

琉球大学学術リポジトリ

[依頼総説] プリオン蛋白質遺伝子欠損細胞を用いた正常型プリオン蛋白質機能解析

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2012-04-13 キーワード (Ja): キーワード (En): prion, PrP, cell line, apoptosis 作成者: 作道, 章一, Sakudo, Akikazu メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016238

プリオン蛋白質遺伝子欠損細胞を用いた正常型プリオン蛋白質機能解析

作道 章一

琉球大学医学部保健学科
生体代謝学分野

Studies on functions of prion protein (PrP) using PrP gene-deficient cell lines

Akikazu Sakudo

Laboratory of Biometabolic Chemistry, School of Health Sciences, Faculty of Medicine,
University of the Ryukyus

ABSTRACT

Prion is an infectious particle composed of an abnormal isoform of the prion protein (PrP^{Sc}), and causes prion diseases such as bovine spongiform encephalopathy (BSE), Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), and scrapie. As a counterpart of PrP^{Sc}, host cells express the cellular isoform of prion protein (PrP^C). This paper presents our recent studies on PrP^C using prion protein gene-deficient cell lines. *Ryukyu Med. J.*, 29(3,4)11~16, 2010

Key words: prion, PrP, cell line, apoptosis

はじめに

プリオン病は蛋白質性の感染因子プリオン (Prion: Proteinaceous infectious particle) によって引き起こされる致死性の神経変性疾患である¹⁾。プリオン病の例としては、ヒトではクロイツフェルト・ヤコブ病、羊ではスクレイピー、ウシでは牛海綿状脳症 (BSE) などが挙げられる。現在のところプリオン病は死後脳を用いることでのみ確定診断が可能であるが、近年早期診断に有効な臨床症状や核磁気共鳴画像法 (MRI)、ポジトロン断層法 (PET)、単一光子放射断層撮影 (SPECT) などによる画像検査所見が蓄積しつつあり、診断に活用されている²⁾。また、効果的な治療法も見つかっていない。さらに、プリオンは121℃、20分の高圧蒸気滅菌処理でも不活化されず、これまで知られている病原体の中で最も抵抗性の高いものと考えられている³⁾。本総説では、著者がこれまで行ってきたプリオンを対象とした研究について、解説したい。

プリオン病は正常型プリオン蛋白質 (PrP^C) が異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) へと変換し、PrP^{Sc}の蓄積に

よる毒性およびPrP^Cのloss of functionにより神経細胞が脱落し、発症すると考えられている⁴⁾ (Fig. 1)。

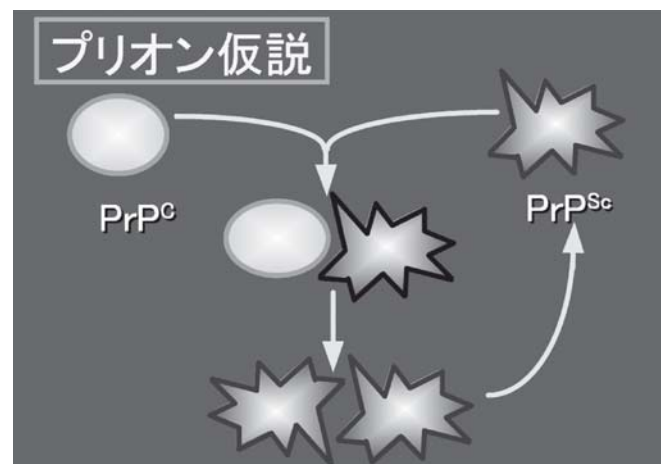


Fig. 1 Prion hypothesis. プリオンに感染した動物の脳では宿主に元々ある正常型プリオン蛋白質 (PrP^C) が異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) へと変換されると考えられている。文献 (14) より改変後引用。

その結果、プリオン感染動物の脳では空胞変性とPrP^{Sc}沈着が観察される。PrP^{Sc}はプリオン病原体の主要構成成分であり、一方PrP^Cは脳を含む様々な臓器で発現し、哺乳動物の間において高い相同性を持っているものの、その機能については不明の点が多く残されている⁵⁾。

