

## 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

Effect of BiP and calreticulin on the aggregation  
of prion protein PrP-(23-98) *in vitro*

平野 義晃, 白石 則之\*

Yoshiaki HIRANO, Noriyuki SHIRAISHI

東海学園大学 健康栄養学部 管理栄養学科

Department of Nutrition, Tokai Gakuen University

キーワード：プリオンタンパク質、凝集、BiP、カルレティキュリン

Key words : prion protein, aggregation, BiP, calreticulin

### 要約

最近、プリオン蛋白質 PrP-(23-98) が、Cu<sup>2+</sup>イオンと NADPH の共存下で、プロテイナーゼ K に対して分解抵抗性をもつアミロイド様の球状凝集体へ重合することが明らかにされている。さらに、この凝集が、レクチンシャペロンであるカルレティキュリン (CRT) により阻害されることも示されている。我々は、本研究で、CRT が NADPH より普遍的に存在する ATP と Cu<sup>2+</sup>イオン共存下における *in vitro*での PrP-(23-98) の凝集を阻害するかどうか、また、Hsp70 の同族体である BiP が、Cu<sup>2+</sup>イオンと NADPH の共存下での PrP-(23-98) の凝集を阻害するかどうかを調べた。実験結果から、CRT が、ATP と Cu<sup>2+</sup>イオン共存下における PrP-(23-98) の凝集を抑制することや、生成した凝集体の崩壊を促進することが示された。CRT の結果と異なり、BiP は、PrP-(23-98) の凝集を抑制せず、逆に、不規則な形状の凝集体が生成した。この凝集体は、アミロイド様でなく、プロテイナーゼ K により分解された。

### Abstract

Prion protein (PrP)-(23-98) has been recently shown to polymerize into amyloid-like, proteinase K-resistant spherical aggregates *in vitro* in the presence of NADPH plus copper ions. Calreticulin (CRT), which is a lectin chaperone, has been shown to suppress NADPH+Cu<sup>2+</sup>-induced PrP-(23-98) aggregation. In this study, we tested whether CRT inhibits PrP-(23-98) aggregation in the presence of ATP, which is more ubiquitous than NADPH, and whether BiP, the ER homologue of Hsp70, inhibits PrP-(23-98)

aggregation in the presence of NADPH plus copper ions. The results showed that CRT suppressed PrP-(23-98) aggregation in the presence of ATP plus copper ions, and that CRT also solubilized the PrP-(23-98) aggregates produced with ATP plus copper ions. Unlike CRT, BiP did not inhibit the formation of PrP-(23-98) aggregates. Upon the addition of BiP, irregularly-shaped aggregates of PrP-(23-98) were observed in the presence of copper ions. These aggregates were not amyloid-like as demonstrated by Congo red binding test, and were sensitive to proteinase K.

## 序論

プリオンタンパク質は、主に神経細胞やリンパ細胞の細胞膜に存在するグルコシルホスファチジルイノシトールアンカー型の膜タンパク質である。このタンパク質の機能については多くの研究が行われているが、未だ明確になっていない (Aguzzi A, Calella AM, 2009)。

羊のスクレイピー、牛の牛海綿状脳症、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、正常型のプリオンタンパク質が、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 (Aguzzi A, Calella AM, 2009)。伝達性および遺伝性のプリオン病での神経の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が開発され研究が進められているが (Matus S et al, 2008)、プリオンタンパク質のミスフォールディングが神経機能に与える影響についての明確なメカニズムは、十分には明らかにされていない。

XBP-1 のスプライシングや小胞体 (ER) ストレスにリンクしている JNK および ERK のようなストレスシグナル伝達経路の活性化が、スクレイピー感染マウスで観察されることが報告されている (Matus S et al, 2008)。また、ヒトの CJD とモデルマウスの脳では、unfolded protein response (UPR) 応答性シャペロンである BiP、Grp94 そして Grp58 のアップレギュレーションが認められている (Yoo BC et al, 2002; Hetz C et al, 2003; Hetz C et al, 2005; Brown AR et al, 2005)。更に、CJD 患者からの脳サンプルのプロテオーム解析から、Grp58 が、CJD に罹患したヒト患者の小脳に高度発現していることが明らかにされている (Yoo BC et al, 2002)。これらのシャペロンは、ミスフォールドしたタンパク質の凝集を減少させることや凝集体をプロテアソームによる分解へと向かわせる作用があることが示されている (Sitia R, Braakman I, 2003)。これらの報告以外にも、BiP が突然変異型プリオンタンパク質 (PrP<sup>Q217R</sup>) のプロテアソームでの分解に関与することや Grp58 が異常型プリオンタンパク質 PrP<sup>Sc</sup> の細胞障害性を抑制することなども明らかにされている (Jin T et al, 2000; Hetz C et al, 2005)。しかし、プリオンタンパク質の生成過程での ER シャペロンの役割については依然不明の点が多

