

大学蛋白質研究所セミナー2010「疾患と膜動態の蛋白質科学」 大阪大学、2010年9月18日

7) 長谷部理絵、堀内基広、Caughey Byron プリオン感染では株により異なる補体因子が反応する 第58回日本ウイルス学会 徳島 2010年11月7日

8) 山崎剛士、鈴木章夫、長谷部理絵、堀内基広 クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤処理による PrPSc の細胞内局在の変化 第58回日本ウイルス学会 徳島 2010年11月7日

9) 堀内 基広 プリオン病治療の可能性 -抗体療法と細胞治療- 東京大学大学院農学生命科学研究科 フードサイエンス棟竣工記念シンポジウム 東京大学 2010年12月11日

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

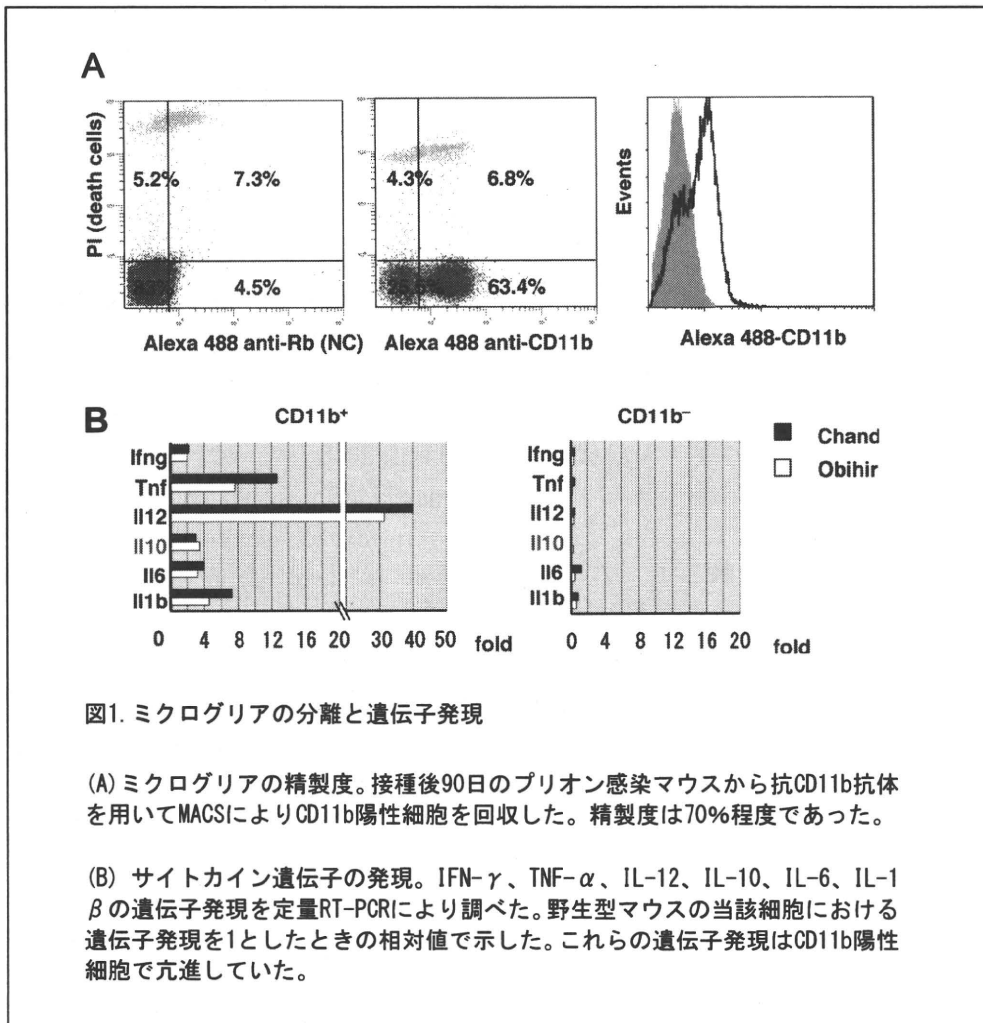


図1. ミクログリアの分離と遺伝子発現

(A) ミクログリアの精製度。接種後90日のプリオン感染マウスから抗CD11b抗体を用いてMACSによりCD11b陽性細胞を回収した。精製度は70%程度であった。

(B) サイトカイン遺伝子の発現。IFN- γ 、TNF- α 、IL-12、IL-10、IL-6、IL-1 β の遺伝子発現を定量RT-PCRにより調べた。野生型マウスの当該細胞における遺伝子発現を1としたときの相対値で示した。これらの遺伝子発現はCD11b陽性細胞で亢進していた。

