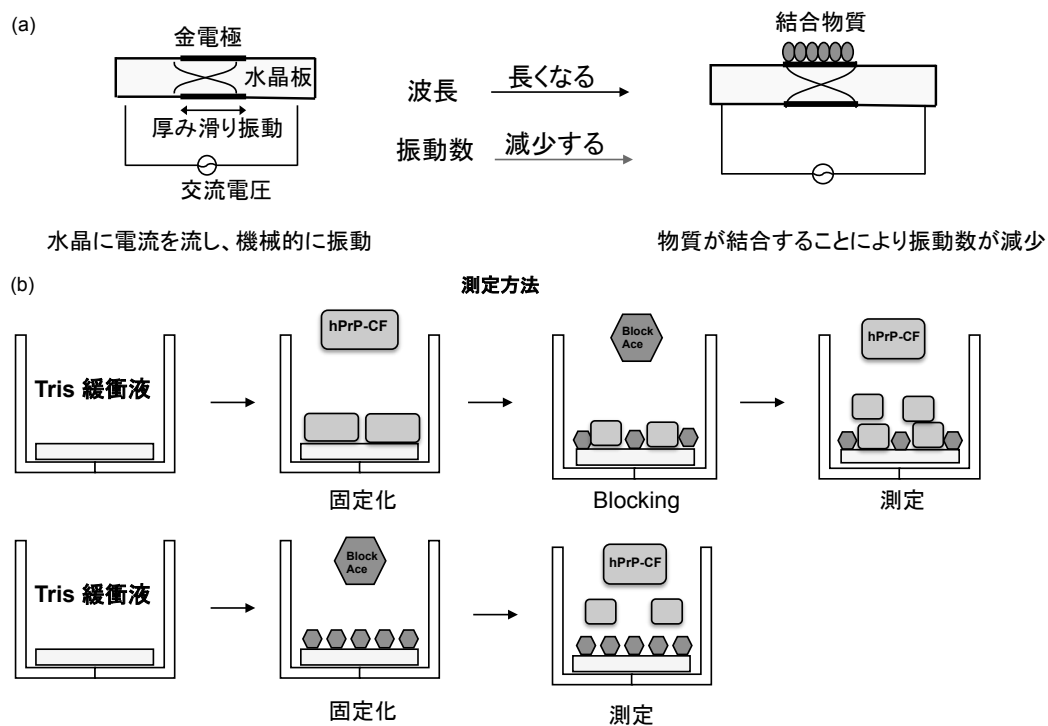


Fig. 7 Principle and measurement methods of AFFINIX QN μ .
 (a) Principle of AFFINIX QN μ . (b) Measurement methods.

hPrP180-192 を水晶振動子に固定化し、hPrP-CF 添加後の振動周波数の時間経過を Fig. 8 に示す。最も振動周波数が低下した hPrP-CF は H2 の C-端からなる hPrP180-192 であり、ペプチドの添加量に比例して振動数の低下がみられた (Fig. 8-a)。H2 の N-端側の hPrP169-183 は、初回添加で大きく振動周波数が低下し、その後の添加により緩やかに振動周波数の低下がみられた (Fig. 8-b)。また、H2 領域を含む最長の hPrP169-192 と中間にあたる最短の hPrP175-183 はペプチドの添加によりわずかに振動周波数が低下したが、ブロッキングを行ったものと比較して差が小さい結果となった (Fig. 8-c and -d)。

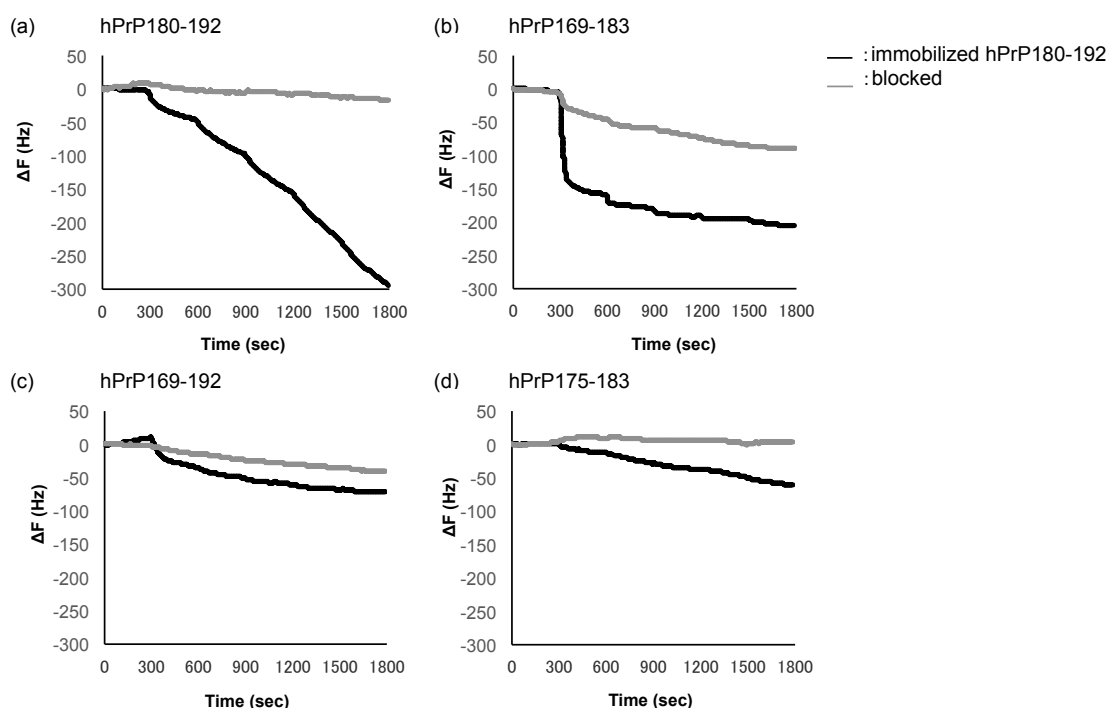


Fig. 8 Intermolecular interaction of hPrP180-192 against hPrP-CF using an AFFINIX QN μ system. 5 kinds of hPrP-CF were injected into the hPrP180-192 immobilized QCM cuvette. (a) hPrP180-192, (b) hPrP169-183, (c) hPrP169-192 and (d) hPrP175-183 were injected in the absence of Cu²⁺

以上の結果より、hPrP180-192 と相互作用を示すペプチドは、hPrP169-183 及び hPrP180-192 ということが明らかとなり、特に hPrP180-192 同士の相互作用が強いことより hPrP180-192 が凝集の核となり得ることが示唆された。前項の Pull down assay においても hPrP169-183 と hPrP180-192 の相互作用が認められ、特に hPrP180-192 の相互作用が強いことが示されており、AFFINIX QN μ においても同様の傾向となった。

2.3 hPrP180-192 の二次構造解析

PrP^C から PrP^{Sc} への構造変化は β -sheet 構造の含有量が関与していると言われている。本項では、二次構造に対する pH、Cu²⁺ 及び時間の影響を CD スペクトルより解析することで hPrP180-192 が PrP 凝集の核となる可能性があるか否かの検討を行った。

2.3.1 至適濃度の検討

始めに、CD スペクトルを解析するために、Cu²⁺ の非存在下における hPrP180-192 の至適濃度の検討を行った。Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中で、種々の濃度の hPrP180-192 を用いて CD スペクトルを測定した。ペプチド溶液調製直後 (0 day) では 50 μ M 及び 100 μ M の濃度で、197 nm 付近に負の極大を持つ典型的な random coil 構造であった (Fig. 9-a) が、10 μ M の濃度では、208 nm と 222 nm 付近に負の極大を、191 nm 付近に正の極大を持つスペクトルを示した。これらの溶液を 37 °C で 10 日間インキュベートすると、50 μ M 及び 100 μ M では 200 nm 付近に正の極大を持つ β -sheet 構造に変化した。また、10 μ M の濃度では 192 nm 付近の正の極大が大きく、どの濃度においても二次構造変化が著明であった (Fig. 9-b)。100 μ M では 200 nm 付近の吸収極大の値が他に比べて小さく、その理由として β -sheet 構造に変化した後、凝集が起こり、そのため可溶性の hPrP180-192 が減少していることが考えられた。そこで以降の実

験には、50 μM の hPrP180-192 を用いることとした。

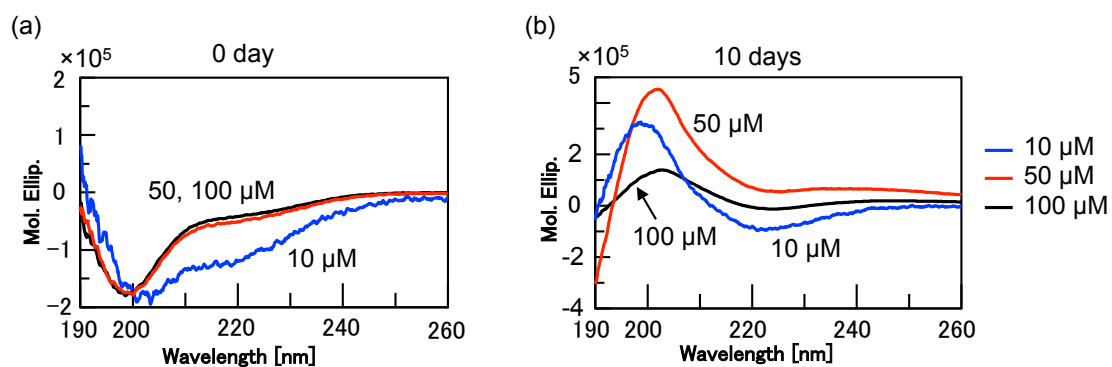


Fig. 9 CD spectra of hPrP180-192 at various concentrations at 0 and 10 days in the absence of Cu^{2+} . Spectra were obtained for hPrP180-192 at 10, 50, and 100 μM . Spectra were obtained at (a) 0 day and (b) 10 days

2.3.2 Cu^{2+} 濃度の検討

hPrP180-192 の二次構造に対する Cu^{2+} の影響を検討するため、50 μM の hPrP180-192 に様々な濃度の Cu^{2+} を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 7 日間インキュベートした。 Cu^{2+} 添加直後では全ての濃度において 197 nm 付近の負の極大がみられ random coil 構造を形成していることより、添加直後では Cu^{2+} 結合による二次構造変化は起きていないと考えられた (Fig. 10-a)。一方、7 日後の CD スペクトルは大きく変化していた。 Cu^{2+} の非存在下では 200 nm 付近の正の極大がみられ β -sheet 構造へ変化していた。hPrP180-192 に対して等量である 50 μM 、2 当量である 100 μM では、197 nm 付近の負の極大を保ち、 β -sheet 構造への変化を抑制していると考えられた。hPrP180-192 濃度に対して 1/10 当量 (Cu^{2+} 5 μM)、1/100 当量 (Cu^{2+} 0.5 μM) の場合、弱いながら 200 nm 付近の正の極大がみられ、低濃度の Cu^{2+} では β -sheet 構造への変化を抑制できていないことが判明した (Fig. 10-b)。

hPrP180-192 は 187 His を 1 つ含み、それに対して Cu^{2+} が 1 原子結合することを考慮すると、矛盾のない結果であると考えられる。この結果に基づき、hPrP180-192 と Cu^{2+} の相互作用が確実に起こると考えられる、2 当量の Cu^{2+} (100 μM) を用いることとした。

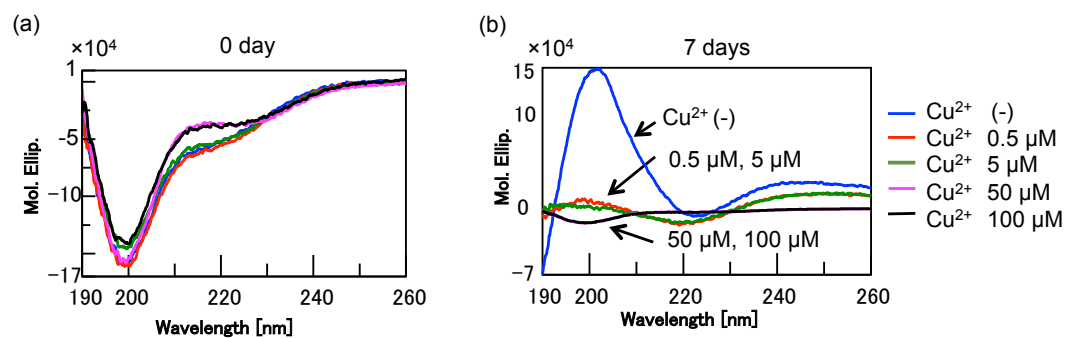


Fig. 10 The effects of Cu^{2+} concentration on CD spectra of hPrP180-192. 50 μM of hPrP180-192 was incubated with 0.5, 5, 50, and 100 μM of Cu^{2+} for (a) 0 day and (b) 7 days.