く残されている。

ER には、多様な分子シャペロンのグループが存在している (Hebert DN, Molinari M, 2007)。BiP、Grp94、および co-chaperones のような熱ショックタンパク質ファミリー、そして、カルネキシン (CNX)、カルレティキュリン (CRT)、ER degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein のようなレクチンシャペロンなどである。これらのなかで、BiP は、ATP アーゼドメインとペプチド結合ドメインとをもつ Hsp70 の小胞体の同族型である (Hebert DN, Molinari M, 2007)。CNX は 90-kDa の I 型小胞体膜タンパク質で、そして CRT は C 末端に KDEL シグナル配列を持つ 60-kDa の可溶性の小胞体内腔に存在するタンパク質である (Hebert DN, Molinari M, 2007)。複数の研究から、CNX の ER の内腔側の可溶性ドメインである S-CNX、そして CRT および BiP が *in vitro* で、非グリコシル化タンパク質に結合特性を有することが示されている (Ihara Y et al, 1999; Saito Y et al, 1999; Stronge VS et al, 2001; Williams DB, 2006; Wang W et al, 2010)。そのため、S-CNX、CRT そして BiP は、クエン酸合成酵素 (CS)、リンゴ酸脱水素酵素、およびプリオンタンパク質などでの熱誘導によるタンパク質の凝集を抑制し、リフォールディングを促進する効果を持っている (Ihara Y et al, 1999; Saito Y et al, 1999; Stronge VS et al, 2001; Williams DB, 2006; Wang W et al, 2010)。

我々は、これまでに NADPH や ATP などのヌクレオチドと  $\text{Cu}^{2+}$  イオン共存下で、N 末端 76 残基からなるリコンビナントタンパク質 (PrP-(23-98)) と全長 (PrP-(23-231)) タンパク質の凝集が起こることや (Shiraishi N et al, 2006)、それらの凝集体による細胞傷害性 (Shiraishi N et al, 2009)、そして、NADPH と  $\text{Cu}^{2+}$  イオン共存下での PrP-(23-98) の凝集を、CRT が阻害することを報告している (Shiraishi N et al, 2011)。本研究では、CRT が NADPH より普遍的に存在する ATP と  $\text{Cu}^{2+}$  イオン共存下における *in vitro* での PrP-(23-98) の凝集を阻害するかどうか、また、Hsp70 の同族体である BiP が、 $\text{Cu}^{2+}$  イオンと NADPH の共存下での PrP-(23-98) の凝集を阻害するかどうかを調べた。

## 実験方法

### PrP-(23-98) の精製

PrP-(23-98) (8.8 kDa) の発現と精製は既に報告されている方法に従って行った (Shiraishi et al, 2006) PrP-(23-98) の濃度はトリプトファンとチロシンの 280nm での分子吸収係数から計算した  $36,334 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  を用いて分光学的方法で求めた。

### CRT の精製

CRT (48 kDa) と GST との融合タンパク質を発現させた大腸菌から上清を調整した (Saito

Y et al, 1999)。上清を Glutathione Sepharose4B カラムに添加し、結合バッファーと PBS で洗浄後、溶出バッファー (0.15 M NaCl、20 mM GSH、50 mM Tris-HCl、pH 8.0) で融合タンパク質を溶出した。PreScission protease 反応バッファー (150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM DTT、50 mM Tris-HCl、pH 7.0) に対して透析後、5°Cで一晩の PreScission protease 処理を行った。処理後、Glutathione Sepharose4B カラムを通して PreScission protease と GST を除いた。CRT を含む素通り画分は 5 mM MES (pH 7.4) に対して一晩透析を行い、得られた試料は濃縮後-80°Cで保存した。CRT の濃度はトリプトファンとチロシンの 280 nm での分子吸収係数から計算した  $80,510 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  を用いて分光学的方法で求めた。

### BiP の精製

BiP (73 kDa) と His-タグとの融合タンパク質を発現させた大腸菌を結合バッファー (0.5 M NaCl、40 mM imidazole、1% sarcosyl、1% Triston X-100、20 mM Tris-HCl、pH 7.4) に懸濁して、超音波で破碎し、遠心により上清を回収した (Stronge VS et al, 2001)。上清を Ni-Sepharose カラムに添加し、洗浄バッファー (0.5 M NaCl、40 mM imidazole、20 mM Tris-HCl、pH 7.4) で洗浄後、溶出バッファー (0.5 M NaCl、500 mM imidazole、20 mM Tris-HCl、pH 7.4) で融合タンパク質を溶出した。溶出画分は 5 mM MES (pH 7.4) に対して一晩透析を行った。得られた試料は濃縮後-80°Cで保存した。BiP の濃度はトリプトファンとチロシンの 280 nm での分子吸収係数から計算した  $28,020 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  を用いて分光学的方法で求めた。

