

遺伝性プリオン病 PrPY145Stop 変異の細胞毒性の解析

研究分担者：坂口 末廣 徳島大学疾患酵素学研究センター 神経変性疾患研究部門

研究協力者：村松 直美 徳島大学疾患酵素学研究センター 神経変性疾患研究部門

研究要旨

我々は、プリオン蛋白(PrP) 遺伝子変異 PrP-Y145Stop の細胞毒性について解析した。PrP-Y145Stop 発現ベクターをヒト胎児腎細胞、HEK293T 細胞に導入しても、細胞毒性は認められなかった。しかし、プロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンや MG132 を加えると、PrP-Y145Stop の細胞毒性が出現した。神経芽細胞腫 N2a 細胞でも、同様な結果が得られた。MG132 を加えると、HEK293T 細胞内の PrP-Y145Stop の発現量は濃度依存的に増加した。また PrP-Y145Stop の一部は、細胞質から核内に移行した。さらに、PrP-Y145Stop は細胞周期に異常を来し、G2 期で停止していた。以上の結果から、PrP-Y145Stop はプロテアソームの機能が阻害されると、その一部が核へと移行し、細胞周期を G2 期で停止させ、細胞毒性を発揮すると考えられた。

A. 研究目的

プリオン病では神経変性死がその病態の中心をなす。しかし、神経細胞死の分子メカニズムは不明である。今回我々は、プリオン病における神経細胞死の分子メカニズムを解明するために、遺伝性プリオン病であるゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病(GSS)で発見されたプリオン蛋白(PrP) 遺伝子変異、Y145Stop 変異(145 番のチロシンコドン(TAT)が一塩基置換(TAG)によってストップコドンへ置換)の細胞毒性について解析した。

B. 研究方法

1. 細胞毒性の評価

PrP-Y145Stop 発現ベクターをヒト胎児腎細胞 HEK293T 細胞及び神経芽細胞腫 N2a 細胞にリポフェクション法によりトランスフェクションし、その後生細胞数をカウントし、細胞毒性を評価した。

2. ウェスタン・ブロッティング

トランスフェクション 48 時間後の HEK293T 細胞を溶解し、抗 PrP SAF32 抗体(SPIbio)を用いて、ウェスタン・ブロッティングを行った。

3. 免疫細胞染色と共焦点顕微鏡観察
Lab-TEK2 チャンバースライド(Nalgene Nunc)に細胞を固定し、0.5%TritonX-100 で処理した。一次抗体に SAF32 抗体(SPIbio)を使用し、二次抗体に Alexa488 goat anti-mouse IgG(Molecular probe)を用いた。Vectashield mounting medium(Vector)でマウントした後、検体を共焦点蛍光レーザー顕微鏡 Clsi(Nicon)で観察した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験については、『遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律』ならびに『研究開発等に係る遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定め

る省令』等の関連法令および大学内規定を遵守して実施した。

C. 研究結果

1. PrP-Y145Stopはプロテアソーム機能が阻害されると細胞毒性を発揮する

我々は、PrP-Y145Stopの細胞毒性を検討するために、HEK293T細胞にPrP-Y145Stop発現ベクターとコントロールベクターを導入し、32時間後の生細胞数を比較した。その結果、生細胞数に差は見られなかった()。しかし、興味深いことに、プロテアソーム阻害剤であるラクタシチンとMG132を加えると、PrP-Y145Stopは阻害剤の濃度依存的に細胞毒性を発揮し、生細胞数を減少させた(図2)。またPrP-Y145Stopは、神経芽細胞腫由来のN2a細胞においても同様な細胞毒性を発揮した(data not shown)。

図1

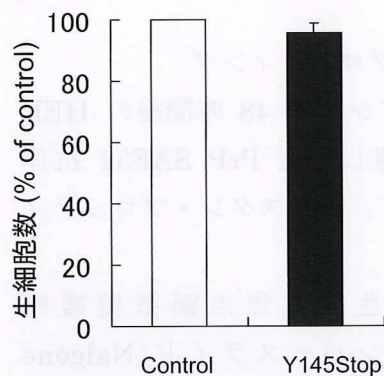
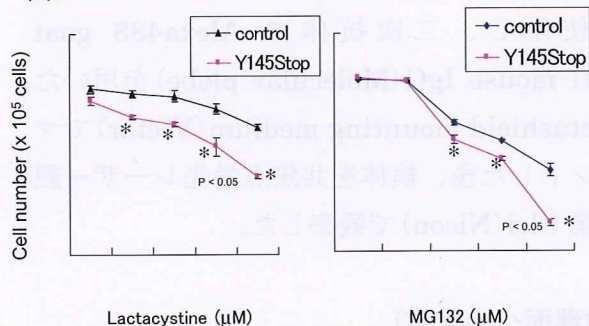


図2

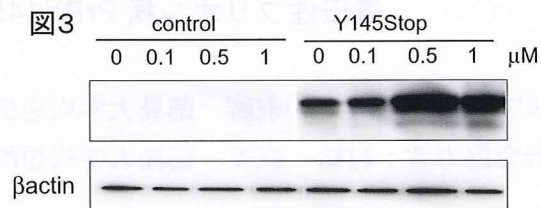


2. MG132によりPrP-Y145Stop発現レベルが増強する

我々は、プロテアソーム阻害時におけるPrP-Y145Stopの発現レベルを調べた。その

結果、PrP-Y145StopはMG132の濃度依存的に発現レベルが上昇した(図3)。

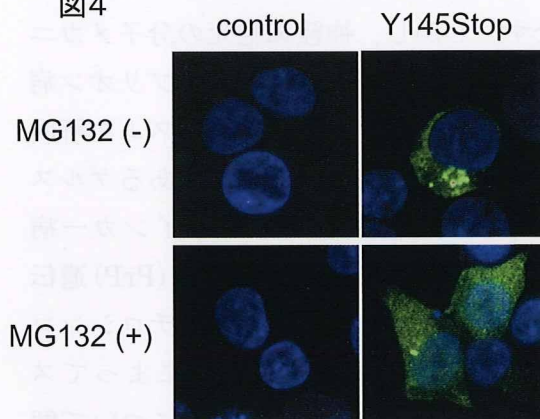
図3



3. プロテアソーム阻害によってPrP-Y145Stopの一部が核に移行する

次に我々は、プロテアソーム阻害によるPrP-Y145Stopの細胞内局在の変化について調べた。その結果、PrP-Y145StopはMG132非存在下では細胞質にのみ観察されたが、MG132を加えると細胞質及び核に認められた(図4)。これらの結果は、プロテアソームが阻害されると、PrP-Y145Stopの一部が核内に移行することを示した。

