

表1：NSEおよびPCP2-PrPLP Tgマウスの系統数

ベクター名	注入受精卵数	誕生マウス数	生存マウス数	Tgマウス系統数
NSE-PrPLP	255	30	24	3
PCP2-PrPLP	250	56	54	9

特発性プリオン病の疾患感受性因子の研究

班 員：堂浦 克美（九州大・院医・脳研病理）

〔研究要旨〕

特発性プリオン病の感受性因子の候補として、プリオン病動物実験で伝播・発症との関連が報告されている補体蛋白C1qやC3のレセプター(C1q BP, C1q RP, CR1, CR2)と、補体系抑制因子であるclusterinに注目した。12例の特発性患者と5例の対照者において、これらの遺伝子をPCR、DNAシーケンシング、RFLP法で解析して遺伝子多型と疾患との関連を検討した。これまでに検索した中では、CR1に複数のアミノ酸置換を伴う多型とC1q BPにイントロン部の多型が確認された。CR1第26エクソンの多型などが患者群で高率に見られたが、さらに症例数を増やし統計学的検討を加える必要がある。

〔研究目的〕

本邦では年間110例前後のプリオン病の発生が見られるが、そのおよそ9割が特発性（散発性）クロイツフェルト・ヤコブ病である。特発性に発生する外的要因については不明であり、宿主側要因として疾患感受性因子の存在が動物プリオン病の研究より明らかとなっている。本研究は疾患感受性因子保有者の罹患予防や罹患時の早期診断・早期治療ができる基盤を整備するため、疾患感受性因子の探索を行う。

プリオン病の伝播、発症には種々の関連蛋白が関与していることが報告されているが、補体系蛋白は遺伝性プリオン病罹患脳に見られるプリオン蛋白アミロイド斑に共存するなどプリオン蛋白との関連が示唆されている⁽¹⁾。また、補体の古典的経路の蛋白であるC1qをノック・アウトしたマウス、あるいは後天的にC3活性を抑制したマウスでは、プリオン病感染因子の腹腔内投与で伝播・発症が抑制されることが報告されている^(2,3)。我々は、特発性クロイツフェルト・ヤコブ病の症例から得られたDNAを試料として、C1q・C3受容体の遺伝子多型を解析して特発性症例の感染・発症におけるこれら受容体の関与を検討した。また、補体系活性を抑制する作用を有し、異常なプリオン蛋白の凝集を抑制することが報告されているclusterin⁽⁴⁾についても同様に解析した。

〔研究方法〕

試料：九州大学脳研病理教室において剖検された特発性クロイツフェルト・ヤコ

ブ病症例（7例）の凍結脳あるいは一般臓器からDNAを抽出した。また、プリオン病が疑われ、プリオン蛋白遺伝子の変異を解析するために提供された試料のうち、その後剖検にて特発性クロイツフェルト・ヤコブ病であることが確認された症例（5例）についても検討した。対照として、プリオン蛋白遺伝子変異の解析のための試料から、非プリオン病を選んで解析した。

PCR： C3レセプターとして、CR1およびCR2を、C1qレセプターとしてC1q BPおよびC1q Rpの蛋白質コード領域をPCR法にて増幅した。プライマーは、CR1では exon13/19/22/26/29/33をそれぞれイントロン部分から挟み込むようにデザインし、CR2ではexon1/2、C1q BPとC1qRpでは全てのエクソンを網羅するようにデザインした。clusterinについては、exon2/5/6/7を増幅した。

DNAシーケンシング： PCR産物を鋳型にして、DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech)によるジデオキシ法でシーケンス反応を行い、ABI PRISM 310 (Applied Biosystems)にてDNAシーケンスを解析した。

RFLP： CR1のexon19/22/33における一塩基多型については、それぞれBstNI、RsaI、MnIIの制限酵素で切断し、15%アクリルアミドゲルで電気泳動して、断片長多型を調べた。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて研究を行った。