PrP^Cの構造

ヒトPrP^Cはシグナルペプチド (アミノ酸残基1-22番目)、オクタリピード領域 (PHGGGWGQの5回繰り返し (アミノ酸残基51-91番目))、疎水性領域 (アミノ酸残基106-126番目)、3つのヘリックス構造 (H1-H3)、グリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカー配列 (アミノ酸残基231-253番目) がある⁵⁾ (Fig. 2)。また、N型糖鎖が付加する部位が2ヶ所 (T181とT197) あり、S-S結合がCys179とCys214の間で形成される。これらの構造の中でPrP^Cの生理機能に最も重要と考えられているのはGPIアンカーと、オクタリピード領域および疎水性領域である。GPIアンカーは細胞膜のラフト (コレステロールに富む脂質の領域) に存在するために必要であり、他のGPIアンカー蛋白がそうであるように、ラフト上でシグナル伝達に関わると考えられている。一方、オクタリピード領域に繰り返し存在するヒスチジンには銅が結合することが知られており、銅とPrP^Cとの関連に注目が集まっている。主要な銅結合蛋白質としてCu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) が知られており、細胞内銅濃度の変化によりCu/Zn SODの活性が変化することが報告されている。このため、PrP^CとSODとの関連にも興味を持たれる。なお、疎水性領域にはStress inducible protein 1 (STI 1) など

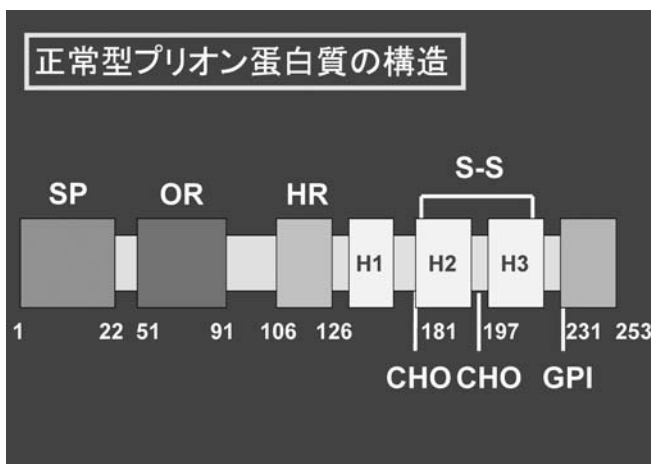


Fig. 2 Structure of human PrP^C. ヒトPrP^Cはシグナルペプチド (SP)、オクタリピード領域 (OR)、疎水性領域 (HR)、3つのヘリックス構造 (H1-H3)、グリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカー配列を持つ。また、2つのN型糖鎖付加部位 (CHO) と1カ所のS-S結合が存在する。数字はアミノ酸番号。

の蛋白質が結合することが報告されている⁵⁾。

著者らの研究

蛋白質の機能を解析するために通常よくとられる方法として遺伝子ノックアウト法が挙げられる。これまでに、プリオン蛋白質 (PrP) 遺伝子ノックアウトマウスは世界で6系統作製されているが、これらのPrP遺伝子ノックアウトマウスの表現形が大きく2つに分かれてしまったことや、ほとんど異常が見られないマウスもあったことから、PrPの生理機能を理解するうえで、十分な情報を得ることができなかった⁵⁾。例えば、Ngsk型PrP遺伝子ノックアウトマウスは加齢に伴う行動異常を示したが、ZrchI型やNpu型のPrP遺伝子ノックアウトマウスはそれらの異常を示さなかった⁵⁾。その後、この原因はPrP遺伝子をノックアウトする際のコンストラクトの作製方法の違いに起因することが明らかとなった⁵⁾。現在では、Ngsk型マウスはPrP遺伝子のエクソン3のスプライシングアクセプターが破壊されていたために、下流の遺伝子が発現することで異常が現れたと考えられている。なお、前述のZrchI型やNpu型マウスにはサーカディアンリズムや長期増強 (LTP) の異常が報告されているが、その異常が顕著でないからか、複数の研究室で一致した結果が得られていない。

そこで、著者らの研究グループでは、細胞株を作製して、PrP^Cの機能解析にアプローチすることにした。まず、PrP遺伝子ノックアウトマウス胎児脳の海馬より、Simian Virus 40 (SV40) large T抗原遺伝子を発現するレトロウイルスベクターを用いて不死化することにより、PrP遺伝子欠損神経細胞株HpLを樹立した。同様に野生型マウスから神経細胞株HWを作製した。これらの細胞を比較したところ、海馬由来神経細胞株の非増殖時培養に用いられることの多い無血清培地において、HWは神経突起の伸長を示したが、HpLはアポトーシスによる細胞死を起こした。一方、PrP遺伝子を再導入したHpLは生存することが明らかとなった⁶⁾ (Fig. 3)。これらの結果から、PrP^Cが細胞の生存維持に間接的な役割を果たしていることが示唆された。

