

# PrP (プリオンタンパク質) ペプチドの凝集とその細胞傷害性

Aggregation of PrP (prion protein) peptides and their cytotoxicity

平野義晃\*, 白石則之\*

Yoshiaki HIRANO, Noriyuki SHIRAISHI

キーワード：プリオンタンパク質、凝集、細胞傷害性

Key Words : prion protein, aggregation, cytotoxicity

## 要約

細胞のプリオンタンパク質 (PrP<sup>C</sup>) は、ヒトの 20 番染色体やマウスの 2 番染色体にある PRNP 遺伝子によってコードされるグリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型タンパク質である。PrP<sup>C</sup>の生理学的役割の詳細は明らかでないが、シナプス伝達、記憶形成、神経保護など、いくつかの脳機能への関与が示唆されている。牛海綿状脳症やクロイツフェルト・ヤコブ病などのプリオン病は、正常型の PrP<sup>C</sup>が、感染型のスクレイピーアイソフォーム (PrP<sup>Sc</sup>) に変換することで生じる致死的な神経変性疾患である。PrP<sup>Sc</sup>の細胞傷害性を調べる研究の多くは、細胞死を誘導する PrP の断片を特定することに焦点が合わされてきた。本論文では PrP<sub>106-126</sub>、PrP<sub>82-146</sub>、PrP<sub>118-135</sub>、PrP<sub>127-147</sub>、PrP<sub>23-144</sub>、PrP<sub>23-98</sub>などの PrP ペプチドの凝集とその細胞傷害性についてレビューした。これらの PrP ペプチドから生じた凝集体の形状は、オリゴマーやフィブリルが主であった。これらのオリゴマーやフィブリルには細胞傷害性が認められ、アポトーシスを介する可能性を示す報告もあった。細胞傷害性への内在性の PrP<sup>C</sup>の関与については報告によって異なり PrP<sup>C</sup>に依存するルート、あるいは PrP<sup>C</sup>に依存しないルートがあることが示唆されている。依存しない場合は、膜の不安定化、流動性の変化、イオン透過性の原因となる細孔の形成が考えられている。

## Abstract

The cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) is a glycosylphosphatidylinositol anchored protein encoded by the PRNP gene on chromosome 20 of humans and chromosome 2 of mice. The details of the physiological role of PrP<sup>C</sup> are not clear, but it has been suggested to be involved in

several brain functions such as synaptic transmission, memory formation, and neuroprotection. Prion diseases such as bovine spongiform encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob disease are fatal neurodegenerative diseases caused by the conversion of normal PrP<sup>C</sup> to infectious scrapie isoforms (PrP<sup>Sc</sup>). Many studies investigating the cytotoxicity of PrP<sup>Sc</sup> have focused on identifying fragments of PrP that induce cell death.

In this paper, we reviewed the aggregation of PrP peptides and their cytotoxicity, such as PrP<sub>106-126</sub>, PrP<sub>82-146</sub>, PrP<sub>118-135</sub>, PrP<sub>127-147</sub>, PrP<sub>23-144</sub>, and PrP<sub>23-98</sub>. The shape of the aggregates formed from these PrP peptides was mainly oligomers and fibrils. Cytotoxicity was observed in these oligomers and fibrils, and it was reported that they were mediated by apoptosis. The involvement of the endogenous PrP<sup>C</sup> in cytotoxicity differs in some reports, and it is suggested that there is a route that depends on PrP<sup>C</sup> or an another one that does not depend on PrP<sup>C</sup>. If it does not depend on it, it is considered that destabilization of the membrane, change in fluidity, and formation of pores that cause ion permeability.