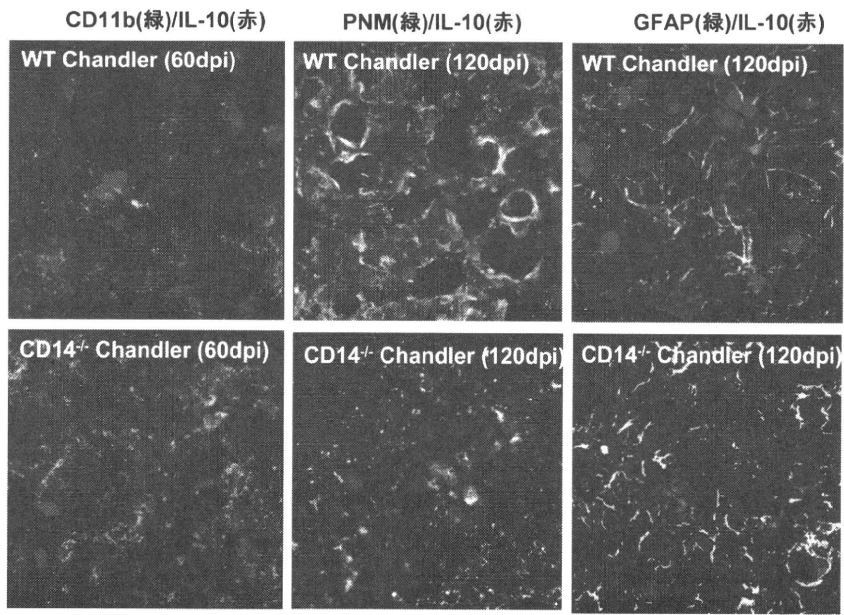


図2. 蛍光2重IL-10陽性細胞の検出
 左：Chandler株接種後60日の視床，中央：Chandler株接種後120日の海馬，右：
 Chandler株接種後120日の視床

12. CWD のサーベイランスとシカ PrP 遺伝子型の調査

分担研究者 堀内 基広 北海道大学大学院 獣医学研究科 教授

研究要旨 鹿科動物の慢性消耗病(Chronic wasting disease, CWD)は、我が国で発生の報告はない。しかし、鹿肉はゲームミートとして人に食されること、北海道ではエゾシカ肉の活用を推進していること、鹿の臓器はペットフードに利用されることから、CWD が食を介してヒトに感染する懸念、あるいは動物種間を超えて伝播する懸念が絶えない。我が国の鹿科動物における CWD の存在の有無を調べるために、北海道の鹿専用の簡易と殺場で延髄の採材を行うためのマニュアルを作製し、CWD のサーベイランスを実施した。道北、道東、道央で捕獲された計 70 頭のエゾシカの延髄から PrP^{Sc} の検出を行ったが、全例陰性であった。また、計 10 頭のエゾシカの PrP 遺伝子多型を解析したが、アミノ酸型は ²⁰Asp⁹⁵Gln⁹⁶Gly¹⁰⁰Ser¹¹⁶Ala¹³²M²²⁵Ser²²⁶Gln であり、アミノ酸多型は認められなかった。

A. 研究目的

鹿科動物の慢性消耗病(Chronic wasting disease, CWD)は、カナダ、アメリカおよび韓国で発生がある。サルおよびヒト PrP を発現するトランスジェニックマウスを用いた感染実験では、ヒトへの感染効率は高くはないこと推測できる報告があるが、ヒトへのリスクは慎重に判断する必要がある。我が国で発生の報告はないが、鹿肉はゲームミートとして人に食されることから CWD を不安視する声がある。特に北海道ではエゾシカ肉の活用を推進しており、学校給食での利用も模索されていることから、CWD への不安が強い。また、鹿の臓器はペットフードに利用されることから、動物種間を超えて伝播する懸念が絶えない。そこで、CWD の存在の有無を継続的に調べるために、北海道の鹿専用の簡易と殺場で延髄の採材を行うためのマニュアルを作製し、CWD のサーベイランスを実施した。

B. 方法

1) PrP^{Sc} の検出

エゾシカの延髄から、BSE 確認検査と同様に、ウエスタンブロットイング(WB)で PrP^{Sc} の検出を行った。PK 処理および未処理の試料を作製し、ペアで電気泳動して、PK 未処理の試料で PrP^C が検出され、PK 処理により PrP^C 由来のバンドが消失することを確認した。抗体として、mAb44B1 と mAb132 を用いた。

2) エゾシカ PrP 遺伝子の解析

延髄から DNA を抽出した。プライマー MD582F および MD1479R(Jewell et al., 2005)によりエゾシカの PrP ORF を完全に含む DNA 断片を増幅し、

これらのプライマーおよび内部にシーケンシング用プライマーを設定して、PCR 産物のダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果

1) CWD サーベイランス

道北の 40 頭(西興部、狩猟個体、年齢不詳)、道東の 10 頭(知床、生体捕獲個体、うち推定 2 歳以上 6 頭)、道央の 20 個体(トムラウシ、生体捕獲個体、うち推定 2 歳以上 14)の試料を用いて WB を行ったが全て陰性であった。

2) エゾシカ PrP 遺伝子の解析

道央 6 頭、道東 4 頭の計 10 頭の PrP 遺伝子の塩基配列を解析したが、塩基置換は認められなかった。アミノ酸型は全て ²⁰Asp⁹⁵Gln⁹⁶Gly¹⁰⁰Ser¹¹⁶Ala¹³²M²²⁵Ser²²⁶Gln であった。

D. 考察

CWD に感染した鹿では、末梢のリンパ系組織に PrP^{Sc} が蓄積することから、直腸粘膜、扁桃などのリンパ系組織から PrP^{Sc} を検出することで、診断が可能である。一方、継続して CWD のサーベイランスを行うためには、エゾシカ専用の簡易と殺場でと殺解体に従事者に採材を協力してもらう必要がある。エゾシカ専用の簡易と殺場には解剖学的な知識を持つ獣医師がいないこと、また、少人数でと殺解体を実施していることから、解体