〔結果〕

今回解析した試料中には、CR1のexon19/22/33でそれぞれG3093T、A3650G、C5507G（数字は、ヌクレオチド通し番号）の一塩基多型が存在した。3つの多型には強い連鎖があり、遺伝子型は、3093G/G・3650A/A・5507C/Cを持つものと、3093G/T・3650A/G・5507C/Gを持つものと2通りであった。検索した特発性クロイツフェルト・ヤコブ病5例中、前者が2例、後者が3例であった。これらの多型は、DNAシーケンシングに加えてRFLPでも同様の結果が確認された。

また、CR1のexon26にACGからATGへのアミノ酸置換を伴う一塩基多型が見られ、このATGへの置換は検索した4例の特発性患者のうち3例の患者でヘテロに認められた。

C1q BPでは第3エクソン近傍のイントロン内に14bpの欠失多型が観察された。欠失は検索した9例の特発性患者では4例がヘテロで、残り5例がホモで持っていた。検索した4例の対照群でも同様の割り合い（2例がヘテロで、残り2例がホモ）で欠失多型が観察された。

CR2、Clusterin、C1q Rpについては、検索した範囲内ではアミノ酸置換を伴う遺

伝子多型は確認できなかった。

〔考 察〕

プリオン病感染因子の経口的、あるいは血液を介した伝播・発症には、脾臓、リンパ装置など網内系が関与している。C3レセプターであるCR1は、濾胞樹状細胞を含め網内系細胞にも発現していることが報告されている。今回の結果で存在が示されたCR1 exon19/22/33の多型は、赤血球表面に発現するCR1蛋白の量と相関があり、3093G・3650A・5507Cは高発現型(H type)、3093T・3650G・5507Gは低発現型(L type)の表現型と相関する⁽⁵⁾とされており、低発現型は、炎症性疾患においては免疫複合体の組織への沈着という組織障害性に働き、マラリア感染においては赤血球のロゼット形成を抑制して重症化の抑制に働くとされている⁽⁶⁾。検討した特発性症例の数が少ないことと、非プリオン病の対照群においてこの遺伝子多型がどの程度の頻度で存在するのか分からないため、今後は試料の数を増やして検討する必要がある。

C1qレセプターであるC1q BPは、C1qと結合してその作用を抑制するとされており、C1q BP遺伝子は、マウスでは11番染色体の37.00cMの位置にある。マウスの系統によってプリオン病感染因子の脳内接種後の潜伏期間が違うことから、遺伝子型を比較して関連遺伝子の重み付けをしたLloydらによる報告⁽⁷⁾の中で、最も潜伏期間の長さとの相関が強い部分とされるマーカーD11Mit36は11番染色体40.31cMにあり、C1q BP遺伝子はそれに近いところに存在する。これまでの解析でC1q BP遺伝子にイントロン部の欠失多型が見つかったが、その頻度は今回の解析では対照群と特発性患者群との間で差が見られなかった。

clusterin遺伝子解析は、今回特発性患者 5 例および対照群 5 例について exon2/5/6/7のみを検討し、アミノ酸置換を来たすような遺伝子多型は認めなかった。また、CR2、C1q Rpについても、検索したエクソンが限られており、その範囲内ではアミノ酸置換を伴う遺伝子多型は確認できなかった。したがって、さらに検索範囲を拡大し検討する必要がある。

〔結 論〕

特発性プリオン病の疾患感受性因子の候補として補体系蛋白のレセプターであるCR1、CR2、C1q BP、C1q Rpおよび補体抑制因子clusterinの遺伝子多型を、少数例の特発性ヤコブ病患者と対照群において解析した。これまでに検索した中では、CR1に複数のアミノ酸置換を伴う多型とC1q BPにイントロン部の多型が確認されたが、さらに症例数を増やし統計学的検討を加える必要がある。

〔参考文献〕

1. Ishii T, Haga S, Yagishita S, Tateishi J: The presence of complements in amyloid plaques of Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Appl Pathol* 1984, 2: 370-9.
2. Klein MA, Kaeser PS, Schwarz P, et al.: Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med* 2001, 7: 488-92.
3. Mabbott NA, Bruce ME, Botto M, et al.: Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nat Med* 2001, 7: 485-7.
4. Sasaki K, Doh-ura K, Ironside JW, Iwaki T: Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol* 2002, 103: 199-208.
5. Xiang L, Rundles JR, Hamilton DR, Wilson JG: Quantitative alleles of CR1: coding sequence analysis and comparison of haplotypes in two ethnic groups. *J Immunol* 1999, 163: 4939-45.
6. Rowe JA, Moulds JM, Newbold CI, Miller LH: P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature* 1997, 388: 292-5.
7. Lloyd SE, Onwuazor ON, Beck JA, et al.: Identification of multiple quantitative trait loci linked to prion disease incubation period in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98: 6279-83.