## 序論

細胞のプリオンタンパク質 (PrP<sup>C</sup>) は、ヒトの 20 番染色体やマウスの 2 番染色体にある PRNP 遺伝子によってコードされるグリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型タンパク質である (Prusiner et al., 1998, Aguzzi et al., 2004, Linden et al., 2008, Del Rio, 2018)。

PrP<sup>C</sup> mRNA の顕著な発現が、成人脳の皮質と小脳で観察されている。これらの神経系に加えて、リンパ器官や心臓を含むいくつかの組織でもその発現が報告されている (Ford et al., 2002, Miele et al., 2003, Linden et al., 2008)。また、低レベルであるが腎臓や肝臓での発現も明らかにされている (Miele et al., 2003, Tichopad et al., 2003)。PrP<sup>C</sup> の生理学的役割の詳細は明らかでないが、シナプス伝達、記憶形成、神経保護など、いくつかの脳機能への関与が示唆されている (Wulf et al., 2017, Legname, 2017)。

羊のスクレイピー、牛海綿状脳症、およびヒトのクールー病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、致死性家族性不眠症、クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)、バリエント CJD などのプリオン病は、正常型の PrP<sup>C</sup> が、感染型のスクレイピーアイソフォーム (PrP<sup>Sc</sup>) に変換することで生じる致死的な神経変性疾患である (Prusiner, 1991, Prusiner, 1998, Aguzzi et al., 2009, Brandner et al., 2017)。伝達性および遺伝性のプリオン病での神経機能障害の分子機構を解明するため、*in vitro* および *in vivo* でのプリオン病のモデル系の開発とそれらを使った研究 (Brandner et al., 2017) や、PrP の誤った折り畳み構造と細胞傷害性に注目した研究も行われている (Corsaro et al., 2012)。この論文では、PrP ペプチドの凝集とその細胞傷害性についてレビューした。

## 1. PrP<sup>C</sup>の構造と銅結合領域

はじめに PrP<sup>C</sup>の構造とその特徴の一つである銅結合領域について述べる。構造と組換えプリオンタンパク質 (rec-PrP) を使用した構造研究から、残基 125~231 を含む C 末端ドメインは、2つの短い  $\beta$  ストランドと 3つの  $\alpha$  ヘリックスで構成される球状構造であることが示されている。一方、残基 23~124 を含む N 末端ドメインは、構造化されずフレキシブルである (図 1)。PrP<sup>C</sup>では、 $\alpha$  ヘリックスが多く (タンパク質の~40%)、 $\beta$  ストランドは少ない (3%)。一方、PrP<sup>Sc</sup>では、 $\alpha$  ヘリックスは少し減少し (30%)、 $\beta$  ストランドが多くなる (~40%) (Daggett, 1998, Brown, 2001, Aguzzi et al., 2004, Aguzzi et al., 2009, Sánchez-López, 2018)。

この N 末端ドメインについては、多くの研究により、オクタペプチド配列 PHGGGWGQ の 4つの繰り返しからなる残基 51~90 に、銅イオンを選択的に結合する 4つの銅結合部位が見られることが示されている (Viles et al., 1999, Aronoff-Spencer et al., 2000, Bonomo et al., 2000, Shiraishi et al., 2000, Whittal et al., 2000, Jackson et al., 2001, Burns et al., 2003) (図 1)。この銅結合部位に銅イオンを結合させるために PrP とインキュベートすると、銅イオンの結合によってコンフォメーション変化が誘導され、PrP がプロテイナーゼ K 耐性を獲得することも報告されている (Qin et al., 2000, Wong et al., 2000, Quaglio et al., 2001, Kuczius et al., 2004, Yen et al., 2016, Lu et al., 2018)。

この銅結合部位と銅イオンとの親和性は、実験条件などからフェムトモルからマイクロモルの範囲となっている (Viles et al., 1999, Shiraishi et al., 2000, Whittal et al., 2000, Jackson et al., 2001)。遠心限外ろ過法で測定した私たちの結果では 0.58  $\mu$ M であった (Shiraishi et al., 2000)。さらに、他の複数の研究で、残基 92-96 (GGGTH)、および残基 107-111 (TNMKH) にもさらなる銅結合部位が見られることが報告されている (Burns et al., 2003, Jones et al., 2004, Hureau et al., 2006, Klewpatinond et al., 2007)。

