

20020747

厚生科学研究費補助金

特定疾患対策研究事業

硬膜移植後プリオン病に対する進行阻止法の開発に関する基礎研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金子 清俊

平成15(2003)年 3月

目 次

I.	統括研究報告	
	硬膜移植後プリオン病に対する進行阻止法の開発に関する基礎研究	
	ドミナントネガティブ効果を有する変異型プリオン蛋白を用いたプリオン病の治療開発の検討 -----	1
	蛋白質の高次構造をほどく新しいシャペロン分子アンフォルジン -----	9
	金子清俊	
II.	分担研究報告	
	1. 硬膜移植後プリオン病発症モデルマウスの作成 -----	16
	川原信隆	
	西島正弘	
	2. リコンビナントプリオンタンパク投与によるプリオン病発症の遅延効果 -----	19
	西島正弘	
	3. 遺伝子導入法の確立 -----	22
	武田伸一	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	25

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
総括研究報告書

硬膜移植後プリオン病に対する進行阻止法の開発に関する基礎研究

ドミナントネガティブ効果を有する変異型プリオン蛋白を用いた
プリオン病の治療開発の検討

主任研究者 金子清俊（国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部）
研究協力者 岸田日帯（国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部）
八谷如美（国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部）
逆瀬川裕二（国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部）

研究要旨

日本におけるプリオン病の特徴として、ヒト乾燥硬膜移植後の医原性 Creutzfeldt-Jakob 病（CJD）が挙げられる。また平成 13 年 9 月に国内で初のウシ海綿状脳症（BSE）が発見されて以来、プリオン病に対する社会的関心が高まり、治療法開発が待望されている。

従来の孤発性 CJD に関する疫学的研究から、ヒトのプリオン遺伝子のコドン 219 のグルタミン酸がリジンに置換した遺伝子多型(219K)を有する個体が、プリオン病に対して抵抗性を有することが明らかになっている。金子らはスクレイピー持続感染 N2a(ScN2a)細胞に、219K に相当するマウスの変異型プリオン蛋白質(MoPrP218K)を発現することによって、PrP^{Sc} の複製が抑制されドミナントネガティブ効果を呈することを示した。今年度は、このドミナントネガティブ効果を有する MoPrP218K の変異型プリオン蛋白質を高純度に得るために、大腸菌 BL21 株に発現させた後、回収された封入体を 8 M 尿素で可溶化し、尿素存在下で陽イオン交換カラムとニッケル NTA カラムを用いて精製した画分を用いて、アルギニン存在下で蛋白質高次構造の再巻き戻しを行った。ここで得られた高純度に精製したドミナントネガティブ効果を有する MoPrP218K の変異型プリオン蛋白質を細胞外から投与することで PrP^{Sc} 生成抑制効果が得られた。

MoPrP218K の変異型プリオン蛋白質はプリオン病の進行阻止・治療開発に応用できる可能性が十分にあると考えられる。

A. 研究目的

プリオン病の原因であるプリオン蛋白質 (PrP)には正常型 (PrP^C) と異常感染型

(PrP^{Sc}) とが存在し、両者のアミノ酸配列は相同だが立体構造は大きく異なる。ヒトのプリオン病である Creutzfeldt-

Jakob 病 (CJD) は、進行性痴呆や運動機能障害が急速に悪化して数ヶ月で無動無言状態となる致死性の疾患である。特に我が国では 1973 年から 1997 年 3 月までの脳外科手術において年間約 2 万枚の乾燥硬膜が使用され、この硬膜移植が原因と考えられる医原性 CJD が大きな社会問題となっている。また平成 13 年 9 月に国内初のウシ海綿状脳症 (BSE) が発見されて以来、プリオン病に対する社会的関心は非常に高い。我々は硬膜移植後プリオン病の進行阻止・治療法の開発のために、PrP^{Sc}複製の抑制を目標とした検討を行っている。

B. 研究方法

孤発性 CJD の疫学的研究から、ヒトのプリオン遺伝子のコドン 219 のグルタミン酸がリジンに置換した遺伝子多型 (219K) を有する個体が、プリオン病に対して抵抗性を有することが明らかになっている。金子らはスクレイピー持続感染 N2a(ScN2a)細胞に、219K に相当するマウスの変異型プリオン蛋白質 (MoPrP218K) を発現することによって、PrP^{Sc}の複製が抑制されドミナントネガティブ効果を呈することを示した。そこで本研究では MoPrP218K を細胞外から投与することによる PrP^{Sc}複製への変換抑制効果を検討すべく、昨年度は大腸菌に発現させた Mo218K する実験系を確立した。

今年度は、このドミナントネガティブ効果を有する MoPrP218K の変異型プリオン蛋白質を高純度に得るために、大腸菌 BL21 株に発現させた後、回収された封入体を 8 M 尿素で可溶化し、尿素存在

下で陽イオン交換カラムとニッケル NTA カラムを用いて精製した画分を用いて、アルギニン存在下で蛋白質高次構造の再巻き戻しを行った。ここで得られた高純度の MoPrP218K リコンビナントマウスプリオン蛋白質が、細胞外投与により感染型プリオン PrP^{Sc} 生成抑制効果を持つかどうかを調べるために、昨年度構築したスクレイピー持続感染型マウス神経芽細胞腫由来 N2a 細胞 (ScN2a) によるアッセイ系を用い、培地に添加して一定時間インキュベートした後に細胞を回収し、ウエスタンブロット法にて検出した。

(倫理面への配慮)

本実験においてはヒト及び動物の試料を使用しないため、特に倫理上の問題点はないと考えている。

C. 研究結果

ドミナントネガティブ効果を有する MoPrP218K の変異型プリオン蛋白質を高純度に得るために今回新たに構築した 2 つのオープンカラムクロマトグラフィーを用いた簡単な精製法によって、純度 99% 以上のリコンビナント MoPrP218K マウスプリオン蛋白質を大腸菌封入体より約 80% の収量にて精製することに成功した (図 1)。また、アルギニンと酸化・還元型グルタチオンを用いた蛋白質高次構造の再巻き戻し法を確立したことによって、全長のプリオン蛋白質としては初めて可溶性モノマーとして収率約 60% で回収することが可能となった。得られた MoPrP218K の変異型プリオン蛋白質を用いて PrP^{Sc} 生成抑制効果を調べたとこ