工程の衛生環境を損ねる採材は避けるべきと判断し、扁桃や直腸粘膜は採材の対象外とし、延髄を採材することにした。実際に簡易と殺場に赴き、作業工程を確認した上で、マニュアルを作製した。マニュアル化したことで、今後、他の簡易と殺場での採材が容易になることから、次年度以降、効率良くサーベイランスが進むことが期待できる。

ミュールジカでは²²⁵SerがCWDに感受性が高いことが報告されている(Jewell et al., 2005)。またオジロジカ⁹⁵Gln⁹⁶GlyのalleleがCWDの感受性と関係することが知られている(O'Rourke et al., 2004; Johnson et al., 2006)。ロッキーマウンテンエルクでは、¹³²Metを有するエルクでCWD陽性率が高い(O'Rourke et al., 1999)。エゾシカCWD感受性は不明であるが、エゾシカのPrPは他の鹿科動物でCWD感受性のアミノ酸多型を有していることになる。

E. 結論

シカ専用の簡易と殺場で、食用としてと殺されるエゾシカのCWDサーベイランスのための採材マニュアルを作成した。マニュアルに基づきシカ延髄を採材して、ウエスタンブロットによりPrP^{Sc}の有無を調べた結果、北海道のエゾシカでCWD陽性個体は検出されなかった。今後、対象地域を拡大して定期的なモニタリングを継続して、CWDの有無を調査する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakata H, Horiuchi M, Takahashi I, and Kinjo M. : Confomational Analysis of Soluble Oligomers of GFP Tagged Prion Protein by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2010; 11; 87-95.
- 2) Sato Y, Shimonohara N, Hanaki KI, Goto M, Yamakawa Y, Horiuchi M, Takahashi H, Sata T, Nakajima N.: ImmunoAT method: an initial assessment for the detection of abnormal isoforms of prion protein in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J. Virol. Methods.* 2010; 165: 261-267.
- 3) Watanabe Y, Hiraoka W, Igarashi M, Ito K, Shimoyama Y, Horiuchi M, Yamamori T, Yasui H, Kuwabara M, Inagaki F, and Inanami O.: A novel copper(II) coordination at His186 in full-length murine prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 394: 522-528.
- 4) Sassa Y, Yamasaki T, Horiuchi M, Inoshima Y, Ishiguro N.: The effects of lysosomal and proteasomal inhibitors on abnormal forms of prion protein degradation in murine macrophages. *Microbiol. Immunol.* 2010; 54: 763-768.

2. 学会発表

- 1) Sakai K, Song C-H, Hasebe R, Horiuchi M. Analysis of pathobiology of prion infection in Cd14 gene deficient mice. Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases. Sapporo, Japan, July 24-25, 2010
- 2) Yamasaki, T., Suzuki, A., and Horiuchi, M. Clint-1 mediated clathrin-dependent retrograde transport is involved in PrPSc trafficking in Neuro2a mouse neuroblastoma cells. Prion2010 Salzburg, Austria, Sept. 8-11, 2010
- 3) Hasebe, R., Horiuchi, M., and Caughey, B. Reaction of conplement factors differs with prion strains in vitro and in vivo. Prion2010 Salzburg, Austria, Sept. 8-11, 2010
- 4) Sakaguchi, S., Horiuchi, M., Yamakawa, Y., Sata, T., and Furuoka, H. Temporal kinetics of prion protein accumulation and its effect on neurotransmitters in the cerebellum of guinea pigs infected with BSE prion Prion2010 Salzburg, Austria, Sept. 8-11, 2010
- 5) Horiuchi, M. Application of anti-PrP antibody recognizing the most amyloidogenic region for the detection of PrPSc in immunocyto- and immunohistochemistry. Prion Japan & Canada, Tokyo, Japan, Nov. 11-12, 2010
- 6) 堀内 基広 プリオン持続感染細胞における異常型プリオン蛋白質の細胞内輸送 大阪大学蛋白質研究所セミナー2010「疾患と膜動態の蛋白質科学」 大阪大学、2010年9月18日
- 7) 長谷部理絵、堀内基広、Caughey Byron プリオン感染では株により異なる補体因子が反応する 第58回日本ウイルス学会 徳島 2010年11月7日
- 8) 山崎剛士、鈴木章夫、長谷部理絵、堀内基広 クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤処理による PrPSc の細胞内局在の変化 第58回

日本ウイルス学会 徳島 2010年11月7日
 9)堀内 基広 プリオン病治療の可能性 -抗体療法と細胞治療- 東京大学大学院農学生命科学研究科 フードサイエンス棟竣工記念シンポジウム 東京大学 2010年12月11日

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

採材マニュアルの作成

1

シカ延髄の採材

目的: シカの慢性消耗病(Chronic Wasting disease, CWD)のモニタリングとシカ遺伝子の保存

注意事項

- 1) 延髄は、原則として齡別で選別以上と判断できる個体からサンプリングして下さい。(1歳未満の個体からは採材しないで下さい) (6ページ参照)
- 2) 1日5~10頭を目録にサンプリングを実施して下さい。
- 3) 採材した延髄は冷凍保存して下さい。
- 4) 採材シートに必要な事項を記入して下さい。
- 5) 1月分のサンプルが纏まった時点で、クール宅急便(冷凍)で北海道大学に送付して下さい。