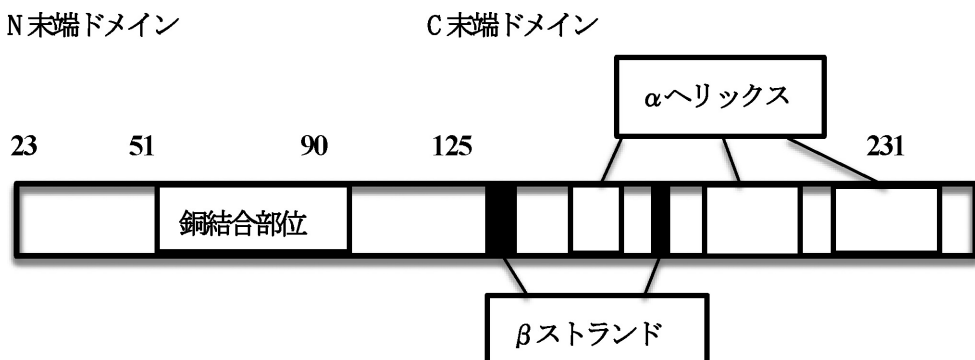


図 1 PrP<sup>C</sup>の構造

## 2. PrP<sup>Sc</sup>と recPrP 由来のオリゴマーとフィブリルの細胞傷害性

PrP<sup>Sc</sup>の細胞傷害性を調べる研究の多くは、細胞死を誘導する PrP の断片を特定することに焦点が合わされてきた。スクレイピー脳から細胞傷害性を引き起こす断片を特定することの難しさは、PrP<sup>Sc</sup>凝集体が、フィブリルと非フィブリルオリゴマーの混合物である (Silveira et al., 2005) ことや、PrP<sup>Sc</sup>に非タンパク質成分が強固に結合していることなどに起因する (Appel et al., 1999, Zou et al., 2004)。スクレイピー脳から調製された PrP<sup>Sc</sup>の N 末端切断型である PrP27-30 (残基 90-231) が、初代ニューロンおよび培養細胞でアポトーシス細胞死を誘発することが報告されている (Prusiner, 1998, Giese et al., 1998, Post et al., 2000, Hetz et al., 2003) (表 I)。

全長リコンビナントプリオンタンパク質 (rec-PrP) の細胞傷害性とそのコンフォメーションについても報告がある。完全長哺乳類 rec-PrP から生成した3つのコンフォメーション (モノマー、可溶性オリゴマー、フィブリル) を用いて培養細胞と初代培養ニューロン細胞で調べられている (Novitskaya et al., 2006)。これらの研究から、可溶性オリゴマーとフィブリルは、細胞傷害性が強く、アポトーシスを誘導することが明らかになっている。また、siRNA による内在性 PrP<sup>C</sup>発現の抑制が、全長 rec-PrP から生成されたオリゴマーおよびフィブリルの細胞傷害性を無効にすることも見出されている (Novitskaya et al., 2006) (表 I)。これらの結果から、オリゴマーやフィブリルの細胞傷害性には内在性 PrP<sup>C</sup>が介在していることが明らかである。しかし、別の研究では、フィブリルのみがヒト胚性奇形癌 NTERA2 細胞に細胞傷害を引き起こすことが示されている (Novitskaya et al., 2007) (表 I)。細胞傷害性と PrP のコンフォメーションとの関連を理解するには、さらなる研究が必要と思われる。

## 3. PrP ペプチドの細胞傷害性

前段の研究とは別に PrP の細胞傷害性についてペプチドを使った多くの研究が、残基 106-126、残基 82-146、118-135、および残基 127-147 などの PrP フラグメントを用いて行われている (表 I)。

### 1) PrP<sub>106-126</sub>

これらのペプチドのなかで、PrP<sub>106-126</sub>は、 $\beta$ シートコンフォメーション、アミロイドフィブリルの形成およびプロテイナーゼ K に対する部分的な耐性などの PrP<sup>Sc</sup>の特徴の一部を持っているため多くの研究で使用されてきている。PrP<sub>106-126</sub>を用いた研究から、PrP<sub>106-126</sub>から形成されたフィブリルとオリゴマーの両方が細胞に対して傷害性を持つ (Forloni et al., 1993, Brown et al., 1996, Gu et al., 2002, Kaye et al., 2003) ことや、PrP<sub>106-126</sub>に起因する細胞傷害性には内在性の PrP<sup>C</sup>が、不可欠であることなどが明らかにされている (Brown et al., 1994, Jobling et al., 1999, Fioriti et al., 2005) (表 I)。