2.3.3 二次構造に対する pH、Cu²⁺ 及び時間の影響

次に、hPrP180-192 の二次構造変化に対する pH、Cu²⁺ 及び時間の影響を分析した。Cu²⁺ 非存在下、hPrP180-192 溶液調製直後において、hPrP180-192 はいずれの pH においても random coil 構造をとっており、二次構造に違いがみられなかった。7 日後では、pH 7.0、pH 8.0、pH 9.0 の溶液において 200 nm 付近の正の極大がみられ、 β -sheet 構造への変化がみとめられた。その中でも、pH 7.0 の溶液において 200 nm 付近の正の極大が大きく、二次構造変化が著明であった。さらに、 β -sheet 構造への変化がみとめられた溶液に Cu²⁺ を添加し 7 日経過すると、pH 7.0 の溶液のみが 197 nm 付近の負の極大を示すスペクトルに変化し、random coil 構造へ戻ることが確認された (Fig. 11-a)。Cu²⁺ 存在下では、hPrP180-192 溶液調製直後においては、Cu²⁺ 非存在下と同様に hPrP180-192 はいずれの pH においても random coil 構造をとっていた。7 日後では、pH 9.0 の溶液のみ 200 nm 付近の正の極大がみられ、 β -sheet 構造への変化がみとめられた (Fig. 11-b)。

以上の結果より、Cu²⁺ の非存在下では hPrP180-192 の二次構造変化が pH 6.0 以下で抑制され、Cu²⁺ の存在下では pH 8.0 以下まで抑制されることが明らかとなった。興味深いことに、生理的条件に近い pH 7.0 では、Cu²⁺ の非存在下で random coil 構造から β -sheet 構造へ変化しても、Cu²⁺ の添加で再び二次構造は random coil 構造へ戻ることが判明した (Fig. 11-a)。

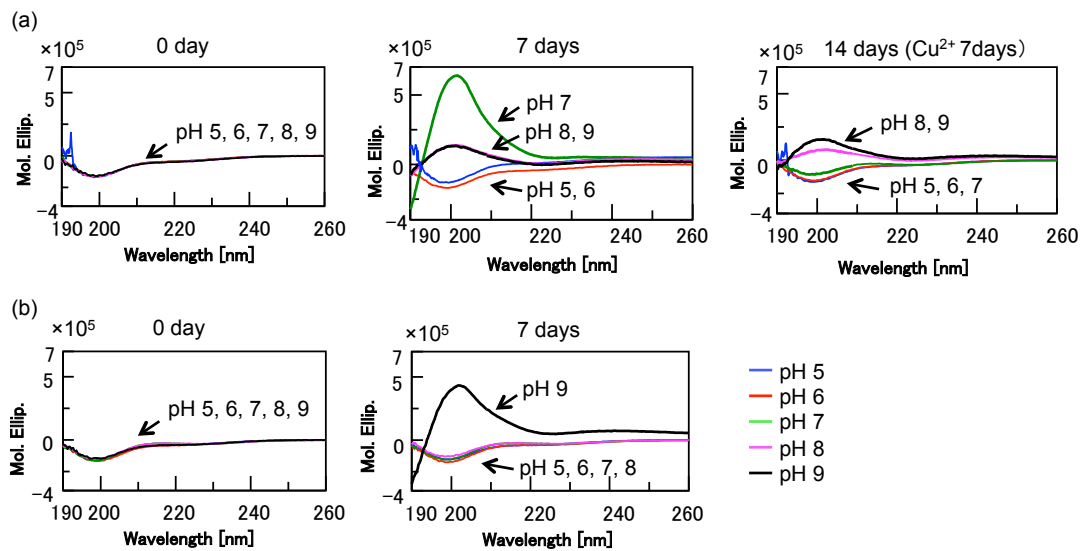


Fig. 11 CD spectra of hPrP180-192 at increasing pH over time. Spectra were obtained in the (a) absence of Cu^{2+} and (right) following the addition of $100 \mu\text{M}$ of Cu^{2+} after 7 days, obtained at 14 days. (b) Presence of Cu^{2+} at an initial time point (0 day) and after 7 days.

2.4 病的遺伝子変異ペプチド hPrP180-192 V180I との二次構造比較

前項までの検討により、hPrP180-192 は生理的 pH において β -sheet 構造へと変化することが判明した。本項では、PrP の H2 領域の 2 箇所の病的な遺伝子変異の内、日本人で最も多くみられる 180 Val から Ile への点変異の影響を解明するため hPrP180-192 V180I の pH 7.5 における二次構造を詳細に検討し、hPrP180-192 と比較した。同時に、CD 測定溶液を HPLC 分析することで可溶性ペプチド量を求めた。

2.4.1 二次構造と Cu^{2+} の影響

Cu^{2+} 非存在下において試料溶液調製直後では hPrP180-192 と hPrP180-192 V180I 共に 197 nm に負の極大を持つ random coil 構造特有のスペクトルパターンを示し、かつ HPLC 分析により可溶性であることが確認できた。1 日後には、両ペプチドとも負の極大が消失し、HPLC クロマトグラムにおいては大幅なピーク高さの減少が見られた (Fig. 12)。一方、予め Cu^{2+} を添加した溶液では、hPrP180-192 と hPrP180-192 V180I は共に調製直後と 1 日後のスペクトルパターンは random coil 構造から変化は無く、HPLC のクロマトグラムでもピーク高さの変化はみられなかった (Fig. 13)。この結果より、 Cu^{2+} 添加により、hPrP180-192 と hPrP180-192 V180I の二次構造変化と可溶性ペプチドの減少が抑制されていることが明らかとなった。

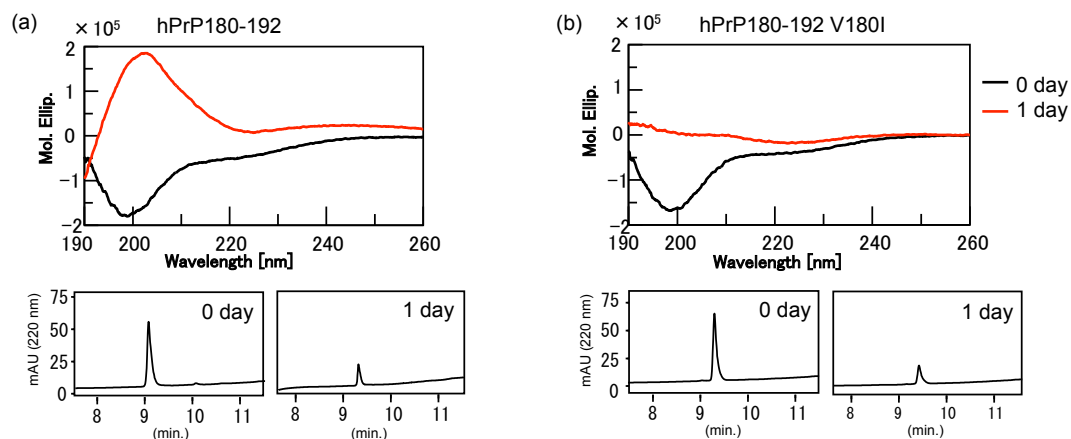


Fig. 12 Time dependency of the structure and peak value changes of hPrP180-192 and hPrP 180-192 V180I in the absence of Cu^{2+} .
 Upper: CD spectra for 50 μM of (a) hPrP180-192 and (b) hPrP180-192 V180I incubated for 0 day and 1 day.
 Lower: Detection of soluble (a) hPrP180-192 and (b) hPrP180-192 V180I by HPLC at 0 day and 1 day. Twenty μL of 50 μM of each peptide was injected for HPLC analysis.

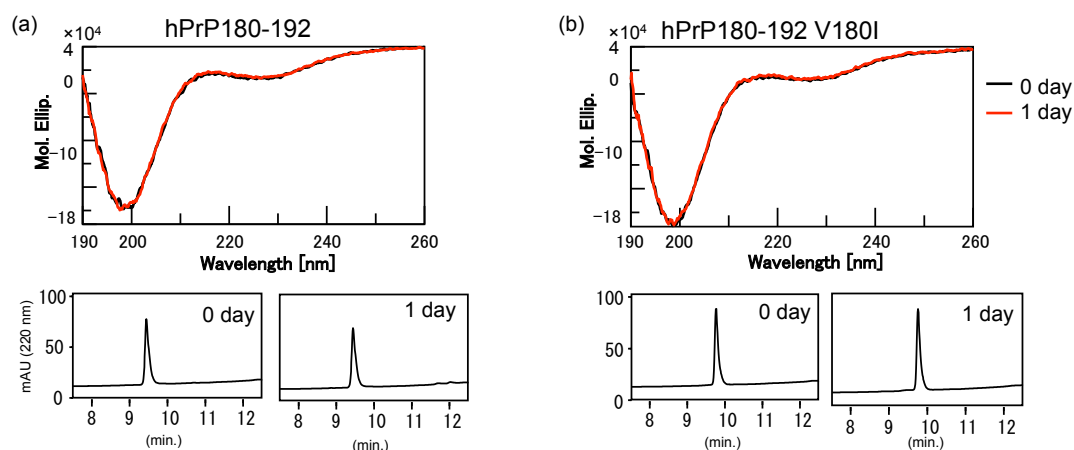


Fig. 13 Time dependency of the structure and peak value changes of hPrP180-192 and hPrP 180-192 V180I in the presence of Cu^{2+} .
 Upper: CD spectra for 50 μM of (a) hPrP180-192 and (b) hPrP180-192 V180I incubated for 0 day and 1 day.
 Lower: Detection of soluble (a) hPrP180-192 and (b) hPrP180-192 V180I by HPLC at 0 day and 1 day. Twenty μL of 50 μM of each peptide was injected for HPLC analysis.

2.4.2 経時的な二次構造変化と Cu^{2+} の影響

前項の検討より、hPrP180-192 と hPrP180-192 V180I は共に Cu^{2+} 非存在下、溶液調製直後では 197 nm 付近に負の極大を示すスペクトルパターンを示し、random coil 構造を形成して可溶性となっているが、1 日後には 200 nm 付近の正の極大がみられ、 β -sheet 構造へ変化すると共に不溶性となることが示唆された。そこで、 Cu^{2+} 非存在下、経時的に CD スペクトルの変化を詳細に解析すると共に β -sheet 構造へ変化し不溶性となった hPrP180-192 と hPrP180-192 V180I に対する Cu^{2+} の影響を検討することとした。

hPrP180-192 は、0 hr では random coil 構造をとっていたが、2 hr、4 hr、6 hr と経時的に 197 nm 付近の負の極大の減少がみられた。26 hr で 200 nm 付近の正の極大がみられ、 β -sheet 構造への変化がみとめられた。その後は 49 hr で 200 nm 付近の正の極大が減少し、68 hr では 49 hr から変化はみられなかった (Fig. 14-a)。この時、hPrP180-192 の溶液に白色沈殿物がみられた。引き続き、68 hr で Cu^{2+} を添加した。 Cu^{2+} 添加直後は一時的に 200 nm 付近の正の極大の増加がみられた。 Cu^{2+} 添加 2 時間後、再び 197 nm 付近の負の極大がみられ、random coil 構造へ戻る傾向がみられた。興味深いことに、 Cu^{2+} 添加 8 時間後でさらに 197 nm 付近の負の極大が増加し、実験の開始時に認められた負のピークに戻った。その後、 Cu^{2+} 添加 22 時間後で測定を行ったが、 Cu^{2+} 添加 8 時間後の二次構造から変化はみられなかった (Fig. 14-b)。同時に、HPLC を用いて可溶性 hPrP180-192 の量を分析した。0 hr で観察された hPrP180-192 のピーク