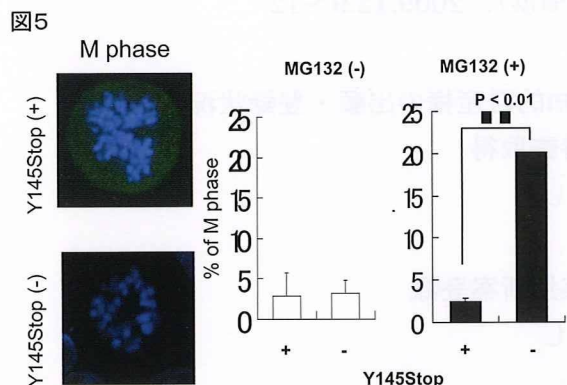
図4



4. MG132存在下でPrP-Y145Stopは細胞周期を阻害する

さらに我々は、プロテアソーム阻害により核内に移行したPrP-Y145Stopが細胞周期に影響を与える可能性について検討するために、MG132添加12時間後のM期のHEK293T細胞をPrP-Y145Stop発現の有無によりカウントした。M期細胞はDAPI染色により染色体構造を有する細胞とした(図5)。その結果、

PrP-Y145Stop 発現細胞の M 期の割合が非発現細胞と比べて著明に減少していた(図 5)。この結果は、PrP-Y145Stop が細胞周期を阻害し、G2 期で停止させることを示唆した。



D. 考察

本研究において、我々は、PrP-Y145Stop がプロテアソームの機能障害により、その一部が核内に移行し、G2 期停止を引き起こし、細胞死を誘導する可能性を見出した。

近年、細胞周期の異常が神経細胞死に関与する可能性が指摘されている(1)。実際、Yang らはアルツハイマー病の海馬神経細胞が 4 倍体染色体を有し、G2 期において停止していることを報告している(2)。プリオン病における神経細胞死のメカニズムは不明である。しかし、今回の我々の結果は、プリオン病でも PrP-Y145Stop によってもたらされた細胞周期異常による細胞死と同様なメカニズムが関与している可能性を示した。

興味深いことに、プリオン持続感染 N2a 細胞やプリオン感染マウス脳内のプロテアソーム活性が低下していることが報告されている(3)。PrP-Y145Stop 自体はプロテアソームを阻害する機能を有しない。従って、PrP^{Sc} によるプロテアソームの機能抑制は、アミノ酸 145 番目以降の C 末領域を介している可能性が考えられる。以上の結果から、プリオン病では、PrP^{Sc} の C 末領域がプロテアソームの機能を阻害し、その結果 PrP-Y145Stop に

相当する細胞毒性を有する領域が細胞内に蓄積し、その後核内に移行し、G2 期停止を引き起こし、細胞死をもたらしている可能性が考えられた。しかし、PrP-Y145Stop は C 末領域を欠いている。従って、PrP-Y145Stop によるプリオン病の病態には、PrP-Y145Stop の PrP 遺伝子変異とプロテアソーム異常の 2 つの要因が必要であるかも知れない。

E. 結論

本研究において、我々は、PrP-Y145Stop がプロテアソームの機能障害により、その一部が核内に移行し、G2 期停止を引き起こし、細胞死を誘導する可能性を見出した。

[参考文献]

- 1) Wang W, et al. Neuronal cell cycle dysregulation and central nervous system diseases. *Progress in Neurobiology*. 89: 1-17, 2009
- 2) Yang Y, et al. *Journal of Neuroscience*. 21: 2661-2668, 2001
- 3) Kristansen M, et al. *Molecular Cell*. 26: 175-188, 2007

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2009/4/1~2010/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Sakaguchi S, Ishibashi D, Matsuda H: Antibody-based immunotherapeutic attempts in experimental animal models of prion diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 19(7): 907-917, 2009
- 2) Sakaguchi S: Prospects for Preventative Vaccines against Prion Diseases. *Protein and Peptide Letters*. 16(3):

260-270, 2009

- 3) 坂口末廣. プリオン病と治療戦略の最近の動向. BRAIN and NERVE. 61: 929-938, 2009

2. 学会発表

- 1) 森剛志, 松田真美, 村松直美, 山口仁孝, 藤田浩司, 坂口末廣. プリオン蛋白過剰発現による細胞死メカニズムの解析. 第 82 回日本生化学会大会. 神戸国際会議場(神戸). 2009.10.21~24
- 2) 村松直美, 森剛志, 山口仁孝, 藤田浩司, 坂口末廣. 遺伝性プリオン病 Y145Stop 変異における細胞毒性の検討. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 都師センターホテル(東京). 2009.10.25~27
- 3) 村松直美, 森剛志, 山口仁孝, 藤田浩司, 坂口末廣. Enhanced toxicity of a

hereditary prion mutation by proteasomal inhibitors: Implication of proteasomal dysfunction in the pathogenesis of prion diseases. 第 31 回日本分子生物学会年会. パシフィコ横浜(横浜). 2009.12.9~12

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

酵母を用いた異種間プリオン感染の分子機構解明

研究分担者：田中 元雅 独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター 田中研究ユニット

研究要旨

本研究では、プリオン病の病態解明のためのモデル生物として優れている出芽酵母を使い、酵母プリオン[PSI⁺]の系を用いることで、酵母プリオン蛋白質 Sup35 の凝集体の性質、プリオン株の表現型、異種間プリオン感染の相関関係を明らかにすることを目的とする。本年度は、Sup35 の異種間プリオン感染能を評価する実験系を構築するとともに、高感染力をもつプリオン凝集体の生成にはオリゴマー内の非天然相互作用が重要な役割を果たすことを見出した。

A. 研究目的

酵母プリオン Sup35NM タンパク質を異なる温度(4°C、37°C)下で凝集させると、4°Cでは感染性の高い脆弱なアミロイド構造、37°Cでは感染性の低い硬いアミロイド構造が生成することを我々はこれまでに明らかにしてきた。しかし、その異なるアミロイド構造が、まったく同じプリオンタンパク質からどのように生成するかは不明であった。本年度の研究では特に、感染性の高いアミロイド構造の生成機構の解明を目指した。また、プリオン病がまれに種間の障壁を越えて感染する時の分子機構には不明な点が多い。本年度は、膨大なスクリーニングを行うことができる酵母プリオンの系を用い、種の障壁を越えて感染する酵母プリオン Sup35 の変異体の同定を目指した。

B. 研究方法

4°C、37°Cと異なる温度下におけるSup35NMの会合状態を調べるために、SPring-8の理研ビームラインBL45XUを用いてX線小角散乱による測定を行った。また、Sup35NMオリゴマーの生成とプリオン株の相関について、感染実験から検討した。さら

に、オリゴマーの構造に関しては、Sup35NMにピレン分子を導入し、そのエキシマー蛍光の測定を行った。さらに、より詳しくオリゴマーの構造や形成過程を明らかにするために、NMRの測定を実施した。