ろ、ScN2a 細胞培養液中 5 µg/ml, 10µg/ml、15µg/ml, 20µg/ml の各濃度にて3日間添加、培養することによって、それぞれ約 15%、70%、90%、~100%の効率で正常プリオン蛋白質の異常感染型への構造変換を阻止することに成功した。

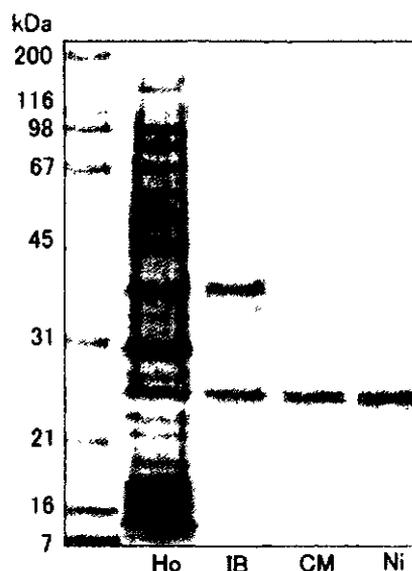
D. 考察

PrP^C から PrP^{Sc} への高次構造変換には、プリオン蛋白質のほかにシャペロン様因子の関与があると考えられており、我々はこの予想される因子をプロテイン X と呼称している。プロテイン X がコドン 218 およびその近傍部位と相互作用することが PrP^{Sc} の複製過程に重要であることから、MoPrP218K の変異型プリオン蛋白質はプロテイン X と PrP^C の相互作用を阻害することでドミナントネガティブ効果を示すと考えられる。昨年度の結果および今年度の結果からドミナントネガティブ効果を有する MoPrP218K の変異型プリオン蛋白質はプリオン病の進行阻止および治療開発に応用できる可能性がある。また、プリオン病に有効であるとの報告があるといういくつかの薬剤（キナクリン等）と併用することでさらに相乗効果があるものと考えられる。

E. 結論

高純度に精製したドミナントネガティブ効果を有する MoPrP218K の変異型プリオン蛋白質を細胞外から投与することで PrP^{Sc} 生成抑制効果を得られた。MoPrP218K の変異型プリオン蛋白質はプリオン病の進行阻止・治療開発に応用できる可能性が十分にあると考えられる。

図 1



F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Furuta M, Ito T, Eguchi C, Tanaka T, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K: Two-Dimensional Electrophoresis/Phage Panning (2D-PP): A Novel Technology for Direct Antibody Selection on 2-D Blots. *J Biochem* (Tokyo). 132: 245-251, 2002
2. Tanaka T, Ito T, Furuta M, Eguchi C, Toda H, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K: In Situ Phage Screening. A method for identification of subnanogram tissue components *in situ*. *J Biol Chem*. 277: 30382-30387, 2002
3. Perrier V, Kaneko K, Safar J, Vergara J, Tremblay P, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB, Wallace AC:

- Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice
Proc Natl Acad Sci U S A. 99: 13079-13084, 2002
4. Korth C, Kaneko K, Groth D, NHeye N, Telling G, Mastrianni J, Parchi P, Gambetti P, Will R, Ironside J, Heinrich C, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB:
Abbreviated transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to mice expressing a novel chimeric prion protein transgene.
Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. in press
 5. Toda H, Sakasegawa, Y, Kishida, H, Arima K, Yamada M, Arai T, K, Hitoshi Takahashi H, Yoshiyuki Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K:
Distinct pattern of tau phosphorylation in laser microdissected Pick bodies: "A novel microbiological approach *in situ*".
Neurosci Lett, in press
 6. Sekijima M, Motonon C, Yamasaki S, Kaneko K, Akiyama Y.
Molecular dynamics simulation of dimeric and monomeric forms of human prion protein (HuPrP) reveals the higher stability of the dimeric form.
Biophys J, in press
 7. 八谷如美, 金子清俊.
プリオン病.
医学のあゆみ, 200: 1241-1242, 2002
 8. 金子清俊.
ヤコブ病.
医学最前線 132, 健康な子ども, 352: 38-39, 2002
 9. 逆瀬川裕二、金子清俊.
分子レベルの最新疾患研究①プリオン病の分子病態と抗体を用いた治療法.
実験医学, 2: 1344-1348, 2002
 10. 桜井総子、金子清俊.
プリオン蛋白質異常化の分子メカニズムと治療への応用.
ファルマシア, 38: 645-648, 2002
 11. 金子清俊.
プリオン病研究の現状と変異型CJD.
脳と精神の医学, 13: 171-174, 2002
 12. 金子清俊.
牛海綿状脳症：BSEいわゆる狂牛病とは、どんな病気か？
武田薬報, 430: 23-26, 2002
 13. 金子清俊.
BSEによる人への感染の危険性と治療法.
食品衛生学雑誌, 43: 221-227, 2002
 14. 逆瀬川裕二、金子清俊.
プリオン病とプリオン特異抗体を用いた治療法.
Cognition and Dementia, 1: 33-38, 2002
 15. 金子清俊.
牛海綿状脳症 (BSE) と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD).
東京保険医新聞, 1206: 3-4, 2002
 16. 金子清俊.
牛海綿状脳症 (BSE) と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD).