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) Kawashima T., Doh-ura K., Ogomori K., Iwaki T.: Apoptotic bodies in the cerebellum of Japanese patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Pathol. Int.* 51:140-144, 2001
- 2) Sasaki K, Doh-ura K, Ironside JW, Iwaki T: Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol.* 103: 199-208, 2002

2. 学会発表

- 1) 堂浦克美：プリオン病の診断と治療—治療法開発の現状と早期診断法開発の重要性。第6回日本神経感染症研究会、2001年、札幌
- 2) 堂浦克美：ヒトプリオン病の診断と治療—現状と将来への展望。第5回日本神経ウイルス研究会、2001年、大阪

〔知的財産権の出願・登録状況〕

1. 特許取得

堂浦克美、村上郁子「病原性プリオンタンパク質生成阻害用組成物および病原性プリオン蛋白質生成阻害方法」、特許願2001-227093、整理番号P0406T、2001年7月

2. 実用新案登録

なし

異常型プリオン蛋白質特異的分子プローブの作製

班 員：堀内 基広（帯広畜産大・原虫研、獣医公衆衛生）

〔研究要旨〕

プリオン病の病原体（プリオン）の主要構成要素は正常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）の病原性構造異性体である異常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）である。プリオン病の診断、予防、治療法の開発には本病の病態機序の解析が必要である。プリオンを構成するPrP^{Sc}に特異的に反応する分子プローブは病態機序の解析に非常に有用な道具と考えられるが、現在まで実用可能なPrP^{Sc}特異分子プローブはない。そこで本研究ではPrP^{Sc}特異分子プローブとして、モノクローナル抗体（mAb）の作製を試みた。PrP遺伝子欠損マウスにスクレイピー感染マウス脳から精製した感染性を有するPrP^{Sc}を免疫して、常法に従ってmAbを作製した。得られた計34のmAbは、認識するエピトープから9群に分類可能であった。そのうちmAb6H10は精製PrP^{Sc}画分と反応するが組換えPrPとは反応しないことから、PrP^{Sc}を特異的に認識する可能性が示唆されたため、さらに詳細な解析を行った。mAb6H10はProteinase K処理したPrP^{Sc}とも反応するが、グアニジン塩酸塩処理で解離・変性したPrP^{Sc}とは反応しなかった。またmAb6H10はスクレイピー感染マウス脳乳剤からPrP^{Sc}を免疫沈降したが、非感染脳からPrP^Cを沈降しなかった。以上の結果からmAb6H10はPrP^{Sc}凝集体上に存在するPrP^{Sc}特異的非連続エピトープを認識することが示唆された。

〔研究目的〕

プリオンの主要構成要素は異常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）であり、PrP^{Sc}が蓄積することがプリオンにおける神経細胞死に関与すると考えられている。従ってPrP^{Sc}の諸性状や生成・分解機構の解析は、依然不明な点が多いプリオンの本体の解明、および本病の診断・予防・治療法の開発に必要な基礎知見を得るという観点から重要な研究対象である。PrP^{Sc}の解析が進んでいない理由として、実用可能なPrP^{Sc}特異的な分子プローブがないことが挙げられる。これまでに日本を含め世界各国で作製されたPrP分子に対する抗体(pan-PrP抗体)は、変性剤で処理したPrP^{Sc}および正常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）に反応するが、未変性のPrP^{Sc}凝集体とは反応しない^{1,4)}。その理由はPrP^{Sc}凝集体は抗PrP抗体が認識するエピトープを露出していないからである。プリオンの感染性はPrP^{Sc}凝集体に付随しており、凝集体を解

離・変性させると感染性は消失する。従って、現存する抗PrP抗体では感染性が付随するPrP^{Sc}（プリオン）の解析を行うことができない。そこで、本研究では感染性が付随する未変性PrP^{Sc}に対する分子プローブの作製を目的として、モノクローナル抗体（mAb）の作製を行った。