一方、Sup35NMにランダムに変異を導入し、そのプラスミドを野生型の*S. cerevisiae*とは異なる種(*K. lactis*)のSup35を発現するように改変した酵母内で過剰発現させ、異種間プリオン感染能を調べる実験系を構築した。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

温度によってSup35NMの会合状態が大きく異なることが分かった。37°CではSup35NMは単量体(モノマー)であるのに対し、4°CではX線の散乱強度が増大し、Sup35NMが会合してオリゴマーを形成していることを明らかにしました。また、4°C、37°Cと温度変化を繰り返しても、同じ温度では同じ散乱強度を示したことから、Sup35NMのオリゴマー形成は温度変化に対して可逆的であることが分かった。さらに、

10~37℃でオリゴマーを経由せずに生成した Sup35NM アミロイドは、富栄養培地上でピンク色を呈する感染性の低いプリオン株を導くのに対して、4~9℃でオリゴマーを経て生成した Sup35NM アミロイドは、富栄養培地上で白色を呈する、感染性の高いプリオン株を導くことを見いだした。

オリゴマー形成にかかわるアミノ酸を特定するために Sup35NM 変異体を作製し、どの変異によってオリゴマー形成能が低下するかを X 線小角散乱で検討した。低温下で生成する Sup35NM アミロイドのコア領域は、Sup35NM タンパク質におけるプリオンドメイン(1~123 番目のアミノ酸)の最初の 35 個のアミノ酸であることが知られているが、X 線散乱強度の測定から、アミロイド生成途中のオリゴマー形成では、最初の約 100 個のアミノ酸が関与していることを明らかにした。

次に、その 100 個のアミノ酸の中で、どのアミノ酸が最初にオリゴマー形成を誘導するかを、Sup35NM タンパク質のいくつかのアミノ酸を蛍光分子であるピレンで修飾し、そのエキシマー蛍光の強度から検討した。その結果、Sup35NM タンパク質におけるプリオンドメインの 89~108 番目のアミノ酸領域が最初に会合することによってオリゴマー形成が開始することが分かった。

S. cerevisiae の Sup35 のプリオンドメインに変異を導入し、その変異体の異種間プリオン感染力を調べるための実験系を構築した。これまでに約 18,000 個のコロニーをスクリーニングし、異種間プリオン感染能をもつ Sup35NM 変異体を複数、新たに同定した。

D. 考察

本結果は、Sup35NM タンパク質が、低温下で生成する Sup35NM アミロイドのコア領域(1~35 番目)とは異なるアミノ酸領域の“非天然相互作用”によって、コア領域が 35 個のアミノ酸と短く、脆弱なアミロイド構造

を生成していることを示している。脆弱なアミロイドは細胞内で効率的に分断されるため、より多くのアミロイド断片を生じて感染性が高まることがすでに明らかになっている。従って今回の結果により、感染性の高いアミロイド構造の生成機構が解明できたといえる。

また、異種間におけるプリオン感染の分子機構の解明に関しては、今後、これまでに同定した Sup35 変異体の異種間プリオン感染能の再現性を確認後、その変異体の性質の解析や異種間感染時におけるプリオン伝播の詳細な解析を行う予定である。

E. 結論

今回、酵母プリオン Sup35NM タンパク質が、温度に依存して、可逆的にオリゴマーを形成し、低温下で起こるオリゴマー形成が、感染性の高い脆弱なアミロイド構造を導くことを突き止めた。さらに、そのアミロイド構造を生成させる上で、オリゴマー形成時の“非天然相互作用”が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

この成果は、プリオン病の新たな治療戦略の開発に大きく貢献するとともに、疾患原因のタンパク質がアミロイドを生成するほかの多くの神経変性疾患の病態解明や、新たな治療法の開発に道を開くと期待できる。

[参考文献]

Motomasa Tanaka, Sean Collins, Brandon Toyama, Jonathan S. Weissman. The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* 442: 585-589, 2006

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表(2009/4/1~2010/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Yumiko Ohhashi, Kazuki Ito, Brandon Toyama, Jonathan Weissman, Motomasa Tanaka. Differences in prion strain conformations result from non-native interactions in a nucleus. Nature Chem. Biol. in press.

2. 学会発表

- 1) 大橋祐美子, 田中元雅. 酵母プリオン Sup35 を異なる凝集体へと導く二種の経路の解明. 第9回日本蛋白質科学学会. 熊本. 2009.5.20
- 2) Motomasa Tanaka, Yumiko Ohhashi, Molecular Basis of Yeast Prion Strains. FASEB summer research conferences (Amyloid fibril formation and protein

misfolding). Snowmass village, Colorado. 2009.6.30

- 3) 田中元雅, 大橋祐美子. 核形成時における非天然相互作用がプリオン株におけるコンフォメーションの差異を決定する. 第82回日本生化学大会. 神戸. 2009.10.22

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

プリオン立体構造変換初期過程の解析

研究分担者：桑田 一夫 岐阜大学 人獣感染防御研究センター
 研究協力者：鎌足 雄司 岐阜大学 人獣感染防御研究センター
 研究協力者：山本 典史 岐阜大学 人獣感染防御研究センター
 研究協力者：木村 力 岐阜大学 人獣感染防御研究センター
 研究協力者：武藤 淳二 岐阜大学 人獣感染防御研究センター
 研究協力者：山口 圭一 岐阜大学 人獣感染防御研究センター
 研究協力者：石川 岳志 岐阜大学 人獣感染防御研究センター
 研究協力者：石倉 孝一 岐阜大学 人獣感染防御研究センター

研究要旨

プリオン立体構造変換の初期過程を、NMR を初めとする様々の実験及び計算機シミュレーションを用いて解明し、それに基づく治療薬の設計・開発を行った。種々の NMR 測定法(CPMG 緩和時間分散法、*in vitro* conversion 法等)を用い、構造変換初期過程に関与する部分を推定した結果、TVTTTTTKG(アミノ酸番号 189-195)周辺であることが明らかとなった。同部位は、構造変化しやすく、特に異常型存在下では特徴的な構造転移を示した。従って、同部位は、異常型との相互作用部位である可能性がある。興味深いことに、この部分(特に TTTT の連続配列)は哺乳類では存在するが、ニワトリなどの鳥類や、カメ、カエルなどの両生類では存在しない。同部位は、B-ヘリックスの C 端を形成しており、その立体構造は HD 交換反応でも保護されないくらい、構造も柔らかく、溶媒にも露出している。分子動力学シミュレーションにより、同部位は尿素でも特に変性しやすいことが分かった。また、我々が見出した抗プリオンリード化合物、GN8 は同部位に特異的に結合することにより、異常型への変換を抑制する。これら実験及び計算結果を総合すれば、B-ヘリックス C 端の TTTT 配列は、プリオン立体構造変換初期過程に関わっている可能性が極めて高い、と考えられる。さらにこれらの知見から、抗プリオン物質の最適化の方向も明らかになった、と考えられる。