### PrP-(23-98) と CS の凝集

$5 \mu\text{M}$  PrP-(23-98)、 $20 \mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$ 、 $500 \mu\text{M}$  ヌクレオチド、そして 50 mM MES (pH 7.4) を含む反応液を 25°Cでインキュベートし、凝集の状態を 450 nm の吸光度の変化でモニターした。あるいは、反応液を 96 穴マイクロプレートに分注し 25°Cでインキュベート後、マイクロプレートリーダーで各ウエルの吸光度を 450 nm で測定した (Shiraishi et al, 2006)。

ブタ心臓由来 CS (Sigma-Aldrich) は、NAP-10 カラムでの精製後実験に用いた。50 mM MES (pH 7.4)、5 mM  $\text{CaCl}_2$ 、 $4 \mu\text{M}$  CS、BiP ( $0.5\text{-}2 \mu\text{M}$ ) を含む反応液を 42°Cで 1 時間インキュベートした。反応液を 96 穴マイクロプレートに分注し、マイクロプレートリーダーで各ウエルの吸光度を 450 nm で測定した (Stronge VS et al, 2001)。

### コンゴレッド結合

前述した条件で調製した凝集体の吸収スペクトルを測定した。その後、コンゴレッドを終濃度  $5 \mu\text{M}$  になるように加えて吸収スペクトルの変化を測定した。

## プロテイナーゼ K

生成した凝集体 (PrP-(23-98)として  $10 \mu\text{M}$ ) にプロテイナーゼ K (PK と PrP-(23-98) の割合は 1 : 5 ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )) を加えて、 $37^\circ\text{C}$ で 60 分間インキュベートした。PMSF の添加により反応を止め、SDS-PAGE サンプル緩衝液を加えた後、 $95^\circ\text{C}$ で 5 分間の処理を行った。PrP-(23-98) の分解を SDS-PAGE 後の免疫染色で定量した。

## ウエスタンブロットと免疫染色

SDS-PAGE 後、タンパク質のニトロセルロースメンブランへの転写を 66V, 1 時間で行った。転写終了後、1 次抗体として prion protein monoclonal antibody SAF32 (Cayman Chemical Co) (1,000 倍希釈)、2 次抗体として HRP 標識抗体 (Chemicon International Inc) (5,000 倍希釈) を用いてプリオンタンパク質の検出を行った。ECL Western blotting detection reagents (Amersham Biosciences Corp) を用いて化学発光によりバンドの検出を行い、CCD カメラで記録した。

## 顕微鏡像

光学顕微鏡を用いて凝集体の明視野観察を行った。

## 結果と考察

### CRT による PrP-(23-98) の凝集の阻害

NADPH と  $\text{Cu}^{2+}$  イオン共存下での PrP-(23-98) の凝集を、CRT が阻害することが報告されていることから (Shiraishi N et al, 2011)、他のヌクレオチド下での凝集でも同様な現象が認められるかを明らかにするため、普遍的に細胞内に存在する ATP と  $\text{Cu}^{2+}$  イオン共存下での PrP-(23-98) の凝集への CRT の影響を調べた。

$\text{Cu}^{2+}$  イオンと ATP の共存下で PrP-(23-98) の凝集体生成に伴って吸光度の顕著な上昇が認められたが、NADPH の系と同様に、モル比 1 の CRT 存在下ではその上昇が認められなかった (図 1 A)。CRT による阻害作用は濃度依存的 (モル比で 0.2~1) で ATP の系では 65%から 84%、NADPH の系では 71%から 93%であった (図 1 B)。

PrP-(23-98) の凝集開始前に反応液に CRT が存在することで、ATP あるいは NADPH 誘導による PrP-(23-98) の凝集が阻害されたことから、生成した凝集体を含む反応液へ CRT を添加した場合の影響を調べた。CRT の添加後 (モル比 1)、急激な吸光度の減少が認められ (図 1 C)、凝集体の崩壊が生じていると考えられた。この現象は顕微鏡での明視野観察でも確認された (図 1 D)。また、この崩壊は添加した CRT の濃度 (モル比 0.2~1) に依存していた (図 1 E)。