材料

ヘラ、ピンセット、プラスチックシャーレ、マジック、ビニールテープ、ジップロック

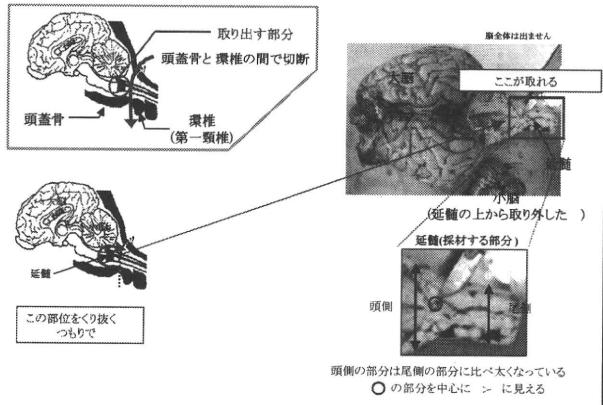
調査シート記入例

採材日	性別	年齢	生体情報・狩猟情報	特記事項
1	♂	3	生体	
2	♀	6	生体	
3	♂	3	生体	尻尾に怪痕あり
4	♀	2歳以上	生体	詳細に調査 臓器に寄生虫多数 延髄
5	♀	6	生体	
6	♂	2歳以上	生体	解体時、腸管を壊つけた
7	♂	2歳以上	物死	

・気になった点を何でも特記事項欄に記入して下さい。
 ・年齢は経験的な判断でも結構です。2歳以上、以下の判断が微妙な場合は、歳を見て、2歳以上、2歳以下とおおまかに判断して下さい。

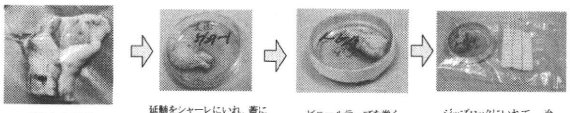
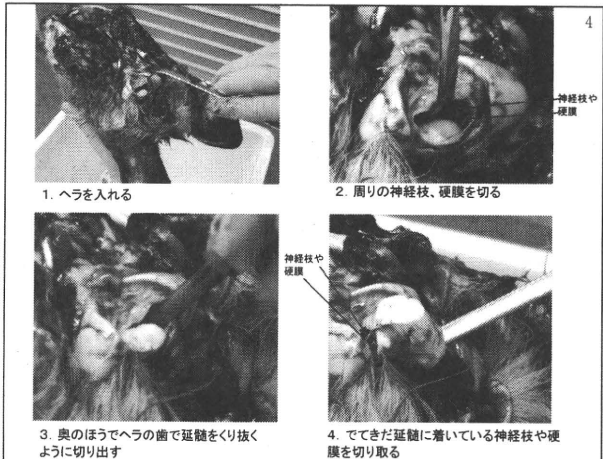
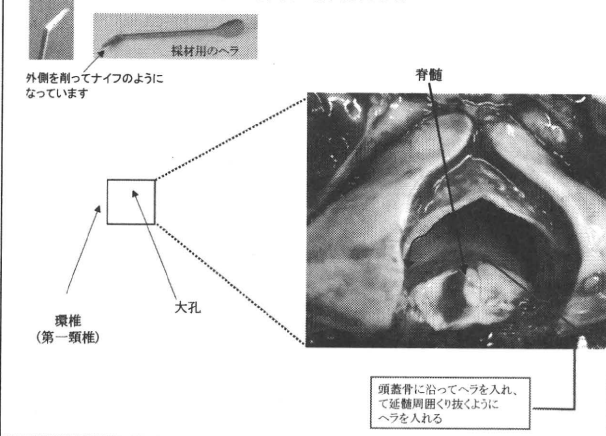
延髄の採材(採材部位)

2



延髄の採材(採材方法)

3

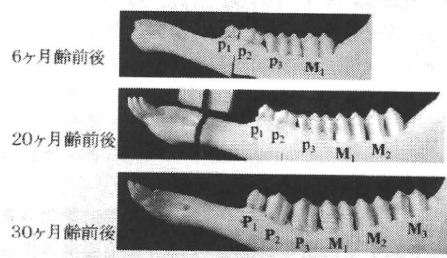


- ✓延髄は床に落ちたり、毛がついていても問題ありません。
- ✓ピンセットなしでも採材できます。ピンセットは必要があれば使ってください。
- ✓使用したヘラ、ピンセットはお湯で洗浄して乾燥させた後、次回のサンプリングに使用して下さい。
- ✓1月分のサンプルが纏まった時点で、クール宅急便(冷凍・着払い)で北海道大学に送付して下さい。
- ✓必要な消耗品は北海道大学から供給しますので、少なくなったら連絡して下さい(堀内: 011-706-5293, hortuch@vetmed.hokudai.ac.jp)

お手数おかけしますが、ご協力御願致します。

北海道大学大学院獣医学研究科
 獣医学部
 教授・堀内基広
 011-706-5293
 hortuch@vetmed.hokudai.ac.jp
 060-0618 札幌市北区北18条西5丁目

