

分担研究者：三好一郎 名古屋市立大学大学院医学研究科実験動物研究教育センター

## 1. 研究目的

私達は、プリオン病の感染初期には異常感染型プリオンタンパク (PrP<sup>Sc</sup>) の伝播・増幅など、生体が特異的な反応を示すと仮定し、関与する分子を転写(産物)レベルで捕捉する目的で、マウス感染実験、あるいは、ScN2a 細胞を用いて試験管内感染や治療の実験を行い、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリングを実施した。発現の変動を示す遺伝子を定量的に解析し、特に試験管内治療・感染実験で高発現を示した遺伝子について、その siRNA 導入による発現抑制が PrP<sup>Sc</sup> 増殖にどのように関与するか検討した。

## 2. 研究方法

福岡 1 株あるいは正常脳 10%乳剤を C57BL/6 マウスの脳 (20 $\mu$ l) および腹腔内 (50 $\mu$ l) に接種し、2 及び 10、30 日後に採取した脾臓、脳等から mRNA を抽出した。また、コンゴレッド存在下 (2.5  $\mu$ g/ml) で培養することにより PrP<sup>Sc</sup> が検出されなくなった ScN2a に、PrP<sup>Sc</sup> を産生している ScN2a あるいは対照の N2a の超音波処理乳剤を加えて再感染させた後、細胞濃度を変えて (1 : 12 および 1 : 8) 継代した細胞から RNA を抽出・精製した。これらの RNA を用いて、マイクロアレイによるプロファイリングを実施した。次に、感染と非感染細胞の間で発現の変動を示す 11 遺伝子、および、Ingenuity Pathway Analysis によって PrP などとの相互作用が示唆される遺伝子、個体接種実験で選択された遺伝子などの中から任意に選び出した合計 37 遺伝子について Real time-PCR を行い定量的に解析した。そのうち特に細胞の再感染実験で高発現を示した 6 遺伝子に関して、プ

リオン高感受性クローン (ScN2a-5) に siRNA を導入して培養後、イムノプロットにて PrP<sup>Sc</sup> を定量しその増殖への影響について解析した。

(倫理面の配慮)

本研究では、文部科学省の研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針およびその関連法や基準、さらに名古屋市立大学大学院医学研究科の動物実験指針に従い、同研究科動物実験委員会の承認のもとで動物実験を実施した。また、遺伝子組換え実験は、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律を遵守し名古屋市立大学大学院医学研究科の遺伝子組換え実験安全委員会の承認のもとで遂行した。

## 3. 研究結果及び考察

個体レベルの接種実験及び細胞レベルでの再感染実験で発現変動を示した 37 遺伝子の mRNA を定量したところ、低密度非感染時の PrP<sup>C</sup> と比較して殆どの遺伝子の発現量は少なく、前述の 11 遺伝子のうちの 6 遺伝子 (Afg3l1 および Nup43、Sdf2l1、Cdca3、Ppp1cb、Surf4) のみ比較的高発現の傾向を示した。さらにそのうちの 2 遺伝子 (Nup43、Ppp1cb) は個体接種実験でも高発現しており興味深い。全般に個体レベルと細胞レベルの結果との間に密接な関連が見出せなかった。

ScN2a-5 細胞に siRNA をトランスフェクトしてその PrP<sup>Sc</sup> 蓄積に対する効果を調べたところ、プロファイリングから選択された 6 遺伝子ではなく、対照に用いた Ugcg (glucosylceramide synthase、スフィンゴ糖脂質合成経路の最初のステップでセラミドにグルコースを転移する酵素) 遺伝子のみが PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を抑制し

た。6 遺伝子の発現抑制は、細胞増殖の低下を示す傾向にあるにもかかわらず、むしろ PrP<sup>Sc</sup> の相対的蓄積量は増加した。機構は全く不明であるが Ugcg 遺伝子の発現を抑制すると、逆にその他の 6 遺伝子の発現が高くなっていた。これらの遺伝子(産物)は、凝集化した PrP<sup>Sc</sup> を反応可能な状態に触媒する可能性が考えられるものの、異常タンパク反応、あるいはシャペロン活性化、小胞体関連分解など、たんぱく質の品質管理や細胞内輸送に関連する機能を持つと考えられており、PrP<sup>Sc</sup> が増幅されつつある細胞内での生体側の反応として矛盾しないとも考えられる。

#### 4. 評価

##### 1) 達成度について

個体レベル及び培養細胞系で、PrP<sup>Sc</sup> 感染時に生体側の反応に伴うプリオン病特異的遺伝子発現プロファイルを基に、siRNA 導入による PrP<sup>Sc</sup> 増殖抑制効果を調べ、幾つかの候補分子を絞り込むところまで到達した。しかしながら、これらの結果を確定するには、その分子機序の解明が必要である。また、有意な発現遺伝子のプロファイリングデータを得るためには、実験規模を大きくし且つ繰り返す必要があると実感している。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

プリオン感染に伴う遺伝子発現プロファイリングは幾つか報告されているが、個体レベル及び培養細胞系の比較解析や治療・再感染実験は独創的である。また、PrP 以外の分子を標的にした siRNA による PrP<sup>Sc</sup> 産生への関与を調べた研究は少なく、貴重なデータを提示できると考える。

##### 3) 今後の展望

選抜した候補分子による分子機序の解明、特に高発現の影響も含み、細胞系および遺伝

子組換えマウスによる動物実験系での反応の再構築・検証が必要である。

##### 4) 研究内容の効率性について

発現遺伝子のプロファイリングから有意なデータを得るためには、実験規模を大きくし繰り返す必要があるが、いずれも充分と言えるか疑問が残る。一方、個体接種実験あるいは siRNA 導入による PrP<sup>Sc</sup> 増殖抑制実験などは研究班内の方々のご指導・ご協力を賜り極めて効率的に遂行されたと考える。

#### 5. 結論

個体接種実験および試験管内感染実験から選ばれた 37 候補遺伝子を対象にプリオン感染に伴う発現変動を定量的に解析したが、細胞レベルと個体接種で得られた結果の間に明らかな関連は見られなかった。細胞感染実験で高発現を示した 6 遺伝子は、その発現を抑制すると ScN2a-5 の PrP<sup>Sc</sup> 増殖を促進する傾向を示し、逆に、間接的にその発現が促進されると PrP<sup>Sc</sup> 増殖が抑制されたことから、これらの遺伝子(産物)が、たんぱく質の品質管理や細胞内輸送に関連する機能を持つことを支持すると考えられた。

#### 6. 研究発表

##### 1) 国内

口頭発表：1 件

原著論文による発表：1 件

それ以外(レビュー等)の発表：1 件

そのうち主なもの

##### 論文発表

1. 三好一郎. 遺伝子組換え動物を用いた疾患モデル動物の開発および疾患原因遺伝子の同定・機能解析. 名古屋市立大学医学会雑誌 2005 : 56(2, 3) ; 29-40.

2. 三好一郎. 実験動物をめぐる. 現代醫學 2006 : 54(1) ; 185-189.

## 学会発表

1. 三好一郎, 宮本智美, 毛利資郎, 村本環, 北本哲之. プリオン感染および治療に伴って発現の変動する遺伝子の解析. 2005 年プリオン研究会 天童, 2005.8.