A. 研究目的

プリオンにおける正常型から異常型への立体構造変換は、まず正常型立体構造が崩壊した後、ダーウィンの立体構造進化により、感染性の強い異常型が生成する、と考えられる。感染性が成立した後のダーウィンの進化は多様であり、よく理解されていないため、それを食い止めるのは困難であろう。これに対し、正常構造の崩壊を抑制することは、理論的か

つ実験的にも可能といえる。そのため、プリオン立体構造変換の初期過程を、NMR を初めとする様々の実験及び計算機シミュレーションを用いて解明する。

B. 研究方法

NMR 測定法(CPMG 緩和時間分散法、*in vitro* conversion 法)を用い、構造変換初期過程に関与する部分を調べた。また、分子動力

学法により、構造変換初期過程をシミュレーションした。さらに、これらの知見と、我々が見出した抗プリオンリード化合物、GN8の結合部位とを比較し、抗プリオン物質の一般的な設計原理、及びその最適化の方向を明らかにする。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果

in vitro NMR conversion 法を用い、構造変化初期過程に関与する部分を総合的に推定した結果、TVTTTTKG (189-195) 周辺であることが明らかとなった。同部分は、特に構造変化しやすく、異常型存在下では特徴的な構造転移を示す。従って、同部位は、異常型との相互作用部位である可能性がある。興味深いことに、この部分(特に TTTT の連続配列)は哺乳類では存在するが、ニワトリなどの鳥類や、カメ、カエルなどの両生類では存在しない。この配列の特異性により、何故プリオン病が哺乳類には存在するが鳥類や両生類では存在しないか? という疑問を説明できる可能性がある。

また、同部位は、B-ヘリックスの C 端を形成しており、その立体構造は HD 交換反応でも保護されないくらい、構造も柔らかく、溶媒にも露出している。そこで今回、分子動力学シミュレーションを行った結果、同部位は尿素存在下で、最初に変化を引き起こす部位であることが判明した。

D. 考察

我々が見出した抗プリオンリード化合物、GN8 は同部位に特異的に結合することにより、異常型への変換を抑制する。これら実験結果、及び計算結果を総合すれば、B-ヘリックス C 端の TTTT 配列は、プリオン立体構造変換初期過程に関わっている可能性が極めて

高い、と考えられる。

E. 結論

B-ヘリックス C 端から B-C ループにかけての部位が局所的に破壊された構造は、細胞型からスクレイピー型への遷移状態 (PrP*) である可能性が高い。またこれらの知見は、抗プリオン物質の一般的な設計原理、及びその最適化の方向を示す、と考えている。

[参考文献]

該当なし

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表 (2009/4/1~2010/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Ishikawa T, Kuwata K. Fragment molecular orbital calculation using the RI-MP2 method. *Chemical Physics Letters*. 474: 195-198, 2009
- 2) Okuda Y, Nakamura HK, Kuwata K. Novel anti-cancer compound : structure-based discovery of chemical chaperons for p53. *Oncology reports*. 22: 739-744, 2009
- 3) Yamamoto N, Kuwata K. Regulating the Conformation of Prion Protein through Ligand Binding. *Journal of Physical Chemistry B*. 113: 12853-12856, 2009
- 4) Yamamoto N, Kuwata K. Difference in redox behaviors between copper-binding octarepeat and nonoctarepeat sites in prion protein. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 14: 1209-1218, 2009
- 5) Matsumoto T, Nakagawa T, Kuwata K. Cold destabilization and temperature jump of the murine prion protein

- mPrP(23-231). *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics*. 1794: 669-673, 2009
- 6) Ishikawa T, Ishikura T, Kuwata K. Theoretical study of the prion protein based on the fragment molecular orbital method. *Journal of Computational Chemistry*. 30: 2594-2601, 2009
2. 学会発表
- 1) Kuwata K. Regulation of protein conformation by rationally designed drugs. *International Symposium on Multi-Scale Dynamic of Protein Complex Formation and Function*. The University of Tokyo, 2009.7.14-16
- 2) Kuwata K, Kimura T, Kamatari YO, Hosokawa-Muto J, Yamaguchi K, Ishikawa T, Ishikura T, Yamamoto N, Okuda Y. Rational design of anti-prion compounds targeting the PrP characteristic sites. *Prion2009*. Thessaloniki-Chalkidiki Greece, 2009. 9.23-25
- 3) Hosokawa-Muto J, Yamaguchi K, Kamatari YO, Kuwata K. Development of double-fluorescent-labeled prion protein system for FRET analysis. *V III European Symposium of The Protein Society*. Zurich Switzerland, 2009.6.14-18
- 4) Nakamura H, Hosokawa-Muto J, Kamatari YO, Kuwata K. New evaluation scheme for anti-prion compounds using ensemble of docking modes. *V III European Symposium of The Protein Society*. Zurich Switzerland, 2009.6.14-18
- 5) Kamatari YO, Hosokawa-Muto J, Nakamura H, Hayano Y, Kuwata K. Identification of a variety of anti-prion compounds that acts as chemical chaperons. *V III European Symposium of The Protein Society*. Zurich Switzerland, 2009.6.14-18
- 6) Yamamoto N, Kuwata K. Regulating Conformation of Prion Protein through Ligand Binding. *The 23rd Symposium of The Protein Society*. Boston Massachusetts, 2009.7.24-29
- 7) 桑田一夫. 低分子化合物による難治感染症克服—ケミカルバイオロジーから創薬—異常プリオンを抑える物質の発見とそのメカニズムの解明. 第 147 回日本獣医学会学術集会, 栃木県総合文化センター 2009.4.2-4
- 8) 金本大成, 中村寛則, 寺久保繁美, 浅井大輔, 桑田一夫, 中島秀喜. HIV プロテアーゼ阻害能を示す低分子化合物. 第 66 回神奈川県感染症医学会学術集会, 日本大通りビル 2F 松村ガーデンホール 2009. 9.12
- 9) 山本典史, 桑田一夫. 抗プリオン化合物の作用機序:ケミカルシャペロンによるプリオンタンパクの構造制御. 第 3 回分子科学討論会, 名古屋大学 2009.9.21-24
- 10) 武藤淳二, 山口圭一, 鎌足雄司, 桑田一夫. アンバーおよび 4 塩基コドンを用いたデュアルピンポイント蛍光標識プリオン蛋白質の合成. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 都市センターホテル 2009.10. 25-27
- 11) 桑田一夫. プリオン病—感染メカニズムとダイナミクスに基づく創薬. 日本生物物理学会第 47 回年会, アスティとくしま 2009.10.30-11.1
- 12) 山本典史, 桑田一夫. ケミカルシャペロンとして働く抗プリオン化合物 GN8. 日本生物物理学会第 47 回年会, アスティとくしま 2009.10.30-11.1