エゾシカの年齢の推定
 下顎骨の臼歯(奥歯)の M2 が確認できれば 2歳以上、確認できなければ 2歳以下、と判断する。



13. プリオン蛋白構造変換機序の解析

研究分担者 堂浦克美 東北大学大学院 医学系研究科 教授
研究協力者 木村朋寛 東北大学大学院 医学系研究科

研究要旨 異常型プリオン蛋白 (プリオン) の産生に影響する宿主因子の同定を目指して、異常型プリオン蛋白産生速度の異なると考えられる細胞間での DNA マイクロアレイ解析により、新規ターゲットとして“Sparcl1 (Hevin)”を見出した。しかし、オフターゲット効果が疑われたため、新たな DNA マイクロアレイ解析を行って“Sctr”を見出した。Sctr やその関連する因子の遺伝子ノックダウンやサイレンス変異を導入した発現ベクターによるレスキュー実験などによってその特異性を確認した。

A. 研究目的

プリオン病の病原因子とされる異常型プリオン蛋白(プリオン)の複製・増殖機構は未だ解明されておらず、治療法の開発が遅れている。異常型プリオン蛋白産生速度の異なると考えられる細胞間での DNA マイクロアレイ解析により、プリオン蛋白の異常化に関与する新規ターゲットを見出したので、この因子について RNA 干渉による遺伝子発現抑制法を用いてプリオン蛋白の異常化への影響やその特異性を調査した。その結果、オフターゲット効果が疑われたので、更なる DNA マイクロアレイ解析によって真のターゲットを探索し、その候補を見出した。この因子について RNA 干渉による遺伝子発現抑制法を用いてプリオン蛋白の異常化への影響やその特異性を調査した。

B. 研究方法

1) siRNA

siRNA は Invitrogen 社の Stealth Select を用いた。

2) 培養細胞への遺伝子導入

マウス神経芽腫細胞 N2a 細胞を宿主とし、22L プリオン株、RML プリオン株、および Fukuoka-1 プリオン株に持続感染した培養細胞 (N167、ScN2a、F3)、さらに非感染の N2a 細胞を使用した。6 穴プレートに細胞を継代した翌日に siRNA を細胞に導入し、3 日間培養した。

3) 異常型プリオン蛋白の検出

遺伝子を導入した感染細胞の溶解液をプロテアーゼ K 処理後に精製し、ウエスタンブロット法により異常型プリオン蛋白産生量を検定した。シグナルは解析ソフトを用いて概ね数値化し、導入

試薬のみを添加した細胞をコントロールとした。

4) 標的遺伝子およびプリオン蛋白遺伝子の発現解析

siRNA を導入した細胞の全 RNA を抽出し、ランダムヘキサマーにより cDNA を合成してリアルタイム PCR を用いた mRNA の発現解析を行った。内部標準に β -actin もしくは GAPDH を用いて相対的な定量を行った。

5) マイクロアレイ解析

N167 細胞にプリオン蛋白遺伝子に対する siRNA もしくは導入試薬のみ (コントロール) を導入した。導入処理後 15 日目におけるコントロール群と siRNA 処理群との遺伝子発現量を DNA マイクロアレイ (アジレント社製) で解析した。

N167 細胞に Sparcl1 に対する siRNA、5 塩基の置換を行った siRNA、および導入試薬のみ (コントロール) を導入した。これらの遺伝子発現量を DNA マイクロアレイ (アジレント社製) で解析し、コントロールに対する変動が置換前の siRNA で大きくなる因子で、かつ置換後の siRNA で小さく収まる因子を洗い出した。

6) レスキュー実験

候補因子の遺伝子を発現ベクターに組み込み、siRNA の標的となる配列にアミノ酸置換の起こらない変異を導入した。その発現ベクターと siRNA を同時に細胞に導入し、空ベクターと siRNA を同時に導入した細胞と異常型プリオン蛋白量を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究では倫理面に配慮する実験を含んでいない。

C. 研究結果

プリオン蛋白遺伝子に対する siRNA を導入すると、3日目から6日後においては検出限界程度まで異常型プリオン蛋白が減少するが、その後再び検出されるようになり、更にそれは徐々に増加してくる。18日後までは鋭い増加傾向を示し、その後は増加速度が鈍くなりほぼ横ばいとなった。導入15日後におけるDNAマイクロアレイ解析により、siRNA導入群において Sparc11 (Hevin) の発現亢進が認められた。このことはリアルタイムPCRでの解析によっても確かめられた。Hevinに対して標的配列が異なる9種類のsiRNAを試したところ、3種類のsiRNAにおいて異常型プリオン蛋白産生抑制が認められた。また、そのうちの2種類のsiRNAでは細胞傷害性がほとんど無いことが確かめられた。

最も高い効果を示す siRNA を N167、ScN2a、F3 のプリオン持続感染細胞に導入したところ全ての細胞で異常型プリオン蛋白産生抑制が認められた。しかし、この結果が、特異的なものであるかどうかを判定するレスキュー実験においてレスキューベクターの導入によって異常型プリオン蛋白産生抑制効果の低減は見られなかった。

この最も高い効果を示す Hevin に対する siRNA は5カ所の塩基の置換により Sparc を標的とする配列となり、この置換 siRNA の導入では異常型プリオン蛋白産生抑制効果は消失した。

置換前と置換後の siRNA 導入細胞で DNA マイクロアレイ解析をして置換前で大きく発現変動する遺伝子で、かつ置換後では変動が小さい遺伝子を洗い出した。それらについて siRNA 導入実験を行い、Sctr を見出した。この結果が、特異的なものであるかどうかを判定するレスキュー実験によってレスキューベクターの導入によって異常型プリオン蛋白産生抑制効果の低減が確認された。さらに、Sctr のリガンドである Sct を添加すると異常型プリオン蛋白の産生量が増加した。