## 2) 海外

口頭発表 : 0 件

原著論文による発表 : 9 件

それ以外(レビュー等)の発表 : 1 件

そのうち主なもの

## 論文発表

1. Miyoshi I, Okamura T, Kasai N, Kitamoto T, Ichikawa S, Osuka S, Hirabayashi Y. Conventional/Conditional Knockout Mice. In : Hirabayashi Y, Igarashi Y, Merrill AH Jr. ed : Sphingolipid Biology. 2006 : 443-452, Springer-Verlag, Tokyo.
2. Mototani Y, Miyoshi I, Okamura T, Moriya T, Meng, Y, Pei XY, Kameo S, Kasai N. Phenotypic and genetic characterization of the Atp7aMo-Tohm mottled mouse : A new murine model of Menkes disease Genomics 2006 : 87(2) ; 191-199.
3. Numata Y, Terui T, Okuyama R, Hirasawa N, Sugiura Y, Miyoshi I, Watanabe T, Kuramasu A, Tagami H, Ohtsu H. The accelerating effect of histamine on the cutaneous wound healing process through the action of bFGF. J Invest Dermatol 2006 : 31(4) ; 306-316.
4. Cho A, Uchio-Yamada K, Torigai T, Miyamoto T, Miyoshi I, Matsuda J, Kurosawa T, Kon Y, Asano, A, Sasaki N,

- Agui T. Deficiency of the tensin2 gene in the ICGN mouse, an animal model for congenital nephrotic syndrome. Mamm Genome 2006 : 17(5) ; 407-416.
5. Takahashi RI, Kuramochi T, Aoyagi K, Hashimoto S, Miyoshi I, Kasai N, Hakamata Y, Kobayashi E, Ueda M. Establishment and Characterization of CAG/EGFP transgenic rabbit line. Transgenic Res. 2007 ; 16(1) : 115-120.
6. Murakami M, Ohba T, Wu TW, Fujisawa S, Suzuki, T, Takahashi Y, Takahashi E, Watanabe H, Miyoshi I, Ono K, Sasano H, Ito H, Iijima T. Modified sympathetic regulation in N-type calcium channel null-mouse. Biochem Biophys Res Commun 2007. 354(4) ; 1016-1020.
7. Sasaki N, Hosoda Y, Nagata A, Ding M, Cheng JM, Miyamoto T, Okano S, Asano A, Miyoshi I, Agui T. A mutation in tpst2 encoding tyrosylprotein sulfotransferase causes dwarfism associated with hypothyroidism. Mol Endocrinol 2007 : 21(7) ; 1713-1721.

## 学会発表

特になし

## 7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

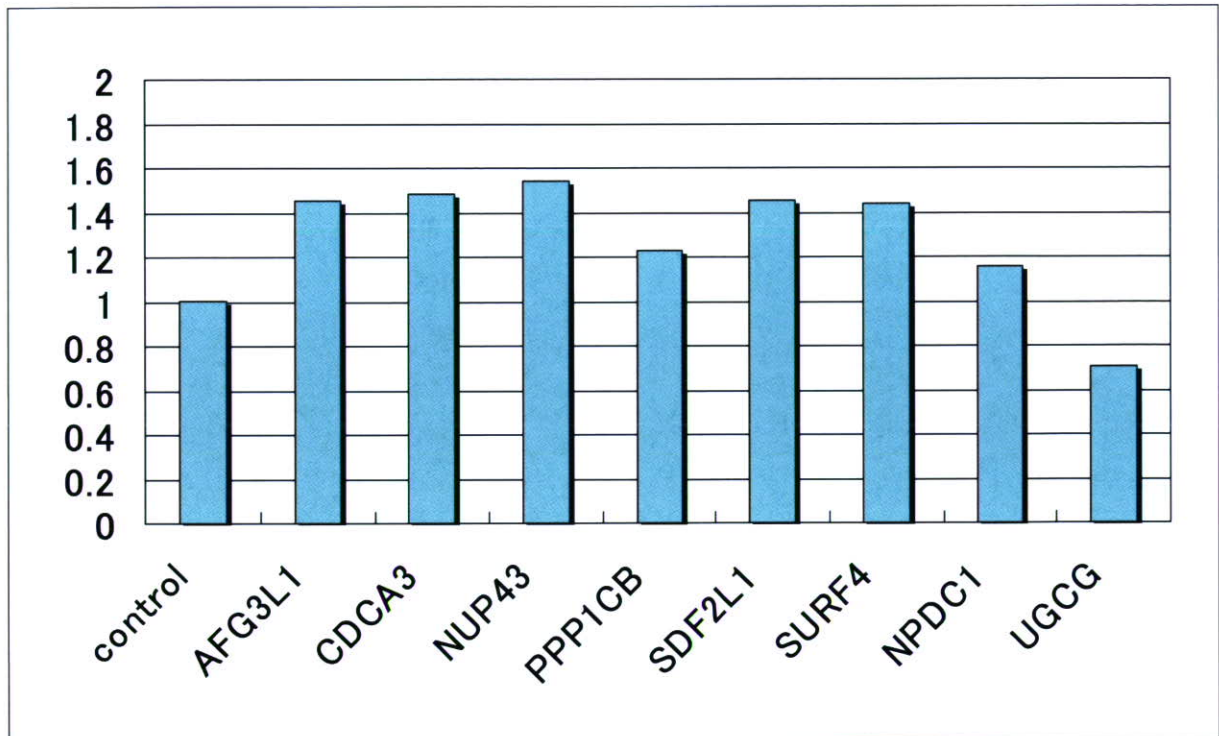
特になし

3. その他

特になし

## プリオン感染および治療に伴う遺伝子発現の解析

分担研究者：三好一郎 名古屋市立大学大学院医学研究科実験動物研究教育センター



マウス個体及び培養細胞で異常感染型プリオンタンパク ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) への構造変換及びその増殖に伴い発現が変動する遺伝子を比較解析し、定量的に高発現を示した 6 遺伝子 (Afg3l1, Cdca3, Nup43, Ppp1cb, Sdf2l1, Surf4) 及び Npdc1、Ugcg に関して、siRNA 導入による遺伝子発現の抑制が ScN2a-5 プリオン高感受性クローンの  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  増殖に影響を与えるか検討した。6 遺伝子及び Npdc1 の発現抑制は、細胞増殖率の低下に反して相対的  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の蓄積を助長した (図)。逆に、Ugcg siRNA の導入により 6 遺伝子の発現は高くなり  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  増殖が抑制された。異常タンパク反応あるいはシャペロン活性化、小胞体関連分解など、たんぱく質の品質管理や細胞内輸送に関連すると考えられる 6 遺伝子は、 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の増殖を抑制するために発現・機能し、その発現が抑制されると  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の増殖を促進することが示唆された。

分担研究者：金子清俊 東京医科大学医学部神経生理学講座

## 1. 研究目的

感染型プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) 生成に関する膨大な研究成果と異なり、正常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>C</sup>) の細胞内での動態についてはほとんど研究されていない現状を踏まえ、PrP<sup>C</sup> の細胞内輸送機構の解明を目的とし、蛍光標識 PrP<sup>C</sup> の細胞内可視化系を用いた検討を行った。

## 2. 研究方法

- 1) PrP<sup>C</sup> の微小管依存性細胞内輸送の詳細な観察に向けて、安定した蛍光蛋白質標識 PrP<sup>C</sup> の持続発現培養細胞株及び1週間以上に及ぶ蛍光標識 PrP<sup>C</sup> 連続観察系の詳細な条件検討を行った後に、長期間連続した生細胞の持続観察を行った。
- 2) N2a細胞を分化誘導した状態での蛍光標識 PrP<sup>C</sup> の細胞内挙動、輸送される PrP<sup>C</sup> の最終目的地に関する検討を通じ、PrP<sup>C</sup> の生理機能の解明を試みた。

(倫理面の配慮)