次に、HpLが細胞死にいたるメカニズムを知るために、血清除去により誘導されることが知られている、スーパーオキシドアニオンの測定を蛍光試薬Dihydroethidiumを用いて行った⁶⁾。その結果、HpLは血清除去6時間でスーパーオキシドアニオンの発生がピークになり、その時PrP再発現HpL細胞ではスーパーオキシドアニオン発生が抑制されていることがわかった (Fig. 4)。そこで次に、スーパーオキシドアニオンを消去する酵素であるSODの活性を測定したところ、PrP遺伝子再発現HpL細胞は、非発現HpL細胞に比べ、血清存在下でも非存在下でも高いSOD活性を示した⁶⁾ (Fig. 5)。以上の結果から、PrPは細胞内SOD活性を上昇さ

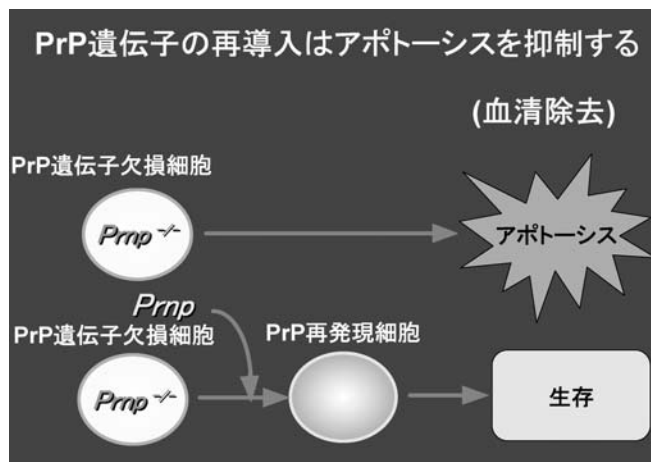


Fig. 3 PrP^C suppresses apoptosis induced by serum deprivation. PrP遺伝子欠損細胞 (Prnp^{-/-}) は血清除去によりアポトーシスを示すが、PrP遺伝子を再導入した細胞は血清除去下で生存する. 文献 (14) より改変後引用.

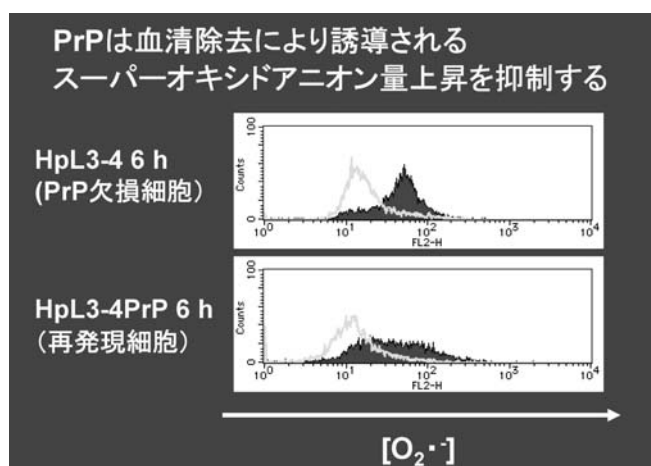


Fig. 4 Generation of superoxide anion is inhibited by PrP expression. PrP遺伝子欠損細胞 (HpL3-4) は無血清培地へ移行6時間後、スーパーオキシドアニオン (O₂^{·-}) 量がピークとなる. この時、PrP遺伝子を再発現した細胞HpL3-4PrPではO₂^{·-}量はこれよりも少ない. O₂^{·-}量は蛍光試薬dihydroethidiumを用いてフローサイトメトリーにより測定した. 灰色線の白抜き: 0時間; 黒色線の黒塗りつぶし: 6時間. 文献 (6) より引用.

せ、スーパーオキシドアニオンを消去することで血清除去誘導アポトーシス抑制に働くことが示唆された.