次に、凝集開始直後に CRT を添加した場合の影響を調べた。凝集体生成過程でも CRT によ

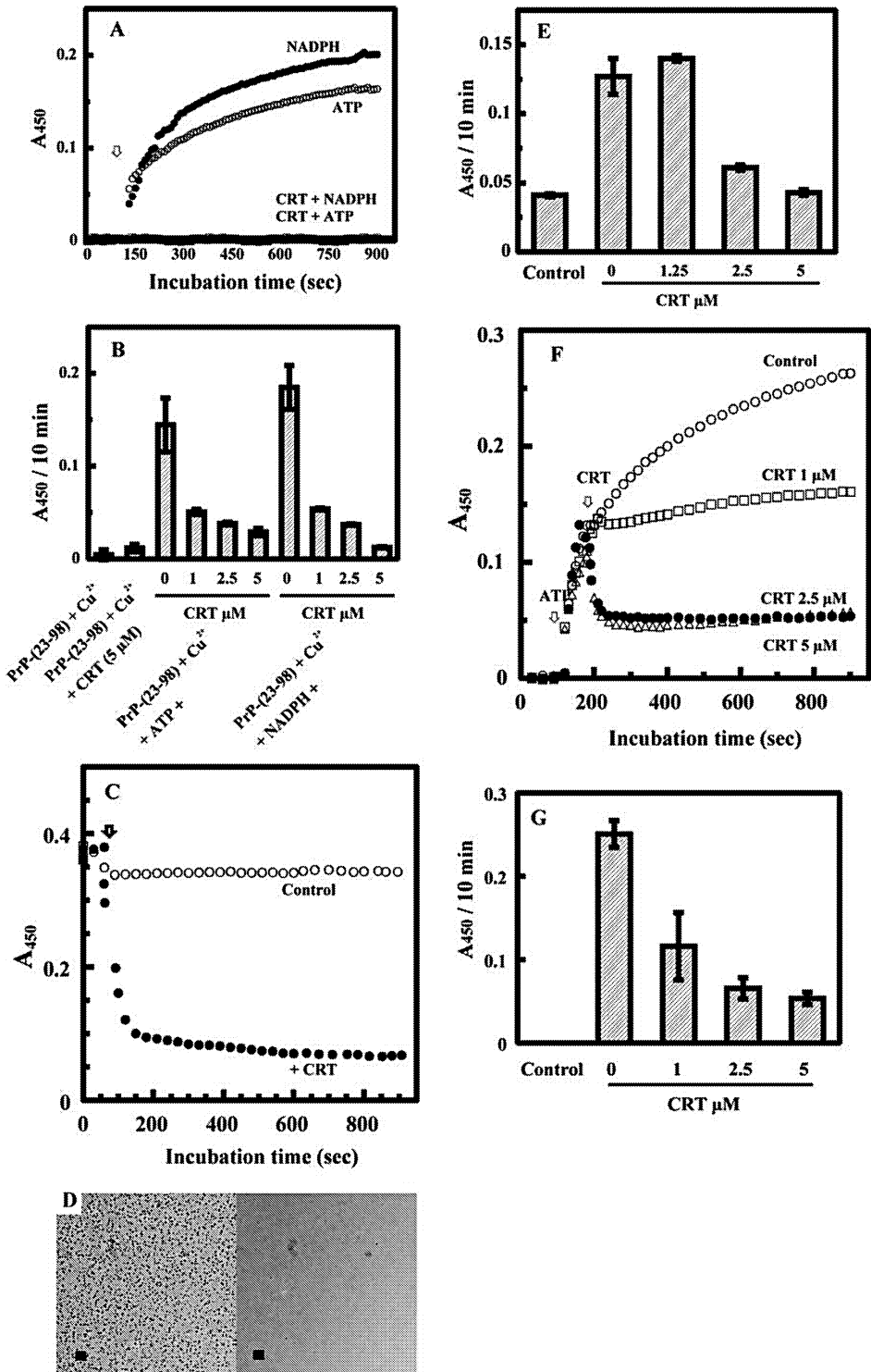


図1 CRTによるPrP-(23-98)の凝集の阻害

A, ヌクレオチドによる PrP-(23-98) の凝集の誘導と CRT による阻害

5M PrP-(23-98)、20  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>、5  $\mu$ M CRT そして 50 mM MES (pH 7.4) を含む反応液を 25  $\mu$ C でインキュベートした。矢印は 500  $\mu$ M ATP あるいは NADPH を添加した時点。ATP, PrP-(23-98)+CuCl<sub>2</sub>+ATP; NADPH, PrP-(23-98)+CuCl<sub>2</sub>+NADPH; CRT+ATP, PrP-(23-98)+CuCl<sub>2</sub>+ATP+CRT; CRT+NADPH, PrP-(23-98)+CuCl<sub>2</sub>+NADPH+CRT.