本研究は、患者や動物を対象としていないため、特段の配慮は必要ないと考える。必要な場合には、東京医科大学並びに関連施設の倫理規定に従って対応する。

## 3. 研究結果及び考察

- 1) 微小管阻害剤であるノコダゾールにより、PrP<sup>C</sup> の細胞内局在パターンが明らかに阻害されたことから、PrP<sup>C</sup> の細胞内局在には微小管が関与していることを明らかにし、さらに試験管内の再構成実験により、PrP<sup>C</sup> と微小管との相互作用を確認した。
- 2) N 末端に GFP を融合した PrP<sup>C</sup> を発現させ細胞内の動きをタイムラプスにて詳細

に観察した結果、PrP<sup>C</sup> の微小管依存性順行性及び逆行性輸送を見出した。

- 3) タイムラプス計測によって得られたデータから順行性及び逆行性輸送速度を計算し、さらに各阻害剤を添加した実験から、順行性輸送はキネシンスーパーファミリーの KIF4 によって、逆行性輸送はダイニンによって行われていることを明らかにし、PrP<sup>C</sup> のアミノ酸配列上、各輸送に関わる部分を同定した。
- 4) N 末端、C 末端両方に蛍光蛋白質を融合したキメラプリオン蛋白質の N2a 生細胞による観察から、細胞内での PrP<sup>C</sup> 切断を可視化し、N 末端を含む切断断片と C 末端を含む切断断片では各々の分布が異なっていることが明らかになった。
- 5) PrP<sup>C</sup> の神経細胞内輸送を詳細に解析する目的で、神経成長因子 NGF 依存性分化応答細胞株である PC12 細胞を用い、分化誘導前後での PrP<sup>C</sup> の細胞内輸送を解析した。分化誘導前の PC12 細胞では、N2a 細胞とほぼ同様に、順行性に 150nm/sec、逆行性に 1  $\mu$  m/sec での移動が観察された。
- 6) PrP<sup>C</sup> の細胞内輸送をさらに詳細に解析するために、我々は PrP<sup>C</sup> の N 末端に GFP を融合したキメラ蛋白質 (GFP-PrP<sup>C</sup>) 発現プラスミドを構築し、N2a 細胞において発現後、薬剤耐性によるスクリーニングを経て、安定にキメラ蛍光タンパク質を発現する細胞株を樹立した。
- 7) これらの PrP<sup>C</sup> 持続発現細胞株においては、NGF 分化誘導による神経突起伸張が著明に亢進していたのみならず、神経突起の直径の増大が認められた。
- 8) この GFP-PrP<sup>C</sup> 安定発現 N2a 細胞を用い

て、デルタビジョンセクション顕微鏡により、分化前後での輸送速度のタイムラプス測定を行った結果、核から細胞膜方向への順行性の輸送において、細胞体内における GFP-PrP<sup>C</sup> の移動速度が 140nm/sec であったのに対し、樹状突起内では 50nm/sec と、ほぼ 1/3 にまで低下していることを見出した。

- 9) この樹状突起内での移動速度低下の現象には、キネシンスーパーファミリーである KIF5C が関与していることを見出した。一方、ダイニン依存性の逆行性輸送においては速度の違いは観察されなかった。
- 10) これらの観察結果は同じコンストラクトのキメラ蛋白質を一過性に発現した PC12 細胞においても同様に認められた。以上の観察結果から、GFP-PrP<sup>C</sup> 安定発現 N2a 細胞においては、核から細胞膜方向への順行性輸送の際、細胞体から樹状突起に至る過程で輸送機構の変化が生じていることが明らかになった。

神経機能分子と蛍光性タンパク質のキメラタンパク質は機能分子の動態・構造変化をリアルタイムで観察するうえで極めて有効であり、この方法によって従来は見落とされていた現象を明らかにすることが出来る。

我々が樹立した N 末端標識 GFP 融合 PrP<sup>C</sup>、C 末端標識 DsRed 融合 PrP<sup>C</sup> の持続発現 PC12 細胞株を用いた検討により、分化誘導に伴い形成される樹状突起内において、PrP<sup>C</sup> を含む同一の輸送小胞が細胞体内から樹状突起に移動する際に異なるモーター蛋白質への乗換えが生じている可能性が示唆された。

#### 4. 評価

##### 1) 達成度について

3 年間の成果としては、まず満足すべき達成度と考える。しかし、PrP<sup>Sc</sup> 変換の補助因子や PrP<sup>C</sup> 分解酵素の同定までには至らず、

これらの点は今後に残された課題である。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

我々は、世界に先駆けて、蛍光ラベル PrP<sup>C</sup> の安定発現株を樹立し、細胞内挙動を観察する細胞内可視化の系を確立した。

##### 3) 今後の展望

PrP<sup>C</sup> の細胞内動態の検討を通じ、PrP<sup>C</sup> 分解酵素の同定と作用機序解明を目的とする。これらの成果は、プリオン病の治療法開発のみならず、PrP<sup>C</sup> が蛋白質分解酵素と反応する際にその関与が示唆される何らかの分子シャペロン様分子の同定への貢献も期待される。

##### 4) 研究内容の効率性について

3 年間という限られた時間で、前述の成果を挙げることが出来た点から、研究内容の効率性は高いものと考えられる。

#### 5. 結論

我々が樹立した N 末端標識 GFP 融合 PrP<sup>C</sup>、C 末端標識 DsRed 融合 PrP<sup>C</sup> の持続発現 PC12 細胞株を用いた検討により、分化誘導に伴い形成される樹状突起内において、PrP<sup>C</sup> を含む同一の輸送小胞が細胞体内から樹状突起に移動する際に異なるモーター蛋白質への乗換えが生じている可能性が示唆された。

今後さらに、N 末端、C 末端の両端に蛍光分子を持つ PrP<sup>C</sup> の持続発現細胞株を用いた研究を継続することで、細胞内で PrP<sup>C</sup> 切断に関わる酵素の同定などが可能になると期待される。

#### 6. 研究発表

##### 1) 国内

口頭発表：50 件

原著論文による発表：0 件

それ以外(レビュー等)の発表：40 件

そのうち主なもの

### 論文発表

1. 八谷如美, 金子清俊. 新しいシャペロンの発見－神経難病の治療へ－. 科学. 2005 : 75 ; 283-285.
2. 八谷如美, 金子清俊. プリオン病の治療－現状と将来展望－. Annual Review 2005 神経 Vol. 4, 柳沢信夫, 篠原幸人, 岩田誠, 清水輝夫, 寺本明 ed. 中外医学社(東京), 2005 : 90-95.
3. 金子清俊. 不思議なプリオン病. 脳はどこまでわかったか. 朝日選書 Vol. 771, 井原康夫 ed. 朝日新聞社(東京), 2005.
4. 金子清俊. プリオン病. 日常診療に活かす老年病ガイドブック－認知症・うつ・睡眠障害の診療の実際－. 三木哲郎 ed. Medical View(東京), 2005 : 4 ; 173-179.
5. 八谷如美, 金子清俊. 正常型プリオンたんぱく質の正体は?－その推定される機能－. 現代化学. 2006 : 422 ; 26-31.
6. 八谷如美, 金子清俊. プリオンたんぱく質は正常人では何をしているのか?. 科学. 2006 : 76 ; 1138-1142.
7. 金子清俊. プリオンタンパク, プリオン遺伝子. 医学大辞典. 鈴木肇 ed. 南山堂(東京), 2006 : 19 ; 2217.
8. 金子清俊. 科学者が語るBSEのはなし, コープ出版(東京) 2006 : 1-34.
9. 八谷如美, 金子清俊. 正常プリオン蛋白とその機能. プリオン病と遅発性ウイルス感染症. 日本臨床. 2007 : 65(8) ; 1385-1390.
10. 八谷如美, 金子清俊. プリオン病. アルツハイマー病－基礎研究から予防・治療の新しいパラダイム－ Vol. 4, 平井俊策 ed. 日本臨床社(東京), 印刷中.
11. 八谷如美, 金子清俊. 正常型プリオン蛋白質の機能. プリオン病と遅発性ウイルス感染症水澤英洋 ed. 金原出版(東京), 印刷中.