- 東京内科医会誌, 18: 21-24, 2002
17. 金子清俊.
プリオン病の分子生物学.
臨床検査, 46: 1501-1508, 2002
 18. 金子清俊.
Prion 病発症のメカニズム.
神経内科, 57: 377-383, 2002
 19. 金子清俊.
プリオン蛋白関連疾患.
医学の歩み, 203: 855-857, 2002
 20. 逆瀬川(八谷)如美、金子清俊.
プロテイン X-異常プリオン増殖に
関与するプレイヤー.
医学の歩み, 203: 877-880, 2002
 21. 金子清俊.
プリオン病の分子生物学.
臨床検査, 46: 1501-1508, 2002
 22. 金子清俊.
牛海綿状脳症(BSE)と変異型クロイ
ツフェルト・ヤコブ病(vCJD).
運動障害, 12: 113-118, 2002
 23. 金子清俊.
プリオン蛋白質異常化のメカニズム.
神経研究の進歩, 47: 37-44, 2003
2. 学会発表
1. Kishida H, Sakasegawa Y, Yamakawa Y, Kuroiwa Y, Hachiya NS, and Kaneko K. Protective prion-protein inhibited the scrapie formation. The 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases [III], Shonan, Oct 2-5, 2002
 2. Sakasegawa Y, Aoto K, Kamata R, Hachiya NS, and Kaneko K. Membrane fractions from mouse neuroblastoma cells contained peptides derived from the cellular prion. The 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases [III], Shonan, Oct 2-5, 2002
 3. Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Tsukita S, and Kaneko K. A Novel protein unfolding chaperon "Unfoldin" unfolds proteins with broad specificity in vitro. The 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases [III], Shonan, Oct 2-5, 2002
 4. Kamata R, Sakasegawa Y, Hachiya NS, and Kaneko K. The real time analysis of prion protein-localization using living cells. The 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases [III], Shonan, Oct 2-5, 2002
 5. Yamazaki K, Yamada E, Kanaji Y, Sato K, Takano K, Sakasegawa Y, and Kaneko K. Regulation of Cellular Prion Protein (PrPc) mRNA Expression by TSH in Human Thyroid Follicles. The 74th Annual Meeting of the American Thyroid Association. Los Angeles, Oct 9-13, 2002.
 6. Hachiya NS, Sakasegawa Y, Jozuka A, Sasaki H, Tsukita S, Kaneko K. A novel ATP-dependent protein chaperone, Unfoldin. 42th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Francisco, Dec 14-18, 2002.
 7. Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Burton DR, and Prusiner SB.

- Antibodies inhibit prion formation and abolish prion infectivity. New perspectives for Prion therapeutics. Paris, Dec 1-3, 2002.
8. 金子清俊. プリオン病の病態と治療戦略. 神経筋ネットワーク第2回東海北陸ブロック会議. 静岡, 4.12, 2002.
 9. 金子清俊. プリオンとヒト変異型クロイツフェルトヤコブ病について. 日本食肉研究会・シンポジウム. 東京, 4.13, 2002.
 10. 金子清俊. プリオン複製に関与する新しい因子の同定とプリオン病治療・予防法開発への応用. CREST「脳を守る」シンポジウム. 東京, 4.25-26, 2002.
 11. 金子清俊. 謎の病原体 プリオン. 東京電力エネルギー館科学ゼミナール. 東京, 5.11, 2002.
 12. 金子清俊. プリオン病. 神戸市医師会学術講演会. 神戸, 5.18, 2002.
 13. 金子清俊. プリオン病について, 科学技術振興事業団主催サイエンスチャンネル. 東京, 5.22, 2002.
 14. 金子清俊. 狂牛病と私たちの暮らし, 2002年度一橋大学婦人部定期講演会. 東京, 5.30, 2002.
 15. 金子清俊. 牛海綿状脳症と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. 東京内科医学術講演会. 東京, 6.8, 2002.
 16. 金子清俊. プリオン病の治療法. 第19回葛南神経学セミナー. 千葉, 6.21, 2002.
 17. 金子清俊. プリオン病の治療の治療に向けて. 第7回動物細胞工学シンポジウム. 日本動物細胞工学会. 東京, 7.2, 2002.
 18. 金子清俊. 牛海綿状脳症(BSE)に関する国際シンポジウム・パネリスト. 畜産技術協会. 東京, 7.4, 2002.
 19. 金子清俊. 牛海綿状脳症について. 第32回安全工学シンポジウム. 日本人間工学会. 東京, 7.11-12, 2002.
 20. 金子清俊. 牛海綿状脳症及び変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の正しい知識. 第13回生体防御学会市民講座. 東京, 7.13, 2002.
 21. 金子清俊. ウシ海綿状脳症とヒト変異型CJD. 第32回新潟神経学夏期セミナー. 新潟, 7.25-27, 2002.
 22. 金子清俊. 変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. 第24回運動障害研究会. 東京, 7.27, 2002.
 23. 金子清俊. 牛海綿状脳症(BSE)とヒトへの感染の危険性. 2002夏期学校給食学習会. 全国学校給食を考える会. 横浜, 8.6, 2002.
 24. 金子清俊. プリオン病等の神経疾患における磁気共鳴装置を用いた早期診断の可能性. 創価大学生命研セミナー. 脳機能疾患への13C-MRSへの応用を考える会. 東京, 8.29, 2002.
 25. 金子清俊. 防御型プリオンと抗体療法. 第121回日本医学会シンポジウム. 日本医学会. 箱根, 8.30-9.1, 2002.