PrPにはオクタリピード領域と疎水性領域と呼ばれる哺乳動物間で高度に保存された領域が存在する⁷⁾ (Fig. 6). そこで、次にこれらの領域のうち、どの領域がPrP^Cの機能に重要であるのかを調べた. PrP^Cのアポトーシス抑制機能, SOD活性制御機能に重要な領域を調べるため、オクタリピード領域を欠損したPrP, 疎水性領域のN末端側を欠損したPrP, 疎水性領域のC末端側の領域を欠損したPrPをPrP遺伝子欠損細胞株へ発現させた⁸⁾. そして、フローサイトメトリーを用いて、細胞表

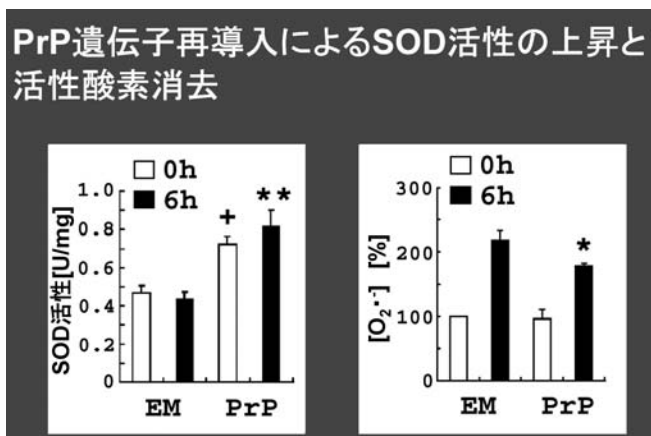


Fig. 5 Activation of SOD by PrP expression. PrP発現によるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性上昇 (左図) とスーパーオキシドアニオン (O₂^{·-}) 量の低下 (右図). HpL3-4E (EM) とHpL3-4PrP (PrP) を血清除去後、0時間 (白棒) および6時間 (黒棒) 後にSOD活性とO₂^{·-}量の解析を行った. SOD活性はキサンチンペーの比色定量により測定した (units/mg蛋白質量). O₂^{·-}量は蛍光試薬dihydroethidiumを用いてフローサイトメトリーにより平均蛍光強度から算出した. なお、右図において、HpL3-4EMの0時間時のO₂^{·-}量を100%とした. アスタリスク (*) およびダブルアスタリスク (**) はそれぞれ、HpL3-4EMの血清除去6時間時と比較して有意な差があったことを示す [p < 0.05 (*) and p < 0.01 (**)]. プラス (+) はHpL3-4EMの血清除去0時間と比較して有意な差があったことを示す [p < 0.01 (+)]. 文献 (6) より改変後引用.

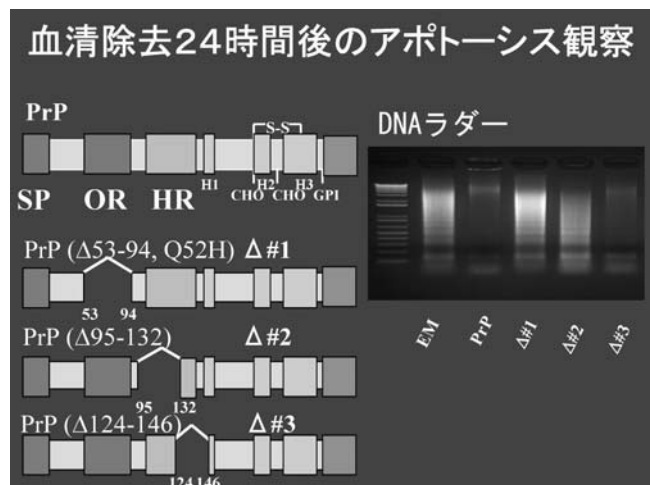


Fig. 6 PrP deletion mutants and DNA ladder. 欠損変異PrP遺伝子 (#1, #2, #3) および野生型PrP遺伝子を発現するHpL3-4細胞を血清除去24時間後に回収し、DNAを抽出して電気泳動を行った. 空ベクター導入細胞 (EM) も同様に解析した. SP: シグナルペプチド; CHO: N型糖鎖; GPI: グリコシルフォスファチジルイノシトール; H1~H3: ヘリックス領域; OR: オクタリピード領域; HR: 疎水性領域. 文献 (8) より改変後引用.