Sctr と Hevin に対する siRNA を同時に導入すると異常型プリオン蛋白産生効果がそれぞれを単独に導入した時よりも増大した。

D. 考察

プリオン病の病原因子プリオンが感染するには、異常型と正常型のプリオン蛋白の接触が必要だと考えられている。本研究の標的であるプリオン増殖に関与する宿主因子としては、ラフトを含む細胞膜上に存在する細胞接着や受容体に関連

する分子、脂質代謝に関連する分子、糖鎖関連因子などが候補となる。さらに異常型への高次構造変換により、細胞内へ何らかのシグナルが伝達される可能性も予想される。

異常型プリオン蛋白産生速度の異なると考えられる細胞間での DNA マイクロアレイ解析から見つけ出された Hevin においては、2種類の siRNA で目立った細胞傷害を起こすことなく異常型プリオン蛋白産生が抑制された。薬剤試験等で ScN2a 細胞に比べて効果が出にくい N167 細胞でも異常型プリオン蛋白産生抑制効果が顕著に観察されたことから、これまでに発見した GABAA 受容体 β サブユニット1や LRP1 よりもプリオン蛋白構造変換において中心的な役割を担っている可能性が考えられ、創薬標的因子としても期待されたが、この結果が、特異的なものであるかどうかを判定するレスキュー実験において望ましい結果が得られていないことから、異常型プリオン蛋白産生抑制効果が別の遺伝子を標的としたオフターゲット効果によるものであることが疑われた。

Hevin に対する siRNA のうちの1つが5カ所の塩基の置換により Sparc を標的とする配列となり異常型プリオン蛋白産生抑制効果も消失することから、置換前と置換後の siRNA 導入細胞で DNA マイクロアレイ解析をして候補遺伝子を洗い出した。それらについて siRNA 導入実験を行い、Sctr を見出した。ノックダウンにより異常型プリオン蛋白産生抑制効果が見られ、レスキュー実験によりその効果が低減された。また、Sctr のリガンドである Sct のノックダウンによって異常型プリオン蛋白産生抑制効果が見られ、Sct の添加により異常型プリオン蛋白産生促進が見られた。これらのことから、Sctr とその周辺の因子(シグナル伝達経路因子)も含めて異常型プリオン蛋白産生に関与していることが示唆されたので、今後の研究でこれらの点について更なる知見を積み重ねて行きたい。

Sctr と Hevin に対する siRNA を同時に導入すると異常型プリオン蛋白産生効果がそれぞれを単独に導入した時よりも増大する。このことより、Sctr とは別の因子も異常型プリオン蛋白産生に関与していることが示唆され、その同定は今後の課題である。

E. 結論

プリオン産生に影響する宿主因子の一つとし

て“Sctr”を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamanaka T, Sakasegawa Y, Omoto A, Kimura T, Ando T, Doh-ura K.: Anti-prion activity of protein-bound polysaccharide K in prion-infected cells and animals. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 in press
- 2) Teruya K, Nishizawa K, Doh-ura K.: Semisynthesis of a protein with cholesterol at the C-terminal, targeted to the cell membrane of live cells. *Protein J.* 2010 Oct;29(7):493-500.
- 3) Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-ura K.: In vivo detection of prion amyloid plaques using [(11)C]BF-227 PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2010 May;37(5):934-941.
- 4) Kimura T, Ishikawa K, Sakasegawa Y, Teruya K, Sata T, Schätzl H, Doh-ura K.: GABAA receptor subunit beta1 is involved in the formation of protease-resistant prion protein in prion-infected neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* 2010 Mar 19;584(6):1193-1198.

2. 学会発表

- 1) Sakasegawa Y, Nakabayashi S, Nishizawa K, Oguma A, Doh-ura K. CC chemokines are upregulated in prion-infected neuroblastoma cells. *Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, July 24-25, 2010*
- 2) Kimura T, Nishizawa K, Doh-ura K. Search for endogenous factors involved in the abnormal PrP formation in prion-infected cells. *Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, July 24-25, 2010*
- 3) Teruya K, Doh-ura K. A thioflavin derivative facilitates cross-linking of abnormal PrP but not normal PrP. *Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, July 24-25, 2010*
- 4) Hamanaka T, Sakasegawa Y, Oguma A,

Nishizawa K, Doh-ura K. Anti-prion activities of PSK in vitro and in vivo -further evaluation of its function-. *Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, July 24-25, 2010*

- 5) 堂浦克美 : ヤコブ病の克服研究 第4回プリオン病の市民講座 食と医療の安全、東京、2010年11月23日
- 6) 逆瀬川裕二、堂浦克美 : 熱ショック蛋白質 Hsp90 のリコンビナントプリオン蛋白質に対する部分変性活性は低濃度 Cu (II) イオンによって可逆的に制御される. 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会、神戸、2010年12月7日-10日