〔研究方法〕

マウススクレイピー帯広株感染マウス脳から、Bolton⁵⁾らの方法に準じてPrP^{Sc}を精製した。組換えマウスPrP（rMoPrP）は原核細胞発現ベクターpRSETBおよびpET22bにて大腸菌で発現させた。封入体をGdnHClあるいはUreaで変性後、DEAE陰イオン交換クロマトグラフィーおよび逆相HPLCにより、分子内SS結合を形成したrMoPrPを精製した。精製PrP^{Sc}あるいは精製rMoPrPをPrP遺伝子欠損マウスに免疫し、常法に従い細胞融合を行った。ハイブリドーマの培養上清は精製PrP^{Sc}およびrMoPrPを抗原としたELISAによりスクリーニングした。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマの無血清高密度培養の上清から硫酸塩析およびゲルろ過により精製した。抗体が認識するエピトープの解析は欠損変異および点変異rMoPrPを用いてELISAにより行った。Pepspot膜もエピトープの解析に使用した。PrPの免疫沈降はProtein G結合磁性ビーズを用いて行い、磁性ビーズ結合画分はウエスタンブロットにより解析した。

（倫理面への配慮）

研究に用いた動物の飼育管理は帯広畜産大学動物実験指針を遵守して行った。

〔研究結果〕

エピトープ解析の結果から、樹立したmAbは少なくとも9群に分類可能であった（表1）。グループIからVIに分類したmAbはpepspot膜による解析から、表に示す領域から構成されるPrP分子上の連続エピトープを認識することが明らかとなった。グループVIIおよびVIIIに分類した抗体は変異rMoPrPを用いたELISAによりaa155-231(VII)、およびaa89-121(VIII)の領域から構成される非連続エピトープを認識することが判明した。また、VIIおよびVIII群に分類したmAbは分子内SS結合が形成されないC179AおよびC214Aの変異組換えハムスターPrPと反応しなかったことから、これらの非連続エピトープ形成にはPrP分子内のSS結合が関与していると考えられる。グループIからVIIIのmAbはELISAにおいてrMoPrPとは反応するが、PK処理した未変性PrP^{Sc}と反応しないかもしくは非常に弱い反応性を示すのみであった。しかし、3M GdnSCNで変性させたPrP^{Sc}とは反応することから、グループIからVIIIのmAbはpan-PrP抗体に属すると考えられる。

グループIXに分類した抗体（mAb 6H10）はrMoPrPとは反応しないがPK処理未

変性PrP^{Sc}と反応するという、pan-PrP抗体とは正反対の反応性を示したことから(表1) mAb6H10がPrP^{Sc}と特異的に反応するがPrP^Cとは反応しない可能性が示唆されたため、mAb6H10の反応性を詳細に検討した。mAb6H10は未変性PrP^{Sc}を高濃度のPKで消化した場合でもPrP^{Sc}との反応性は消失しなかった(図1)。対照的に、実験に使用したpan-PrP抗体mAb31C6(epitope: aa143-151)、mAb72-5(epitope:aa89-231)、mAb44B1(epitope:aa155-231)はPK未処理のPrP^{Sc}画分とは反応したが処理濃度の上昇に伴いPrP^{Sc}画分と反応しなくなった(図1)。この理由は以下のように説明できる。pan-PrP抗体のPK未処理の精製PrP^{Sc}画分に対する反応性は、精製PrP^{Sc}に付随しているPrP^CもしくはPK感受性のPrP分子に対する反応であり、そのようなPrP分子は低濃度のPK処理により消化されるために、PK濃度の上昇にともない、pan-PrP抗体は精製PrP^{Sc}とは反応しなくなったと考えられる。PK処理精製PrP^{Sc}画分をGdnHClで変性させた場合、3M以上の濃度のGdnHCl処理によりmAb6H10は反応しなくなるが、対照的にpan-PrP抗体はGdnHCl濃度の上昇に伴い反応性が顕著に上昇した(図2)。従ってmAb6H10がPrP^{Sc}上の構造エピトープを認識することが示唆された。