クは 68 hr でほぼ消失し、 Cu^{2+} を添加しても直後にはピークは認められなかった。しかしながら、 Cu^{2+} 添加後は経時的にピークが高くなり反応直後のピーク高さと比較して 60 % の復帰が認められた (Fig. 14-c and 16-b)。一方、PrP180-192 V180I は Cu^{2+} 非存在下では CD スペクトル及び HPLC 分析において hPrP180-192 同様の結果を示した (Fig. 15-a)。しかしながら、凝集後の Cu^{2+} 添加では hPrP180-192 と異なり、二次構造は変化せず (Fig. 15-b)、HPLC のピーク高さも 15 % の復帰となり、hPrP180-192 と比較して極わずかな上昇であった (Fig. 15-c and 16-b)。クロマトグラムのピーク高さは CD スペクトルの 200 nm 付近の負の極大と良い相関を示しており (Fig. 16)、CD スペクトルの 200 nm 付近の負の極大が可溶性 hPrP180-192 の量を表すことが示唆される。

これらの結果より、V180I の変異が起きてもペプチドの物性は変わらないが、一旦不溶体を形成した後の物性、特に Cu^{2+} による影響には大きな差が生じることが明らかとなった。

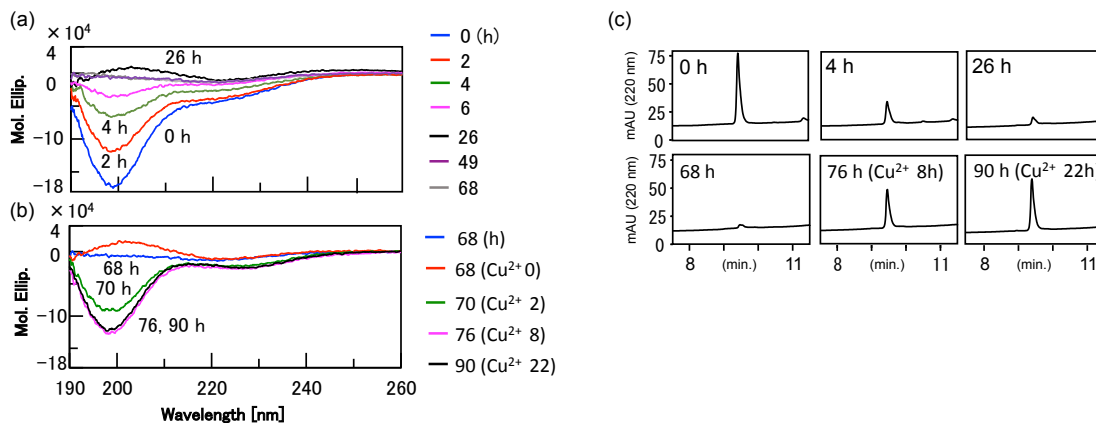


Fig.14 Time dependency of the structure and peak value changes of hPrP180-192. (a) CD spectra for 50 μM of hPrP180-192 incubated for 0, 2, 4, 6, 26, 49, and 68 h without Cu^{2+} . (b) CD spectra for hPrP180-192 following the addition of 100 μM of Cu^{2+} after 68 h, obtained at 70, 76, and 90 h. (c) Detection of soluble hPrP180-192 by HPLC at 0, 68, and 96 hours. Cu^{2+} was added at 68 h. Twenty μL of 50 μM hPrP180-192 was injected for HPLC analysis.

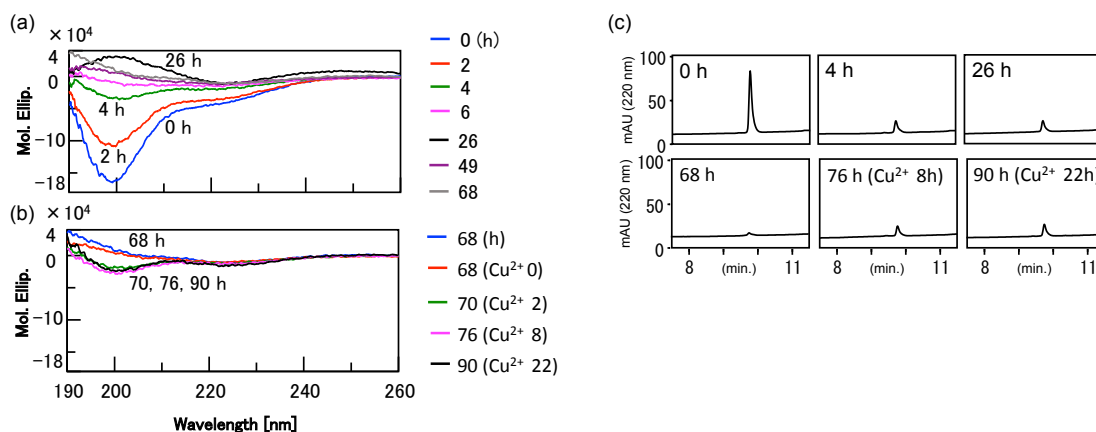


Fig.15 Time dependency of the structure and peak value changes of hPrP180-192 V180I. (a) CD spectra for 50 μM of hPrP180-192 V180I incubated for 0, 2, 4, 6, 26, 49, and 68 h without Cu^{2+} . (b) CD spectra for hPrP180-192 V180I following the addition of 100 μM of Cu^{2+} after 68 h, obtained at 70, 76, and 90 h. (c) Detection of soluble hPrP180-192 V180I by HPLC at 0, 68, and 96 hours. Cu^{2+} was added at 68 h. Twenty μL of 50 μM hPrP180-192 V180I was injected for HPLC analysis.

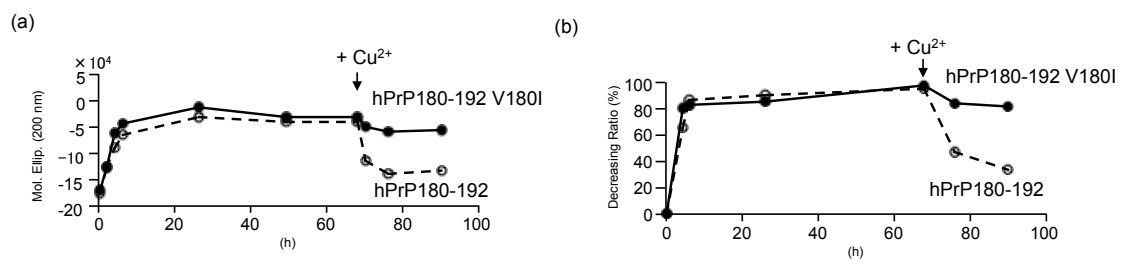


Fig.16 Molar ellipticity at 200 nm and peak value changes of hPrP180-192 and hPrP180-192 V180I. (a) The molar ellipticity at 200 nm plotted for each CD spectrum. (b) The decreasing ratio of all peaks relative to their peak height at 0 h on HPLC were calculated.

2.5 AFFINIX QN μ による分子間相互作用の比較検討

前項までの検討により、hPrP180-192 と hPrP180-192 V180I の Cu²⁺ 非存在下での二次構造は類似しているにも関わらず、不溶体形成後における Cu²⁺ の影響に差があることが明らかとなった。本項では、hPrP180-192 及び hPrP180-192 V180I の AFFINIX QN μ を用いた分子間相互作用と、それに対する Cu²⁺ の影響を検討した。

2.5.1 Tris-HCl 緩衝液中での相互作用の検討

hPrP180-192 を固定化した場合、Cu²⁺ 非存在下では、hPrP180-192 は添加量に比例して振動数の低下がみられ、強い相互作用が確認できた (Fig. 17-a)。一方、Cu²⁺ 存在下では、hPrP180-192 は添加により振動数の低下はみられず、相互作用は確認できなかった (Fig. 17-b)。また、hPrP180-192 V180I を固定化し hPrP180-192 V180I を添加した場合は、Cu²⁺ の有無に関わらずわずかに振動数の低下がみられ、弱いながら相互作用が確認できた (Fig. 17-c and -d)。hPrP180-192 V180I は Cu²⁺ 添加による影響が僅かであるのに対し、hPrP180-192 は Cu²⁺ 添加により相互作用が強く抑制されていた。

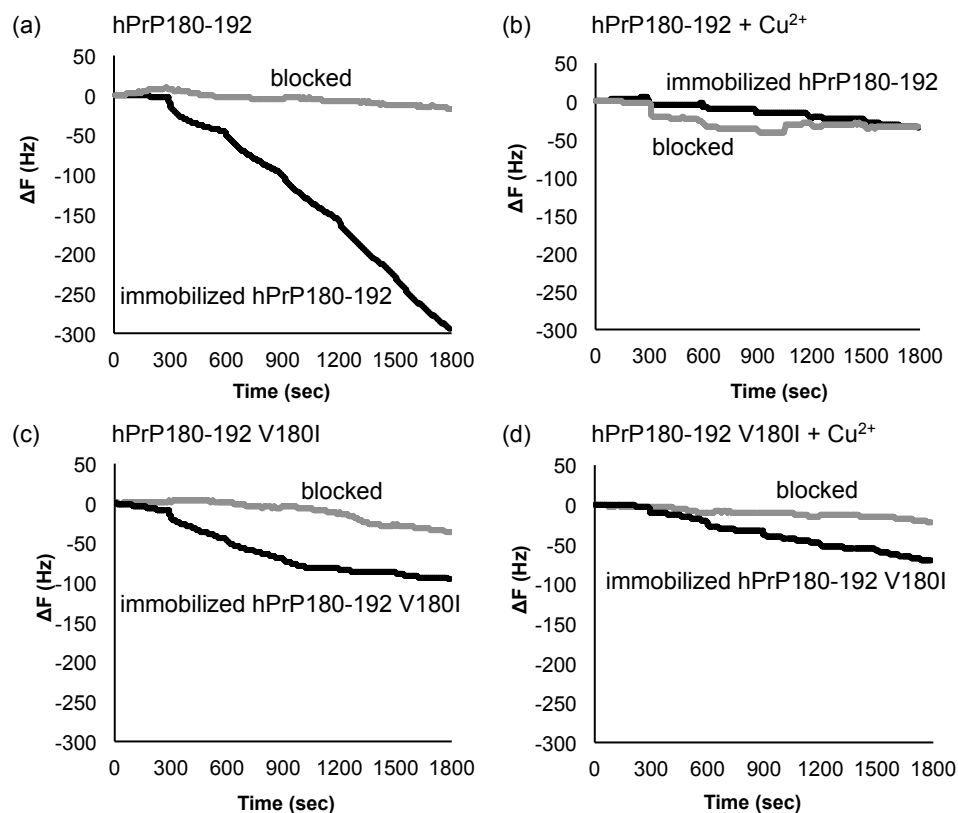


Fig. 17 Intermolecular interaction of hPrP180-192 and hPrP180-192 V180I. Change in oscillation frequency of (a) hPrP180-192 and (b) hPrP180-192 V180I in the absence of Cu^{2+} and (c) hPrP180-192 and (d) hPrP180-192 V180I in the presence of Cu^{2+} .