面PrP量がほぼ等しく発現する細胞を得た。これらの細胞を無血清培地で24時間培養後、DNAを抽出し、DNAラダーの検出を行ったところ、オクタリピート領域欠損PrP発現細胞 #1や疎水性領域のN末端側を欠損したPrP発現細胞 #2ではアポトーシスが抑制されないことがわかった (Fig. 6)。次に、アポトーシスに特徴的なヒストン付加断片化DNAの検出をEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて行ったところ、DNAラダーの結果と同様に、オクタリピート領域欠損PrP発現細胞 #1や疎水性領域のN末端側を欠損したPrP発現細胞 #2では血清除去により誘導されるアポトーシスが抑制されないことがわかった (Fig. 7)。さらに、各欠損変異体発現細胞のSOD活性を調べると、血清除去6時間において、PrP再発現細胞や疎水性領域のC末端側を欠損したPrP発現細胞 #3では、空ベクター導入細胞EMに比べて有意に高いSOD活性を示した (Fig. 8)。一方、オクタリピート領域欠損PrP発現細胞 #1や疎水性領域のN末端側欠損PrP発現細胞 #2は空ベクター導入細胞EMと同等もしくは低いSOD活性を示した。これらの結果から、PrP^CによるSOD活性化には、オクタリピート領域だけでなく、疎水性領域のN末端側の領域も重要であり、血清除去時のアポトーシスの程度はSOD活性と逆相関することが示唆された (Fig. 9)。

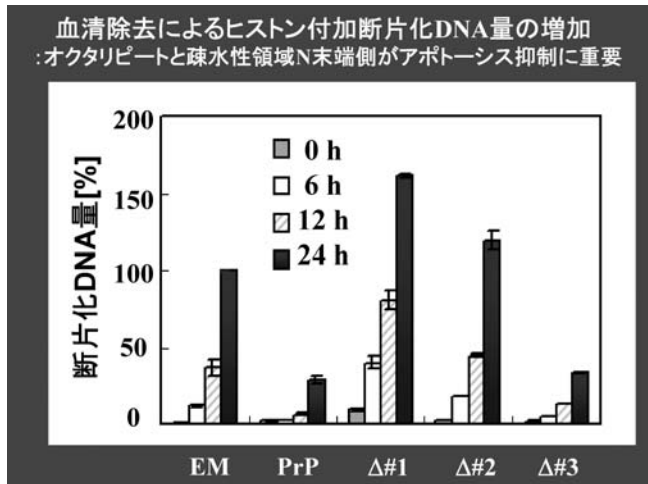


Fig. 7 Histone-associated fragmented DNA. 欠損変異PrP遺伝子 (#1, #2, #3) および野生型PrP遺伝子を発現するHpL3-4細胞を経時的 (0, 6, 12, 24時間後) に細胞を回収し、ELISAによりヒストン付加断片化DNA量を比較した。空ベクター導入細胞 (EM) も同様に解析した。文献 (8) より改変後引用。

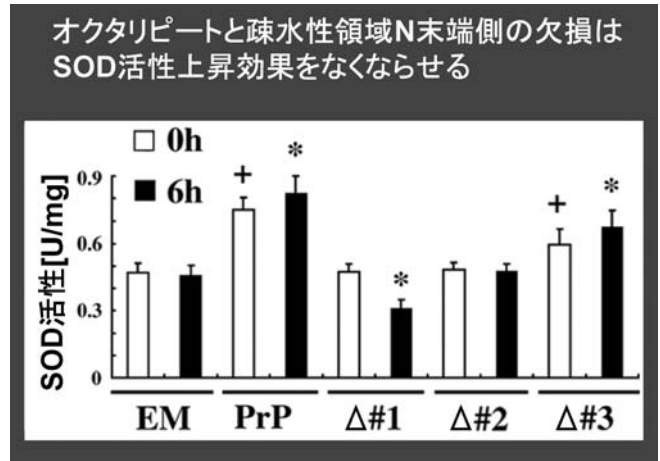


Fig. 8 Octapeptide repeat and N-terminal portion of hydrophobic region are essential for SOD activation by PrP. 欠損変異PrP遺伝子 (#1, #2, #3) および野生型PrP遺伝子を発現するHpL3-4細胞を血清除去0時間および6時間後に回収し、SOD活性を測定した。空ベクター導入細胞 (EM) も同様に解析した。アスタリスク (*) はHpL3-4EM血清除去6時間と比較して有意な差があったことを示す (p < 0.01)。プラス (+) はHpL3-4EM血清除去0時間と比較して有意な差があったことを示す (p < 0.01)。文献 (8) より改変後引用。