13) 山口圭一, 松本友治, 武藤淳二, 桑田一夫.
シーディングによる 2 種類のプリオンア
ミロイド線維の伝播. 日本生物物理学会
第 47 回年会, アスティとくしま 2009.10.
30-11.1

14) 木村 力, 武藤淳二, 鎌足雄司, 桑田一夫.
抗プリオン化合物 GN8 の類縁体合成およ
び活性評価. 第 40 回中部化学関係学協会
支部連合秋季大会, 岐阜大学 2009.11.
7-8

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

PrP^{res} 産生抑制を示す幾つかの有機低分子化合物の特性

研究分担者：照屋 健太 東北大学大学院医学系研究科 プリオン蛋白分子解析分野
研究協力者：堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科 プリオン蛋白分子解析分野
研究協力者：川越 敬一 第一製薬 東京開発研究センター
研究協力者：陳 忠正 第一製薬 東京開発研究センター

研究要旨

現在までに様々なスクリーニング法によって抗プリオン活性をもつ化合物が報告・分類されている。アミロイド親和性化合物はその一つのグループを形成している。しかしながら、その作用機序は明らかにはなっていない。今年度は幾つかの化合物についてプリオン持続感染細胞での PrP^{res} 産生抑制能と抗 A β アミロイド形成能との比較を行った。その結果、両者に関して相関はみられなかった。また、アミロイド親和性の抗プリオン活性のスクリーニングの過程において、N167 感染細胞で異常型プリオン蛋白質複合体形成を促進する一方で、RML 感染細胞では PrP^{res} 産生抑制する化合物を見出した。

A. 研究目的

硫酸化多糖類を基本骨格とする薬剤ではその荷電と高分子鎖が抗プリオン活性にとって重要な特性であり、特にヘパリンにおいては、鎖中に現れるある二糖構造が重要であることを昨年度報告した。このことは、低分子化や荷電の変換によって、プリオン病の実質的な変性部位である脳へ効率的に移行させることが困難であることを示している。末梢投与可能な抗プリオン薬が求められている現状[1]においては、速やかに脳に移行することが可能な薬剤の検索が必要である。

我々は持続感染細胞においてきわめて高い PrP^{res} 産生抑制を有する、あるアミロイド親和性化合物を以前に報告している[2]。速やかな脳への移行の反面、脳からの離脱も速やかであったためプリオン感染マウスにおいては期待していたほどの治療効果を得ることはできなかった。

そこで、プリオン持続感染細胞での抗プリオン活性に A β のアミロイド形成阻害能を評

価の軸として加えることで、アミロイド親和性化合物の基本的な特性について調査した。

B. 研究方法

(A) 既報を含む、16 種類のアミロイド親和性化合物をサンプルとして用い、

(1) ScN2a 細胞 (N2a 細胞に RML プリオン株が感染) を上記の化合物の濃度系列のもとで培養した。培養後細胞を溶解し、プロテアーゼ K で処理し、その後遠心することによって PrP^{res} を含む画分を得た。ウェスタンブロットによって PrP^{res} の含有量を求め、化合物の濃度系列に対してプロットすることでプリオン持続感染細胞に対する化合物の EC50 を算出した。

(2) 可溶化した A β ペプチド溶液を調製しアミロイド形成反応を共存させたチオフラビンの蛍光増大を指標として評価した。この系を化合物の濃度系列のもとで行うことによって、化合物の EC50 を算出した。

(3) A β アミロイドはヘパリンと結合する性

質を有している。アミロイド親和性化合物による、この結合の競合的阻害能を調べた。

(B)アミロイド親和性化合物「プリムリン」について、ScN2a 細胞と N167 細胞 (N2a 細胞に 22L プリオン株が感染)を各濃度系列のもとで培養した。あるいは、プリオン持続感染細胞の溶解液を調製しプリムリンを添加し、経時的にサンプリングした。これらのサンプルは、前実験と同様な処理をおこない、濃度や時間に対する PrP^{res}の量をウエスタンブロット上で判定した。定量などの必要に応じて糖鎖を除去したサンプルを調製した。

(倫理面への配慮)

ヒトに関する試料を用いた実験は行っていない。遺伝子組み換え体は所属する東北大学の取り決めを遵守した。

C. 研究結果

(A) (1) 16 種類のアミロイド親和性化合物は ScN2a 細胞上で、0.50nM - 4.3 uM の PrP^{res} 産生抑制能に関する EC50 を示した。明確な構造活性相関は見出されなかった。

(2) A β アミロイド形成阻害能は、0.30uM - 25uM の範囲であった。明確な構造活性相関は見出されなかった。

(3) A β アミロイド-ヘパリン結合阻害能は、ほとんどの化合物で、0.30 - 1.9uM 程度の値を示したが、いくつかの化合物は 50 uM 以上の濃度でないと阻害能を示さなかった。明確な構造活性相関は見出されなかった。

(B)「プリムリン」を添加して培養した N167 細胞の PrP^{res} は、プリムリンの用量依存的に 35kDa - 55kDa に新たなバンドを生じた(以下 35k バンドと呼ぶ)。一方、ScN2a 細胞では用量依存的な PrP^{res} 産生抑制能を示した。このときの EC50 は 1.0uM 程度であった。プリオン持続感染細胞の溶解液とプリムリンの混合実験では、プリオン株によらず時間依存的な 35k バンドの増加がみられた。このプリ

ムリンによる 35k バンドの形成促進反応は、PK 処理前に行う方が PK 処理後に行うのに比べて速度が速かった。

D. 考察

●プリオン持続感染細胞での抗プリオン活性と A β のアミロイド形成阻害能との間に相関関係はみられなかった。

培養細胞中での各化合物のバイオアベイラビリティに関する検討が必要であるものの、アミロイド親和性化合物によるアミロイド形成阻害能は「アミロイド」という束一的な性質を持った物に対する効果ではなく、アミロイドを構成しているタンパク質への親和性が重要であることを示唆している。

その一方で、アミロイド親和性化合物のうち、A β アミロイドと PrP^{res} への阻害活性の高かったものは、フェニルオキサゾール環やピリジンメタンイミンのいずれかの化学構造を共通して有していた。

A β アミロイド-ヘパリン結合阻害能の結果から、A β アミロイドへのアミロイド親和性化合物の結合の様式は一つではなく、複数の様式があることが示唆される。

●PrP^{res} との強固な複合体形成を促進するアミロイド親和性化合物を見出した。

SDS-PAGE サンプルバッファーでの煮沸でも解離しない PrP^{res} と複合体を構成するもの(35k バンド)は、プロテアーゼ耐性コアをもち、PrP と同様の糖鎖修飾を受けており、PrP^{res} と同様な分子量をもっていることが判明した。