次に両ペプチド間での相互作用を同様の方法にて検討した。hPrP180-192 を固定化し hPrP180-192 V180I を添加、及び hPrP180-192 V180I を固定化し hPrP180-192 を添加した場合を比較すると、hPrP180-192 の固定化で強い相互作用が認められた (Fig. 18-a and -c)。また、これらの相互作用も両ペプチド同士と同様に Cu^{2+} で阻害されることが明らかとなった (Fig. 18-b and -d)。

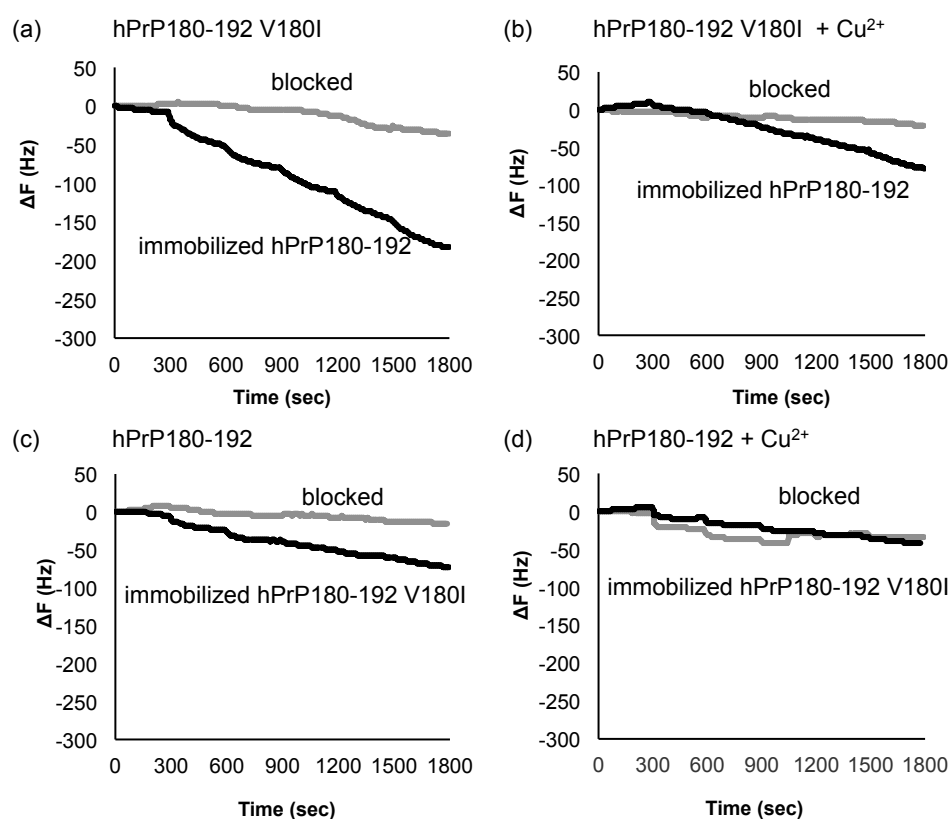


Fig. 18 Intermolecular interaction between hPrP180-192 and hPrP180-192 V180I. Change in oscillation frequency after injection of each peptides. hPrP180-192 V180I injected in to the hPrP180-192-immobilized QCM cuvette (a) in the absence of Cu^{2+} and (b) in the presence of Cu^{2+} . hPrP180-192 injected in to the hPrP180-192 V180I-immobilized QCM cuvette (c) in the absence of Cu^{2+} and (d) in the presence of Cu^{2+} .

2.5.2 生理的条件下における相互作用の検討

前項までより、hPrP180-192 及び hPrP180-192 V180I は Tris-HCl 緩衝液中で相互作用を示すことが明らかとなった。本項では Tris-HCl 緩衝液より生理的条件下に近い Phosphate buffered salts (PBS) 中 (pH 7.4) において相互作用の検討を行った。hPrP180-192 は、Tris-HCl 緩衝液中では相互作用がみられたのに対し、PBS 中ではわずかな相互作用しかみとめられなかった (Fig. 19-a)。対照的に、hPrP180-192 V180I は、Tris-HCl 緩衝液中では相互作用が弱かったのに対し、PBS 中では強い相互作用がみとめられた (Fig. 19-b)。PBS に Cu^{2+} を添加し相互作用の検討を行ったが、正確な振動数の低下が測定できなかった。この結果はペプチドを溶かしている溶液によりそれぞれの二次構造に与える影響が大きく異なっていることを示している。これらの結果は、生体内に存在する種々の微量元素が PrP^{C} から PrP^{Sc} への変化を複雑にしている要因の一つだと考えられる。

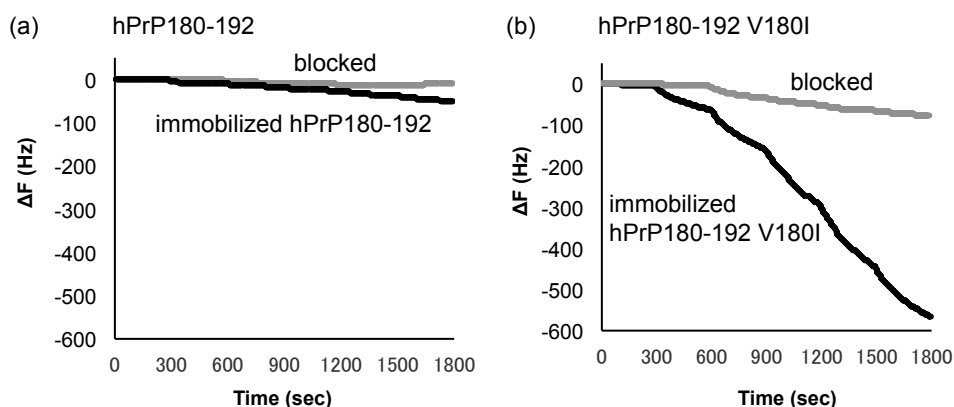


Fig. 19 Intermolecular interaction of hPrP180-192 and hPrP180-192 V180I in the PBS buffer. (a) hPrP180-192 and (b) hPrP180-192 V180I.

2.6 Thioflavin T を用いた凝集性の検討

CD スペクトルおよび HPLC 分析、相互作用の検討結果から、hPrP180-192 と hPrP180-192 V180I はそれ自体で凝集体を形成することが示唆された。本項では、その凝集性を評価するために Thioflavin T (ThT) を用いて Tris-HCl 緩衝液中、pH 7.5、37 °C で経時的に検討を行った [64]。ThT はアミロイド線維と結合すると 490 nm 付近に強い蛍光を発することが知られており [65]、本項では 10 日間蛍光強度を測定した (Fig. 20)。

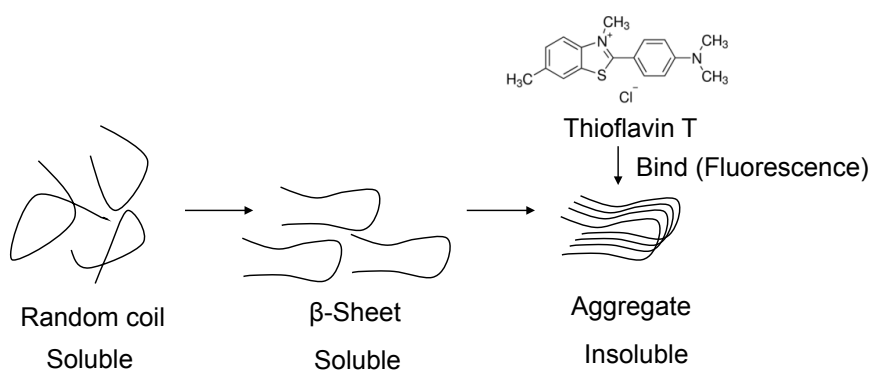


Fig. 20 A study of Aggregability using Thioflavin T.

Cu^{2+} 非存在下では、hPrP180-192 は経時的に蛍光強度の上昇がみられ、凝集性がみとめられた。予め Cu^{2+} を添加した溶液では、蛍光強度の上昇がみられず、凝集性はみとめられなかった (Fig. 21-a)。hPrP180-192 V180I は、2 日後までに大幅に蛍光強度の上昇がみられた。その後は低下し横ばいとなり、hPrP180-192 と比較して最大蛍光強度が 10 倍程度と高い凝集性がみとめられた。予め Cu^{2+} を添加した溶液では、hPrP180-192 と同様、蛍光強度の上昇はみられず凝集性はみとめられなかった (Fig. 21-b)。これらのデータから、hPrP180-192、PrP180-192 V180I はそれ自身と凝集体を形成する傾向があること、および Cu^{2+} が hPrP180-192、hPrP180-192 V180I の凝集を阻害することが示された。

経時的な二次構造変化の検討の結果と、凝集性の関連を検討するため、hPrP180-192 と hPrP180-192 V180I が確実に β -sheet 構造へ確実に変化していると考えられる 3 日目に Cu^{2+} の添加を行った。hPrP180-192 は、 Cu^{2+} を添加せずに 2 検体経時的に蛍光強度を測定すると、2 検体とも 2 日目まで蛍光強度の上昇がみられた。3 日目に 2 検体中 1 検体のみ Cu^{2+} を添加すると、添加直後より蛍光強度の低下がみられた。その後も、 Cu^{2+} 添加溶液では、蛍光強度の上昇が抑制されていた。 Cu^{2+} 非添加溶液では蛍光強度が上昇した (Fig. 21-c)。hPrP180-192 V180I では、PrP180-192 と同様に 2 日目まで 2 検体とも蛍光強度の上昇がみられた。3 日目に 1 検体のみ Cu^{2+} を添加しても蛍光強度の変化はみられず、 Cu^{2+} 添加 1 日後より低下がみられた。 Cu^{2+} 非添加溶液では蛍光強度の上昇がみられた (Fig. 21-d)。これらのデータは、前項の CD スペクトルおよび HPLC 分析によって得られたデータを強く支持している。また、

hPrP180-192 V180I は hPrP180-192 と比較し高い凝集性を示すことがわかった。

さらに、hPrP180-192 V180I は Cu^{2+} 添加により凝集性は低下するが、低下後も

hPrP180-192 と比較して高い凝集性を示すことがわかった。

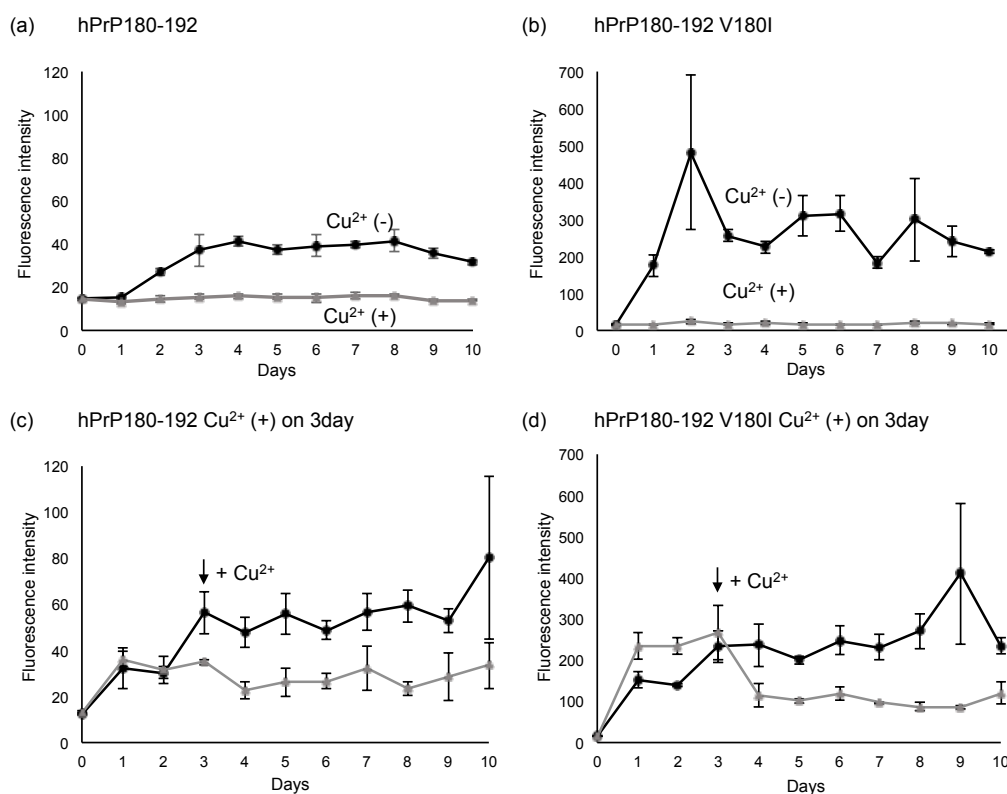


Fig. 21 Aggregability of hPrP180-192 and hPrP180-192 V180I. Fluorescence intensity of (a) hPrP180-192 and (b) hPrP180-192 V180I in the absence or presence of Cu^{2+} and (c) hPrP180-192 and (d) hPrP180-192 V180I in the absence or presence of Cu^{2+} after 3 days incubation.