mAb6H10がPrP^{Sc}特異的な構造エピトープを認識することが示唆されたことから、スクレイパー感染マウス脳乳剤からPrP^{Sc}を免疫沈降を試みた。mAb6H10で免疫沈降した画分にはPK処理後にも典型的なPrP^{Sc}のバンドが検出されたが、mAb31C6で沈降した画分に存在するPrPはPK処理により消化された(図3a)。また、PrP^Cとの反応性を調べるために、非感染マウス脳を用いて免疫沈降を行ったところ、mAb31C6ではPrP^Cが免疫沈降されたが、mAb6H10ではPrP^Cのバンドは検出されなかった(図3b)。

〔考 察〕

mAb6H10は未変性PrP^{Sc}とは反応するが変性PrP^{Sc}とは反応しないという、pan-PrPとは正反対の反応性を示した。使用する株により多少の差異はあるが、プリオンの感染性が3M以上のGdnHClの処理で著しく低下する^{6, 7)}。また、263K株感染ハムスター脳から精製したPrP^{Sc}を3.5M以上のGdnHClで処理した場合、試験管内においてPrP^{Sc}がPrP^CをPK抵抗性分子であるPrP-resに転換する活性が消失することから⁶⁾、3M以上のGdnHCl処理によりmAb6H10がPrP^{Sc}画分と反応しなくなることは、mAb6H10のエピトープの存在とPrP^{Sc}の生物活性に何らかの関連がある可能性を示唆するものかもしれない。本研究で用いた精製PrP^{Sc}画分には $>10^{11}$ LD₅₀/gの感染価が存在する。mAb6H10が感染性を有するPrP^{Sc}凝集体上に存在するエピトープを認識する可能性があることから、今後mAb6H10とプリオン感染性の関係を明らかにする必要がある。mAb6H10はPrP^{Sc}とPrP^Cを識別可能であり、これまで樹立されて

きたmAbとは明らかに異なる性質を示す。この抗体はプリオン本体の研究の大きなブレイクスルーになることが期待される。

〔結 論〕

PrP遺伝子欠損マウスにスクレイピー感染マウス脳から精製した感染性を有するPrP^{Sc}を免疫して、34のモノクローナル抗体(mAb)を樹立した。作製した抗体は認識するエピトープから9群に分類可能であった。そのうちmAb6H10は、1) 精製PrP^{Sc}画分と反応するが組換えPrPとは反応しないこと、2) Proteinase K処理後のPrP^{Sc}と反応するが、グアニジン塩酸塩処理で解離・変性したPrP^{Sc}とは反応しないこと、3) PrP^Cを免疫沈降しないこと、からmAb6H10はPrP^{Sc}凝集体上に存在するPrP^{Sc}特異的非連続エピトープを認識することが示唆された。

〔参考文献〕

- 1) Kascsak, R.J., Rubenstein, R., Merz, P.A., Tonna-DeMasi, M., Fersko, R., Carp, R.I., Wisniewski, H.M. and Diringer, H. Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J. Virol.*, **61**: 3688-3693 (1987)
- 2) Serban, D., Taraboulos, A., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B. Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins. *Neurology*, **40**: 110-117 (1990)
- 3) Williamson, R.A., Peretz, D., Smorodinsky, N., Bastidas, R., Serban, H., Mehlhorn, I., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. and Burton, D.R. Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 7279-7282 (1996)
- 4) Peretz, D., Williamson, R.A., Matsunaga, Y., Serban, H., Pinilla, C., Bastidas, R.B., Rozenshteyn, R., James, T.L., Houghten, R.A., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. and Burton, D.R. A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform. *J. Mol. Biol.*, **273**: 614-622 (1997)
- 5) Bolton, D.C., Bendheim, P.E., Marmorstein, A.D. and Potempska, A. Isolation and structural studies of the intact scrapie agent protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, **258**: 579-590 (1987)
- 6) Caughey, B., Raymond, G.J., Kocisko, D.A. and Lansbury, P.T. Jr. Scrapie infectivity correlates with converting activity, protease resistance, and aggregation of scrapie-associated prion protein in Guanidine denaturation studies. *J. Virol.*, **71**: 4107-4110 (1997)
- 7) Manuekidis, L., Skaviadis, T., Akowitz, A. and Fritch, W. Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) Horiuchi, M., Baron, G., Xiong, L.-W., and Caughey, B. Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain. *J. Biol. Chem.* 276: 15489-15497 (2001)
- 2) Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Matsuo, T., and Kaneko, K. Glycidol degrades scrapie mouse prion protein. *J. Vet. Med. Sci.*, 63(9): 983-990 (2001)
- 3) 品川 森一、堀内 基広、松井 高峯 プリオンの免疫学的検出法 生活衛生、45: 259-269 (2001)
- 4) 池田 徹也、堀内 基広、古岡 秀文、石黒 直隆、品川 森一 牛海綿状脳症に関する検査概要と今後の対応 食品衛生研究、52: 33-42 (2002)
- 5) 堀内 基広 動物のプリオン病 ウイルス、51(2): 145-150 (2002)