この化合物「プリムリン」は、チオフラビン T の基本的な骨格であるベンゾチアゾリンを分子内に 2 個有している。この分子骨格からタンパク質分子とのクロスリンスが可能な反応機序は想定できない。

一方、細胞溶解液を用いた実験ではプリオン株依存性を示さず複合体を形成した。正常型 PrP には、このような複合体を形成する作

用を示さなかった。異常型 PrP おいては、プロテアーゼ耐性コアへの作用よりも、インタクトな異常型 PrP に対しての作用の方が効率的であった。このことはプリムリンの作用はインタクトの異常型 PrP 選択的であることを示している。

プリムリンによるこの PrP^{Pres} 複合体の形成は時間に対して、近似的に一次反応で進行した。また、この複合体形成反応の進行において、新規に取り込まれる正常型 PrP は検出されなかった。すなわち、正常型から異常型への PrP のコンバージョンはおこさず、試験管内にすでにあるインタクトの異常型 PrP が複合体を形成すると考えられる。

以上を総合すると、ウエスタンブロット上に新たに形成された 35k バンドは異常型 PrP の二量体であることが想定される。この二量体では、PrP 上のプロテアーゼ耐性コアどうし、糖鎖を介さずにクロスリンクしていることになる。このような存在様式の PrP^{Pres} の性質は報告されておらず、この生成機序とクロスリンクしている部分を同定することで PrP^{Pres} の構造についての知見と、アミロイド親和性化合物のプリオン持続感染細胞における PrP^{Pres} 産生抑制機序に関する知見が得られるかもしれない。

E. 結論

- プリオン持続感染細胞での抗プリオン活性と A β のアミロイド形成阻害能との間に相関関係はみられなかった。
- PrP^{Pres} との強固な複合体形成を促進するアミロイド親和性化合物を見出した。

[参考文献]

- 1) Teruya K, Kawagoe K, Kimura T, Chen CJ, Sakasegawa Y and Doh-ura K. Amyloidphilic compounds for prion

diseases. Infectious Disorders Drug Targets. 9: 15-22, 2009

- 2) Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen CJ, Teruya K, Sakasegawa Y and Doh-ura K. Orally administered amyloidphilic compound is effective in prolonging the incubation periods of cerebrally infected prion disease animals in a prion strain-dependent manner. Journal of Virology. 81: 12889-12898, 2007

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2009/4/1~2010/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) 照屋健太, 堂浦克美. 最新事情 プリオン病のメカニズムと治療戦略.In: 幸野友浩・編. メディカルバイオ 2010年1月号, 東京都千代田区, 株式会社オーム社, 48-55, 2010

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

北本哲之, 堂浦克美, 小林篤志, 照屋健太, 竹内敦子, 森田将典, 山本幸, 白澤映子. 変異タンパク質の製造方法. 国立大学法人東北大学, 株式会社ベネシス. 特願 2009-180098. 2009年7月31日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ヒトプリオンの伝達性に関する研究

—遺伝子改変マウスにおける内因性プリオン蛋白質の変換について—

研究分担者：毛利 資郎 動物衛生研究所プリオン病研究センター

研究協力者：松浦 裕一 動物衛生研究所プリオン病研究センター

研究協力者：石川有紀子 動物衛生研究所プリオン病研究センター

研究分担者：横山 隆 動物衛生研究所プリオン病研究センター

研究協力者：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

研究協力者：北本 哲之 東北大学大学院医学研究科創生応用医学研究センター

研究要旨

プリオン蛋白質(PrP)遺伝子改変マウスへのプリオン伝達試験で本来マウスの持っている内因性プリオン蛋白質遺伝子(*Prnp*)が、プリオンの伝達を阻害することが知られている。すなわち、マウスの内因性プリオン蛋白質(MoPrP^C)が導入プリオン蛋白質遺伝子産物のプリオン変換に対して抑制的に働き、潜伏期間が延長される。

われわれはヒトプリオンの伝達性試験のモデルマウス作製のために、ヒト型プリオン蛋白質遺伝子導入マウスを作成し、伝達試験を行っている。プリオン蛋白質遺伝子のノックアウトマウス(*Prnp*^{0/0})との交配により得られたヒト型プリオン蛋白質遺伝子のみが発現するマウスは、孤発性 CJD(sCJD)プリオン接種により非常に短い潜伏期間で発症した。一方、MoPrP^Cと導入ヒト型遺伝子産物を同時に発現するマウスでは、潜伏期間が著しく延長した。このマウスでは導入ヒト型遺伝子産物のプリオン変換と同時に、抑制的に働いている MoPrP^Cのプリオンへの変換が促進される現象が認められた。この現象は、プリオン変換機構を考える上で興味深い現象である。

A. 研究目的

ヒト型プリオン蛋白質遺伝子導入マウスとヒト由来プリオンを用いて伝達試験を行い、ヒトプリオンと遺伝子改変マウスの組み合わせによる潜伏期間、病理変化、産生された異常プリオン蛋白質性状により伝達の要因について解析する。本年度は、ヒト型モデルマウス伝達試験における内因性マウスプリオン蛋白質の動態について調べる。

B. 研究方法

(1) ヒト/マウスキメラプリオン蛋白質遺伝子導入(Tg)マウス

① Tg マウスにおける導入遺伝子はマウス PrP exon 3 の ORF の Sma I から BstEII 間をヒト型のプリオンタンパク遺伝子に換えたキメラ型のヒト/マウスキメラ型の導入遺伝子構造である。

② それらの Tg マウスのうち Tg-ChM (129Met) はヒト PrP 遺伝子の多型に合わせて codon129 がメチオニンタイプ、Tg-ChV (129Val) はバリン型である。

(2) Tg マウスのプリオン遺伝子関連の発現状況と伝達試験については Tg-ChM (129Met) を例に図 1 に示した。

(3) 伝達試験はヒト孤発性クロイツフェル

ト・ヤコブ病(CJD)codon129 メチオニンタイプの 10%脳乳剤をそれぞれのマウス脳内に 20 μ l 接種した。

- (4) プリオンの検出はウエスタンブロッティング法により、マウスの内因性遺伝子産物の検出にはマウス型プリオン蛋白質と特異的に反応し、ヒト型プリオン蛋白質とは反応しない SAF83 抗体を、ヒト型トランスジーンの遺伝子産物についてはマウス型とは反応しない 3F4 抗体を用いた。

(倫理面への配慮)

「農林水産省の所管する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」に則り、動物衛生研究所の動物実験委員会により審査承認されている。(承認番号 第 07-10 号)