26. 金子清俊. 抗 PrP モノクローナル抗体の開発とプリオン病の診断と治療. ウェスタン・ブロット法の基本手法と牛海綿状脳症 (BSE) 検査法への応用. 学際企画. 東京, 9.8, 2002.
27. 金子清俊. プリオン蛋白質解析 - 何ができて、何ができないのか? 理研シンポジウム. 理化学研究所. 埼玉, 9.13, 2002.
28. 金子清俊. プリオン病について. 第15回茨城神経内科集談会. 茨城, 9.25, 2002.
29. K. Kaneko. Therapeutic Approaches in Prion Disease. The 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases [III], Shonan, Oct 2-5, 2002.
30. 金子清俊. プリオン蛋白質の代謝と高次構造変換. 第7回金沢神経科学シンポジウム. 金沢, 10.13, 2002.
31. 金子清俊. プリオン病の治療法開発. 第75回日本生化学大会シンポジウム. 京都, 10.14-17, 2002.
32. 金子清俊. プリオン病-現状と行政の対応-. フォーラム2002: 衛生薬学・環境トキシコロジー. 日本薬学会. 広島, 10.25, 2002.
33. 金子清俊. ウシ海綿状脳症 (BSE) とヒト変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) について. 第11回日本口腔感染症学会. 神戸, 11.16, 2002.
34. Kaneko K. Therapeutic Approaches for Prion Disease. CJD Symposium, Tokyo, Nov 25, 2002.
35. 金子清俊. 牛海綿状脳症 (BSE) 制圧に向けたナショナルプロジェクト Replication mechanism of PrP^{Sc} and therapeutic approaches for prion disease. 東京, 12.2, 2002.
36. 岸田日帯, 戸田宏幸, 黒岩義之, 鈴木友子, 武田伸一, 山河芳夫, 萩原健一, 大内史子, 西島正弘, 金子清俊. 変異型プリオン蛋白を用いたプリオン病の治療開発の検討 CREST 「脳を守る」シンポジウム. 東京, 4.25-26, 2002.
37. 逆瀬川裕二, 青砥久美子, 金子清俊. プリオン蛋白質局在画分としての脂質ラフトの解析. CREST 「脳を守る」シンポジウム. 東京, 4.25-26, 2002.
38. 桜井総子, 鎌田礼子, 古田大, 八谷如美, 金子清俊. 正常型プリオンタンパク質の代謝機構における分解活性の検討. CREST 「脳を守る」シンポジウム. 東京, 4.25-26, 2002.
39. 八谷如美, 渡邊光太, 鎌田礼子, 逆瀬川裕二, 金子清俊. プリオン蛋白質の細胞内局在の解析. CREST 「脳を守る」シンポジウム. 東京, 4.25-26, 2002.
40. 岸田日帯, 山川芳夫, 黒岩義之, 逆瀬川裕二, 金子清俊. 遺伝子多型を用いたプリオン病の治療開発に向けた培養細胞による検討. 第43回日本神経学会. 札幌, 5.29-31, 2002.

- の新しい解析法. 第43回日本神経学会. 札幌, 5.29-31, 2002.
42. 鎌田礼子、逆瀬川裕二、八谷如美、金子清俊. マウス神経芽細胞種由来N2a細胞におけるプリオンタンパク質の局在. 第45回日本神経化学会. 札幌, 7.17-19, 2002.
43. 渡邊光太、逆瀬川裕二、八谷如美、金子清俊. プリオン蛋白質の生細胞における局在の解析」第75回日本生化学大会. 京都, 10.14-17, 2002.
44. 鎌田礼子、逆瀬川裕二、八谷如美、金子清俊. 生細胞におけるプリオン質の切断後の挙動の解析」第75回日本生化学大会 京都 10.14-17, 2002
45. 逆瀬川裕二、岸田日帯、鎌田礼子、青砥久美子、八谷如美、金子清俊. プリオン蛋白質局在画分としての脂質ラフトの解析. 第75回日本生化学大会. 京都, 10.14-17, 2002.
46. 八谷如美、鎌田礼子、逆瀬川裕二、金子清俊. プリオンタンパク質の代謝に関わる因子について. 第75回日本生化学大会. 京都, 10.14-17, 2002.
47. 桜井総子、八谷如美、逆瀬川裕二、金子清俊. 酵母を用いた, マウス由来正常型プリオンタンパク質の発現解析. 第75回日本生化学大会. 京都, 10.14-17, 2002.
48. 岸田日帯、逆瀬川裕二、青砥久美子、鎌田礼子、山河芳夫、西島正弘、黒岩義之、八谷如美、金子清俊. 防御型プリオンタンパクを用いたプリオン病の治療開発の培養細胞における検討. 第75回日本生化学大会. 京都, 10.14-17, 2002.
49. 戸田宏幸、逆瀬川裕二、有馬邦正、黒岩義之、金子清俊. Pick小体の蛋白質解析. 第75回日本生化学大会. 京都, 10.14-17, 2002.
50. 田中 寅彦、伊藤 卓、古田 大、江口 睦志、戸田 宏幸、高井 (若林) 恵理子、金子 清俊. In situ phage screening; single chain Fvファージライブラリーを用いた、組織切片中の微量抗原同定法. 第25回日本分子生物学会年会. 横浜, 12.11-14, 2002.
51. 逆瀬川裕二、鎌田礼子、青砥久美子、八谷如美、金子清俊. 脂質ラフトに局在するプリオン蛋白質に由来するペプチド断片の解析. 第25回日本分子生物学会年会. 横浜, 12.11-14, 2002.

H. 知的所有権の取得状況

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
総括研究報告書

硬膜移植後プリオン病に対する進行阻止法の開発に関する基礎研究

蛋白質の高次構造をほどく新しいシャペロン分子アンフォルジン

主任研究者 金子清俊（国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部）
研究協力者 八谷如美（国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部）
逆瀬川裕二（国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部）

研究要旨

日本でのプリオン病の主な症例は脳外科手術によるヒト乾燥硬膜移植後の医原性 Creutzfeldt-Jakob 病（CJD）である。また平成 13 年 9 月に国内で初のウシ海綿状脳症（BSE）が発見されて以来、プリオン病に対する社会的関心が非常に高く、本疾患の治療法開発が期待されている。

正常型プリオン蛋白質の生理的切断部位は、感染型プリオン蛋白質立体構造の鍵となる β シート領域と重なり、しかも極めて疎水性の高い部分に位置するため、正常プリオン蛋白質分解酵素がアクセスする際及び感染型プリオン蛋白質への変換の際に、何らかの分子シャペロン様分子の関与が示唆される。さらに、この分子は通常分子シャペロンとは異なり、misfold された分子ではなく正常に folding された分子を認識するという概念が大きく異なる。我々は、正常に folding された分子を認識し、それを unfold する活性を検出する系を出芽酵母を用いて確立した結果、新しい概念に属するシャペロン様分子を同定し、“アンフォルジン”と命名した。

アンフォルジンはプリオン蛋白質、アミロイド β ペプチド(1-42)、 α -synuclein の高次構造を試験管内で unfold し、トリプシン感受性をあげる事ができた。アンフォルジンに特異性を付加する事によって、所謂蛋白質凝集病の治療法への可能性が示唆された。

A. 研究目的

プリオン病の原因であるプリオン蛋白質 (PrP) には正常型 (PrP^C) と異常感染型 (PrP^{Sc}) とが存在し、両者のアミノ酸配列は相同だが立体構造は大きく異なる。ヒトのプリオン病である Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) は、進行性痴呆や運動機能障害が急速に悪化して数ヶ月で無動無言状態となる致死性の疾患である。特に我が国では 1973 年から 1997 年 3 月までの脳外科手術において年間約 2 万枚の乾