12. 金子清俊. ウシ海綿状脳症. 「蛋白質 核酸 酵素」増刊号「キーワード:蛋白質の一生」遠藤斗志也 ed. 共立出版(東京), 印刷中.

### 学会発表

1. 金子清俊. Cellular prion protein : Intracellular trafficking and mitochondria-mediated neuronal apoptosis. 京都大学ウイルス研究所コロキウム「膜輸送研究の新展開」. 京都, 2005.2.10 - 11.
2. 金子清俊. プリオン病の謎に挑む. 信州大学ヒト環境科学研究支援センター主催セミナー. 松本, 2005.3.18.
3. 八谷如美, 渡邊光太, 逆瀬川裕二, 金子清俊. Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. 第78回日本生化学会大会. 神戸, 2005.10.19-22.
4. 八谷如美, 大久保卓哉, 小塚芳道, 逆瀬川裕二, 金子清俊. Over a hundredfold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by Unfoldin/oligomeric Aip2p. 第78回日本生化学会大会. 神戸, 2005.10.19-22.
5. 大久保卓哉, 逆瀬川裕二, 有馬邦正, 山田光則, 水澤英洋, 八谷如美, 金子清俊. ピック小体の主要構成蛋白は異常リン酸化タウ69kDaである. 第28回日本分子生物学会年会. 福岡, 2005.12.7-10.
6. 金子清俊. 変異型クロイツフェルト・ヤコブ病と牛海綿状脳症. プリオン病のサーベイランスと対策に関する全国担当者会議. 東京, 2006.2.24.
7. 金子清俊. プリオン病の早期診断と治療法の進歩. 平成18年度難治性疾患克服研究推進事業研究成果発表会. 東京, 2007.2.26.
8. 金子清俊. プリオン病と分子シャペロン.

第2回臨床ストレス応答学会．福岡，  
2007.11.30-12.1.

9. 八谷如美，西島佳奈，田中真由美，小塚芳道，金子清俊．新しいレーザーダイセクションシステムの開発および蛋白質解きほぐし分子Aip2多量体(アンフォルジン)を用いた神経変性疾患病態解析への応用．第二回臨床ストレス応答学会．福岡，2007.11.30-12.1.
10. 田中真由美，小塚芳道，八谷如美，金子清俊．正常型プリオン蛋白質(PrP<sup>C</sup>)の細胞内輸送機構の解析．第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会合同大会．横浜，2007.12.11-15.
11. 西島佳奈，田中真由美，今川美登里，小塚芳道，八谷如美，金子清俊．細胞内に発現した蛍光タンパク質を単離する新しいレーザーダイセクションシステムの開発．第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会合同大会．横浜，2007.12.11-15.

## 2) 海外

口頭発表：17件

原著論文による発表：16件

それ以外(レビュー等)の発表：6件

そのうち主なもの

### 論文発表

1. Hachiya NS, Kaneko K. Investigation of laser-microdissected inclusion bodies. *Methods Cell Biol* Vol. 82, Berns M, Greulich KO ed. Academic Press(San Diego), 2007 : 355-375.
2. Furuya K, Kawahara N, Yamakawa Y, Kishida H, Hachiya NS, Nishijima M, Kirino T, Kaneko K. Intracerebroventricular delivery of dominant negative prion protein in a mouse model of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after dura graft transplantation. *Neurosci Lett* 2006 : 402(3) ; 222-226.

3. Ohkubo T, Sakasegawa Y, Toda H, Kishida H, Arima K, Yamada M, Takahashi H, Mizusawa H, Hachiya NS, Kaneko K. Three-repeat Tau 69 is a major tau isoform in laser-microdissected Pick bodies. *Amyloid*. 2006 : 13(1) ; 1-5.
4. Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Sano K, Takeuchi Y, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K : Mitochondrial localization of cellular prion protein(PrP<sup>C</sup>) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP<sup>C</sup>. *Neurosci Lett* 2005 : 374(2) ; 98-103.
5. Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 : 327(3) ; 894-899.
6. Hachiya NS, Ohkubo T, Kozuka Y, Yamazaki M, Mori O, Mizusawa H, Sakasegawa Y, Kaneko K. More than a 100-fold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric actin interacting protein 2/d-lactate dehydrogenase protein 2. *Anal Biochem* 2005 : 347(1) ; 106-111.

### 学会発表

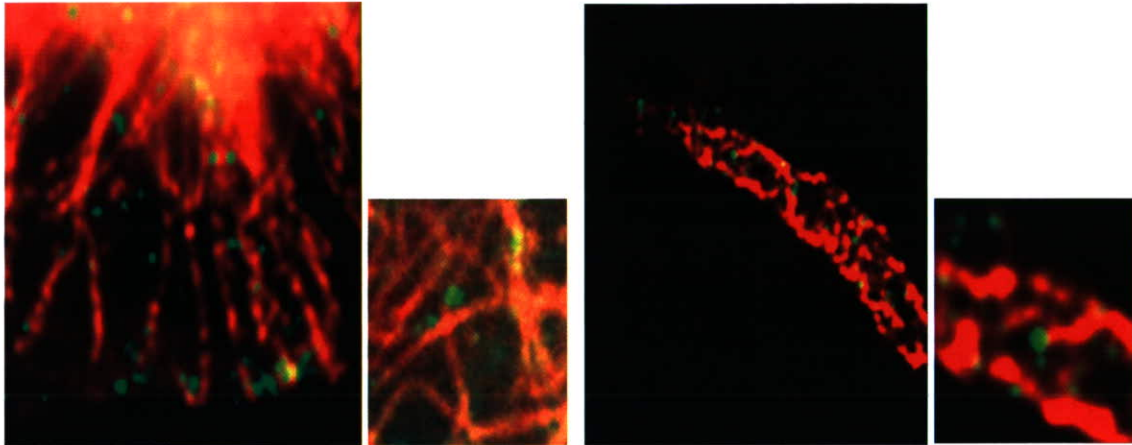
1. Kaneko K. Diagnostic application of a novel protein unfolding chaperone (Unfoldin) in protein aggregation disorders. The 1st International Symposium on Geriatrics and Gerontology. Nagoya, Nov 3, 2005.
2. Hachiya NS, Yamada M, Jozuka A, Sakasegawa Y, Kaneko K. Prion disease