B, CRT による凝集阻害の濃度依存性

反応条件は A と同じ。反応液を 96 穴マイクロプレートの各ウエルに 200  $\mu$ l ずつ分注し、25°C で 10 分間インキュベートした。マイクロプレートリーダーを用い、各ウエルの吸光度を 450nm で測定した。データは平均値±標準偏差 (n=4)。PrP-(23-98)+Cu<sup>2+</sup>, 5  $\mu$ M PrP-(23-98)+20  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>; PrP-(23-98)+Cu<sup>2+</sup>+CRT, 5  $\mu$ M PrP-(23-98)+20  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>+5  $\mu$ M CRT; PrP-(23-98)+Cu<sup>2+</sup>+ATP+CRT, 5  $\mu$ M PrP-(23-98)+20  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup>+500  $\mu$ M ATP+CRT (1~5  $\mu$ M); PrP-(23-98)+Cu<sup>2+</sup>+NADPH+CRT, 5  $\mu$ M PrP-(23-98)+20  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup>+500  $\mu$ M NADPH+CRT (1~5  $\mu$ M).

C, CRT 存在下での PrP-(23-98) 凝集体の崩壊

5  $\mu$ M PrP-(23-98)、20  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>、500  $\mu$ M ATP、そして 50mM MES (pH 7.4) を含む反応液を 25°C で 10 分間インキュベートすることで凝集体を生成させた。Control, PrP-(23-98)+CuCl<sub>2</sub>+ATP; + CRT, PrP-(23-98)+CuCl<sub>2</sub>+ATP+CRT。矢印は 5  $\mu$ M CRT 添加した時点。Control では CRT の代わりに 5 mM MES (pH 7.4) を同量添加した。

D, 凝集体の明視野観察像

5  $\mu$ M PrP-(23-98)、20  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>、500  $\mu$ M ATP、そして 50mM MES (pH 7.4) を含む反応液を 25°C で 10 分間インキュベート後、5  $\mu$ M CRT を添加 (右パネル) あるいは添加しないで (左パネル)、更に 10 分間インキュベートを続けた。インキュベート終了後、凝集体の明視野観察を行った。倍率は 200 倍、スケールバーは 10  $\mu$ m。

E, PrP-(23-98) 凝集体の CRT による崩壊の濃度依存性

50 mM MES (pH 7.4)、5  $\mu$ M PrP-(23-98)、20  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>、500  $\mu$ M ATP (B) を含む反応液を 25°C で 10 分間インキュベートすることで凝集体を生成させた。その後、各濃度の CRT を加え 96 穴マイクロプレートのウエルに 200  $\mu$ l ずつ分注し、25°C で 10 分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーを用いて各ウエルの吸光度を 450nm で測定した。反応液からヌクレオチドを除いたものを Control とした。データは平均値±標準偏差 (n=4)。

F, PrP-(23-98) の凝集体生成過程での CRT による阻害

5  $\mu$ M PrP-(23-98)、20  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> そして 50 mM MES, (pH 7.4) を含む反応液をインキュベートし 500  $\mu$ M ATP (矢印 ATP) を添加し凝集を開始した。図中矢印 CRT で、各濃度の CRT 添加し、その後の吸光度変化を測定した。Control では CRT の代わりに 5 mM MES (pH 7.4) を同量添加した。

G, 凝集体生成過程での CRT による阻害の濃度依存性

実験条件は D と同じ。ATP 添加により凝集を開始し、1 分後、各濃度の CRT を添加した。CRT 添加 10 分後の吸光度を測定した。反応液からヌクレオチドと CRT を除いたものを Control とした。データは平均値±標準偏差 (n=4)。

りその凝集が濃度依存的（モル比 0.2~1）に阻害された（図 1 F, G）。これらの結果から、CRT には凝集体の生成を阻害する機能や凝集体の崩壊を促進させる機能があることが示唆された。

### BiP による PrP-(23-98) の凝集の阻害

NADPH や ATP などのヌクレオチドと  $\text{Cu}^{2+}$  イオン共存下での PrP-(23-98) の凝集を、CRT が阻害することが明らかにされたことから、次に、同じ ER シャペロンである BiP の PrP-(23-98) 凝集への影響を調べた。5  $\mu\text{M}$  PrP-(23-98)、20  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  そして 50mM MES (pH 7.4) を含む反応液への BiP 添加実験を行った。CRT を用いた実験結果と異なり（図 1 A）、BiP を反応液に添加する（モル比 1）とヌクレオチド非存在下でも予想に反して吸光度の顕著な上昇が認められた（図 2 A）。BiP のみの条件や CRT の添加ではこのような現象は認められなかった（図 2 A）。

BiP による PrP-(23-98) の凝集の誘導という予期しない現象が認められたことから、本実験で用いた BiP の機能が正常であるか否かを検討した。BiP については、CS の熱変性に伴う凝集体の生成を抑制することが報告されていることから（Stronge VS et al, 2001）、本実験に用いた BiP による CS の熱変性の抑制実験を行った。CS の熱変性は BiP の存在により 0.5  $\mu\text{M}$  の濃度で 31%、1  $\mu\text{M}$  で 42%、2  $\mu\text{M}$  で 48%と抑制されていた（図 2 B）。この結果から、本実験に用いた BiP の機能は正常に保たれていると判断した。