燥硬膜が使用され、この硬膜移植が原因と考えられる医原性 CJD が大きな社会問題となっている。また平成 13 年 9 月に国内初のウシ海綿状脳症 (BSE) が発見されて以来、プリオン病に対する社会的関心は非常に高い。我々は硬膜移植後プリオン病の進行阻止・治療法の開発のために、PrP^{Sc} 複製の抑制を目標とした検討を行っている。

PrP^C は、異常感染型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) を鋳型とした PrP^C から PrP^{Sc} へ

の高次構造変換がその基盤にあると考えられている。生体内における PrP^C の分解経路において、PrP^C はその中心領域で最初の分解を受けることが知られている。この部分は、PrP^{Sc} への変換に際しても critical な領域、いわゆる β -シート領域に相当するため、分解を受けるか変換されるかという、互いに相補的な関係を有する。言い換えれば、この部分で切断されてしまえばもはや PrP^{Sc} への変換は生じ得ないため、治療法開発の点からも重要である。また同時に、この部分は非常に疎水性に富んでいるため、分解酵素がアクセスするにはこの領域が unfold される必要があると推察される。我々は、まずこの部分を unfold する分子の同定を目指している。これは、PrP^{Sc} への変換に関与する分子シャペロン様分子、いわゆる X 因子との相同性も注目される。

しかしながら、これらの unfolding 活性は正常に folding された分子 (PrP^C) を標的とすると考えられるため、従来から知られている misfolding 蛋白質を標的とする一般的な分子シャペロンの範疇には該当しない。そこで我々は、このような正常分子に対し unfolding 活性を発揮する新規分子シャペロンが実際に存在するかどうかを、まず yeast の系において検討した。

B. 研究方法

細胞内で合成されたポリペプチドが機能する分子となるには、速やかに正しい立体構造を形成することが重要である。そこで細胞には、この速やかな立体構造形成を手助けするためにシャペロンとよばれる一連の分子が存在し効率良く機能する分子を作り出している。ところが細胞が運動、分裂などダイナミックな動きをするときや、間違った高次構造をとったものを一旦ほどいて分解系へ手渡すような場合、対象となる蛋白質には一旦形成された高次構造を速やかに変換させる

(unfolding) 柔軟性が必要になってくる。

我々は出芽酵母細胞内からこのような unfoldase 活性を持つ分子を精製するためにトリプシン感受性を利用した独自の試験管内アッセイ系を確立した。精製標品の分子量は 58 キロダルトンで、試験管内で蛋白質の高次構造をほぐす活性から Unfoldin (アンフォルジン) と命名した。アンフォルジンを高純度に精製し電子顕微鏡を用いて一分子の形態を低角度回転蒸着法により観察したところ、直径約 10nm、中央に約 2 nm のホールを持つリング状構造が観察された (図 2)。アンフォルジンが基質を認識して unfold する活性は ATP 依存性であり、ADP 存在下では活性が認められない。また unfold 活性には基質特異性がなく、ATP 存在下では調べた限りすべての基質に結合しその高次構造を unfold することができる。また、試験管内ではアンフォルジンには基質特異性がないことから、プリオンをはじめ様々な蛋白質凝集病の治療への応用が示唆された。そこで、試験管内でアンフォルジンがプリオンをはじめとする β -シート構造をもつ蛋白質をアンフォルドできるか否かをトリプシン感受性を用いたアッセイ系にかけ調べた。

(倫理面への配慮)

本実験においてはヒト及び動物の試料を使用しないため、特に倫理上の問題点はないと考えている。

C. 研究結果

プリオン蛋白質 (図 3)、アミロイド β ペプチド(1-42)、 α -synuclein を基質として、アンフォルジンが試験管内でこれら病因分子の立体構造を unfold できるか否かをトリプシン感受性を用いたアッセイ系で確認した。すなわち、これらの基質蛋白質を ATP 存在下においてアンフォルジンとインキュベートしたのち、さらに低濃

度のトリプシンとインキュベートした。アンフォルジンにこれら基質蛋白質の高次構造を unfold する活性があれば、高次構造変化によって低濃度のトリプシンにも感受性が上昇し容易に分解されるはずである。予想通り ATP 存在下においてアンフォルジンはこれら基質の高次構造を unfold し、トリプシン感受性をあげる事ができた。

D. 考察

アンフォルジンには試験管内での基質特異性が認められない。この特徴を利用してプリオン病をはじめとする蛋白質凝集病への治療への応用が考えられる。

E. 結論

アンフォルジンはプリオン蛋白質、アミロイドβペプチド(1-42)、α-synuclein の高次構造を試験管内で unfold し、トリプシン感受性をあげる事ができた。アンフォルジンに特異性を付加する事によって、所謂蛋白質凝集病の治療法への可能性が示唆された。

図 2

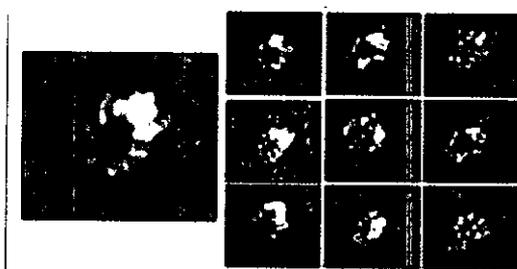
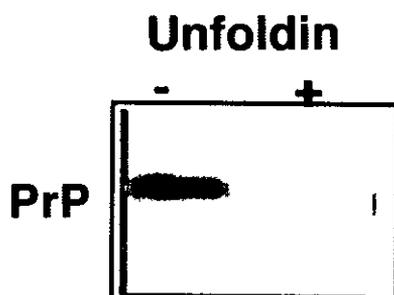


図 3



F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Furuta M, Ito T, Eguchi C, Tanaka T, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K: Two-Dimensional Electrophoresis/Phage Panning (2D-PP): A Novel Technology for Direct Antibody Selection on 2-D Blots. *J Biochem* (Tokyo). 132: 245-251,2002
2. Tanaka T, Ito T, Furuta M, Eguchi C, Toda H, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K: In Situ Phage Screening. A method for identification of subnanogram tissue components *in situ*. *J Biol Chem*. 277: 30382-30387,2002
3. Perrier V, Kaneko K, Safar J, Vergara J, Tremblay P, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB, Wallace AC: Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 13079-13084,2002
4. Korth C, Kaneko K, Groth D, NHeye N, Telling G, Mastrianni J, Parchi P, Gambetti P, Will R, Ironside J, Heinrich C, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB: Abbreviated transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to mice expressing a novel chimeric prion protein transgene. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* in press
5. Toda H, Sakasegawa, Y, Kishida, H, Arima K, Yamada M, Arai T, K, Hitoshi Takahashi H, Yoshiyuki Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K. Distinct pattern of tau phosphorylation in laser microdissected Pick bodies: "A novel microbiological approach *in situ*".