## 2) PrP<sub>82-146</sub>

ゲルストマン・ストロラー・シャインカー病に関連するアミロイドの主成分である PrP<sub>82-146</sub> から生成したフィブリルが、ラットおよびマウスの胚から調製された皮質ニューロン細胞に対してアポトーシスシグナルを誘導し、細胞傷害性を示すことが明らかにされている (Fioriti et al., 2007) (表 I)。しかし、この結果とは対照的に、PrP 遺伝子欠損マウスに由来する皮質ニューロン細胞に対しては、PrP<sub>82-146</sub> から生成されたフィブリルは、弱い細胞傷害性しか示さないことも同時に報告されている (Fioriti et al., 2007) (表 I)。これらの結果は、PrP<sub>82-146</sub> から生成したフィブリルによって引き起こされる細胞傷害性は、複数のルートで生じていて、そのうちのいくつかに内在性 PrP<sup>C</sup> が関与していることを示唆している。

フィブリルによって引き起こされる傷害性が、膜の不安定化やイオン透過性を起こす細孔の形成など、PrP<sup>C</sup> に依存しない方法で発生する可能性がある (Demuro et al., 2005)。実際、PrP<sub>82-146</sub> は、人工膜でイオンチャネルを形成し (Bahadi et al., 2003)、膜の流動性を変化させることが示されている (Salmona et al., 2003)。さらに、細胞膜コレステロールのレベルを低下させるスクアレニンターゼの阻害剤であるスクアレスタチンが、PrP<sub>82-146</sub> の傷害作用に拮抗することが示されている (Bate et al., 2004)。したがって、おそらく PrP<sub>82-146</sub> から生成されたフィブリルには構造的に異なるドメインが存在し、その異なるドメインによって誘発される細胞傷害性に内在性の PrP<sup>C</sup> に依存するルート、あるいは内在性の PrP<sup>C</sup> に依存しないルートがあることが示唆される (Fioriti et al., 2007) (表 I)。

## 3) PrP<sub>118-135</sub> と PrP<sub>127-147</sub>

PrP<sub>118-135</sub> を用いた研究から、PrP<sub>118-135</sub> から生成した非フィブリルは、内在性の PrP<sup>C</sup> の発現とは無関係に *in vivo* および *in vitro* で細胞傷害性を誘発することが報告されている (Pillot et al., 2000, Chabry et al., 2003) (表 I)。

また、PrP<sub>127-147</sub> を用いた研究から、PrP<sub>127-147</sub> から生成したフィブリルが、コレステロールが豊富な領域に結合して細胞傷害性を誘導することが示唆されている (Tagliavini et al., 1993, Rymer et al., 2000) (表 I)。

## 4. N 末端ドメイン由来の PrP ペプチドの細胞傷害性

PrP の N 末端ドメインから生成するオリゴマーまたはフィブリルには細胞傷害性があるのか興味を持たれる。N 末端ドメインに欠失がある rec-PrP を使用した複数の研究からは、N 末端ドメインは、PrP のフィブリル形成に必要ではなく、また、PrP の細胞傷害性にも直接関与していないとされている (Charco et al., 2017)。

しかし、いくつかのタイプの家族性 CJD では、N 末端ドメインの銅結合部位であるオクタペプ

チド配列の数の増加が、その特徴とされている (Goldfarb et al., 1991, Campbell et al., 1996)。さらに、オクタペプチド配列の挿入変異を伴う PrP<sup>Sc</sup>を発現するトランスジェニックマウスでは、運動失調を特徴とし、神経病理学的に PrP の沈着、アストログリオシス、および小脳顆粒ニューロンの大量アポトーシスを特徴とする致命的な神経傷害を発症することが報告されている (Chiesa et al., 1998, Chiesa et al., 2000)。