次に、PrP-(23-98) の凝集促進作用の BiP の濃度依存性を調べた。PrP-(23-98) の凝集を促進する BiP の影響は濃度依存性（モル比 0.2~1）であった（図 2 C）。この BiP 存在下で生じる PrP-(23-98) の凝集は CRT の添加により強く抑制された（図 2 C）。また、光学顕微鏡で観察した凝集体の形状は、NADPH と  $\text{Cu}^{2+}$  イオン共存下で生成した PrP-(23-98) の凝集体（図 2 D, 左パネル）と異なり、大きく不規則な形状をしていた（図 2 D, 右パネル）。

BiP 存在下で凝集体の生成が認められたことから、アミロイド繊維への結合が知られているコンゴーレッドの凝集体への結合性を調べた。 $\text{Cu}^{2+}$  イオンと NADPH 共存下での PrP-(23-98) の凝集体では、アミロイド繊維の性質を示すコンゴーレッドのスペクトルの長波長側へのピークの移動 red shift が認められたが（図 2 E）、これと比較して、 $\text{Cu}^{2+}$  イオン存在下 BiP と PrP-(23-98) から生じた凝集体のコンゴーレッドのスペクトルでは長波長側へのピークの移動 red shift はほとんど認められなかった（図 2 E）。次に、生成した凝集体の PK 抵抗性を調べた（図 2 F）。 $\text{CuCl}_2$  存在下での PrP-(23-98)（レーン 2）や  $\text{CuCl}_2$  と NADPH 共存下での PrP-(23-98) の凝集体（レーン 4）には抵抗性が認められることは既に報告されているが（Shiraishi N et al, 2006）、これらの結果と対照的に、BiP 存在下で生成した凝集体には抵抗性は認められなかった（レーン 6）。これらの結果から、BiP と PrP-(23-98) から生じた凝集体はアミロイド繊維としての性質を示していないと考えた。