- and Unfoldase : an ATP-dependent novel protein-unfolding chaperone. Keystone Symposia : Molecular Mechanisms of Transmissible Spongiform Encephalopathies. Colorado, Jan 11-15, 2005.
3. Hachiya NS, Yamada M, Jozuka A, Sakasegawa Y, Kaneko K. Prion disease and Unfoldase chaperone : an ATP-dependent novel protein-unfolding chaperone. 30th FEBS & 9th IUBMB Conference : The Protein World. Budapest, July 2-7, 2005.
  4. Hachiya NS, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. Over a hundredfold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric Aip2p/Dld2p. 45th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Francisco, Dec 10-14, 2005.
  5. Kaneko K. Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) and variant CJD. National Assembly Compound. Seoul, Nov 23, 2006.
  6. Hachiya NS, Watanabe K, Imagawa M, Kaneko K. More than a thousand-fold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric Aip2p/Dld2p. 10th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. Prague, June 24-28, 2006.
  7. Hachiya NS, Kaneko K. Molecular Recognition and Mitochondrial Targeting of Nonnative, Aggregation-prone Proteins are Mediated by 14-3-3 eta/zeta Proteins. The Gordon Research Conference on biology of 14-3-3 proteins. Oxford, Aug 27-Sept 1, 2006.
  8. Hachiya NS, Nishijima K, Yoshimichi K, Kaneko K. Diagnostic and therapeutic use of a novel unfolding chaperone, oligomeric actin-interacting protein 2 (Aip2p), for neurodegenerative diseases. 3rd Annual Therapeutic Strategies against Neurodegenerative Conditions. San Francisco, Sept 20-21, 2007.
7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
    1. 特許取得
      1. 金子清俊. 高効率抗体スクリーニング方法. 日本 patent 第 4022367 号. 10.5 2007.
    2. 実用新案登録
      - 特になし
    3. その他
      - 特になし

## 正常型プリオン蛋白質の細胞内輸送機構の解明

分担研究者：東京医科大学医学部神経生理学講座・金子清俊



赤：微小管、緑：正常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>)  
細胞体内 (左図2枚)、右図神経突起内 (右図2枚)での分布

GFP-PrP<sup>C</sup> 安定発現N2a細胞を用いて、デルタビジョンセクション顕微鏡により、分化前後での輸送速度のタイムラプス測定を行った結果、核から細胞膜方向への順行性の輸送において、細胞体内におけるGFP-PrP<sup>C</sup>の移動速度が140 nm/secであったのに対し、樹状突起内では50 nm/secと、ほぼ1/3にまで低下していることを見出した。この樹状突起内での移動速度低下の現象には、キネシンスーパーファミリーであるKIF5Cが関与していることを見出した。一方、ダイニン依存性の逆行性輸送においては速度の違いは観察されなかった。

神経機能分子と蛍光性タンパク質のキメラタンパク質は機能分子の動態・構造変化をリアルタイムで観察するうえで極めて有効であり、この方法によって従来は見落とされていた現象を明らかにすることが出来る。我々が樹立したN末端標識GFP融合PrP<sup>C</sup>、C末端標識DsRed融合PrP<sup>C</sup>の持続発現PC12細胞株を用いた検討により、分化誘導に伴い形成される樹状突起内において、PrP<sup>C</sup>を含む同一の輸送小胞が細胞体内から樹状突起に移動する際に異なるモーター蛋白質への乗換えが生じている可能性が示唆された。今後さらに、N末端、C末端の両端に蛍光分子を持つPrP<sup>C</sup>の持続発現細胞株を用いた研究を継続することで、細胞内でPrP<sup>C</sup>切断に関わる酵素の同定などが可能になると期待される。

分担研究者：桑田一夫 岐阜大学人獣感染防御研究センター

## 1. 研究目的

リコンビナントプリオンの凝集体或いはアミロイドが感染性を持ち、凝集体のサイズが感染性と相関している、と考えられている。そこで本研究ではプリオンの部分ペプチドにおける凝集体形成を調べ、その物理化学的性質、感染性、及び阻害物質を調べる。

## 2. 研究方法

リコンビナントプリオンを大量発現し、凝集体を作成する。反応過程は CD、赤外スペクトル、及び光散乱で追跡する。また、生成物の構造はパルスラベル NMR 等で調べる。感染性は P3 の動物飼育施設で、マウスの脳に注入することにより調べる。

（倫理面の配慮）

マウスの手術に際しては、痛みや苦しみを与えないよう、麻酔を行う。動物実験に関しては、岐阜大学組み換え DNA・安全委員会において既に承認されている。

## 3. 研究結果及び考察

PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Sc</sup> への構造変換における、それぞれの領域の役割に注目してアミロイド線維形成について調べると、ヘリックス B(アミノ酸 172~194 残基)とヘリックス C(200~227 残基)領域のペプチドと、疎水コア(113~127 残基)領域のペプチドがアミロイド線維を形成した。興味深いことに、ペプチドの種類によって形成されるアミロイド線維の構造と形態がかなり異なっていた。特にヘリックス B が形成するアミロイドは針状で、構造もしっかりしていた。これを CD 及び FTIR で測定すると、特殊なターン構造の形成が明らかとなった。ヘリックス C は柔らかい凝集

体を形成した。全長の PrP<sup>C</sup> を用いて、*in vitro* で線維形成について調べると、針のような線維ではなくオリゴマー状の凝集体がよくできた。しかし、条件をしばれば、細長いアミロイド線維が形成される場合もあり、全長 PrP<sup>C</sup> にはいくつかの形態が存在すると考えられた。さらに、その形態は毒性と関連があると考えられる。さらに、我々が開発した抗プリオン物質 GN8 は、全長 PrP<sup>C</sup> の熱安定性を高めることが明らかとなった。

## 4. 評価

### 1) 達成度について

当初の目的である部分ペプチドの凝集体形成を調べ、その物理化学的性質を調べることが出来た。また、低分子化合物 GN8 がプリオンの熱安定性を高めることが明らかとなった。さらに、現在、感染性を有するリコンビナントプリオン作成手法に関する知見を得ており、パルスラベルを用いた立体構造の特徴付けを行っているところである。従って、当初の研究目的は、ほぼ達成された、と考えられる。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

プリオン立体構造変換メカニズムの解明、及びこの変換反応の制御は、現在の生物学・医学における最大のテーマのひとつである。この現象と深い関連を有するアミロイド形成反応を物理化学的な方法で解析することにより、上記の有用な知見が得られた。このことは、変異型ヤコブ病が国際的に大きな社会問題となっている現在、治療薬や予防薬の開発に役立つ情報を提供できたという点で、大き

な意義があったといえよう。

### 3) 今後の展望

アミロイド形成は、プリオンの病原性に必須ではないが、病原性を持つプリオンがアミロイドを形成しやすいという実験事実は、病原性の発現に分子間相互作用が深いかかわりを有することは明らかである。

今後は、病原性に関連する分子間相互作用に関して、原子レベルで、詳細に明らかにしていきたい。

### 4) 研究内容の効率性について

ペプチド合成、アミロイド形成反応、分光測定等、短期間で効率的な実験を行うことが出来た。これは、事前にプリオン以外のペプチドを用いたアミロイド形成実験のノウハウがあったためである。

## 5. 結論

プリオンの部分ペプチドにおける凝集体形成、アミロイド形成反応を調べ、その物理化学的性質、感染性との関連、及び阻害物質の性質を明らかにすることが出来た。

## 6. 研究発表

### 1) 国内

口頭発表：3件

原著論文による発表：2件

それ以外(レビュー等)の発表：0件

そのうち主なもの

#### 論文発表

1. 武藤(細川)淳二, 鎌足雄司, 松本友治, 中村寛則, 桑田一夫: 正常型プリオン蛋白質構造安定化への挑戦 - 特集 異常型プリオン蛋白質への挑戦(後編) - 臨床獣医 2007年10月 Vol.25 No.10
2. 桑田一夫.  $\beta$ -ラクトグロブリン分子の立体構造形成反応 平成 19 年度日本酪農科学シンポジウム「牛乳  $\alpha$ -ラクトアルブミ

ンと  $\beta$ -ラクトグロブリンの構造と機能の新展開」Milk Science Vol. 2007 ; 56(2).