また、ゲルストマン・ストロスラー・シャインカー様疾患に関連する Y145Stop PrP 変異体に対応する rec-PrP<sub>23-144</sub>が、自発的にアミロイドフィブリルを形成する (Kundu et al., 2003, Vanik et al., 2004, Jones et al., 2005, Abdallah et al., 2012) ことや感染性も示すことも報告されている (Choi et al., 2016) (表 I)。これらの結果から、N 末端ドメインから生成するフィブリルにも細胞傷害性があると考えられる。

前述した rec-PrP<sub>23-144</sub>とは異なるが、私たちは4つの保存されたオクタペプチド配列 (Octa4、残基 60-91) と1つの部分的なりビート (残基 92-98) を含む rec-PrP<sub>23-98</sub>、全長 rec-PrP<sub>23-231</sub>や PrP ペプチド (Octa4) が、*in vitro* で、ヌクレオチド (NADPH や ATP など) と銅イオンの共存下で、アミロイド様の球状凝集体 (オリゴマー) に変化することを見出している。これらの凝集体は、プロテイナーゼ K 耐性を獲得し、Neuro2a 細胞へのアポトーシス誘導による細胞傷害性や海馬細胞株 HpL3-4 へ傷害性を示すことが報告されている (Shiraishi et al., 2006, 2009, 2011, 2020, 白石, 2012, 白石他, 2017) (表 I)。また、カルレチキユリンや BiP などのシャペロンが、*in vitro* での rec-PrP<sub>23-98</sub>の凝集に影響を与えることも同時に観察している (平野他, 2014, Shiraishi et al., 2016)。

これらの報告のなかで、PrP 遺伝子欠損マウスから樹立された海馬細胞株 HpL3-4 での、PrP<sub>23-98</sub>凝集体によって誘導される細胞傷害性について調べ、野生型 PrP を発現する HpL3-4-PrP 細胞と HpL3-4 細胞の両方の生存率を著しく低下させることが明らかになっている (Shiraishi et al., 2009)。これらの結果は、PrP<sub>23-98</sub>凝集体の傷害性が、内在性 PrP<sup>C</sup>に依存しない効果に起因することを示唆している。前述した PrP<sub>82-146</sub>の研究報告で示されたように、PrP<sub>23-98</sub>凝集体は、膜の不安定化やイオン透過性細孔の形成など、内在性の PrP<sup>C</sup>に依存しない傷害性を誘導する可能性があると考えられ、今後検討する必要があると思われる。

表 I PrP と PrP ペプチドによる凝集体形成と細胞傷害性

| ペプチド                             | 凝集体の形状             | 細胞傷害性           | 細胞傷害への内在性 PrP <sup>C</sup> 関与 | その他の特徴             | 文 献  |
|----------------------------------|--------------------|-----------------|-------------------------------|--------------------|--|
| PrP <sub>27-30</sub> (残基 90-231) | aggregated forms   | 有り              | 関与                            | PK 耐性<br>アポトーシスの誘導 | Giese et al. (1998),<br>Post et al. (2000),<br>Hetz et al. (2003)  |
| rec-PrP (全長)                     | フィブリル<br>オリゴマー     | 有り<br>有り        | 関与<br>関与                      | アポトーシスの誘導          | Novitskaya et al. (2006, 2007)   |
| PrP <sub>106-126</sub>           | フィブリル<br>オリゴマー     | 有り<br>有り        | 関与<br>関与                      | PK 耐性<br>PK 耐性     | Forloni et al. (1993),<br>Brown et al. (1994, 1996),<br>Jobling et al. (1999),<br>Gu et al. (2002),<br>Kayed et al. (2003),<br>Fioriti et al. (2005) |
| PrP <sub>82-146</sub>            | フィブリル<br><br>フィブリル | 有り<br><br>弱い傷害性 | 関与と無関係の二つの経路                  | アポトーシスの誘導          | Bahadi et al. (2003),<br>Salmona et al. (2003),<br>Bate et al. (2004),<br>Fioriti et al. (2007)  |
| PrP <sub>118-135</sub>           | 非フィブリル             | 有り              | 無関係                           |                    | Pillot et al. (2000),<br>Chabry et al. (2003)  |
| PrP <sub>127-147</sub>           | フィブリル              | 有り              |                               | 膜への結合              | Tagliavini et al. (1993),<br>Rymer et al. (2000)   |
| rec-PrP <sub>23-144</sub>        | フィブリル              | 有り              | 関与                            | PK 耐性<br>感染性       | Kundu et al. (2003),<br>Vanik et al. (2004),<br>Jones et al. (2005),<br>Abdallah et al. (2012),<br>Choi et al. (2016)                                |
| rec-PrP <sub>23-98</sub>         | オリゴマー              | 有り              | 無関係                           | PK 耐性<br>アポトーシスの誘導 | Shiraishi et al. (2006, 2009, 2011, 2020),<br>白石 (2012),<br>白石他 (2017)   |