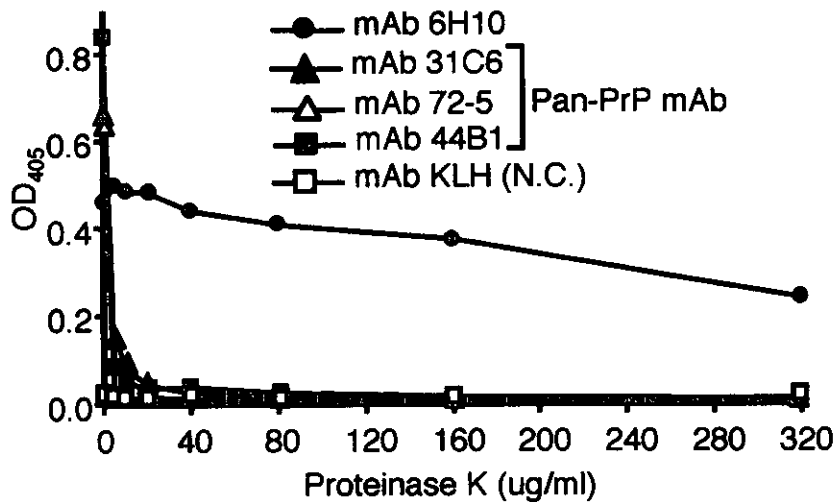
2. 学会発表

- 1) Horiuchi, M.: Detection of PrP^{Sc} for the diagnosis of prion diseases, *5th International Symposium on Infectious Disease*, Chunju/Korea (2001)
- 2) Horiuchi, M.: Inhibition of pathogenic prion protein formation; implication for possible therapeutic target, *Forum for Infectious Disease of the 21th Century*, Osaka (2002)
- 3) 堀内 基広：動物プリオン病診断法の現状と課題、Brain国際フォーラム 東京(2001)
- 4) 山本 真理、品川 森一、石黒 直隆、堀内 基広：エポキシ化合物によるプリオン不活化、第131回日本獣医学会 東京(2001)
- 5) 堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一：PrP合成ペプチドによるPrP分子間相互作用の阻害、第131回日本獣医学会 東京(2001)
- 6) 毛利 崇、堀内 基広、石黒 直隆、品川森一：免疫磁性ビーズを用いたPrP^{Sc}検出法の開発、第49回日本ウイルス学会 大阪(2001)
- 7) 金 チャンラン、毛利 崇、狩野 綾子、堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一：プリオン蛋白質に対するモノクローナル抗体パネルの作製、第49回日本ウイルス学会 大阪(2001)
- 8) 狩野 綾子、堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一：精製PrP^{Sc}画分と特異的に反応するmAb6H10の解析、第49回日本ウイルス学会 大阪(2001)