PBS 中では、hPrP180-192 は Tris-HCl 緩衝液中での検討結果と同様、 Cu^{2+} 非存在下で蛍光強度が上昇し、凝集性がみとめられた (Fig. 22-a)。hPrP180-192 V180I も同様の結果となったが、興味深いことに最も高い蛍光強度の上昇がみとめられ、異常な凝集性がみとめられた (Fig. 22-b)。これは、分子間相互作用測定の結果 (Fig. 19) と相関することが示された。hPrP180-192 V180I は、生理的条件下で hPrP180-192 とは異なる凝集性を示すことが示唆された。

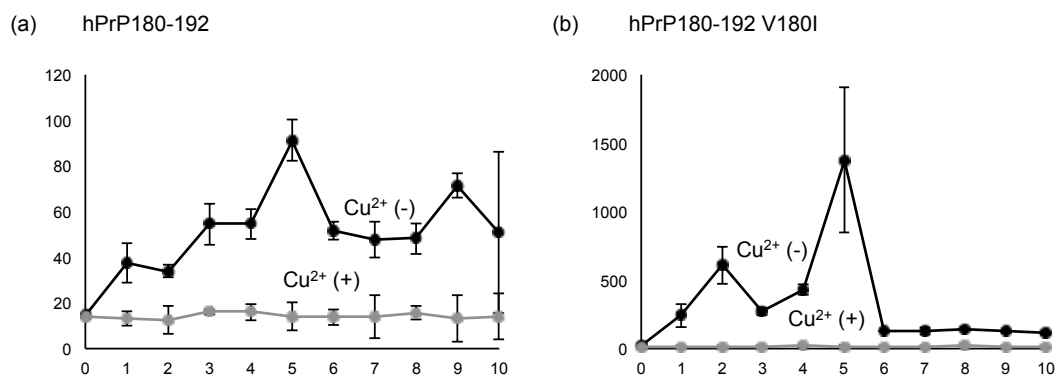


Fig. 22 Aggregability of hPrP180-192 in the PBS buffer. Fluorescence intensity of (a) hPrP180-192 and (b) hPrP180-192 V180I in the absence or presence of Cu^{2+} .

3 考察

本研究は PrP の凝集メカニズムを解明するための基礎データを取得する目的で計画した。その前提となる仮説は、金属関与説である。現在の分子生物学的手法を用いれば、全長 PrP^C の組換え体の調製は容易であるが、その化学的・物理的性質を考えると精製も含めて実験上の取り扱いに困難を伴う可能性が予測される。加えて、PrP^C から PrP^{Sc} への構造変化と感染のメカニズムが解明されていない現状では、設備も含め実験上の注意すべきことが多い。一方、フラグメントペプチドを用いると、PrP^C 全体の立体構造を反映しない恐れはあるが組換え体に比べ大量調製と取り扱いは極めて容易であり、かつ先の実験上のリスクを軽減することができる。さらに最近の機器分析の進歩により金属や pH による構造変化の影響、さらに相互作用や凝集性やそれらに関与する部位 (アミノ酸配列) などを関連付けて検討することも容易である。プリオン病に関する研究の現状を考えると、予防・診断、および治療薬の開発のためには、フラグメントペプチドの化学・物物理学的性質に関する基礎データを総合的に取得することが重要である。

アミロイド繊維は分子間相互作用によって強固に安定化されており、分子間相互作用がもたらす構造の多様性によって、プリオン病の複雑な病態が説明できると期待されている [66]。hPrP は生体内で Cu²⁺ と結合することが知られており [19,20,67]、PrP^C から PrP^{Sc} への構造変化は、以前から Cu²⁺ の関与が示唆されていた [68,69,70]。しかし、OP-repeat 領域、中間領域のペプチドにおいて、hPrP と Cu²⁺ の結合は β -sheet 構造を誘導したという報告がある一方 [68,69]、

β -sheet 構造形成を抑制することによって神経細胞に対する毒性を軽減したという報告もある [70]。このように、 Cu^{2+} は PrP^{C} から PrP^{Sc} への構造変化を促進するのか抑制するのか、これまでの研究結果は一貫しておらず、 PrP と Cu^{2+} の関係は単純ではないと考えられる。 PrP^{C} と PrP^{Sc} の性質の違いを考慮すると、凝集の核となる条件は β -sheet 構造をとり、凝集性を示すことが必要である [1,2]。コドン 111 に His 残基を 1 つ含む hPrP111-126 も、二次構造が経時的に β -sheet 構造へ変化するが、His を介して 1 等量で Cu^{2+} に結合した場合 β -sheet 構造への変化を抑制できることが報告されており [71]、 Cu^{2+} の存在は PrP の凝集抑制に関与していると考えられる。さらに、プリオン病患者では、膜内 Cu^{2+} 含量が低下し Mn^{2+} が増加していること [20] も報告されている。

これまでの研究では OP-repeat 領域や中間領域に着目した報告が多い。最近、C-端領域が凝集の核となる可能性が示唆されており、本研究では金属関与説に基づき、C-端の H2 領域に焦点を絞って検討することとした。様々な C-端由来フラグメントペプチドの物理・化学的性質を比較すると、hPrP180-192 が凝集の核となる可能性が考えられた (Table 3)。そこで、C-端領域の重要性と Cu^{2+} の関与の解明を目指し、 Cu^{2+} 結合性の高い hPrP180-192 と日本人に多く、かつ研究報告の少ない病的遺伝子変異体である hPrP180-192 V180I の二次構造と相互作用および凝集性と、これらに対する Cu^{2+} の影響を比較検討することとした。本研究の結果を Fig. 23 and Table 3 にまとめた。 Cu^{2+} 存在下の二次構造は両ペプチド共 random coil 構造となり差は認められなかった。しかしながら、 Cu^{2+} の影響は以下に示すような興味深い差が認められた。hPrP180-192 において Cu^{2+}

非存在下での β -sheet への構造変化を伴った凝集は Cu^{2+} の添加により random coil 構造への復帰及び可溶性ペプチドの増加が認められた (Fig. 16-a)。一方、PrP180-192 V180I では性質が異なり、一旦 β -sheet に構造変化をすると Cu^{2+} 添加により random coil 構造への復帰はなく可溶性ペプチドの増加も僅かであった (Fig. 16-b)。これらの結果は、V180I の変異により凝集体に対する Cu^{2+} の影響が大きく異なっていることを示している。

この結果に基づき、C-端領域の細胞毒性について考察を試みる (Fig. 24)。細胞外の Cu^{2+} の恒常性が OP-repeat 領域により保たれている場合、変異の無い PrP^C の中間領域は random coil 構造を保ち、さらにマトリックスメタロプロテアーゼなど様々な酵素により分解される。一方、酵素により切断部位が少ない C-端側のフラグメントは細胞膜上に残り、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。この時すでに β -sheet 構造への変化は始まっていると考えられる。細胞内の Cu^{2+} 濃度が高い場合は、 Cu^{2+} と結合することで random coil 構造に回復し、凝集体を形成しない。一方、 Cu^{2+} 濃度が低い場合は時間とともに β -sheet 構造が増え、凝集体を形成することで細胞毒性を示す (Fig. 24-a)。次に、V180I の変異体の場合は、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた後は、 Cu^{2+} の濃度に関わらず凝集体を形成し、細胞毒性を示す (Fig. 24-b)。このように、C-端領域が凝集の核であり、かつ C-端領域のみで細胞毒性を発揮する可能性が示唆された。今回の検討によりフラグメントペプチドを用いることでより詳細な検討が行えることが明らかとなった。

PrP^C の中間領域には数多くの His 残基が存在し [19]、 Cu^{2+} との結合により

構造変化の多様性が生じる。さらにこの領域には多数の変異が報告されており、変異アミノ酸の位置と種類による PrP^{Sc} の構造上の多様性も予想される。細胞外 Cu²⁺ による酵素耐性獲得への影響も考えると、非常に複雑であり解析が煩雑となる。よって PrP^C から PrP^{Sc} への構造変化を解明するためには、本研究で用いた方法により様々なフラグメントペプチドの性質を詳細に比較検討することが有用であると考えられる。

Table 3 Characterization of hPrP-CF.

Name	Hisの数	相互作用 (AFFINIX)	結合性 (Pull down assay)		二次構造		二次構造変化 (incubate 7 days)
			Cu ²⁺ (-)	Cu ²⁺ (+)	Cu ²⁺ (-)	Cu ²⁺ (+)	
169-192	2	-	-	-	β-sheet	変化なし	N.D
169-183	1	+	+	-	β-sheet	β-sheetの減少	N.D
175-183	1	±	-	-	Random coil	わずかにα-helixへ変化	変化なし
180-192	1	++	++	-	Random coil	変化なし	β-sheetへ変化

Pull down assay ++:R-Tris×4≤, +:R-Tris×2≤, -:R-Tris×2>

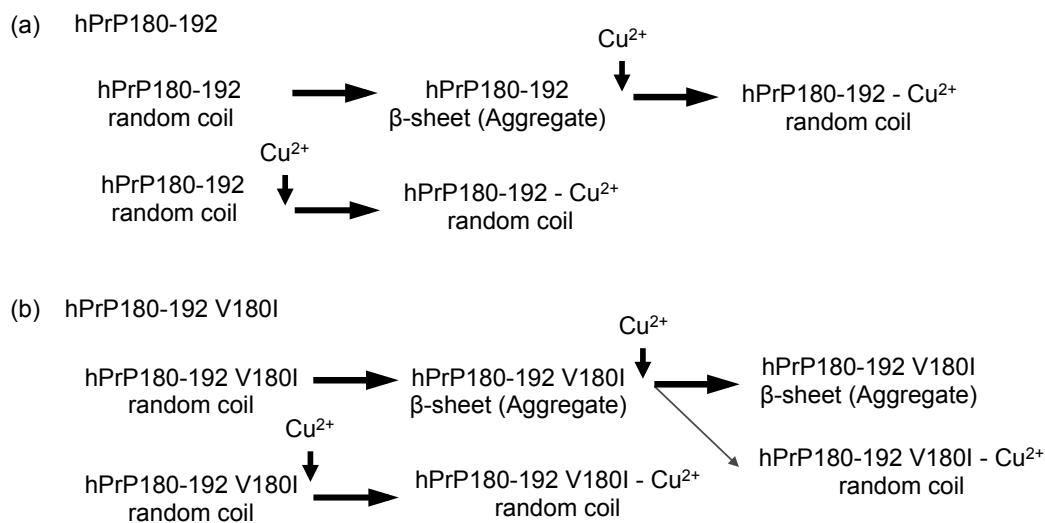


Fig. 23 Structure changes and aggregate formation of hPrP180-192 and hPrP180-192 V180I. (a) hPrP180-192 V180I and (b) hPrP180-192.

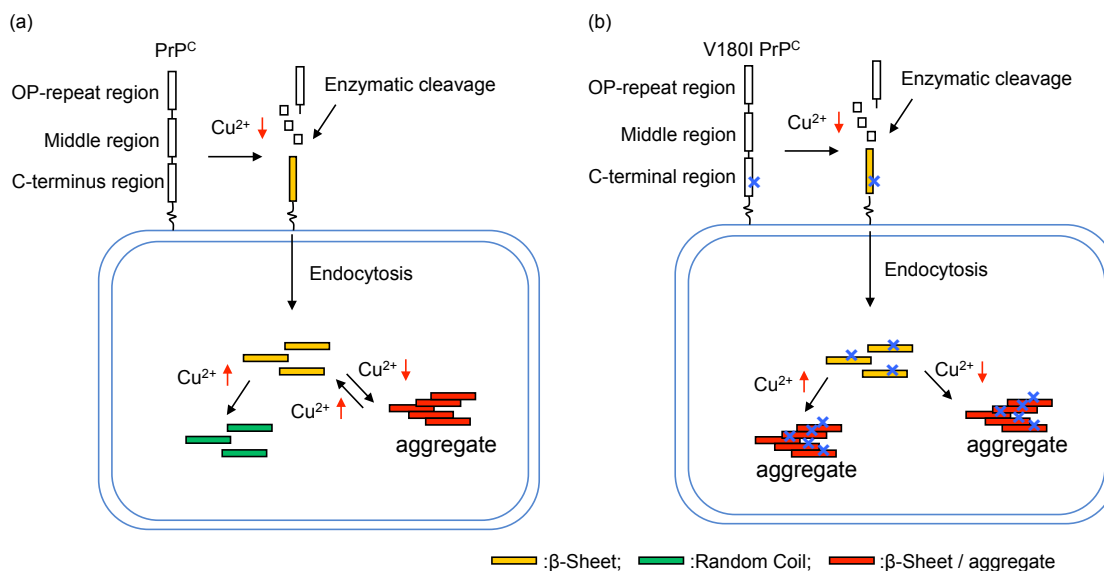


Fig. 24 Estimated role of C-terminus region for aggregation. (a) PrP^C (b) V180I mutated PrP^C