PK, プロテイナーゼ K

## 参考文献

- Abdallah, A., Wang, P., Richt, J. A. et al., 2012. Y145Stop is sufficient to induce de novo generation prions using protein misfolding cyclic amplification. *Prion* 6:81-88.
- Aguzzi, A., Miele, G., 2004. Recent advances in prion biology. *Curr Opin Neurol* 17:337-342.
- Aguzzi, A., Polymenidou, M., 2004. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* 116:313-327.
- Aguzzi, A., Calella, A. M., 2009. Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev* 89: 1105-1152.
- Aronoff-Spencer E., Burns, C. S., Avdievich, N. I. et al., 2000. Identification of the Cu<sup>2+</sup> binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy. *Biochemistry* 39: 13760-13771.
- Appel, T. R., Dumpitak, C., Matthiesen, U. et al., 1999. Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold. *Biol Chem* 380:1295-1306.
- Bahadi, R., Farrelly, P. V., Kenna, B. L. et al., 2003. Channels formed with a mutant prion protein PrP(82-146) homologous to a 7-kDa fragment in diseased brain of GSS patients. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C862-872.
- Bate, C., Salmona, M., Diomede, L. et al., 2004. Squalastatin cures prion-infected neurons and protects against prion neurotoxicity. *J Biol Chem* 279:14983-14990.
- Bonomo, R. P., Imperlizzeri, G., Pappalardo, G. et al., 2000. Copper (II) binding modes in the prion octapeptide PHGGGWGQ: a spectroscopic and voltammetric study. *Chemistry* 6:4195-4202.
- Brandner, S., Jaunmuktane, Z., 2017. Prion disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133:197-222.
- Brown, D. R., 2001. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci* 24, 85-90.
- Brown, D. R., Herms, J., Kretzschmar, H. A., 1994. Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. *Neuroreport* 5:2057-2060.
- Brown, D. R., Schmidt, B., Kretzschmar, H. A., 1996. Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 380:345-347.
- Burns, C. S., Aronoff-Spencer, E., Legname, G. et al., 2003. Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. *Biochemistry* 42:6794-803.
- Campbell, T. A., Palmer, M. S., Will, R. G. et al., 1996. A prion disease with a novel 96-base pair insertional mutation in the prion protein gene. *Neurology* 46:761-766.
- Chabry, J. C., Ratsimanohatra, C., Sponne, I. et al., 2003. In vivo and in vitro neurotoxicity of the human prion protein (PrP) fragment P118-135 independently of PrP expression. *J Neurosci* 23: 462-469.
- Charco, J. M., Eraña, H., Venegas, V. et al., 2017. Recombinant PrP and its contribution to research on transmissible spongiform encephalopathies. *Pathogens* 6:67-86.