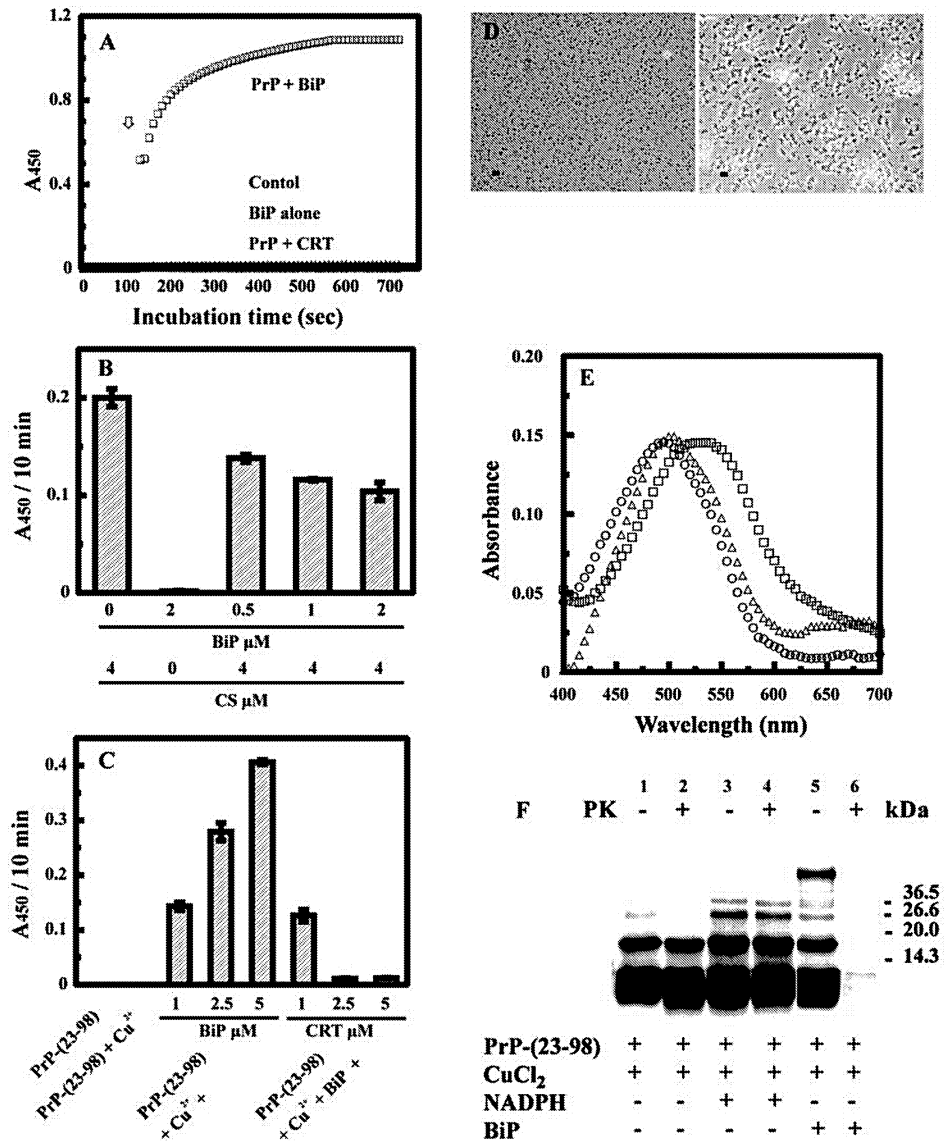


図2 BiPによるPrP-(23-98)の凝集の誘導

A, 凝集による吸光度変化

5 μM PrP-(23-98), 20 μM CuCl<sub>2</sub>そして50 mM MES (pH 7.4)を含む反応液を25°Cでインキュベートした。矢印は5 μM BiPあるいは5 μM CRTを添加した時点。Controlとしては5 mM MES (pH 7.4)を同量添加した。Control, PrP-(23-98)+CuCl<sub>2</sub>; BiP alone, CuCl<sub>2</sub>+BiP; PrP+BiP, PrP-(23-98)+CuCl<sub>2</sub>+BiP; PrP+CRT, PrP-(23-98)+CuCl<sub>2</sub>+CRT。

B, BiPによるCSの熱変性の抑制

50 mM MES (pH 7.4), 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 μM CS, BiP (0.5-2 μM)を含む反応液を42 °Cで1時間インキュベートした。反応液を96穴マイクロプレートに分注し、マイクロプレートリーダーで各ウエルの吸光度を450 nmで測定した。データは平均値±標準偏差 (n=4)。

## C, BiP による凝集促進の濃度依存性

実験条件は A と同じ。各組成の反応液を 96 穴マイクロプレートに分注し 25°C で 10 分間インキュベート後、マイクロプレートリーダーで各ウエルの吸光度を 450 nm で測定した。データは平均値±標準偏差 (n=4)。PrP-(23-98), 5 μM PrP-(23-98) のみ; PrP-(23-98)+Cu<sup>2+</sup>, 5 μM PrP-(23-98)+20 μM CuCl<sub>2</sub>; PrP-(23-98)+Cu<sup>2+</sup>+BiP, 5 μM PrP-(23-98)+20 μM CuCl<sub>2</sub>+BiP (1~5 μM); PrP-(23-98)+Cu<sup>2+</sup>+BiP+CRT, 5 μM PrP-(23-98)+20 μM Cu<sup>2+</sup>+5 μM BiP+CRT (1~5 μM)

## D, 凝集体の明視野観察像

5 μM PrP-(23-98)、20 μM CuCl<sub>2</sub>、500 μM NADPH のインキュベートで生成した凝集体 (左パネル) と 5 μM PrP-(23-98)、20 μM CuCl<sub>2</sub>、5 μM BiP のインキュベートで生成した凝集体 (右パネル) の明視野観察を行った。倍率は 200 倍、スケールバーは 10 μm。

## E, 凝集体へのコンゴローレッドの結合

50 mM MES (pH 7.4)、2 μM PrP-(23-98)、2 μM BiP を 25°C で 10 分間インキュベートした後、スペクトルを測定した。その後、5 μM になるようにコンゴローレッドを加えてスペクトルの変化を測定し、差スペクトルをグラフに示した (○)。同様の条件下で 8 μM CuCl<sub>2</sub> と 500 μM NADPH の存在下で生じた PrP-(23-98) 凝集体 (□) や CuCl<sub>2</sub> 存在下で PrP-(23-98) と BiP から生じた凝集体 (△) の差スペクトルをグラフに示した。

## F, プロテイナーゼ K による凝集体の分解

10 μM PrP-(23-98) と 40 μM CuCl<sub>2</sub> のインキュベートサンプル、10 μM PrP-(23-98)、40 μM CuCl<sub>2</sub> と 500 μM NADPH のインキュベートで生成した凝集体 (PrP-(23-98) として 10 μM) あるいは 10 μM PrP-(23-98)、40 μM CuCl<sub>2</sub> と 10 μM BiP のインキュベートで生成した凝集体 (PrP-(23-98) として 10 μM) にプロテイナーゼ K (PK と PrP-(23-98) の割合は 1:5 (μg/μg)) を加えて (+) あるいは加えないで (-)、37°C で 60 分間インキュベートした。PMSF の添加により反応を止め、SDS-PAGE サンプル緩衝液を加えた後、95°C で 5 分間の処理を行った。SDS-PAGE 後、タンパク質のニトロセルロースメンブランへの転写を 66V, 1 時間で行った。転写終了後、1 次抗体として prion protein monoclonal antibody SAF32、2 次抗体として HRP 標識抗体を用いてプリオンタンパク質の検出を行った。ECL Western blotting detection reagents を用いて化学発光によりバンドの検出を行い、CCD カメラで記録した。