4 結論

本研究の結果、以下のことが明らかとなった (Fig. 23)。

- 1) hPrP180-192 及び hPrP180-192 V180I は共に生理的 pH において random coil 構造を形成するが、経時的に β -sheet 構造に変化する。
- 2) β -sheet 構造に変化した hPrP180-192 に Cu^{2+} を添加すると経時的に random coil 構造に回復する。
- 3) hPrP180-192 は凝集性が高いが、 Cu^{2+} の添加により凝集を抑制することが可能である。
- 4) hPrP180-192 V180I は β -sheet 構造を維持し、random coil 構造への回復はわずかである。
- 5) hPrP180-192 V180I は hPrP180-192 と比較して高い凝集性を持ち、一度凝集すると Cu^{2+} の添加によっても再溶解しない。
- 6) β -sheet 構造と凝集体の量は良い相関を示す。
- 7) PrP の凝集メカニズムの解析に hPrP-CF が有効であることが明らかになった。
- 8) これらの結果は、PrP の凝集メカニズムにおいて、核依存重合説を支持するものである。

5 実験の部

5.1 試薬

5.1.1 ペプチド合成関連

Piperidine

SIGMA

O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetra-methyluronium hexafluoro-phosphate

(HATU)

N,N Dimethylformamide (DMF)

N-Diisopropylethylamine/*N*-Methylpyrrolidone

N-Methylpyrrolidone

Dichloromethane

Preloaded Resin F-moc-L-Thr (tBu)、Preloaded Resin F-moc-L-Val

以上、Applide Biosystems

F-moc-L-Asn (Trt)、F-moc-L-Asp (OtBu)、F-moc-L-Cys (Trt)

F-moc-L-Gln (Trt)、F-moc-L-His (Trt)、F-moc-L-Ile

F-moc-L-Lys (Boc)、F-moc-L-Phe、F-moc-L-Ser (tBu)

F-moc-L-Thr (tBu)、F-moc-L-Tyr (tBu)、F-moc-L-Val

以上、ペプチド研究所

Acetonitrile (高速液体クロマトグラフ用)

Acetonitrile (試薬特級)

Diethyl ether

Trifluoroacetic Acid (Peptide Synthesis Grade)

Thioanisole

以上、和光純薬工業

Acetic acid

Crystalline

Phenol

以上、ナカライテスク

1,2-Ethandithiol

関東化学

5.1.2 HPLC

Acetonitrile (高速液体クロマトグラフ用)

和光純薬工業

HCl

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)

以上、ナカライテスク

5.1.3 Pull down assay

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)

HCl

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

以上、ナカライテスク

TOYOPEARL AF-Formyl-650 M resin

TOSOH BIOSCIENCE

Sodium dihydrogen phosphate. Anhydrous (試薬特級)

キシダ化学株式会社

Amino acid standard (Type H)

Methanol (試薬特級)

Acetonitrile (高速液体クロマトグラフ用)

CH₃COONa

以上、和光純薬工業

HCl

Acetic acid (試薬特級)

NaHCO₃

Na₂CO₃

以上、ナカライテスク

Dabsyl Chloride

東京化成工業株式会社

5.1.4 分子間相互作用測定

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)

HCl

CuCl₂ · 2H₂O

以上、ナカライテスク

PBS (Phosphate Buffered Salts Tablet)

TaKaRa

Block Ace Powder

KAC (Japan)

5.1.5 CD スペクトル

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)

HCl

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

以上、ナカライテスク

5.1.6 Thioflavin T

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)

HCl

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

以上ナカライテスク

PBS (Phosphate Buffered Salts Tablet)

TaKaRa

Thioflavin T

Wako

5.2 装置

5.2.1 ペプチド合成関連

433 ペプチドシンセサイザー

Applide Biosystems

5.2.2 HPLC

HPLC (分取)

Pump: 880-PU

Mixer: HG-980-31

以上、JASCO

Integrator: C-R6A

Detector: SPD-6A

以上、SHIMADZU

Column: CAPCELLPAK C₁₈ (TYPE AQ 5 μm、10 mm I.D. x 250 mm) SHISEIDO

HPLC (分析)

Column: CAPCELLPAK C₁₈ (Type MGII 5 μm、4.6 mm i.d. x 150 mm) SHISEIDO

Pump: LC-20AD

SHIMADZU

Oven: COLUMN HEATER U-620 TYPE30V

Sugai

Detector: MD-4017

クロマトグラム用データ処理装置 : ChromNAV

以上、JASCO

HPLC (アミノ酸分析)

Computer : FUJITSU FMV ESPRIMO

FIJITSU

Column: COSMOSIL Packed Column (4.6 mm I.D. x 250 mm)

(Type 5C₁₈-MG- II)

SHISEIDO

Pump: PU-2089

Detector: UV-2075

Oven : CO-965

以上、JASCO

5.2.3 質量分析測定装置

JEOL JMS-700T

JEOL

QSTAR Elite Hybrid LC/MS/MS System

Applide Biosystems

5.2.4 分子間相互作用測定

AFFINIX QN μ

ULVAC

4.2.6 CD スペクトル測定

J-805 円二色性分散計

JASCO

5.2.7 蛍光測定

蛍光プレートリーダー

FMP-825

FP-8300

Driver: Spectra Manager Version 2

以上、JASCO

5.3 方法

5.3.1 hPrP-CF の合成および精製

5.3.1.1 フラグメントペプチドの合成 (固相法)

フラグメントペプチドは、アプライドバイオシステム社 (Applied Biosystems) の 433A ペプチドシンセサイザーを用いて F-moc 固相法により合成した。使用ソフトは SynthAssist Software v3.1 を用いた。

5.3.1.2 脱保護 (TFA クリーベッジ法)

合成ペプチドレジンを入れたナス型フラスコに脱保護液を加え、マグネットスターラーを用いて室温で 1.5 あるいは 3 時間攪拌した。反応後、冷ジエチルエーテルを適量加えて攪拌し、生じた沈殿を PTFE タイプメンブレンフィルター (Pore Size 3.0 μm , ADVANTEC 社) を用いて吸引ろ過を行った。PTFE タイプメンブレンフィルター上の沈殿を冷ジエチルエーテルで洗浄後、酢酸溶液を加え、沈殿が溶けたことを確認し、吸引ろ過でナス型フラスコに酢酸溶液を回収した。これを凍結乾燥し、粗精製試料とした。

<脱保護液と試料>

脱保護液 : TFA 9.5 mL、MilliQ 水 0.5 mL

試料 : hPrP169-192、hPrP169-183、hPrP175-183、hPrP180-192、hPrP180-192 V180I

5.3.1.3 フラグメントペプチドの精製

粗精製試料を 50 % アセトニトリル (0.1 % TFA) に溶解し、流量 3.0 mL/min.、カラム温度は室温とし、SHISEIDO CAPCELLPAK C₁₈ (TYPE AQ 5 μm、10 mm I.D. x 250 mm) を用いた分取用 HPLC システムによる MilliQ 水 (0.1 % TFA) から 50 % アセトニトリル (0.1 % TFA) への 30 分間のリニアグラジエントで分取を行った。その後、流量 1.0 mL/min.、カラム温度は 40 °C とし、SHISEIDO CAPCELLPAK C18 (Type MGII 5 μm、4.6 mm i.d. x 150 mm) を用いたフォトダイオードアレイ検出器付き HPLC システムにより、MilliQ 水 (0.1 % TFA) から 50 % アセトニトリル (0.1 % TFA) への 30 分間のリニアグラジエントで純度確認を行った。分子量の確認には質量分析を行った。

5.3.2 Pull down assay

5.3.2.1 hPrP180-192 のレジンの固定化

固定化レジンの準備として、レジン懸濁液 (TOYOPEARL AF-Formyl-650 M) 3 mL をガラスフィルター上に移し、0.1 M 炭酸 buffer (pH 8.18) 10 mL を加え吸引ろ過した。吸引ろ過は、3 回繰り返した。

hPrP180-192 に 0.1 mM NaHCO₃ を加えて 0.2 mM に調製し、吸引洗浄後のレジンを加えて激しく懸濁し、2000 rpm で 5 分間遠心分離した。NaCNBH₃ 90 mg を加え、よく攪拌し、25 °C で一晩ローテーターを使用して反応させた。その後、10 分間遠心分離し、上清を全て除去した。PrP180-192 固定化後のレジンを MilliQ 水で流し吸引瓶で吸引ろ過し、1 M NaCl と水で洗浄した。固定化量はレジンを酸加水分解した後 HPLC で分析し、Val のピーク高さから算出した (Fig. 5)。

<試薬調製>

○ 0.1 M 炭酸 buffer (pH 8.18)

NaHCO₃ 4.2 g を MilliQ 水 100 mL で溶解し 0.5 M NaHCO₃ とした。MilliQ 水 40 mL、0.5 M NaHCO₃ 10 mL を混合し 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.42) とした。

Na₂CO₃ 5.3 g を MilliQ 水 100 mL で溶解し 0.5 M Na₂CO₃ とした。MilliQ 水 40 mL、0.5 M Na₂CO₃ 10 mL を混合し 0.1 M Na₂CO₃ (pH 11.21) とした。

0.1 M NaHCO₃ (pH 8.42) を 0.1 M Na₂CO₃ (pH 11.21) を用いて pH 8.18 に調整した。

○ 1 M NaCl

NaCl を 58.44 g を量り取り MilliQ 水を加えて 1 L とした。

○ 0.1 M Tris-HCl Buffer (pH 7.5)

Tris 12.1 g を量り取り MilliQ 水で溶解し HCl で pH 7.5 に調整し、MilliQ 水を加えて 1 L とした。

5.3.2.2 Pull down assay による hPrP180-192 に対する結合性の検討

hPrP180-192 固定化レジン (R-hPrP180-192) の調製方法は、15 mL Centrifuge tube (NEST) 中で hPrP180-192 のアミノ基 (-NH₂) を TOYOPEARL AF-Formyl-650 M resin のカルボニル基 (-CO) にヒドリド還元剤である NaCNBH₃ 存在下で、還元的アミノ化反応により固定化した。

R-hPrP180-192 20 μL (50 % suspension 3.2 nmol) に対し、100 μM hPrP-CF 128 μL (12.8 nmol)、100 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5) 40 μL、MilliQ 水 212 μL を加え全量を 400 μL とした。Cu²⁺ を添加する場合は、R-hPrP180-192 の His 1 残基に対して 2 当量となるよう、100 μM CuCl₂ · H₂O 64 μL を添加し、MilliQ 水を加えて全量 400 μL とした。この溶液を、室温で 24 時間ローテーターを用いて反応させた。その後、上清を捨て、100 mM Tris-HCL Buffer (pH 7.5) で 3 回洗浄し、その後 MiliQ 水で 3 回洗浄した。上清を捨て、100 μL の MilliQ 水で R

-hPrP180-192 を加水分解管に移し取り、さらに上清を捨て、6 規定の HCL を 100 μ L 加えた。110 $^{\circ}$ C で 24 時間反応させ、ペプチドからアミノ酸へ加水分解を行った。加水分解管から上清を取り、その後 150 μ L の MilliQ 水を 2 回添加し上清を移し取った。そこに内標準物質である 12.5 μ M n-Leu を 200 μ L 入れ、凍結乾燥を行った。その後、炭酸バッファーを 40 μ L 加え、溶液の pH が 8 - 9 であることを確認し、Dabsyl Chloride 2 mM を 60 μ L 加えた。70 $^{\circ}$ C で 10 分加熱し、常温に戻した後 HPLC でアミノ酸量を測定した。HPLC のピークの高さを測定し、標準試料と比較してアミノ酸量を推定し、添加した hPrP-CF の量の結合量を算出した。非特異的な結合を排除するためにコントロールとして、活性基を Tris により不活化した R-Tris を用いて同様の検討を行った。

分析は HPLC を用いて行った。試料注入量 4 μ L、流速 1.0 mL/min、カラム温度 40 $^{\circ}$ C とし CAPCELLPAK UG 120 (4.6 mm i.d. x 250 mm) を用い、UV 436 nm で検出した。溶媒は、10 mM NaH₂PO₄ buffer (4 % DMF) (pH 6.6) を A 液、CH₃CN を B 液として用いた。グラジエントモードは、A 液 73 %、B 液 27 % を初期条件とし、15 分で A 液 73 %、B 液 27 %、24 分で A 液 40 %、B 液 60 % を 40 分まで維持し、45 分で初期条件に戻し 60 分まで維持する設定とした。

<試料調製>

○ 100 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5)

1 M Tris-HCl Buffer (pH 7.5) 500 μ L に MilliQ 水 4500 μ L を加えて調製した。

○ 100 μM Cu^{2+} 溶液

$\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.34 mg を量り取り、MilliQ 水で溶解し全量 1 mL とし、2 mM Cu^{2+} 溶液を調製した。