#### 学会発表

1. 鎌足雄司, 武藤(細川)淳二, 西田教行, 松本友治, 児玉耕太, 中村寛則, 桑田一夫: プリオン蛋白質の正常型構造を安定化する低分子化合物の同定. 2007 年プリオン研究会, 新潟, 2007.8.25.
2. 桑田一夫, 鎌足雄司, 松本友治, 西田教行, 武藤淳二, 児玉耕太, 中村寛則, 早野陽介. Dynamics based drug discovery - プリオン病治療薬開発への応用 第 46 回 NMR 討論会, 札幌, 2007.9.11.
3. 武藤(細川)淳二, 西田教行, 桑田一夫. 異常型プリオン蛋白質の産生を抑制する低分子化合物の発見とその類縁体の効果 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2007.10.21-23.
4. 鎌足雄司, 武藤(細川)淳二, 西田教行, 松本友治, 児玉耕太, 中村寛則, 桑田一夫: プリオン蛋白質の正常型構造を安定化する低分子化合物の同定. 2006 年プリオン研究会, 新潟, 2007.8.

### 2) 海外

口頭発表：1件

原著論文による発表：4件

それ以外(レビュー等)の発表：0件

そのうち主なもの

#### 論文発表

1. Kremer W, Kachel N, Kuwata K, Kazuyuki K, Kalbitzer HR. Species specific differences in the intermediate states of human and hamster prion protein detected by high pressure NMR spectroscopy. J Biol Chem 2007 ; 282 : 22689-22698.
2. Kazuo Kuwata, Noriyuki Nishida, Tomoharu Ma tsumoto, Yuji O. Kamatari, Junji Hosokawa-Muto, Kota

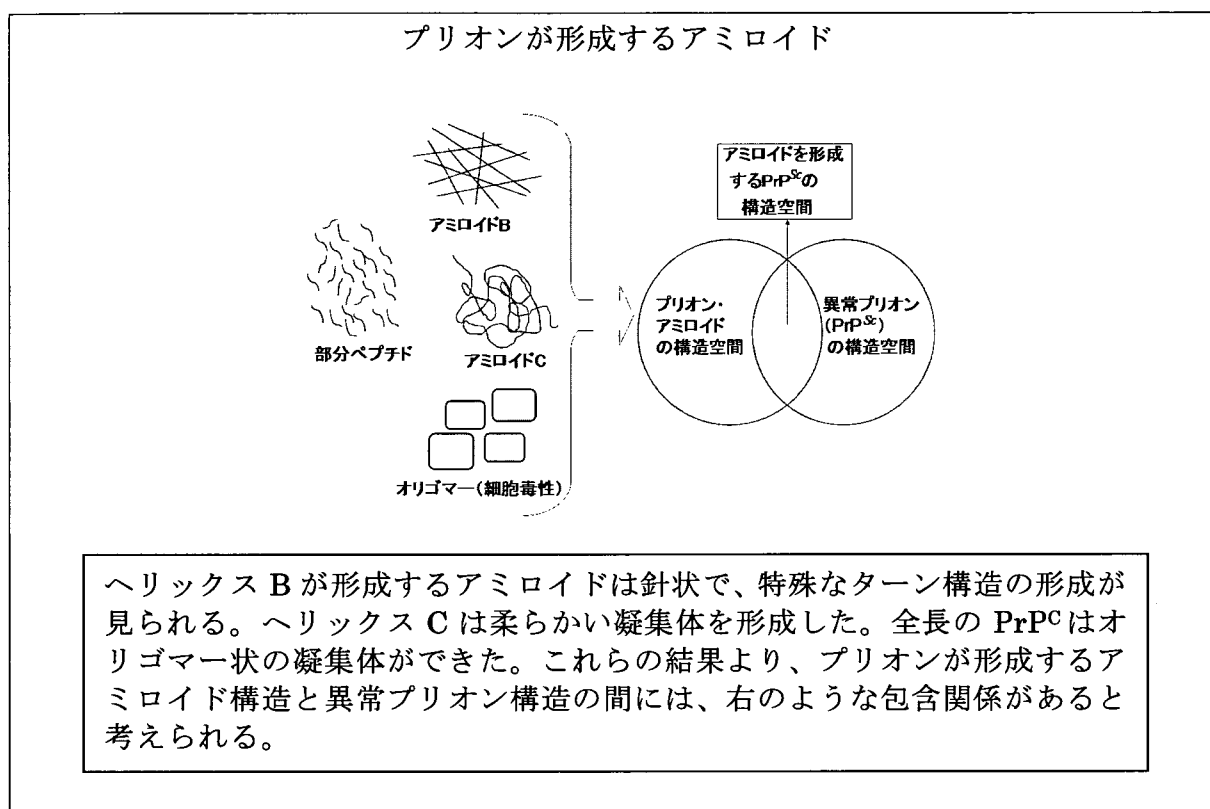
- Kodama, Hironori K. Nakamura, Kiminori Kimura, Makoto Kawasaki, Yuka Takakura, Susumu Shirabe, Jiro Takata, Yasufumi Kataoka, Shigeru Katamine. Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. Proc Natl Acad Sci USA 2007 ; 104 : 11921-11926.
3. Nakamura HK, Takano M, Kuwata K. Modeling of a propagation mechanism of infectious prion protein; a hexamer as the minimum infectious unit. Biochem Biophys Res Commun 2007 ; 361 : 789-793.
4. Yuji O. Kamatari, Hironori K. Nakamura, Kuwata K. Strange kinetic phase in the extremely early folding process of  $\beta$ -lactoglobulin. FEBS Lett 2007 ; 581 : 4463-4467.

学会発表

1. Kuwata K. A hot spot in prion protein for pathogenic conversion : Proteins : From Birth to Death. 21st Annual Symposium of The Protein Society. Boston, July 21-25, 2007.
7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

## プリオン及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究

分担研究者：桑田一夫 岐阜大学人獣感染防御研究センター



ヘリックス B(アミノ酸 172~194 残基)とヘリックス C(200~227 残基)領域のペプチドと、疎水コア(113~127 残基)領域のペプチドがアミロイド線維を形成した。ヘリックス B が形成するアミロイドは針状で、構造もしっかりしていた。これを CD 及び FTIR で測定すると、特殊なターン構造の形成が明らかとなった。一方、ヘリックス C は柔らかい凝集体を形成した。全長の PrP<sup>C</sup> を用いて、*in vitro* で線維形成について調べると、針のような線維ではなくオリゴマー状の凝集体がよくできた。しかし、条件をしぼれば、細長いアミロイド線維が形成される場合もあり、全長 PrP<sup>C</sup> にはいくつかの形態が存在すると考えられた。これらのことから、プリオンが形成するアミロイドと異常プリオン構造との間に、上図右のような包含関係がある、と考えられる。

分担研究者：佐伯圭一 東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター

## 1. 研究目的

プリオン病の伝達および発症には病原体プリオンの侵入が必須であるが、本来宿主が持っている正常型プリオン蛋白の機能解明なしには本疾患の特徴である神経変性を説明できないと考えられる。

そこで、本研究ではプリオン病に密接に関係していると思われるアポトーシスについて注目し、*in vitro* 解析を用いて、正常型プリオン蛋白に関連した細胞死促進や抑制について明らかにしていくことを目的とする。

## 2. 研究方法

プリオン蛋白遺伝子欠損マウスより不死化神経細胞株を樹立し、各種組換えプリオン蛋白遺伝子を導入した。培養液からの血清除去によりアポトーシスを誘導し、各種組換えプリオン蛋白のアポトーシス抑制能について解析した。