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

III. 研究成果に関する刊行一覧表

平成 22 年度 研究成果に関する刊行一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Murayama Y, Yoshioka M, Masujin K, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Fukuda S, Onoe S, Yokoyama T, Mohri S.	Sulfated dextrans enhance in vitro amplification of bovine spongiform encephalopathy PrP(Sc) and enable ultrasensitive detection of bovine PrP(Sc).	PLoS One	5(10)	E13152	2010
Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Masujin K, Shimizu Y, Shu Y, Kurachi M, Kasai K, Murayama Y, Fukuda S, Onoe S, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T, Mohri S, Okada H, Yokoyama T.	Accumulation of L-type bovine prions in peripheral nerve tissues.	Emerg Infect Dis	16(7)	1151-4.	2010
Fukuda S, Okada H, Arai S, Yokoyama T, Mohri S.	Neuropathological changes in auditory brainstem nuclei in cattle with experimentally-induced bovine spongiform encephalopathy.	JComp Pathol.		doi:10.1016/j.jcpa.2010.12.013	2011
Furuoka H, Horiuchi M, Yamakawa Y, Sata T	Predominant involvement of the cerebellum in guinea pigs infected with bovine spongiform encephalopathy (BSE).	J Comp Pathol			in press
Ono F, Tase N, Kurosawa A, Hiyaoka A, Ohyama A, Tezuka Y, Wada N, Sato Y, Tobiume M, Hagiwara K, Yamakawa Y, Terao K, Sata T	Atypical L-type bovine spongiform encephalopathy (L-BSE) transmission to Cynomolgus macaques, a non-human primate.	Jpn J Infect Dis	64	81-4	2011
Ono F, Terao K, Tase N, Hiyaoka A, Ohyama A, Tezuka Y, Wada N, Kurosawa A, Sato Y, Tobiume M, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T	Experimental transmission of bovine spongiform encephalopathy (BSE) to Cynomolgus macaques, a non-human primate.	Jpn J Infect Dis	64	50-4	2011
Tanaka M, Hara H, Nishina H, Hanada K, Hagiwara K, Maehama T	An improved method for cell-to-cell transmission of infectious prion.	Biochem Biophys Res Commun	397	505-8	2010
Shinkai-Ouchi F, Yamakawa Y, Hara H, Tobiume M, Nishijima M, Hanada K, Hagiwara K	Identification and structural analysis of C-terminally truncated collapsin response mediator protein-2 in a murine model of prion diseases.	Proteome Sci	8	53	2010

Yoshioka Y, Ishiguro N, Inoshima Y	Proteasome activity and biological properties of normal prion protein : a comparison between young and aged cattle.	J Vet Med Sci	72	1583-7	2010
Sassa Y, Yamasaki T, Horiuchi M, Inoshima Y, Ishiguro N	The effects of lysosomal and proteasomal inhibitors on abnormal forms of prion protein degradation in murine macrophages.	Microbiol Immunol	54	763-8	2010
Elmonir W, Inoshima Y, Elbassiouny A, Ishiguro N	Intron 1 mediated regulation of bovine prion protein gene expression : Role of donor splicing sites, sequences with potential enhancer and suppressor activities.	Biochem Biophys Res Commun	397	706-10	2010
Sassa Y, Kataoka N, Inoshima Y, Ishiguro N	Anti-PrP antibodies detected at terminal stage of prion-affected mouse.	Cell Immunol	263	212-8	2010
Sassa Y, Inoshima Y, Ishiguro N	Bovine macrophage degradation of scrapie and BSE PrP ^{Sc} .	Vet Immunol Immunopathol	133	33-9	2010
Terada T, Tsuboi Y, Obi T, Doh-Ura K, Murayama S, Kitamoto T, Yamada T, Mizoguchi K	Less protease-resistant PrP in a patient with sporadic CJD treated with intraventricular pentosan polysulphate.	Acta Neurol Scand	121 (2)	127-30	2010
Kobayashi A, Sakuma N, Matsuura Y, Mohri S, Aguzzi A, Kitamoto T	Experimental verification of a traceback phenomenon in prion infection.	J. Virol	84 (7)	3230-3238	2010
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 (4)	1681-1686	2010
Shimizu Y, Kaku-Ushiki Y, Iwamaru Y, Muramoto T, Kitamoto T, Yokoyama T, Mohri S, Tagawa Y	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	54 (2)	112-21	2010
Saito Y, Iwasaki Y, Aiba I, Kitamoto T, Yoshida M, Hashizume Y	An autopsy case of MM2-cortical + thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.	Neuropathology		in press	2010
Okada H, Sato Y, Sata T, Sakurai M, Endo J, Yokoyama T, Mohri S.	Antigen Retrieval Using Sodium Hydroxide for Prion Immunohistochemistry in Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie.	J Comp Pathol.		PMID: 21112058	2010