2 mM Cu^{2+} 溶液 50 μL に MilliQ 水 950 μL を加え、100 μM Cu^{2+} 溶液を調製した。

○ 12.5 μM n-Leu

n-Leu 1.33 mg に MilliQ 水 1014 μL を加えて 10 mM n-Leu を調製した。その後、10 倍希釈し 1 mM n-Leu を調製、さらに 8 倍希釈し 125 μM n-Leu を調製、最後に 10 倍希釈し 12.5 μM n-Leu を調製した。

○ 2 mM Dabsyl Chloride

Dabsyl Chloride 6.5 mg を 10 mL の CH_3CN で溶解し、2 mM Dabsyl Chloride を調製した。その後、1 mL ずつエッペンチューブに分注し、凍結乾燥を行った。使用時に CH_3CN 1 mL で溶解した。

○ 25 mM 炭酸 buffer

NaHCO_3 4.2 g を MilliQ 水 100 mL で溶解し 0.5 M NaHCO_3 とした。MilliQ 水 180 mL、0.5 M NaHCO_3 10 mL を混合し 25 mM NaHCO_3 (pH 8.42) とした。

Na_2CO_3 5.3 g を MilliQ 水 100 mL で溶解し 0.5 M Na_2CO_3 とした。MilliQ 水 180 mL、0.5 M Na_2CO_3 10 mL を混合し 25 mM Na_2CO_3 (pH 11.21) とした。

25 mM NaHCO_3 (pH 8.42) を 25 mM Na_2CO_3 (pH 11.21) を用いて pH 9.0 に調製した。

5.3.3 分子間相互作用測定

分子間相互作用測定装置は AFFINIX QN μ を用いた。緩衝液は 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) を用いた。hPrP180-192 固定化における他の C-端由来フラグメントペプチドとの相互作用の検討では、1 mM PrP180-192 を 20 μ L 固定化し、5 % Block Ace 2 μ L でブロッキングを行った。緩衝液でセルを洗浄後、緩衝液 500 μ L をセルに充填した。1 mM hPrP-CF 4 μ L を 5 回添加し、振動数の変化を検討した。測定条件は、温度 25 $^{\circ}$ C、回転速度 1000 rpm、測定間隔 1 sec. とした。Cu²⁺ 添加溶液は、緩衝液 500 μ L 中 PrP180-192 固定化 20 nmol と添加 20 nmol の合計 40 nmol の 2 当量となるよう、CuCl₂·H₂O の終濃度を 160 μ M とした。

hPrP180-192、PrP180-192 V180I の分子間相互作用の検討においても hPrP180-192 固定化における他の C-端由来フラグメントペプチドとの相互作用の検討と同様の手法で行った。ただし、PrP180-192 V180I 固定化の場合、1 mM hPrP180-192 V180I 20 μ L を固定化した。緩衝液は、Tris と PBS を用いた。PBS の場合は、50 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5) 500 μ L の代わりに、PBS 500 μ L を用いた。なお、PBS は Cu²⁺ 存在下では測定が困難であった。

<試料調製>

○ 50 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5)

Tris 121.4 g を MilliQ 水に溶解し、HCl で pH 7.5 に調製し、全量 1000 mL

として 1 M Tris-HCl Buffer (pH 7.5) を調製した。

1 M Tris-HCl Buffer 500 μ L に MilliQ 水 9500 μ L を加えて 50 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5) を調製した。

○ 2 mM Cu^{2+} 溶液

$\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.34 mg を量り取り、MilliQ 水で溶解し全量 1 mL とした。

○ 160 μ M Cu^{2+} , 50 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5)

1 M Tris-HCl Buffer 500 μ L に 2 mM Cu^{2+} 溶液 80 μ L、MilliQ 水 9420 μ L 加えて調製した。

○ 10 x PBS

PBS (Phosphate Buffered Salts) Tablets 1 粒を MilliQ 水 10 mL に溶解した。

○ 5 % Block Ace

Block Ace Powder 1mg を MilliQ 水 1 mL に溶解した。

5.3.4 CD スペクトル による二次構造解析

5.3.4.1 hPrP180-192 の二次構造解析

hPrP180-192 の至適濃度の検討では、1 mM hPrP180-192 をそれぞれ 10 μ L、50 μ L、100 μ L (終濃度 10 μ M、50 μ M、100 μ M)、100 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5) 100 μ L、MilliQ 水を加え全量 1000 μ L とした。調製直後の溶液と、37 $^{\circ}$ C で 10 日間インキュベートしたものをを用い、試料とした。

hPrP180-192 に対する Cu^{2+} 濃度の検討では、1 mM hPrP180-192 50 μ L、100 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5) 100 μ L、 Cu^{2+} の終濃度がそれぞれ 0.5 μ M、5 μ M、50 μ M、100 μ M となるよう $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を加え、MilliQ 水で全量 1000 μ L とした。調製直後の溶液と、37 $^{\circ}$ C で 7 日間インキュベートしたものをを用い、試料とした。

hPrP180-192 の二次構造に対する pH、 Cu^{2+} 及び時間の影響では、1 mM hPrP180-192 50 μ L、100 mM Tris-HCl Buffer (pH 5、6、7、8、9) 100 μ L、MilliQ 水 850 μ L で全量 1000 μ L とした。調製直後の溶液と、37 $^{\circ}$ C で 7 日間インキュベートしたものをを用い、試料とした。その後、2 mM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 μ L を加え、さらに 37 $^{\circ}$ C で 7 日間インキュベートし、試料とした。 Cu^{2+} 存在下の溶液では、1 mM hPrP180-192 50 μ L、100 mM Tris-HCl Buffer (pH 5、6、7、8、9) 100 μ L、2 mM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 μ L に MilliQ 水 800 μ L を加え、全量 1000 μ L とした。調製直後の溶液と、37 $^{\circ}$ C で 7 日間インキュベートしたものをを用い、試料とし

た。

<試料調製>

○ 100 mM Tris-HCl Buffer

Tris 605.7 mg を MilliQ 水に溶解し、HCl で pH 5、6、7、8、9 に調製し、全量 50 mL とした。

○ 2 mM Cu²⁺ 溶液

CuCl₂ · H₂O 0.34 mg を量り取り、MilliQ 水で溶解し全量 1 mL とした。

5.3.4.2 病的遺伝子変異ペプチド hPrP180-192 V180I との二次構造比較

二次構造と Cu²⁺ の影響では、1 mM hPrP-CF 50 μL、100 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5) 100 μL、MilliQ 水 850 μL で全量 1000 μL とした。Cu²⁺ 存在下の場合には、1 mM hPrP-CF 50 μL、100 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5) 100 μL、2 mM CuCl₂ · 2H₂O 50 μL、MilliQ 水 800 μL で全量 1000 μL とした。調製直後の溶液と、37 °C で 1 日間インキュベートしたものを用い、試料とした。それぞれ CD スペクトル測定前に、HPLC で溶解型 hPrP-CF 量を測定した。

経時的な二次構造変化と Cu²⁺ の影響では、1 mM hPrP-CF 75 μL、100 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5) 150 μL、MilliQ 水 1275 μL で全量 1500 μL とした。調製直後の溶液と、37 °C でインキュベートしたものを経時的に測定した。インキュベート 68 時間後に hPrP-CF に対して 2 当量となるよう 2 mM CuCl₂ ·

2H₂O を加え、さらに 37 °C でインキュベートしたものを経時的に測定した。

さらに、CD スペクトル測定前に HPLC で溶解型 hPrP-CF 量を測定した。

<試料調製>

○ 100 mM Tris-HCl Buffer

Tris 605.7 mg を MilliQ 水に溶解し、HCl で pH 7.5 に調製し、全量 50 mL とした。

○ 2 mM Cu²⁺ 溶液

CuCl₂ · H₂O 0.34 mg を量り取り、MilliQ 水で溶解し全量 1 mL とした。

5.3.5 Thioflavin T (ThT) を用いた凝集性の検討

Cu^{2+} 非存在下の溶液では、1 mM hPrP-F 600 μL (終濃度 50 μM)、1 mM ThT 溶液 1200 μL (終濃度 100 μM)、100 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5) 1200 μL 、MilliQ 水 9000 μL で全量 12000 μL とし、37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートしたものを試料とした。3 日目で Cu^{2+} を添加した溶液では、3 日目に Cu^{2+} 非存在下の溶液 7000 μL に対し、 Cu^{2+} が 2 当量となるよう 100 mM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を 7 μL 添加した。

Cu^{2+} 存在下の溶液では、1 mM hPrP-CF 600 μL (終濃度 50 μM)、1 mM ThT 溶液 1200 μL (終濃度 100 μM)、100 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5) 1200 μL 、2 mM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 600 μL 、MilliQ 水 8400 μL で全量 12000 μL とし、37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートしたものを試料とした。

PBS での検討では、上記溶液の 100 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5) 1200 μL の代わりに 10 x PBS 1200 μL を加えた。

測定には分光蛍光プレートリーダー (FP-8300、JASCO) を用いた。測定条件は、励起波長 440 nm、吸収波長 485 nm、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 日毎に測定を行った。

<試薬調製>

○ 1 mM ThT 溶液

ThT 1.59 mg を量り取り、MilliQ 水で溶解し全量 1 mL とし、5 mM ThT 溶液を調製した。

5 mM ThT 溶液 1 mL を MilliQ 水 4 mL に溶解し、1 mM ThT 溶液を調製し

た。

○ 10 x PBS

PBS (Phosphate Buffered Salts) Tablets 1 粒を MilliQ 水 10 mL に溶解した。

○ 100 mM Cu^{2+} 溶液

$\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 17 mg を量り取り、MilliQ 水で溶解し全量 1 mL とした。

○ 2 mM Cu^{2+} 溶液

100 mM Cu^{2+} 溶液 100 μL を MilliQ 水 4900 μL に溶解した。

謝辞

本研究に際し、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました立命館大学薬学部豊田英尚教授に謹んで感謝いたします。また、本研究に様々なご助力をいただきました立命館大学薬学部小嶋絢助教に深く感謝いたします。

なお、本研究の多くは共同研究として摂南大学薬学部臨床分析化学研究室で実施いたしました。その際、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました高知大学医学部薬理学研究室客員教授秋澤俊史教授（元摂南大学薬学部臨床分析化学研究室）ならびに摂南大学薬学部薬学教育センター統合薬学分野小西元美教授（元摂南大学薬学部臨床分析化学研究室）に謹んで感謝いたします。また、本研究に様々なご助力をいただきました摂南大学薬学部谷口将済助教に深く感謝いたします。実験に際し、ご協力くださいました中村里菜さん、幡川祐資さんをはじめとする摂南大学薬学部臨床分析化学研究室の諸氏に深く感謝いたします。

引用文献

1. Prusiner SB: Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982, **216**, 136-144.
2. Prusiner SB: Molecular biology of prion diseases. *Science*, 1991, **252**, 1515-1522.
3. Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY, Kascsak RJ, Cashman NR, Bolton DC: Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology*, 1992, **42**, 149-156.
4. Takada LT, Geschwind MD: Prion diseases. *Semin Neurol*, 2013, **33**, 348-356.
5. Nozaki I, Hamaguchi T, Sanjo N, Noguchi-Shinohara M, Sakai K, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Moriwaka F, Shiga Y, Kuroiwa Y, Nishizawa M, Kuzuhara S, Inuzuka T, Takeda M, Kuroda S, Abe K, Murai H, Murayama S, Tateishi J, Takumi I, Shirabe S, Harada M, Sadakane A, Yamada M: Prospective 10-year surveillance of human prion diseases in Japan. *Brain*, 2010, **133**, 3043-3057.
6. Nakamura Y, Ae R, Takumi I, Sanjo N, Kitamoto T, Yamada M, Mizusawa H: Descriptive epidemiology of prion disease in Japan: 1999-2012. *J Epidemiol*, 2015, **25**, 8-14.
7. Masters CL, Richardson EP Jr: Subacute spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). The nature and progression of spongiform change. *Brain*, 1978, **101**, 333-344.