- Chiesa, R., Piccardo, P., Ghetti, B. et al., 1998. Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron* 21:1339-1351.
- Chiesa, R., Drisaldi, B., Quaglio, E. et al., 2000. Accumulation of protease-resistant prion protein (PrP) and apoptosis of cerebellar granule cells in transgenic mice expressing a PrP insertional mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5574-5579.
- Choi, J. K., Cali, I., Surewicz, K. et al., 2016. Amyloid fibrils from the N-terminal prion protein fragment are infectious. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:13851-13856.
- Corsaro, A., Thellung, S., Villa, V. et al., 2012. Role of prion protein aggregation in neurotoxicity. *Int J Mol Sci* 13:8648-8669.
- Daggett, V., 1998. Structure-function aspects of prion proteins. *Curr Opin Biotechnol* 9:359-365.
- Del Rio, J. A., Ferrer, I., Gavin, R., 2018. Role of cellular prion protein in interneuronal amyloid transmission. *Prog Neurobiol* 165-167:87-102.
- Demuro, A., Mina, E., Kaye, R. et al., 2005. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* 280:17294-17300.
- Fioriti, L., Angeretti, N., Colombo, L. et al., 2007. Neurotoxic and gliotrophic activity of a synthetic peptide homologous to Gerstmann-Straussler-Scheinker disease amyloid protein. *J Neurosci* 27:1576-1583.
- Fioriti, L., Quaglio, E., Massignan, T. et al., 2005. The neurotoxicity of prion protein (PrP) peptide 106-126 is independent of the expression level of PrP and is not mediated by abnormal PrP species. *Mol Cell Neurosci* 28:165-176.
- Ford, M. J., Burton, L. J., Morris, R. J. et al., 2002. Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* 113:177-192.
- Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R. et al., 1993. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362:543-546.
- Giese, A., Brown, D. R., Groschup, M. H. et al., 1998. Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol* 8:449-457.
- Goldfarb, L. G., Brown, P., McCombie, W. R. et al., 1991. Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10926-10930.
- Gu, Y., Fujioka, H., Mishra, R. S. et al., 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. et al., 2003. Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *Embo J* 22:5435-5445.
- Hureau, C., Charlet, L., Dorlet, P. et al., 2006. A spectroscopic and voltammetric study of the pH-dependent Cu (II) coordination to the peptide GGGTH: relevance to the fifth Cu(II) site in the prion protein. *J Biol Inorg Chem* 11:735-44.

- Jackson, G. S., Murray, I., Hosszu, L. L. et al., 2001. Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8531-8535.
- Jobling, M. F., Stewart, L. R., White, A. R. et al., 1999. The hydrophobic core sequence modulates the neurotoxic and secondary structure properties of the prion peptide 106-126. *J Neurochem* 73:1557-1565.
- Jones, C. E., Abdelraheim, S. R., Brown, D. R. et al., 2004. Preferential Cu<sup>2+</sup> coordination by His96 and His111 induces beta-sheet formation in the unstructured amyloidogenic region of the prion protein. *J Biol Chem* 279:32018-32027.
- Jones, E. M., Surewicz, W. K., 2005. Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids. *Cell* 121:63-72.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L. et al., 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300:486-489.
- Klewpatinond, M., Viles, J. H., 2007. Fragment length influences affinity for Cu<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> binding to His96 or His111 of the prion protein and spectroscopic evidence for a multiple histidine binding only at low pH. *Biochem J* 404:393-402.
- Kuczius, T., Buschmann, A., Zhang, W. et al., 2004. Cellular prion protein acquires resistance to proteolytic degradation following copper ion binding. *Biol Chem* 385:739-747.
- Kundu, B., Maiti, N. R., Jones, E. M. et al., 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.
- Legname, G., 2017. Elucidating the function of the prion protein. *PLoS Pathog* 13:e1006458.
- Linden, R., Martins, V. R., Prado, M. A. et al., 2008. Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 88:673-728.
- Lu, B., Zhao, L., Qin, K., 2018. Copper induces structural changes in N-terminus of human prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 499:470-474.
- Miele, G., Alejo Blanco, A. R., Baybutt, H. et al., 2003. Embryonic activation and developmental expression of the murine prion protein gene. *Gene Expr*. 11:1-12.
- Novitskaya, V., Bocharova, O. V., Bronstein, I. et al., 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. et al., 2007. Amyloid fibrils of mammalian prion protein induce axonal degeneration in NTERA2-derived terminally differentiated neurons. *J Neurochem* 102:398-407.
- Pillot, T., Drouet, B., Pincon-Raymond, M. et al., 2000. A nonfibrillar form of the fusogenic prion protein fragment [118-135] induces apoptotic cell death in rat cortical neurons, *J Neurochem* 75:2298-2308.
- Post, K., Brown, D. R., Groschup, M. H. et al., 2000. Neurotoxicity but not infectivity of prion proteins can be induced reversibly in vitro. *Arch Virol Suppl* 265-273.