（倫理面の配慮）

遺伝子組換え操作および病原体取り扱いに関しては「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」および学内規定を遵守して実施した。

## 3. 研究結果及び考察

培地中の血清成分を除去することによるアポトーシス誘導時において、プリオン蛋白の機能的活性部位はオクタリピート領域とそれに続く疎水性領域であると考えられた。SOD 活性を測定したところ、アポトーシス抑制と細胞内 SOD 活性の上昇には関連が認められた。

また、マウス由来であるプリオン蛋白欠損細胞を用いた場合、マウス由来プリオン蛋白

遺伝子の発現では、アポトーシスの抑制が起こるが、ハムスターやウシ由来プリオン蛋白を産生させてもアポトーシス抑制効果は認められず、むしろこれらの異種プリオン蛋白の産生によって、アポトーシスの亢進が起こると示唆される結果を得た。これらのことからプリオン蛋白が機能を持つためには、種特異性が存在すると考えられた。

## 4. 評価

### 1) 達成度について

当初計画していた目標をほぼ達成できたと思われる。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

プリオン蛋白の機能は不明点が多かったが、抗酸化ストレス的にアポトーシス経路に働く分子であることを明らかにし、学術的、国際的にも本研究成果は高い評価を得ていると考えられる。これまで不明な部分が多い正常型プリオン蛋白の分子機構、機能部位およびプリオン蛋白関連分子が明らかになれば、プリオン病発症機序解明につながるばかりでなく、感染型プリオン蛋白や関連分子を標的とした高精度診断法や治療薬開発につながることで期待されることから、本研究内容が持つ社会的意義は大きいと考えられる。

### 3) 今後の展望

本研究をさらに進展させ、プリオン蛋白質に関連したアポトーシス抑制および促進経路についてより詳細に分子メカニズムを明らかにしていく。

- 4) 研究内容の効率性について  
効率的に研究を遂行できたと思われる。

## 5. 結論

プリオン蛋白の機能的活性部位はオクタリ  
ピート領域とそれに続く疎水性領域であると  
考えられた。また、プリオン蛋白が機能を持つ  
ためには、種特異性が存在すると考えられた。

## 6. 研究発表

### 1) 国内

口頭発表：10件

原著論文による発表：1件

それ以外(レビュー等)の発表：1件

そのうち主なもの

#### 論文発表

1. 李ら. 正常型プリオンタンパクの抗アポ  
トーシス機能における構造的な機能中心  
の解析. 獣医生化学. 2005 : 42 ; 19-23

#### 学会発表

1. 呉ら. Expression of hamster PrP and  
bovine PrP can not prevent murine  
prion protein gene-deficient cell from  
apoptosis. 第 17 回日本生体防御学会学術  
総会. 札幌, 2006. 7. 27.

### 2) 海外

口頭発表：6件

原著論文による発表：9件

それ以外(レビュー等)の発表：2件

そのうち主なもの

#### 論文発表

1. Kim. et al. Late-onset olfactory deficits  
and mitral cell loss in mice lacking  
prion protein with ectopic expression of  
Doppel. Int J Mol Med 2007 : 20(2) ;  
169-176.

#### 学会発表

1. Wu et al. Expression of HaPrP and  
BoPrP in murine Prnp<sup>0/0</sup> HpL3-4 could  
not prevent these cells from apoptosis.  
The XXIST International Winter  
Meeting St. Moritz of Swiss Society of  
Neuropathology. Swiss, 2006. 3. 21.

## 7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得  
特になし

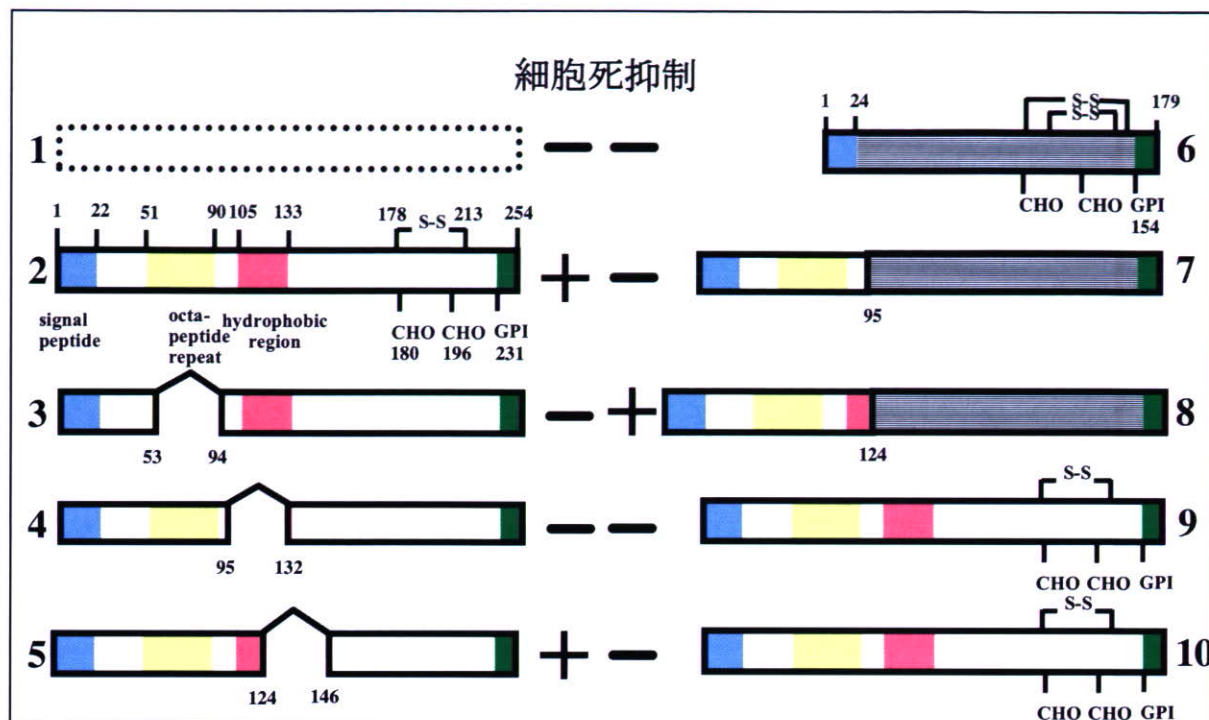
2. 実用新案登録  
特になし

3. その他  
特になし



## 正常プリオン蛋白の機能解析

分担研究者：東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター・佐伯圭一



1: PrP-null, 2: MoPrP, 3: MoPrP ( $\Delta$ 53-94, Q52H), 4: MoPrP ( $\Delta$ 95-132), 5: MoPrP ( $\Delta$ 124-146)  
6: MoDpl, 7: MoPrP (1-95)/MoDpl, 8: MoPrP (1-124)/MoDpl, 9: HaPrP, 10: BoPrP

プリオン蛋白 (PrP) 遺伝子欠損マウス脳から樹立したPrP欠損細胞は、通常培養条件から血清を除去することにより、アポトーシス細胞死を起こす (1)。一方でマウスPrP (MoPrP) 遺伝子を導入することにより、細胞死が抑制された (2)。アポトーシス抑制部位を同定するために、部分欠損遺伝子を作製し、導入するとアミノ酸領域53-94 (3) および95-132 (4) の欠損では細胞死抑制が認められなかったが、124-146 (5) の欠損では細胞死抑制が認められた。PrP様蛋白 (Dpl) 遺伝子 (6) およびDpl遺伝子にPrP1-95を融合させた遺伝子 (7) の導入では、細胞死抑制が認められなかった。一方で、Dpl遺伝子にPrP1-124を融合させた遺伝子 (8) の導入では、細胞死抑制が認められた。以上のことから、PrPによる細胞死抑制部位はN末端側の124アミノ酸領域に存在し、オクタペプチド領域や疎水性領域が重要であると考えられた。