Ano Y, Sakudo A, Uraki R, Sato Y, Kono J, Sugiura K, Yokoyama T, Itohara S, Nakayama H, Yukawa M, Onodera T.	Enhanced enteric invasion of scrapie agents into the villous columnar epithelium via maternal immunoglobulin.	Int J Mol Med.	26	845-51	2010
Okada H, Masujin K, Imamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Mohri S, Czub S, Yokoyama T.	Experimental Transmission of H-type Bovine Spongiform Encephalopathy to Bovinized Transgenic Mice.	Vet Pathol.		PMID: 20921323	2010
Yokoyama T, Okada H, Murayama Y, Masujin K, Iwamaru Y, Mohri S.	Examination of the Offspring of a Japanese Cow Affected with L-Type Bovine Spongiform Encephalopathy.	J Vet Med Sci.	73	121-3	2011
Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Yokoyama T, Mohri S.	Immunohistochemical detection of disease-associated prion protein in the intestine of cattle naturally affected with bovine spongiform encephalopathy by using an alkaline-based chemical antigen retrieval method.	J Vet Med Sci.	72	1423-9	2010
Nagaoka K, Yoshioka M, Shimozaki N, Yamamura T, Murayama Y, Yokoyama T, Mohri S.	Sensitive detection of scrapie prion protein in soil.	Biochem Biophys Res Commun.	397	626-30	2010
Okada H, Sakurai M, Yokoyama T, Mohri S.	Disease-associated prion protein in the dental tissue of mice infected with scrapie.	J Comp Pathol.	143	218-22	2010
Ushiki-Kaku Y, Endo R, Iwamaru Y, Shimizu Y, Imamura M, Masujin K, Yamamoto T, Hattori S, Itohara S, Irie S, Yokoyama T.	Tracing conformational transition of abnormal prion proteins during interspecies transmission by using novel antibodies.	J Biol Chem.	285	11931-6	2010
Hasegawa K, Mohri S, Yokoyama T.	Fragment molecular orbital calculations reveal that the E200K mutation markedly alters local structural stability in the human prion protein.	Prion	4	38-44	2010
An SS, Lim KT, Oh HJ, Lee BS, Zukic E, Ju YR, Yokoyama T, Kim SY, Welker E.	Differentiating blood samples from scrapie infected and non-infected hamsters by detecting disease-associated prion proteins using Multimer Detection System.	Biochem Biophys Res Commun.	392	505-9	2010

Gomi H, Yokoyama T, Itoharu S.	Role of GFAP in morphological retention and distribution of reactive astrocytes induced by scrapie encephalopathy in mice.	Brain Res.	1312	156-67	2010
Imamura M, Kato N, Yoshioka M, Okada H, Iwamaru Y, Shimizu Y, Mohri S, Yokoyama T, Murayama Y	Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor-dependent stimulation pathway required for generation of baculovirus-derived recombinant scrapie prion protein.	J Virol	85(6)		in press
Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, Klug G, McGlade A, Collins SJ, Nishida N	Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion.	Nature Medicine		[Epub ahead of print]	2011
Wiham JM, Orru CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, Meade-White KD, Taubner LM, Timmes A, Caughey B	Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays.	PLoS Pathogens	2;6 (12)	e1001217	2010
Kim JI, Cali I, Surewicz K, Kong Q, Raymond GJ, Atarashi R, Race B, Qing L, Gambetti P, Caughey B, Surewicz WK	Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors.	J Biol Chem	285 (19)	14083-7	2010
Takahashi RH, Tobiume M, Sato Y, Sata T, Gouras GK, Takahashi H.	Accumulation of cellular prion protein within dystrophic neurites of amyloid plaques in the Alzheimer's disease brain.	Neuropathology.		[Epub ahead of print]	2010
Satoh K, Tobiume M, Matsui Y, Mutsukura K, Nishida N, Shiga Y, Eguchi K, Shirabe S, Sata T	Establishment of a standard 14-3-3 protein assay of cerebrospinal fluid as a diagnostic tool for Creutzfeldt-Jakob disease	Lab Invest	90 (11)	1637-44	2010
Furuoka H, Horiuchi M, Yamakawa Y, Sata T	Predominant Involvement of the Cerebellum in Guinea Pigs Infected with Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE).	J Comp Pathol.		[Epub ahead of print]	2010

Okada H, Sato Y, Sata T, Sakurai M, Endo J, Yokoyama T, Mohri S	Antigen Retrieval Using Sodium Hydroxide for Prion Immunohistochemistry in Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie.	J Comp Pathol.		[Epub ahead of print]	2010
Kimura T, Ishikawa K, Sakasegawa Y, Teruya K, Sata T, Schätzl H, Doh-ura K	GABAA receptor subunit β 1 is involved in the formation of protease-resistant prion protein in prion-infected neuroblastoma cells.	FEBS Lett	584 (6)	1193-1198	2010
Sato Y, Shimonohara N, Hanaki KI, Goto M, Yamakawa Y, Horiuchi M, Takahashi H, Sata T, Nakajima N.	ImmunoAT method: an initial assessment for the detection of abnormal isoforms of prion protein in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues.	J. Virol. Methods.	165	261-267	2010
Sakata H, Horiuchi M, Takahashi I, and Kinjo M.	Conformational Analysis of Soluble Oligomers of GFP Tagged Prion Protein by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy.	Curr. Pharm. Biotechnol	11	87-95	2010
Watanabe Y, Hiraoka W, Igarashi M, Ito K, Shimoyama Y, Horiuchi M, Yamamori T, Yasui H, Kuwabara M, Inagaki F, and Inanami O	A novel copper(II) coordination at His186 in full-length murine prion protein.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	394	522-528	2010
Hamanaka T, Sakasegawa Y, Ohmoto A, Kimura T, Ando T, Doh-ura K	Anti-prion activity of protein-bound polysaccharide K in prion-infected cells and animals.	Biochem Biophys Res Commun		in press	2011
Teruya K, Nishizawa K, Doh-ura K	Semisynthesis of a protein with cholesterol at the C-terminal, targeted to the cell membrane of live cells.	Protein J	29 (7)	493-500	2010
Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-ura K	In vivo detection of prion amyloid plaques using [(11)C]BF-227 PET.	Eur J Nucl Med Mol Imaging	37 (5)	934-941	2010