非グリコシル化タンパク質に結合特性を有する S-CNX、そして CRT および BiP が、CS、リソゴ酸脱水素酵素、およびプリオンタンパク質などでの熱誘導によるタンパク質の凝集を抑制し、リフォールディングを促進する効果を示すことが明らかにされている (Ihara Y et al, 1999; Saito Y et al, 1999; Stronge VS et al, 2001; Williams DB, 2006; Wang W et al, 2010)。また、NADPH と Cu<sup>2+</sup> イオン共存下での PrP-(23-98) の凝集を、CRT が阻害することを報告している (Shiraishi N et al, 2011)。

今回の結果でも、CRT は、NADPH と Cu<sup>2+</sup> イオン系での結果と同様に、プリオンタンパク質 PrP-(23-98) の ATP と Cu<sup>2+</sup> イオン共存下での凝集を抑制し、リフォールディングを促進する効果を示した。一方、BiP にはそのような作用は認められなかった。水溶液中で、PrP<sup>Sc</sup> が凝集体を形成するのは、その疎水的領域が、表面に露出し、分子間での疎水性相互作用が生じる

ことで起こると考えられている (Barducci A et al, 2005)。CRT の場合は、CRT が PrP-(23-98) と結合することで、分子間の疎水性相互作用が抑制されたと考えられた。一方、BiP の場合は、BiP が PrP-(23-98) と結合することで、分子間の疎水性相互作用がはたらき凝集体が形成されたと推定した。

## 参考文献

- Aguzzi A, Calella AM, 2009. Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev* 89: 1105–1152.
- Barducci A, Chelli R, Procacci P, Schettino V, 2005. Misfolding pathways of the prion protein probed by molecular dynamics simulations. *Biophys J* 88: 1334-1343.
- Brown AR, Rebus S, McKimmie CS, Robertson K, Williams A, Fazakerley JK, 2005. Gene expression profiling of the preclinical scrapie-infected hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 86–95.
- Hebert DN, Molinari M, 2007. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev* 87: 1377–1408.
- Hetz C, Russelakis-Carneiro M, Maundrell K, Castilla J, Soto C, 2003. Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J* 22: 5435–5445.
- Hetz C, Russelakis-Carneiro M, Wälchli S, Carboni S, Vial-Knecht E, Maundrell K, Castilla J, 2005. The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity. *J Neurosci* 25: 2793-2802.
- Ihara Y, Cohen-Doyle MF, Saito Y, Williams DB, 1999. Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone *in vitro*. *Mol Cell* 4: 331–341.
- Jin T, Gu Y, Zanusso G, Sy M, Kumar A, Cohen M, Gambetti P, Singh N, 2000. The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome. *J Biol Chem* 275: 38699-38704.
- Matus S, Lisbona F, Torres M, León C, Thielen P, Hetz C, 2008. The stress rheostat: an interplay between the unfolded protein response (UPR) and autophagy in neurodegeneration. *Curr Mol Med* 8: 157-172.
- Saito Y, Ihara Y, Leach MR, Cohen-Doyle MF, Williams DB, 1999. Calreticulin functions *in vitro* as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins. *EMBO J* 18: 6718–6729.
- 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, Ihara Y, 2011. Calreticulin inhibits prion protein PrP-(23-98) aggregation in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem* 5: 1625-1627.
- Sitja R, Braakman I, 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426: 891–894.
- Stronge VS, Saito Y, Ihara Y, Williams DB, 2001. Relationship between calnexin and BiP in suppressing aggregation and promoting refolding of protein and glycoprotein substrates. *J Biol Chem* 276: 39779-39787.
- Wang W, Chen R, Luo K, Wu D, Huang L, Huang T, Xiao G, 2010. Calnexin inhibits thermal aggregation and neurotoxicity of prion protein. *J Cell Biochem* 111: 343–349.
- Williams DB, 2006. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 119: 615–623.
- Yoo BC, Krapfenbauer K, Cairns N, Belay G, Bajo M, Lubec G, 2002. Overexpressed protein disulfide isomerase in brains of patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 334: 196–200.

\* 責任筆者連絡先：東海学園大学 健康栄養学部 管理栄養学科、内線 4361  
e-mail: shiraish@tokaigakuen-u.ac.jp