また、マウスPrP遺伝子 (1) の導入では細胞死抑制が認められるが、ハムスターPrP (9) やウシPrP遺伝子 (10) の導入では細胞死抑制が認められなかった。マウス、ハムスター、ウシPrP間ではアミノ酸配列の相違があり、マウス由来細胞株では抑制機能がうまく発揮できないと考えられた。これらの現象を利用していくことによって、PrPの細胞死抑制にもっとも重要なアミノ酸残基の同定が可能となると考えられた。

分担研究者：小林篤史 東北大学大学院医学系研究科 CJD 早期診断・治療法開発分野

## 1. 研究目的

プリオンは異種の動物への感染、言い換えるとプリオン蛋白(PrP)のアミノ酸配列を越えた感染の後も元の種のプリオン蛋白を異常化する能力を保有し続けるという性質を利用し、その由来をたどる(トレースバック)方向への感染実験を行ってヒトの感染性プリオン病である変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)や医原性CJDの由来を同定できるか検証する。

## 2. 研究方法

ウシあるいはヒトのプリオン蛋白を発現するノックインマウスを作製し、vCJDあるいは硬膜移植関連CJD(dCJD)プリオンの感染実験を行う。

(倫理面の配慮)

ヒトを対象とした研究に際しては東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の規定に従い研究を行う。また動物実験に関しては九州大学動物実験に関する指針を遵守する。

## 3. 研究結果及び考察

初年度にはウシ型マウスを用いてvCJDプリオンを用いた感染実験を行った。するとウシ海綿状脳症由来のvCJDプリオンのみがウシ型マウスへ感染性を示した。この結果から、トレースバック実験によりプリオンの由来を同定できることが明らかになった。さらに次年度にはそれまで由来不明であったプラーク型硬膜移植関連CJD(p-dCJD)プリオンを用いた感染実験を行った。するとp-dCJDプリオンはPrP遺伝子コドン129の遺伝子型が異なるにも関わらず129V/Vのヒト型マウスへ感染しやすいことが分かった。これらの結果

からp-dCJDは孤発性CJD(sCJD)-VV2プリオンの感染で引き起こされることが明らかになった。

## 4. 評価

### 1) 達成度について

研究開始時の目的を達成した。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究によりp-dCJDの原因が明らかになり、新たに感染によるプリオン病が発生した際にはトレースバック実験によってその由来を同定できることが実証された。

### 3) 今後の展望

sCJDの中には非定型的な病型を示し、感染性プリオン病の可能性のある症例が存在する。これらの症例についてトレースバック実験を行うことでその由来を同定する。

### 4) 研究内容の効率性について

vCJD、p-dCJDプリオンともに脳内接種実験では長い潜伏期間を要するが、腹腔内接種実験と効果的に組み合わせることで必要最小限の時間で当初の目的を達成した。

## 5. 結論

感染性プリオン病が発生した場合にその由来を同定する手段としてトレースバック実験が有用であることを示した。

## 6. 研究発表

### 1) 国内

口頭発表：0件(ポスター発表2件)

原著論文による発表：0件

それ以外(レビュー等)の発表：0件

そのうち主なもの

論文発表

特になし

学会発表

1. 小林篤史. 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病プリオンの cross-sequence transmission は新たなプリオン株を生み出す. プリオン研究会. 新潟. 2007.8.25.
2. 浅野昌宏. ノックインマウスでみた vCJD の感染性. プリオン研究会. 山形. 2005.8.27.

2) 海外

口頭発表：0件(ポスター発表1件)

原著論文による発表：2件

それ以外(レビュー等)の発表：0件

そのうち主なもの

論文発表

1. Kobayashi A, Asano M, Mohri S, Kitamoto T. Cross-sequence transmission of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease creates a new prion strain. J Biol Chem

2007 : 282 ; 30022-30028.

2. Asano M, Mohri S, Ironside JW, Ito M, Tamaoki N, Kitamoto T. vCJD prion acquires altered virulence through trans-species infection. Biochem Biophys Res Commun 2006 : 342 ; 293-299.

学会発表

1. Kobayashi A. Cross-sequence transmission of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease creates a new prion strain. Cambridge Healthtech Institute's Transmissible spongiform encephalopathies. Baltimore, USA. 2008.2.11.

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

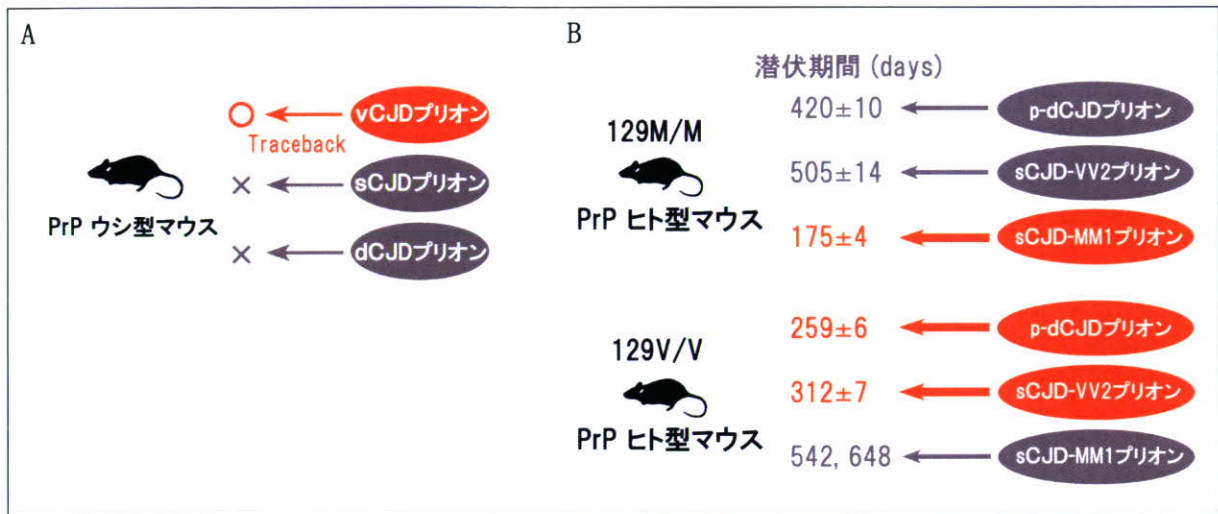
特になし

3. その他

特になし

## トレースバック実験によるプリオンの由来の同定

分担研究者：小林篤史 東北大学大学院医学系研究科 CJD 早期診断・治療法開発分野



- (A) クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) プリオンの中でウシ海綿状脳症由来の変異型 CJD (vCJD) プリオンのみがウシプリオン蛋白 (PrP) を発現するウシ型マウスへ感染性を示した。トレースバックと名づけられたこの性質を利用すれば、プリオンの由来を同定できることが明らかになった。
- (B) これまで由来の分からなかったプラーク型硬膜移植関連 CJD (p-dCJD) プリオンの感染実験を行ったところ、PrP 遺伝子コドン 129 の遺伝子型が異なるにも関わらず 129V/V ヒト型マウスは高い感受性を示した。これらの結果から p-dCJD は孤発性 CJD (sCJD)-VV2 プリオンによって引き起こされることが示された。