- Neurosci Lett*, in press
6. Sekijima M, Motono C, Yamasaki S, Kaneko K, Akiyama Y.
Molecular dynamics simulation of dimeric and monomeric forms of human prion protein (HuPrP) reveals the higher stability of the dimeric form.
Biophys J, in press
 7. 八谷如美, 金子清俊.
プリオン病.
医学のあゆみ, 200: 1241-1242, 2002
 8. 金子清俊.
ヤコブ病.
医学最前線 132, 健康な子ども, 352: 38-39, 2002
 9. 逆瀬川裕二, 金子清俊.
分子レベルの最新疾患研究①プリオン病の分子病態と抗体を用いた治療法.
実験医学, 2: 1344-1348, 2002
 10. 桜井総子, 金子清俊.
プリオン蛋白質異常化の分子メカニズムと治療への応用.
ファルマシア, 38: 645-648, 2002
 11. 金子清俊.
プリオン病研究の現状と変異型CJD.
脳と精神の医学, 13: 171-174, 2002
 12. 金子清俊.
牛海綿状脳症: BSEいわゆる狂牛病とは、どんな病気か?
武田薬報, 430: 23-26, 2002
 13. 金子清俊.
BSEによる人への感染の危険性と治療法.
食品衛生学雑誌, 43: 221-227, 2002
 14. 逆瀬川裕二, 金子清俊.
プリオン病とプリオン特異抗体を用いた治療法.
Cognition and Dementia, 1: 33-38, 2002
 15. 金子清俊.
牛海綿状脳症 (BSE) と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD).
東京保険医新聞, 1206: 3-4, 2002
 16. 金子清俊.
牛海綿状脳症 (BSE) と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD).
東京内科医会会誌, 18: 21-24, 2002
 17. 金子清俊.
プリオン病の分子生物学.
臨床検査, 46: 1501-1508, 2002
 18. 金子清俊.
Prion 病発症のメカニズム.
神経内科, 57: 377-383, 2002
 19. 金子清俊.
プリオン蛋白関連疾患.
医学の歩み, 203: 855-857, 2002
 20. 逆瀬川(八谷)如美, 金子清俊.
プロテイン X-異常プリオン増殖に関するプレイヤー.
医学の歩み, 203: 877-880, 2002
 21. 金子清俊.
プリオン病の分子生物学.
臨床検査, 46: 1501-1508, 2002
 22. 金子清俊.
牛海綿状脳症(BSE)と変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD).
運動障害, 12: 113-118, 2002
 23. 金子清俊.
プリオン蛋白質異常化のメカニズム.
神経研究の進歩, 47: 37-44, 2003
2. 学会発表
1. Kishida H, Sakasegawa Y, Yamakawa Y, Kuroiwa Y, Hachiya NS, and Kaneko K. Protective prion-protein inhibited the scrapie formation. The 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases [III], Shonan, Oct 2-5, 2002
 2. Sakasegawa Y, Aoto K, Kamata R, Hachiya NS, and Kaneko K. Membrane fractions from mouse neuroblastoma cells contained peptides

- derived from the cellular prion. The 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases [III], Shonan, Oct 2-5, 2002
3. Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Tsukita S, and Kaneko K. A Novel protein unfolding chaperon "Unfoldin" unfolds proteins with broad specificity in vitro. The 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases [III], Shonan, Oct 2-5, 2002
 4. Kamata R, Sakasegawa Y, Hachiya NS, and Kaneko K. The real time analysis of prion protein-localization using living cells. The 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases [III], Shonan, Oct 2-5, 2002
 5. Yamazaki K, Yamada E, Kanaji Y, Sato K, Takano K, Sakasegawa Y, and Kaneko K. Regulation of Cellular Prion Protein (PrPc) mRNA Expression by TSH in Human Thyroid Follicles. The 74th Annual Meeting of the American Thyroid Association. Los Angeles, Oct 9-13, 2002.
 6. Hachiya NS, Sakasegawa Y, Jozuka A, Sasaki H, Tsukita S, Kaneko K. A novel ATP-dependent protein chaperone, Unfoldin. 42th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Francisco, Dec 14-18, 2002.
 7. Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Burton DR, and Prusiner SB. Antibodies inhibit prion formation and abolish prion infectivity. New perspectives for Prion therapeutics. Paris, Dec 1-3, 2002.
 8. 金子清俊. プリオン病の病態と治療戦略. 神経筋ネットワーク第2回東海北陸ブロック会議. 静岡, 4.12, 2002.
 9. 金子清俊. プリオンとヒト変異型クロイツフェルトヤコブ病について. 日本食肉研究会・シンポジウム. 東京, 4.13, 2002.
 10. 金子清俊. プリオン複製に關与する新しい因子の同定とプリオン病治療・予防法開発への応用. CREST「脳を守る」シンポジウム. 東京, 4.25-26, 2002.
 11. 金子清俊. 謎の病原体 プリオン. 東京電力エネルギー館科学ゼミナール. 東京, 5.11, 2002.
 12. 金子清俊. プリオン病. 神戸市医師会学術講演会. 神戸, 5.18, 2002.
 13. 金子清俊. プリオン病について, 科学技術振興事業団主催サイエンスチャンネル. 東京, 5.22, 2002.
 14. 金子清俊. 狂牛病と私たちの暮らし, 2002年度一橋大学婦人部定期講演会. 東京, 5.30, 2002.
 15. 金子清俊. 牛海綿状脳症と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. 東京内科医学術講演会. 東京, 6.8, 2002.
 16. 金子清俊. プリオン病の治療法. 第19回葛南神経学セミナー. 千葉, 6.21, 2002.
 17. 金子清俊. プリオン病の治療の治療に向けて. 第7回動物細胞工学シンポジウム. 日本動物細胞工学会. 東京, 7.2, 2002.
 18. 金子清俊. 牛海綿状脳症 (BSE) に関する国際シンポジウム・パネリスト. 畜産技術協会. 東京, 7.4, 2002.
 19. 金子清俊. 牛海綿状脳症について. 第32回安全工学シンポジウム. 日本人間工学会. 東京, 7.11-12, 2002.
 20. 金子清俊. 牛海綿状脳症及び変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の正しい知識. 第13回生体防御学会市民講座. 東京, 7.13, 2002.