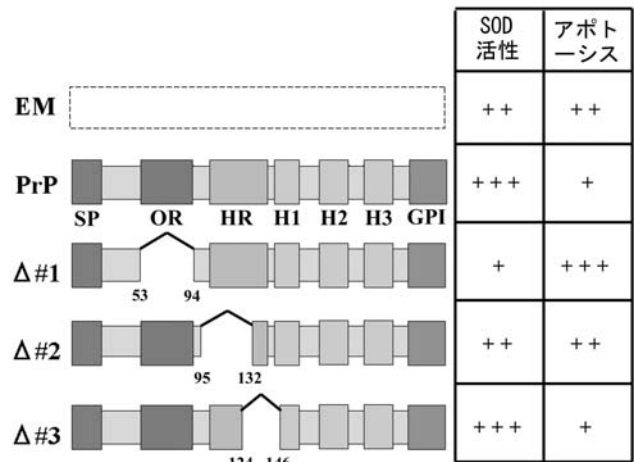


Fig. 9 Summary of SOD activity in HpL cells expressing PrP deletion mutants and their apoptosis induced by serum deprivation. 欠損変異PrP遺伝子 (#1, #2, #3) および野生型PrP遺伝子を発現するHpL3-4細胞を血清除去を行った際のSOD活性およびアポトーシス程度の比較を行った。空ベクター導入細胞 (EM) の結果も同様に示した。+の数が多ほど、SOD活性もしくはアポトーシス程度が高いことを示す。SP: シグナルペプチド; GPI: グリコシルフォスファチジルイノシトール; H1~H3: ヘリックス領域; OR: オクタリピート領域; HR: 疎水性領域。文献 (14) より改変後引用。

著者らの研究で明らかになったこと

著者らの研究により、PrP^Cは抗酸化ストレス、抗アポトーシス活性を持ち、その機能部位はオクタリピート領域と疎水性領域のN末端側の領域であることが明らかとなった (Fig. 10). オクタリピート領域に銅が結合することで、細胞内銅量の調節がPrP^Cにより行われている^{9,10)}. 一方、Cu/Zn SODは銅により活性が制御されることが知られているため¹¹⁾、細胞内銅量の調節によりSOD活性が制御を受けることが考えられる. また、著者らは疎水性領域に、STI 1が結合して、SOD活性化へのシグナルを伝えていることを明らかにしている¹²⁾ (Fig. 10). そして、SODはアポトーシスの誘導物質の一つであるスーパーオキシドアニオンを消去するため、アポトーシスが抑制されると考えられる. 今後、銅およびSTI 1がどのような機構でPrP^C依存的SOD活性化に関わるのか、さらなる研究が必要である.

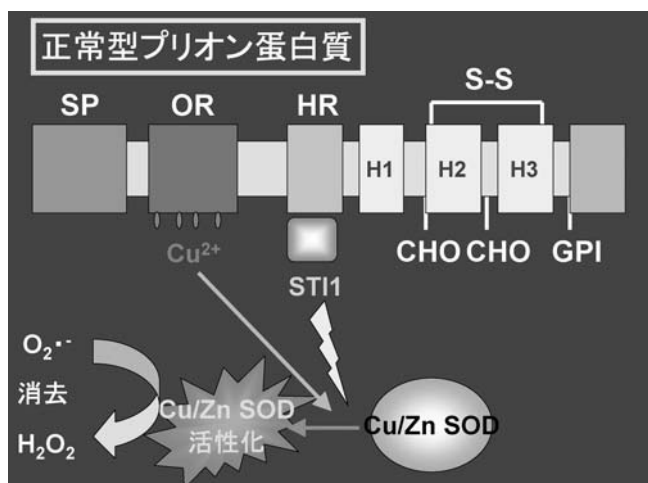


Fig. 10 Schematic presentation of possible mechanisms by which PrP activates SOD and prevents apoptosis. STI1は疎水性領域 (HR) に結合後、オクタリピート領域 (OR) に結合した銅と共役して、PrPがCu/Zn SODを活性化するために働くことが考えられる. 活性化されたCu/Zn SODは血清除去により発生するスーパーオキシドアニオン (O₂^{•-}) を消去して、毒性を弱める. SP: シグナルペプチド; CHO: N型糖鎖; GPI: グリコシルフォスファチジルイノシトール; H1~H3: ヘリックス領域; STI1: Stress inducible protein1; SOD: Superoxide dismutase; S-S: ジスルフィド結合. 文献 (14) より改変後引用.