表1. モノクローナル抗体の性状

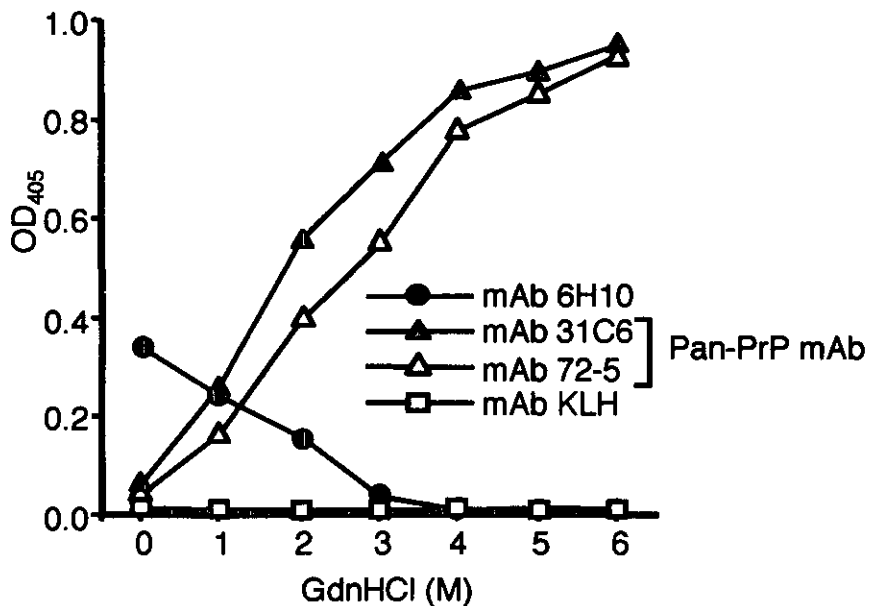
MAb	Epitope	Clones	rPrP	PK(+) PrP^{Sc}	
				Denatured (GdnSCN)	Non- denatured
I	56-89, L	6	+	+	-
II	119-127, L	1	+	+	-
III	137-145, L	2	+	+	-
IV	143-153, L	4	+	+	-
V	161-169, L	1	+	+	-
VI	219-229, L	3	+	+	-
VII	155-231, D	12	+	+	-
VIII	89-231, D	4	+	+	-
IX	Unknown	1	-	-	+

図1. mAb6H10の未変性PrP^{Sc}に対する反応性



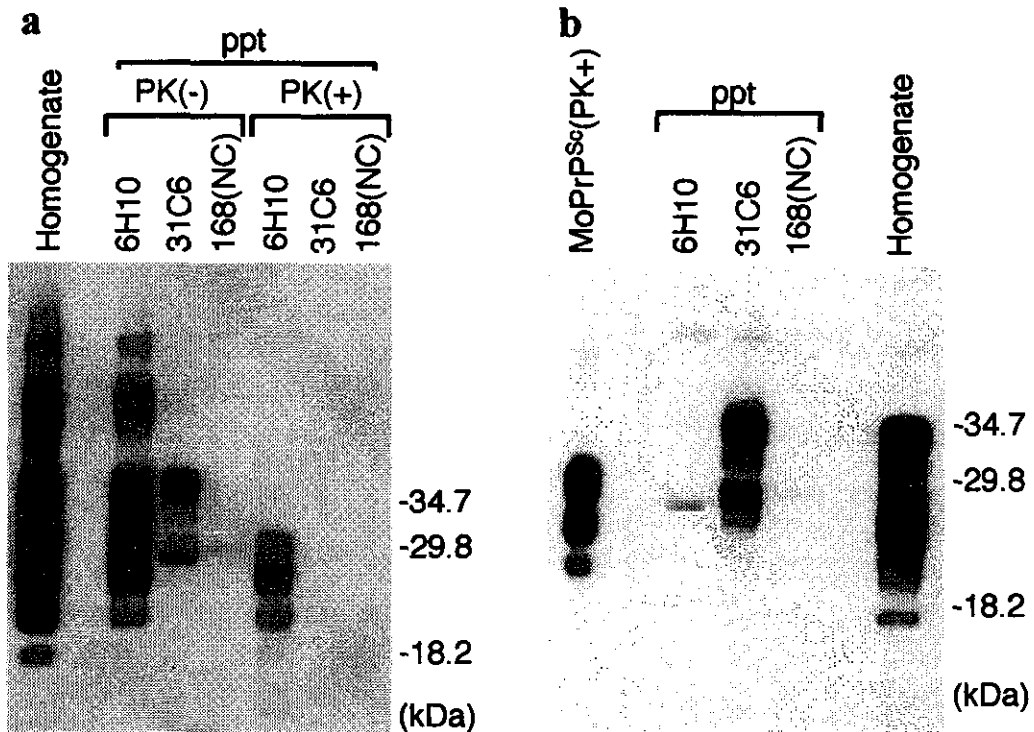
精製PrP^{Sc}をELISAプレートに吸着後、図に示すPK濃度で37℃、40分間処理した。PKをPefablocで不活化した後、常法に従いELISAを行った。