21. 金子清俊. ウシ海綿状脳症とヒト変異型CJD. 第32回新潟神経学夏期セミナー. 新潟, 7.25-27, 2002.
22. 金子清俊. 変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. 第24回運動障害研究会. 東京, 7.27, 2002.
23. 金子清俊. 牛海綿状脳症(BSE)とヒトへの感染の危険性. 2002夏期学校給食学習会. 全国学校給食を考える会. 横浜, 8.6, 2002.
24. 金子清俊. プリオン病等の神経疾患における磁気共鳴装置を用いた早期診断の可能性. 創価大学生命研セミナー. 脳機能疾患への13C-MRSへの応用を考える会. 東京, 8.29, 2002.
25. 金子清俊. 防御型プリオンと抗体療法. 第121回日本医学会シンポジウム. 日本医学会. 箱根, 8.30-9.1, 2002.
26. 金子清俊. 抗PrPモノクローナル抗体の開発とプリオン病の診断と治療. ウェスタン・ブロット法の基本手法と牛海綿状脳症(BSE)検査法への応用. 学際企画. 東京, 9.8, 2002.
27. 金子清俊. プリオン蛋白質解析 - 何ができて、何ができないのか? 理研シンポジウム. 理化学研究所. 埼玉, 9.13, 2002.
28. 金子清俊. プリオン病について. 第15回茨城神経内科集談会. 茨城, 9.25, 2002.
29. K. Kaneko. Therapeutic Approaches in Prion Disease. The 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases [III], Shonan, Oct 2-5, 2002.
30. 金子清俊. プリオン蛋白質の代謝と高次構造変換. 第7回金沢神経科学シンポジウム. 金沢, 10.13, 2002.
31. 金子清俊. プリオン病の治療法開発. 第75回日本生化学大会シンポジウム. 京都, 10.14-17, 2002.
32. 金子清俊. プリオン病-現状と行政の対応-. フォーラム2002:衛生薬学・環境トキシコロジー. 日本薬学会. 広島, 10.25, 2002.
33. 金子清俊. ウシ海綿状脳症(BSE)とヒト変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)について. 第11回日本口腔感染症学会. 神戸, 11.16, 2002.
34. Kaneko K. Therapeutic Approaches for Prion Disease. CJD Symposium, Tokyo, Nov 25, 2002.
35. 金子清俊. 牛海綿状脳症(BSE)制圧に向けたナショナルプロジェクト Replication mechanism of PrP^{Sc} and therapeutic approaches for prion disease. 東京, 12.2, 2002.
36. 岸田日帯, 戸田宏幸, 黒岩義之, 鈴木友子, 武田伸一, 山河芳夫, 萩原健一, 大内史子, 西島正弘, 金子清俊. 変異型プリオン蛋白を用いたプリオン病の治療開発の検討 CREST「脳を守る」シンポジウム. 東京, 4.25-26, 2002.
37. 逆瀬川裕二, 青砥久美子, 金子清俊. プリオン蛋白質局在画分としての脂質ラフトの解析. CREST「脳を守る」シンポジウム. 東京, 4.25-26, 2002.
38. 桜井総子, 鎌田礼子, 古田大, 八谷如美, 金子清俊. 正常型プリオンタンパク質の代謝機構における分解活性の検討. CREST「脳を守る」シンポジウム. 東京, 4.25-26, 2002.
39. 八谷如美, 渡邊光太, 鎌田礼子, 逆瀬川裕二, 金子清俊. プリオン蛋白質の細胞内局在の解析. CREST「脳を守る」シンポジウム. 東京, 4.25-26, 2002.

40. 岸田日帯、山川芳夫、黒岩義之、逆瀬川裕二、金子清俊. 遺伝子多型を用いたプリオン病の治療開発に向けた培養細胞による検討. 第43回日本神経学会. 札幌, 5.29-31, 2002.
41. 戸田宏幸、岸田日帯、有馬邦正、黒岩義之、金子清俊. 神経変性疾患に診られる神経内封入体の構成蛋白質の新しい解析法. 第43回日本神経学会. 札幌, 5.29-31, 2002.
42. 鎌田礼子、逆瀬川裕二、八谷如美、金子清俊. マウス神経芽細胞種由来N2a細胞におけるプリオンタンパク質の局在. 第45回日本神経化学会. 札幌, 7.17-19, 2002.
43. 渡邊光太、逆瀬川裕二、八谷如美、金子清俊. 「プリオン蛋白質の生細胞における局在の解析」 第75回日本生化学大会. 京都, 10.14-17, 2002.
44. 鎌田礼子、逆瀬川裕二、八谷如美、金子清俊. 「生細胞におけるプリオン質の切断後の挙動の解析」 第75回日本生化学大会 京都 10.14-17, 2002
45. 逆瀬川裕二、岸田日帯、鎌田礼子、青砥久美子、八谷如美、金子清俊. プリオン蛋白質局在画分としての脂質ラフトの解析. 第75回日本生化学大会. 京都, 10.14-17, 2002.
46. 八谷如美、鎌田礼子、逆瀬川裕二、金子清俊. プリオンタンパク質の代謝に関わる因子について. 第75回日本生化学大会. 京都, 10.14-17, 2002.
47. 桜井総子、八谷如美、逆瀬川裕二、金子清俊. 酵母を用いた, マウス由来正常型プリオンタンパク質の発現解析. 第75回日本生化学大会. 京都, 10.14-17, 2002.
48. 岸田日帯、逆瀬川裕二、青砥久美子、鎌田礼子、山河芳夫、西島正弘、黒岩義之、八谷如美、金子清俊. 防御型プリオンタンパクを用いたプリオン病の治療開発の培養細胞における検討. 第75回日本生化学大会. 京都, 10.14-17, 2002.
49. 戸田宏幸、逆瀬川裕二、有馬邦正、黒岩義之、金子清俊. Pick小体の蛋白質解析. 第75回日本生化学大会. 京都, 10.14-17, 2002.
50. 田中 寅彦、伊藤 卓、古田 大、江口 睦志、戸田 宏幸、高井 (若林) 恵理子、金子 清俊. In situ phage screening; single chain Fvファージライブラリーを用いた、組織切片中の微量抗原同定法. 第25回日本分子生物学会年会. 横浜, 12.11-14, 2002.
51. 逆瀬川裕二、鎌田礼子、青砥久美子、八谷如美、金子清俊. 脂質ラフトに局在するプリオン蛋白質に由来するペプチド断片の解析. 第25回日本分子生物学会年会. 横浜, 12.11-14, 2002.