8. Mikol J: Neuropathology of prion diseases. *Biomed Pharmacother*, 1999, **53**, 19-26.
9. Geschwind MD: Prion Diseases. *Continuum (Minneapolis Minn)*, 2015, **21**, 1612-1638.
10. 佐藤猛: プリオン病－最新トピックス. *医学のあゆみ*, 2005, **215**, 877.
11. K M Pan, M Baldwin, J Nguyen, M Gasset, A Serban, D Groth, I Mehlhorn, Z Huang, R J Fletterick, F E Cohen: Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, **90**, 10962-10966.
12. Wong BS, Vénien-Bryan C, Williamson RA, Burton DR, Gambetti P, Sy MS, Brown DR, Jones IM. Copper refolding of prion protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **276**, 1217-1224.
13. Wen-Quan Zou, Pierluigi Gambetti: Modeling of human prions and prion diseases in vitro and in vivo. *Drug Discovery Today. Disease Models*, 2004, **1**, 157-164.
14. Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB: Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*, 1995, **83**, 79-90.
15. Kaneko K, Zulianello L, Scott M, Cooper CM, Wallace AC, James TL, Cohen FE, Prusiner SB: 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*, 1997, **94**, 10069-10074.
16. Jarrett JT, Lansbury PT Jr: Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a

- pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, 1993, **73**, 1055-1058.
17. 山内 一也; プリオン説の展開とウシ海綿状脳症(狂牛病). *蛋白質核酸酵素*, 1998, **43**, 65-74.
18. Zahn R, Liu A, Lührs T, Riek R, von Schroetter C, López García F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wüthrich K: NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**, 145-150.
19. Jackson GS, Murray I, Hosszu LL, Gibbs N, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J: Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, **98**, 8531-8535.
20. Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H: The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, 1997, **390**, 684-687.
21. Pauly PC, Harris DA: Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem*, 1998, **273**, 33107-33110.
22. Ruiz FH, Silva E, Inestrosa NC. The N-terminal tandem repeat region of human prion protein reduces copper: role of tryptophan residues. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **269**, 491-495.
23. Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O: Signal transduction through prion protein. *Science*, 2000, **289**, 1925-1928.

24. Wulf MA, Senatore A, Aguzzi A: The biological function of the cellular prion protein: an update. *BMC Biol*, 2017, **15**, 34.
25. Castle AR, Gill AC: Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Front Mol Biosci*, 2017, **4**, 19.
26. Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA: Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol*, 1997, **146**, 104-112.
27. Wong BS, Liu T, Paisley D, Li R, Pan T, Chen SG, Perry G, Petersen RB, Smith MA, Melton DW, Gambetti P, Brown DR, Sy MS: Induction of HO-1 and NOS in doppel-expressing mice devoid of PrP: implications for doppel function. *Mol Cell Neurosci*, 2001, **17**, 768-775.
28. Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H, Hasegawa S, Miyamoto T, Noda T: Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature*, 1996, **380**, 528-531.
29. Nishida N, Tremblay P, Sugimoto T, Shigematsu K, Shirabe S, Petromilli C, Erpel SP, Nakaoka R, Atarashi R, Houtani T, Torchia M, Sakaguchi S, DeArmond SJ, Prusiner SB, Katamine S: A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest*, 1999, **79**, 689-697.
30. Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C,

- Karunaratne A, Pasternak SH, Chishti MA, Liang Y, Mastrangelo P, Wang K, Smit AF, Katamine S, Carlson GA, Cohen FE, Prusiner SB, Melton DW, Tremblay P, Hood LE, Westaway D: Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol*, 1999, **292**, 797-817.
31. Li A, Sakaguchi S, Atarashi R, Roy BC, Nakaoka R, Arima K, Okimura N, Kopacek J, Shigematsu K: Identification of a novel gene encoding a PrP-like protein expressed as chimeric transcripts fused to PrP exon 1/2 in ataxic mouse line with a disrupted PrP gene. *Cell Mol Neurobiol*, 2000, **20**, 553-567.
32. Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T: Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature*, 1999, **400**, 225-226.
33. Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A: Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 2001, **276**, 39145-39149.
34. Nishida N, Katamine S, Shigematsu K, Nakatani A, Sakamoto N, Hasegawa S, Nakaoka R, Atarashi R, Kataoka Y, Miyamoto T: Prion protein is necessary for latent learning and long-term memory retention. *Cell Mol Neurobiol*, 1997, **17**, 537-545.
35. Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG: Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, 1994, **370**, 295-297.

36. Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rülicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC: Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*, 1996, **380**, 639-642.
37. Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascak RJ, Bolton DC, Bendheim PE: Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell*, 1990, **61**, 185-192.
38. Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Wälchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C: Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, 1986, **46**, 417-428.
39. Stahl N, Baldwin MA, Burlingame AL, Prusiner SB: Identification of glycoinositol phospholipid linked and truncated forms of the scrapie prion protein. *Biochemistry*, 1990, **29**, 8879-8884.
40. Colacino S, Tiana G, Broglia RA, Colombo G: The determinants of stability in the human prion protein: insights into folding and misfolding from the analysis of the change in the stabilization energy distribution in different conditions. *Proteins*, 2006, **62**, 698-707.
41. Tizzano B, Palladino P, De Capua A, Marasco D, Rossi F, Benedetti E, Pedone C, Ragone R, Ruvo M: The human prion protein alpha2 helix: a thermodynamic study of its conformational preferences. *Proteins*, 2005, **59**, 72-79.
42. Ronga L, Palladino P, Saviano G, Tancredi T, Benedetti E, Ragone R, Rossi F: Structural characterization of a neurotoxic threonine-rich peptide corresponding to

- the human prion protein alpha 2-helical 180-195 segment, and comparison with full-length alpha 2-helix-derived peptides. *J Pept Sci*, 2008, **14**, 1096-1102.
43. Thompson A, White AR, McLean C, Masters CL, Cappai R, Barrow CJ: Amyloidogenicity and neurotoxicity of peptides corresponding to the helical regions of PrP(C). *J Neurosci Res*, 2000, **62**, 293-301.
44. Yamaguchi KI, Kuwata K: Formation and properties of amyloid fibrils of prion protein. *Biophys Rev*, 2018, **10**, 517-525.
45. Singh J, Udgaonkar JB: Molecular Mechanism of the Misfolding and Oligomerization of the Prion Protein: Current Understanding and Its Implications. *Biochemistry*, 2015, **54**, 4431-4442.
46. Dima RI, Thirumalai D: Exploring the propensities of helices in PrP(C) to form beta sheet using NMR structures and sequence alignments. *Biophys J*, 2002, **83**, 1268-1280.
47. Dima RI, Thirumalai D: Probing the instabilities in the dynamics of helical fragments from mouse PrPC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, **101**, 15335-15340.
48. Lu X, Wintrode PL, Surewicz WK: Beta-sheet core of human prion protein amyloid fibrils as determined by hydrogen/deuterium exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, **104**, 1510-1515.
49. 山口圭一、松本友治、児玉耕太、岸直人、桑田一夫: *細胞工学*, 2007, **26**, 151
50. Honda R, Kuwata K: Evidence for a central role of PrP helix 2 in the nucleation of amyloid fibrils. *FASEB J*, 2018, **32**, 3641-3652.

51. 水澤英洋（編集）：プリオン病および遅発性ウイルス感染症．厚生労働省難治性疾患克服研究事業プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班．金原出版，東京，2010．
52. Mead S: Prion disease genetics. *Eur J Hum Genet.* 2006, **14**, 273-281.
53. Mastrianni JA: The genetics of prion diseases. *Genet Med*, 2010, **12**, 187-195.
54. Higuma M, Sanjo N, Satoh K, Shiga Y, Sakai K, Nozaki I, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kitamoto T, Shirabe S, Murayama S, Yamada M, Tateishi J, Mizusawa H: Relationships between clinicopathological features and cerebrospinal fluid biomarkers in Japanese patients with genetic prion diseases. *PLoS One*, 2013, **8**, e60003.
55. Qina T, Sanjo N, Hizume M, Higuma M, Tomita M, Atarashi R, Satoh K, Nozaki I, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kobayashi A, Kitamoto T, Murayama S, Murai H, Yamada M, Mizusawa H: Clinical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation in the prion protein gene. *BMJ Open*, 2014, **4**, e004968.
56. Akagi A, Iwasaki Y, Mimuro M, Kitamoto T, Yamada M, Yoshida M: Pathological progression of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with a PrP V180I mutation. *Prion*, 2018, **12**, 54-62.
57. Iwasaki Y, Kato H, Ando T, Akagi A, Mimuro M, Miyahara H, Kitamoto T, Yoshida M: Autopsy case of V180I genetic Creutzfeldt-Jakob disease presenting with early disease pathology. *Neuropathology*, 2018, **38**, 638-645.
58. Yi CW, Wang LQ, Huang JJ, Pan K, Chen J, Liang Y: Glycosylation Significantly

- Inhibits the Aggregation of Human Prion Protein and Decreases Its Cytotoxicity. *Sci Rep*, 2018, **8**, 12603.
59. Meli M, Gasset M, Colombo G: Dynamic diagnosis of familial prion diseases supports the β 2- α 2 loop as a universal interference target. *PLoS One*, 2011, **6**, e19093.
60. Kojima A, Mabuchi Y, Konishi M, Okihara R, Nagano M, Akizawa T: Metal-binding ability of human prion protein fragment peptides analyzed by column switch HPLC. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2011, **59**, 965-971.
61. Kojima A, Konishi M, Akizawa T: Prion fragment peptides are digested with membrane type matrix metalloproteinases and acquire enzyme resistance through Cu^{2+} -binding. *Biomolecules*, 2014, **4**, 510-526.
62. Kojima A, Sakaguchi Y, Toyoda H, Taniguchi M, Konishi M, Akizawa T: C-terminal Region of the hPrP Can Be the Core for the Structural Conversion and Aggregation. *Peptide Science*, 2015, **52**, 122-125.
63. Takahashi T, Tanaka T, Tsushima Y, Muragaki K, Uehara K, Takeuchi S, Maeda H, Yamagata Y, Nakayama M, Yoshimi A, Abe K: Ionic interaction of positive amino acid residues of fungal hydrophobin RolA with acidic amino acid residues of cutinase CutL1. *Mol Microbiol*, 2015, **96**, 14-27.
64. Honda RP, Kuwata K: The native state of prion protein (PrP) directly inhibits formation of PrP-amyloid fibrils in vitro. *Sci Rep*, 2017, **7**, 562.
65. Naiki H, Higuchi, Hosokawa M, Takeda T: Fluorometric determination of amyloid

- fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem*, 1989, **177**, 244-249.
66. Wetzel R, Shivaprasad S, Williams AD: Plasticity of amyloid fibrils. *Biochemistry*, 2007, **46**, 1-10.
67. Brown DR: Brain proteins that mind metals: a neurodegenerative perspective. *Dalton Trans*, 2009, **21**, 4069-4076.
68. Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM, Lakey JH: Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **214**, 993-999.
69. Pushie MJ, Rauk A, Jirik FR, Vogel HJ: Can copper binding to the prion protein generate a misfolded form of the protein? *Biometals*, 2009, **22**, 159-175.
70. Kawahara M, Koyama H, Nagata T, Sadakane Y: Zinc, copper, and carnosine attenuate neurotoxicity of prion fragment PrP106-126. *Metallomics*, 2011, **3**, 726-734.
71. Inayathullah M, Satheeshkumar KS, Malkovskiy AV, Carre AL, Sivanesan S, Hardesty JO, Rajadas J: Solvent microenvironments and copper binding alters the conformation and toxicity of a prion fragment. *PLoS One*, 2013, **8**, e85160.

論文目録

本学位論文内容は以下の発表論文による。

副論文目録

1. SAKAGUCHI Yuko, NAKAMURA Rina, KONISHI Motomi, TANIGUCHI Masanari, TOYODA Hidenao and AKIZAWA Toshifumi: The effects of Cu²⁺ on conformational changes of hPrP180-192 derived from the C-terminal region of prion protein. Biomedical Research on Trace Elements, 2019, **30**, 1-8
2. SAKAGUCHI Yuko, NAKAMURA Rina, KONISHI Motomi, HATAKAWA Yusuke, TOYODA Hidenao and AKIZAWA Toshifumi: Effects of Cu²⁺ on conformational change and aggregation of hPrP180-192 with a V180I mutation of the prion protein. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, **514**,798-802

参考論文目録

1. KOJIMA Aya, SAKAGUCHI Yuko, TOYODA Hidenao, TANIGUCHI Masanari, KONISHI Motomi and AKIZAWA Toshifumi: C-terminal Region of the hPrP Can Be the Core for the Structural Conversion and Aggregation. Peptide Science, 2015, **52**, 122-125