図2. mAb6H10の変性PrP^{Sc}に対する反応性



精製PrP^{Sc}をELISAプレートに吸着後、40ug/ml PKで37℃、40分間処理した。PKをPefablocで不活化した後、図に示した濃度のGdnHClで30分処理した。その後、常法に従いELISAを行った。

図 3. mAb6H10によるPrP^{Sc}の免疫沈降



(a) スクレイピー感染脳乳剤からの免疫沈降。図に示したmAbで免疫沈降した試料(ppt)を2等分し、一方はPK未処理(PK(-))、他方はPK処理後(PK(+))にウエスタンブロットで解析した。ウエスタンブロット後の免疫染色にはHRP標識mAb43C5(epitope: aa161-169)を用いた。168(NC): mAb6H10のアイソタイプマッチ陰性mAb(IgG2b)。Homogenate:免疫沈降に使用した脳乳剤。(b)スクレイピー非感染脳乳剤からの免疫沈降。図に示したmAbで免疫沈降した試料(ppt)をウエスタンブロットにて解析した。MoPrP^{Sc}(PK+): PK処理MoPrP^{Sc}。

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

著 者 名	論 文 標 題		
Lehmann S, Laude H, Harris DA, Carp RI, Vilette D, Katamine S, Madec J-Y, and Nishida N.	Ex vivo transmission of mouse-adapted prion strains to N2a and GT1-7 cell lines.		
雑 誌 名	巻・号	発行年	ページ
In Alzheimer's Disease: Advances in Etiology, Pathogenesis and Therapeutics		2001	679-686

著 者 名	論 文 標 題		
Atarashi R., Sakaguchi S., Shigematsu K., Arima K., Okimura N., Yamaguchi N., Li A., Kopacek J., Katamine S.	Abnormal activation of glial cells in the brains of prion protein-deficient mice ectopically expressing prion protein-like protein, PrPLP/Dpl.		
雑 誌 名	巻・号	発行年	ページ
Mol. Med.	7	2001	803-809

著 者 名	論 文 標 題		
坂口末廣, 片峰茂	ノックアウトマウスとプリオン病		
雑 誌 名	巻・号	発行年	ページ
CLINICAL NEUROSCIENCE	19巻8号	2001	36-39

著 者 名	論 文 標 題		
Kawashima T., Doh-ura K., Ogomori K., Iwaki T.	Apoptotic bodies in the cerebellum of Japanese patients with Creutzfeldt-Jakob disease.		
雑 誌 名	巻・号	発行年	ページ
Pathol. Int.	51	2001	140-144

著 者 名	論 文 標 題		
Sasaki K, Doh-ura K, Ironside JW, Iwaki T:	Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies.		
雑 誌 名	巻・号	発行年	ページ
Acta Neuropathol.	103	2002	199-208

著者名	論文標題		
Horiuchi, M., Baron, G., Xiong, L.-W., and Caughey, B.	Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain.		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
J. Biol. Chem.	276	2001	15489-15497

著者名	論文標題		
Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Matsuo, T., and Kaneko, K.	Glycidol degrades scrapie mouse prion protein.		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
J. Vet. Med. Sci	63(9)	2001	983-990

著者名	論文標題		
品川 森一、堀内 基広、松井 高峯	プリオンの免疫学的検出法		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
生活衛生	45	2001	259-269

著者名	論文標題		
池田 徹也、堀内 基広、古岡 秀文、石黒直隆、品川 森一	牛海綿状脳症に関する検査概要と今後の対応		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
食品衛生研究	52	2002	33-42

著者名	論文標題		
堀内 基広	動物のプリオン病		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
ウイルス	51(2)	2002	145-150

研究成果の刊行物・別刷

20010416

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。