H. 知的所有権の取得状況

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

硬膜移植後プリオン病に対する進行阻止法の開発に関する基礎研究

硬膜移植後プリオン病発症モデルマウスの作成

分担研究者 川原信隆（東京大学医学部付属病院）
分担研究者 西島正弘（国立感染症研究所 細胞化学部）
研究協力者 古屋一英（東京大学医学部付属病院）
研究協力者 山河芳夫（国立感染症研究所 細胞化学部）

研究要旨

汚染硬膜移植によるプリオン病の発症モデル動物を作成することを目的として、プリオン病発症マウスの脳ホモゲネートをコラーゲン膜に染み込ませたものを汚染硬膜の代用として用いて病原体の脳表からの接種を試みた。その結果：1. 脳（室）内に接種したものに比べて約 20 日の遅れをもって全てのマウスが発症、死亡した。また発症、死亡したマウス脳には PrP^{Sc} の蓄積がウエスタンブロット法あるいは免疫染色法により確認された。2. マウス脳のスポンジ状態及び PrP^{Sc} が強く免疫染色される部位は PrP^{Sc} を接触させた脳表面と、同側の視床および小脳であった。これらのことから、感染経路は脳表からの PrP^{Sc} 経神経線維性による伝播の可能性が高く、本法により発症せしめたマウスはヒト汚染硬膜移植後プリオン病の発症モデル動物となりうると考えられる。

A. 研究目的

汚染硬膜移植によるプリオン病の発症モデル動物を作成することを目的として、プリオン病発症マウスの脳ホモゲネートをコラーゲン膜に染みこませたものを汚染硬膜の代用として用いてマウス脳表からの病原体の接種を以下に述べる方法で試みた。

B. 研究方法

8 週齢から 13 週齢の両性 C57 マウ

ス（PrP^C 過発現トランスジェニック）一群 5 匹を用いた。マウスにハロセン吸入後、ケタミン 0.3 mg を腹腔内投与し無痛、無動化の後、マウス用ステレオ固定器に固定し正中線に沿って 1cm の切開をおいた。右側の頭蓋骨の Bregma と Lambda の間に一辺 4mm の正方形の開窓をおき硬膜を切開、除去し、30 ゲージ針にて 2 mm の長さの皮質切開線を 0.5 mm 間隔にて 3 本作成後、ヒト脳神経外科手術の際用いられ

る止血用コラーゲンスポンジ（インスタット）3 x 3 mm大を脳表に接着させ、PrP^{Sc}を発症したマウス脳の10% ホモジェネート溶液を5 µl しみこませた後、創部を縫合した。（図1）

（倫理面への配慮）

本実験においては、予め実験動物倫理委員会に申請を行い審議の後、了承を受けた上で実施した。

C. 研究結果

上記実験条件で、病原体を脳（室）内に接種したものに比べて約20日の遅れ、即ち120日前後で全てのマウスが発症、死亡した（図2）。ウエスタンブロット法により、異常型プリオンタンパク質の脳への蓄積は接種後90日以降で顕著に認められる様になり（図3）、瀕死あるいは、死亡したマウス脳にはPrP^{Sc}の強度の蓄積が免疫染色法によっても確認された。

マウス脳の海綿状態及びPrP^{Sc}が強く免疫染色される部位はPrP^{Sc}を接触させた脳表面と、同側の視床および反対側の小脳であった（図4、5）。

D. 考察/E. 結論

これらのことから、PrP^{Sc}の感染経路は脳表からの経神経線維性による伝播の可能性が高く、本法により発症せしめたマウスはヒト硬膜移植によるプリオン病の発症モデル動物となりうると考えられる。本モデルにおいてPrP^{Sc}の感染経路として浸潤性、血行性、経脳脊髄液性、経神経線維性の4つが

考えられるが、大脳皮質と視床との間に連続した染色性が認められない事から、大脳皮質と同側の視床を結びつけるのに矛盾しない説明は経神経線維での伝播である。大脳皮質には同側の視床からの投射繊維が存在しているためPrP^{Sc}の逆行性取り込みによる軸索経由での視床神経細胞体への輸送が起こっているのかも知れない。今後、この可能性を検証するため電子顕微鏡による観察および、レクチン結合型HRPをしみこませたコラーゲンスポンジによる視床への繊維連絡を確認することを考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1) 「プリオン病のプロテオーム解析」大内史子、山河芳夫、西島正弘（国立感染研・細胞化学部）第75回日本生化学会大会（京都）2002.10月

(2) 「ウイルス感染時におけるプリオンタンパク質の機能関与」中村優子¹、山河芳夫¹、西島正弘¹、佐伯圭一²、小野寺節²、¹国立感染研・細胞化学部 ²東大大学院・農学部・応用免疫。第75回日本生化学会大会（京都）2001.10月

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