- Prusiner, S. B., 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252:1515-1522.
- Prusiner, S. B., 1998. Prions *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13363-1383.
- Prusiner, S. B., Scott, M. R., DeArmond, S. J. et al., 1998. Prion protein biology. *Cell* 93:337-348.
- Qin, K., Yang, D. S., Yang, Y. et al., 2000. Copper (II)-induced conformational changes and protease resistance in recombinant and cellular PrP. Effect of protein age and deamidation. *J Biol Chem* 275:19121-1931.
- Quaglio, E., Chiesa, R., Harris, D. A., 2001. Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform. *J Biol Chem* 276:11432-11438.
- Rymer, D. L., Good, T. A., 2000. The role of prion peptide structure and aggregation in toxicity and membrane binding. *J Neurochem* 75:2536-2545.
- Salmona, M., Morbin, M., Massignan, T. et al., 2003. Structural properties of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease amyloid protein. *J Biol Chem* 278:48146-48153.
- Sánchez-López, C., Rossetti, G., Quintanar, L. et al., 2018. Structural determinants of the prion protein N-terminus and its adducts with copper ions. *Int J Mol Sci* 20:18-32.
- Shiraishi, N., Ohta, Y., Nishikimi, M., 2000. The octapeptide repeat region of prion protein binds Cu (II) in the redox-inactive state. *Biochem Biophys Res Commun* 267:389-402.
- 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.
- Shiraishi, N., Inai, Y., Hirano, Y. et al., 2011. Calreticulin inhibits prion protein PrP-(23-98) aggregation in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem* 75:1625-1627.
- Shiraishi, N., Hirano, Y., 2016. Effect of chaperones on prion protein PrP<sub>23-98</sub> aggregation in vitro. *Protein Pept Lett* 23:988-993.
- Shiraishi, N., Hirano, Y., 2020. Combination of copper ions and nucleotide generates aggregates from prion protein fragments in the N-terminal domain. *Protein Pept Lett* 27:782-792.
- Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G. et al., 2005. The most infectious prion protein particles. *Nature* 437:257-261.
- Tagliavini, F., Prelli, F., Verga, L. et al., 1993. Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9678-9682.
- Tichopad, A., Pfaffl, M. W., Didier, A., 2003. Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: Quantification using real-time RT-PCR. *Mol Cell Probes* 17:5-10.
- Vanik, D. L., Surewicz, K. A., Surewicz, W. K., 2004. Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions. *Mol Cell* 14 : 139-145.
- Viles, J. H., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. et al., 1999. Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:

2042-2047.

- Whittal, R. M., Ball, H. L., Cohen, F. E. et al., 2000. Copper binding to octarepeat peptides of the prion protein monitored by mass spectrometry. *Protein Sci* 9:332-343.
- Wong, B. S., Vénien-Bryan, C., Williamson, R. A. et al., 2000. Copper refolding of prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 276:1217-1224.
- Wulf, M. A., Senatore, A., Aguzzi, A., 2017. The biological function of the cellular prion protein: an update. *BMC Biol* 15:34-46.
- Yen, C. F., Harischandra, D. S., Kanthasamy, A. et al., 2016. Copper-induced structural conversion templates prion protein oligomerization and neurotoxicity. *Sci Adv* 2:e1600014.
- Zou, W.Q., Zheng, J., Gray, D. M. et al., 2004. Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1380-1385.
- 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 細胞に対する細胞傷害性. 東海学園大学研究紀要 自然科学研究編 第17号:39-45.
- 白石則之, 平野義晃, 2017. ヌクレオチドと  $\text{Cu}^{2+}$  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. 東海学園大学研究紀要 自然科学研究編 第21号:14-22.
- 平野義晃, 白石則之, 2014. プリオンタンパク質 PrP-(23-98) の in vitro での凝集への BiP とカルレティキュリンの影響. 東海学園大学研究紀要 自然科学研究編 第19号:33-44.