おわりに

プリオン感染動物の脳ではPrP^CがPrP^{Sc}へと変換されることによりPrP^{Sc}の蓄積とPrP^C量の低下が起きているものと考えられている. これまでの研究結果をもとに、PrP^{Sc}の蓄積による酸化ストレス発生とPrP^C量低下による抗酸化ストレス制御能低下により神経変性が起こると

いうプリオン病発症メカニズムを考えることができる¹³⁾. 現在のところプリオン病に有効な治療法はないが、発症メカニズムが明らかになることが治療法開発の手がかりになるものと期待される.

謝 辞

本総説の一部の研究は科学研究費補助金 (若手(B)) および厚生労働科学研究費補助金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」の補助を受けた.

文 献

- 1) Prusiner, S. B.: Prions. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 95: 13363-13383, 1998.
- 2) Sakudo, A., Nakamura, I., Ikuta, K. and Onodera, T.: Recent developments in prion disease research: diagnostic tools and in vitro cell culture models. J. Vet. Med. Sci. 69: 329-337, 2007.
- 3) McDonnell G. E.: Antisepsis, Disinfection, and Sterilization: Types, Action, and Resistance. ASM Press, Washington D. C., 2007.
- 4) Sakudo, A. and Ikuta, K.: Prion protein functions and dysfunction in prion diseases. Curr. Med. Chem. 16: 380-9, 2009.
- 5) Sakudo, A., Onodera, T., Suganuma, Y., Kobayashi, T., Saeki, K. and Ikuta, K.: Recent advances in clarifying prion protein functions using knockout mice and derived cell lines. Mini Rev. Med. Chem. 6: 589-601, 2006.
- 6) Sakudo, A., Lee, D. C., Saeki, K., Nakamura, Y., Inoue, K., Matsumoto, Y., Itohara, S. and Onodera T.: Impairment of superoxide dismutase activation by N-terminally truncated prion protein (PrP) in PrP-deficient neuronal cell line. Biochem. Biophys. Res. Commun. 308: 660-667, 2003.
- 7) Wopfner, F., Weidenhofer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T. F., Werner, T. and Schatzl, H. M.: Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein, J. Mol. Biol. 289: 1163-1178, 1999.
- 8) Sakudo, A., Lee, D. C., Nishimura, T., Li, S., Tsuji, S., Nakamura, T., Matsumoto, Y., Saeki, K., Itohara, S., Ikuta, K. and Onodera, T.: Octapeptide repeat region and N-terminal half of hydrophobic region of prion protein

- (PrP) mediate PrP-dependent activation of superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326: 600-606, 2005.
- 9) Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. and Kretzschmar H.: The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390: 684-687, 1997.
- 10) Sakudo, A., Lee, D. C., Yoshimura, E., Nagasaka, S., Nitta, K., Saeki, K., Matsumoto, Y., Lehmann, S., Itohara, S., Sakaguchi, S. and Onodera, T.: Prion protein suppresses perturbation of cellular copper homeostasis under oxidative conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 850-855, 2004.
- 11) Wong, P. C., Waggoner, D., Subramaniam, J. R., Tessarollo, L., Bartnikas, T. B., Culotta, V. C., Price, D. L., Rothstein, J. and Gitlin, J. D.: Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2886-2891, 2000.
- 12) Sakudo, A., Lee, D. C., Li, S., Nakamura, T., Matsumoto, Y., Saeki, K., Itohara, S., Ikuta, K. and Onodera, T.: PrP cooperates with STI1 to regulate SOD activity in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328: 14-19, 2005.
- 13) Sakudo, A. and Ikuta, K.: Fundamentals of prion diseases and their involvement in the loss of function of cellular prion protein. *Protein Pept. Lett.* 16: 217-229, 2009.
- 14) Sakudo, A., Onodera, T. and Ikuta, K.: Prion protein gene-deficient cell lines: powerful tools for prion biology. *Microbiol. Immunol.* 51: 1-13, 2007.