C. 研究結果

ヒト型プリオン蛋白質のみを発現する Tg マウスは短い潜伏期間、Tg-ChM(129Met) は 165 日、Tg-ChV(129Val) マウスでは 175 日、で全てのマウスが発病し、ヒト型プリオンのみを産生する。マウスの内因性プリオン発現が多くなるにつれて潜伏期間が延長し、トランスジーンの発現のないマウス(野生型マウス)では 700 日以上経過し、しかも全てのマウスでヒトプリオンの伝達が認められるわけではない。しかも、pK 抵抗性のマウス型異常プリオン蛋白質の検出量は少ないことが明らかとなった。ヒト型プリオン蛋白質の異常化が認められるマウスにおいては、野生型マウス検出の異常化を検出した時期(接種後 700 日以上)のおよそ半分の接種後日数(平均 382 日)にもかかわらず pK 抵抗性のマウス型プリオン異常プリオンの産生量は非常に多いことが判明した。これは内因性のマウスプリオン蛋白質の発現量が半分であるネオマイシン耐性遺伝子とヘテロ型のマウスでも同様な現象が認められた。この現象は Tg-ChV

(129Val) マウスでも同様であった。

これらのことから、Tg マウスにおいてマウスの内因性プリオン蛋白質はヒト型 Tg 遺伝子産物のプリオンへの異常化を抑制するが、ヒト型 Tg 産物の異常化に伴いそれ自身のプリオンへの変換効率が高くなることが明らかとなった。

D. 考察

プリオンに変換されやすいプリオン蛋白質が難変換プリオン蛋白質と共存することで変換抑制を受ける現象は、異分子の干渉作用やドミナントネガティブ効果として説明されている。これとは反対に変換されやすいプリオン蛋白質がプリオンに変換されることにより難変換プリオンも同時に変換が促進される現象を見いだした。導入されたヒト型プリオン蛋白質遺伝子のコア部分はヒト型であるが、シグナルペプチドと C 末はマウス型となるヒト・マウスキメラ型遺伝子であることが、この現象に作用しているかもしれない。しかしながら、今のところこの変換に関わるこの興味深い現象のメカニズムは不明である。

E. 結論

1. ヒト型トランスジェニックマウスにおいてマウスの内因性プリオン蛋白質は発現量に応じて導入遺伝子産物のヒト型プリオンへの変換を抑制し、潜伏期間も延長した。
2. ヒトプリオンによる難変換性のマウスの内因性プリオン蛋白質は、導入遺伝子産物のプリオンへの変換に伴い、それ自身のプリオンへの変換が亢進されていることが示された。

[参考文献]

- 1) Kitamoto, T., Mohri, S., Ironside, J. W., Miyoshi, I., et al. Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a

new bioassay for human prions. *BBRC*. 294: 280-286, 2002

- 2) Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen FE, et al. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83: 79-90, 1995
- 3) Perrier V, Kaneko K, Safar J, Vergara J, Tremblay P, DeArmond SJ, et al. Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13079-84, 2002

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2009/4/1~2010/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Hizume M, Kobayashi A, Teruya K, Ohashi H, Ironside J W, Mohri S, and Kitamoto T. Human prion protein (PrP) 219K is converted to PrP^{Sc} but shows heterozygous inhibition in variant Creutzfeldt-Jakob disease infection. *JBC*. 284(6): 3603-3609, 2009
- 2) Y. Shimizu, Y. Ushiki-K., Y. Iwamaru, T. Muramoto, T. Kitamoto, T. Yokoyama, S. Mohri, Y. Tagawa. (in press) A novel anti-prion protein monoclonal antibody and its single-chain fragment variable derivative with ability to inhibit

abnormal prion protein accumulation in cultured cells. *Microbiol. Immunol* (in press)

- 3) Kobayashi A, Asano M, Mohri S, Kitamoto T. A traceback phenomenon can reveal the origin of prion infection. *Neuropathology* 29: 619-624, 2009
- 4) Kobayashi A, Hizume M, Teruya K, Mohri S, Kitamoto T. Heterozygous inhibition in prion infection—The stone fence model. *Prion*, 3: 27-30, 2009

2. 学会発表

- 1) 毛利資郎. 「新しいプリオンによる牛海綿状脳症(非定型 BSE)」第 56 回日本実験動物学会総会シンポジウム. 大宮市. 2009. 5.16
- 2) 毛利資郎. 「動物モデルを用いたプリオンの伝播研究」プリオン研究会 2009. 宮城県蔵王町. 2009.8.30

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

プリオン感染におけるトレースバック現象の実験的証明

研究分担者：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

研究分担者：毛利 資郎 動物衛生研究所プリオン病研究センター

研究協力者：北本 哲之 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

研究要旨

本研究ではトレースバック実験がプリオンの感染源同定のための有用な手段となりうるか検証した。孤発性 CJD-VV2 プリオンを接種した 129M/M ヒト型マウスは長い潜伏期間の後に発病し、脳内には中間型の PrP^{Sc} が蓄積していた。この 129M/M ヒト型マウスの脳ホモジネートを継代接種すると、遺伝子型が異なるにもかかわらず 129V/V ヒト型マウスの方が 129M/M ヒト型マウスより早く発病した。これらの 129V/V ヒト型マウス脳内の PrP 沈着パターンは孤発性 CJD-VV2 プリオンを接種された 129V/V ヒト型マウスのもと同じであった。さらに、PrP^{Sc} タイプは中間型からタイプ 2 へと変化していた。つまり、孤発性 CJD-VV2 プリオンが 129M/M ヒト型マウスに入ると PrP 沈着パターンと PrP^{Sc} タイプが変化するが、そのプリオンが 129V/V ヒト型マウスに戻ればそれらの性質も元に戻ることが示されたのである。これらの結果から、トレースバック実験は PrP アミノ酸配列を越えたプリオン感染が起きた場合に、感染の由来を同定するための信頼できる手段となることが実験的に証明された。

A. 研究目的

我々は昨年度までの研究においてプリオンのトレースバック現象を発見した。これはプリオンが PrP のアミノ酸配列を越えた感染の後も元の配列の PrP を異常化させやすいという現象である。そして、このトレースバック現象を利用すれば、感染性プリオン病の由来を同定できる可能性がでてきた。しかし、トレースバック現象はこれまで実験的には証明されていない。そこで本年度は孤発性 CJD-VV2 プリオンを用いてトレースバック現象が感染源同定のための信頼できる手段となることを証明する。

B. 研究方法

129M/M のヒト PrP を発現するノックインマウスに孤発性 CJD-VV2 プリオンを脳内接

種した。この 129M/M ヒト型マウスの脳ホモジネートをさらに 129M/M あるいは 129V/V ヒト型マウスに脳内接種し、トレースバック現象が観察されるか検証した。潜伏期間、脳内の PrP 沈着パターン、PrP^{Sc} のタイプを免疫組織化学およびウェスタンブロットにより解析した。

(倫理面への配慮)

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った。また動物実験に関しては動物衛生研究所動物実験に関する指針を遵守した。

C. 研究結果

孤発性 CJD-VV2 プリオンを接種した

129M/M ヒト型マウスは長い潜伏期間の後に発病した。この 129M/M ヒト型マウスの脳ホモジネートを継代接種すると、遺伝子型が異なるにもかかわらず 129V/V ヒト型マウスの方が 129M/M ヒト型マウスよりも早く発病した(図 1)。

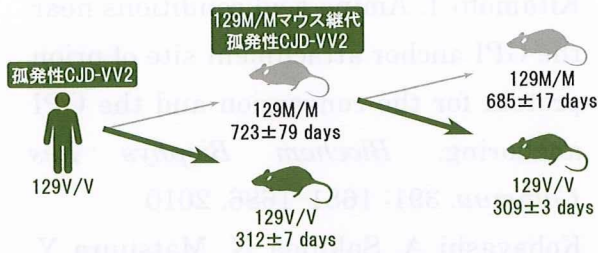


図 1 潜伏期間

孤発性 CJD-VV2 プリオンは 129M/M ヒト型マウスで継代した後も 129V/V ヒト型マウスへの強い感染性を保持していた。

孤発性 CJD-VV2 プリオンを接種された 129V/V ヒト型マウスの脳では白質に局限してプラーク型 PrP 沈着がみられたのに対し、129M/M ヒト型マウスでは灰白質にプラークが散在していた。さらに、継代接種すると 129M/M ヒト型マウスでは灰白質にプラークが散在するパターンのもままであったが、129V/V ヒト型マウスでは白質に局限して沈着するパターンに戻っていた(図 2)。

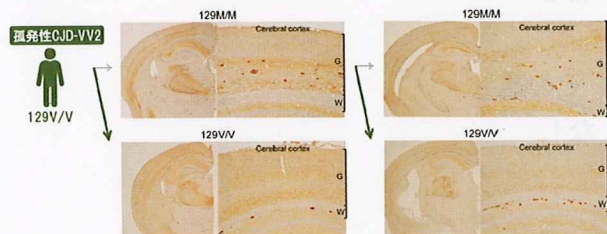


図 2 マウス脳内の PrP 沈着パターン

孤発性 CJD-VV2 プリオンを 129M/M ヒト型マウスへ接種すると PrP 沈着パターンが変化した。その後 129V/V ヒト型マウスへ継代接種すると沈着パターンは元に戻った。

また、孤発性 CJD-VV2 プリオンを接種された 129V/V ヒト型マウスの脳にはタイプ 2 PrP^{Sc} が蓄積していたのに対し、129M/M ヒト型マウスには中間型のタイプ 2^{Sh+} PrP^{Sc} が蓄積していた。そして、継代接種すると 129M/M ヒト型マウスでは中間型のタイプ 2^{Sh+} PrP^{Sc} のままであったが、129V/V ヒト型マウスではタイプ 2 PrP^{Sc} に戻っていた(図 3)。

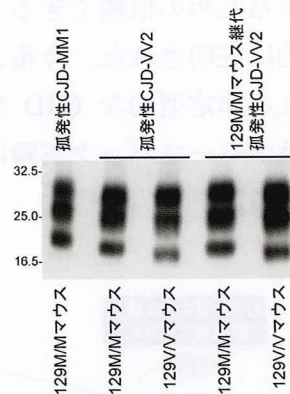


図 3 マウス脳内の PrP^{Sc} タイプ

孤発性 CJD-VV2 プリオンを 129M/M ヒト型マウスへ接種すると PrP^{Sc} タイプが変化した。その後 129V/V ヒト型マウスへ継代接種すると PrP^{Sc} タイプは元に戻った。

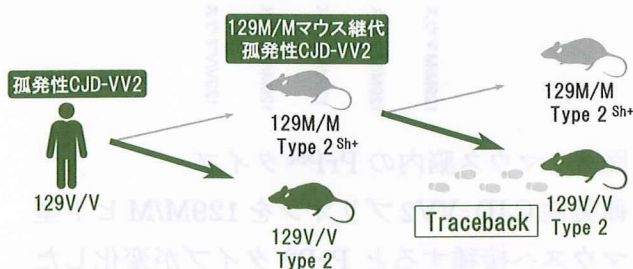
D. 考察

本研究により孤発性 CJD-VV2 プリオンは 129M/M ヒト型マウスで継代した後も、元の遺伝子型の 129V/V ヒト型マウスへ強い感染性を示すことが証明された。さらに孤発性 CJD-VV2 プリオンが 129M/M ヒト型マウスに感染すると PrP 沈着パターンと PrP^{Sc} タイプが変化するが、そのプリオンが元の遺伝子型の 129V/V ヒト型マウスに戻ればそれらの性質も元に戻ることが示された。これらの結果は、PrP のアミノ酸配列を越えた感染では新たな性質をもつプリオン株が生み出されるが、元のアミノ酸配列の宿主に感染すれば元の性質のプリオンに戻ることを示唆している。このように元のプリオンに再び戻ることが元

の宿主に対して強い感染性を示す理由であると考えられた。新たな PrP アミノ酸配列に対して、プリオンの立体構造の適合と多様な PrP^{Sc} 分子集団の中からの選択が起きることがこのようなトレースバック現象の分子基盤となっているのかもしれない。

E. 結論

トレースバック実験は PrP アミノ酸配列を越えたプリオン感染が起きた場合に、感染の由来を同定するための信頼できる手段となることが実験的に証明された。今後、プリオン感染が疑われる非定型的な CJD 症例が発生した場合にはトレースバック実験により感染源を同定できる。



[参考文献]

- 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.* 282: 30022-30028, 2007

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2009/4/1~2010/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Kobayashi A, Asano M, Mohri S, Kitamoto T. A traceback phenomenon can reveal the origin of prion infection. *Neuropathology.* 29: 619-624, 2009
- 2) Hizume M, Kobayashi A, Mizusawa H, Kitamoto T. Amino acid conditions near the GPI anchor attachment site of prion protein for the conversion and the GPI anchoring. *Biochem Biophys Res Commun.* 391: 1681-1686, 2010
- 3) Kobayashi A, Sakuma N, Matsuura Y, Mohri S, Aguzzi A, Kitamoto T. Experimental Verification of a Traceback Phenomenon in Prion Infection. *J Virol.* 2010 (in press).

2. 学会発表

- 1) 小林篤史, 佐久間信行, 北本哲之. ヒト異常型プリオン蛋白タイプ特異的抗体の作製. 新潟, 2009.8.29

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし