



戦略的創造研究推進事業

研究領域「脳を守る」

研究課題

「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法開発への応用」

研究期間：平成11年11月1日～平成17年3月31日

研究代表者

金子 清俊

国立精神・神経センター神経研究所部長

1. 研究実施の概要

プリオン病は、人獣共通感染症であり、プリオンと称される感染性病原体に起因すると考えられている。プリオンの本体は、正常型プリオンタンパク質 (PrP^C)を基に複製される感染型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc})であるとのプリオン説が有力である。両者のアミノ酸配列に違いは見られないが、その立体構造に大きな違いが認められ、PrP^Cに比べると PrP^{Sc}は非常にベータ構造に富んでいる。プリオン病の発症機構として、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されているが、その過程の中で、いったん PrP^Cが解きほぐされる段階を経ると考えられている。我々は、この解きほぐし分子の同定を目指しているが、これはいわゆる X 因子と相同である。X 因子の同定は、正常に folding された PrP^Cを標的とする解きほぐし活性の同定と言い換えることができるが、この活性は従来から知られている misfolding タンパク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。

我々は、このような性質を有する新しいシャペロンを出芽酵母の系から同定し、アンフォルジンと命名した。試験管内においては、アンフォルジンの活性には基質特異性がなく、正常に folding された分子を標的にし得るのみならず、プリオンタンパク質、アミロイド β ペプチド(1-42)、α-シヌクレインなどの異常凝集体の高次構造を解きほぐす活性を有していた。また、その細胞内局在とその活性が、細胞周期によって変化していることを見出し、その活性には ATP の結合が関与していることを明らかにした。これらのアンフォルジン活性調節機構を踏まえることで、プリオン病のみならず、タンパク質凝集病における新しい治療法開発が可能となるかもしれない。

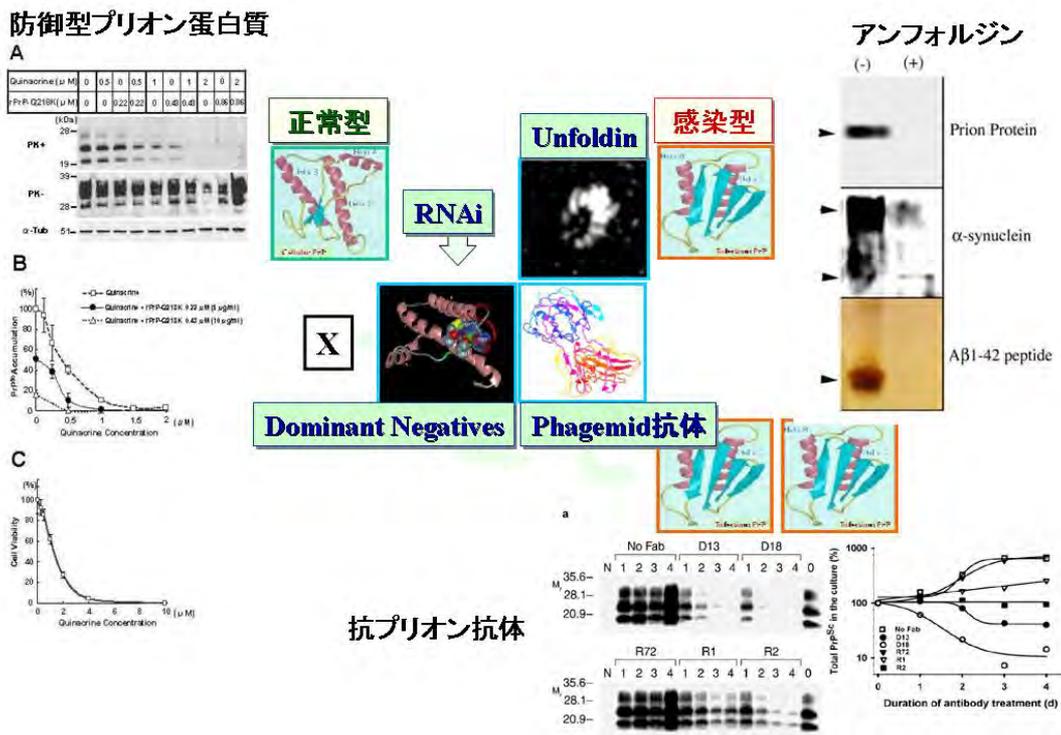
治療法に限らず、アンフォルジンの高度の解きほぐし活性は、様々な分野に応用が可能である。LC-MS/MS 解析を例に取れば、膜タンパク質等の可溶化、断片化の困難なタンパク質群の効率的な解析が可能となることで、タンパク質の網羅的解析(プロテオーム解析)における飛躍的な進展が期待されるであろう。また、種々の疾患における難溶性異常凝集体の構成成分を、アンフォルジンにより解明することができれば、疾患の本体に迫る大きな手がかりとなる。予備実験の結果、実現可能性はかなり高いと考えている。また X 因子の同定に向けて、現在哺乳動物細胞からアンフォルジンアッセイ系を応用し、新規解きほぐし活性の同定を行っている。

プリオンタンパク質の代謝機構の解明に関連して、(1)PrP^Cの細胞内輸送、(2)プリオンタンパク質過剰発現によって生じる細胞死機構について検討した。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として、

プリオンタンパク質の順行性並びに逆行性輸送の詳細を明らかにした。

プリオン感染における神経細胞死には、PrP^{Sc}のみならず、PrP^Cの存在が必須であることが知られている。我々は、プリオンタンパク質過剰発現による細胞死機構として加齢に伴うミトコンドリアアポトーシスの関与を示し、その詳細を明らかにすることができた。また、プリオン病のモデル系としてY145STOP変異を用い、実際にミトコンドリアアポトーシスが、プリオン病の神経細胞死、ひいては海綿状変化に、関連している可能性を示した。今後さらにPrP^Cと神経細胞死との関連に関する理解を深めることができれば、例えPrP^{Sc}の増殖が防ぎきれなくとも、神経細胞死を抑制し生存させるという全く新しい治療戦略を構築することが可能となるであろう。

他のプリオン病治療開発の試みとしては、ドミナントネガティブ効果を持つ防御型プリオンタンパク質、抗プリオン抗体などを検討し、その有用性を確認した。さらに、これらの方法の組み合わせによる併用療法が、プリオン複製阻止効果増強と副作用低減をもたらすことを確認した。

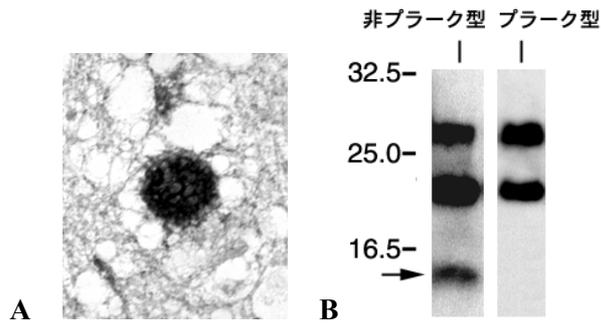


村本グループは以下の研究を行った。

- 1) GPIアンカー欠損プリオン蛋白発現トランスジェニックマウスにおけるプリオン病の解析を行い、プリオン蛋白の異常化、プリオン形成にGPIアンカーは不必要であることを明らかにした。
- 2) 硬膜移植後に発症するクロイツフェルト・ヤコブ病の解析を行い、本病態には、臨床所見、病理所見、異常型プリオン蛋白の分子種サイズ、感染性に違いのある2

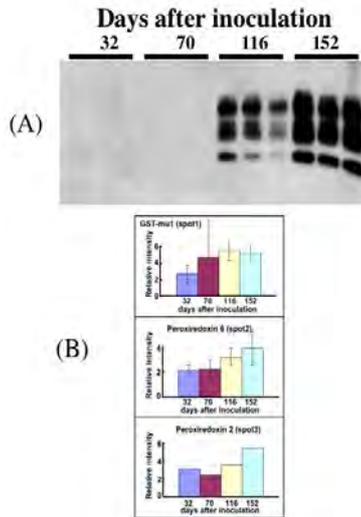
つのサブタイプ（非プラーク型とプラーク型、図1）が存在することを確立した。

図1 A プラーク型症例の脳に存在する斑状異常プリオン蛋白沈着
 図1 B 患者脳組織中の異常型プリオン蛋白：27 kDaと21 kDaの分子種は両サブタイプに共通するが、12 kDa分子種（矢印）は非プラーク型でのみ検出される



西島グループは以下の研究を行った。

研究概要：マウス順化スクレイピー病原体（帯広1株）をマウスに接種し、脳タンパクの変動を経時的、網羅的に解析した。異常型プリオン（PrP^{Sc}）が蓄積し始め、発症が確認され始める接種後約100日以降で、以下の変動を観察した。



PrP^{Sc}の蓄積 (A) と抗酸化ストレスタンパク類の発現量の増加 (B)

1. アストログリアの骨格タンパクである glial fibrillary acidic protein 及び peroxiredoxin 6、peroxiredoxin2、Glutathion S-transferase などの抗酸化ストレスタンパク質群の増加が認められた。前者は神経細胞の変性死に伴うアストログリアの増殖、後者は蓄積した PrP^{Sc}が酸化ストレスを細胞に与える事がそれぞれ原因と推定される。

2. Rho-kinase の基質タンパク質で、神経軸索の伸展に関わると考えられている Collapsin response mediator protein-2 リン酸化型分子が PrP^{Sc} の増加に比例して増加するが、これに伴い活性型の非リン酸化型分子の減少が顕著に認められた。

3. ラフト画分の分析では、細胞の酸性顆粒の pH を調節するプロトンポンプである vacuolar ATPase の A subunit の減少が PrP^{Sc} の増加に伴って認められた。培養神経芽細胞で PrP^{Sc}が酸性顆粒であるリソソームやエンドソームに蓄積することが知られているが、その理由の一つとして、A subunit の脱離に伴うプロトンポンプの活性低下により、リソソーム内のタンパク分解酵素が充分活性化されないことが原因の一つであることが示唆された。

2. 研究構想

プリオン病は、人獣共通感染症であり、プリオンと称される感染性病原体に起因すると考えられている。人のプリオン病は、(1) 原因不明の孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)、(2) ゲルストマン症候群 (GSS)、家族性致死性不眠症 (FFI) といった遺歴を有する家族性、あるいは(3) 感染性に分類される。(3)の感染性のタイプには、BSE由来とされる変異型 CJD をはじめ、食人習慣に伴うクールーや医療行為による医原性プリオン病 (乾燥硬膜移植後 CJD) が含まれる。また、動物のプリオン病としては、BSE 以外にも、200 年以上以前からその存在が知られていたヒツジのスクレイピー、北米大陸で問題となっている野生鹿のプリオン病 (CWD)などが挙げられる。

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きた。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、変異型 CJD を含めたプリオン病に対する社会的関心は非常に高く、北米大陸での BSE の発見に伴う昨今の米国産牛肉の輸入問題とも相まって、社会的な注目を集め続けている。こういった背景の中で、我々はプリオン病に関与する新しい因子の同定、並びに進行阻止・治療法の開発を目指してきた。

プリオンの本体は、正常型プリオンタンパク質 (PrP^{C})を基に複製される感染型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc})であるとのプリオン説が有力である。両者のアミノ酸配列に違いは見られないが、その立体構造に大きな違いが認められ、 PrP^{C} に比べると PrP^{Sc} は非常にベータ構造に富んでいる。CJD の発症機構として、 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されているが、その過程の中で、いったん PrP^{C} が解きほぐされる段階を経ると考えられているが、これが 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 因子である。これは PrP^{C} 及び PrP^{Sc} と並ぶ、プリオン複製に関与する新たな第 3 の分子であり、学問的に極めて重要な研究対象である。のみならず、治療法開発の視点からも最重要の研究対象であるが、現在まで有力な候補は同定されていない。

我々の最も大きな研究テーマとして、この X 因子を代表とするプリオン複製に関与する補助因子の同定が挙げられる。このことは、正常に folding された PrP^{C} を標的とする解きほぐし活性の同定と言い換えることができるが、この活性は従来から知られている misfolding タンパク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。我々は、このような性質を有する新しい概念に属するシャペロン、つまり正常分子に対

し解きほぐし活性を發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、出芽酵母の系において検討してきた。

我々は、出芽酵母細胞からこのような解きほぐし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。その結果、新しいシャペロン様分子を同定した。精製標品の分子量は 58kDa で、試験管内でタンパク質の高次構造をほぐす活性からアンフォルジンと命名した。さらにアンフォルジンは、正常に folding された分子を標的にし得るのみならず、プリオンタンパク質、アミロイドβペプチド(1-42)、α-シヌクレインなどの異常凝集体の高次構造を解きほぐす活性を有していた。

さらに、X 因子の同定に向けて、我々は哺乳動物細胞にアンフォルジンのアッセイ系を応用し、新規解きほぐし活性の同定を行っている。今後 X 因子の同定が可能となれば、プリオン複製の機構解明に向けて、PrP^{Sc} 及び PrP^C の発見に匹敵するプリオン研究における 20 年ぶりの大きなブレークスルーとなるであろう。

西島チームは、プリオンタンパクの異常化に關与するタンパク質の検索とその結合特性の検討として、培養神経芽細胞及びマウス脳組織からプリオンタンパクに結合する物質を検索・同定した。これらの成果を通じ、最終的には生体内でのプリオンタンパク質の異常化のメカニズムを明らかにすることを目指している。

PrP^{Sc} 増殖抑制分子として、(1) 抗プリオン抗体、(2) ヒトプリオンタンパク 219 番のリジンのドミナントネガティブ効果を有する防御型プリオンタンパク質、(3) 前述の異常凝集体を解きほぐす新規分子であるアンフォルジンを用い、プリオン複製阻止効果について検討を行い、その有用性を明らかにした。これに関連して村本チームは、ヒトプリオン病患者がリジン型 219 番プリオンタンパクをコードする遺伝子を持つ頻度、および同遺伝子を持つ患者におけるプリオン病表現型の特異性を評価し、リジン型 219 番プリオンタンパクの発病抑制効果を評価した。また、前述のアンフォルジンが、プリオンタンパク質を含む様々な異常凝集体を解きほぐすことを明らかにした。これらを単独、あるいは組み合わせた治療・予防法の開発へ向け、今後更に研究を進める必要がある。

現在までの研究にも関わらず、PrP^C の生理機能は解明されていない。PrP^C から PrP^{Sc} への変換に關与する分子シャペロン様分子は、PrP^C の生理的機能及び代謝にも密接に關係していることが想定されることから、PrP^C の生理機能、並びに海綿状変性の生じるメカニズム解明に通じる成果も期待される。同時に、PrP^C そのものを蛍光標識し、その代謝過程をリアルタイムで解析する実験系を確立し、その生理的な役割を検討すると共に、過剰な PrP^C 発現により生じる、加齢に伴う神経細胞死の機構についてもその詳細を解

明した。

近年、PrP^{Sc}の存在のみではプリオンによる神経細胞死が生じず、むしろ PrP^Cの存在が必須であると考えられている。すなわち、プリオン病における神経細胞死の主役は PrP^{Sc}というよりもむしろ PrP^Cである可能性が推測されている。このことは、プリオン複製の防止とは異なる、神経細胞死の阻止を目的とする新しい治療戦略の開発に結びつく可能性を有している。この方面に関する更なる検討も大変重要である。

3. 研究成果

3. 1 “プロテイン X 候補タンパク質を含む正常に folding を受けた分子を unfold する因子の同定とプリオン病治療法開発への応用並びに正常型プリオンタンパク質の細胞内代謝と生理機能並びに神経細胞死機構の解明（国立精神・神経センター 金子清俊グループ）”

(1) 研究内容及び成果

プリオンの本体は、正常型プリオンタンパク質 (PrP^{C}) を基に複製される感染型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) であるとのプリオン説が有力である。両者のアミノ酸配列に違いは見られないが、その立体構造に大きな違いが認められ、 PrP^{C} に比べると PrP^{Sc} は非常にベータ構造に富んでいる。CJD の発症機構として、 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されているが、その過程の中で、いったん PrP^{C} が解きほぐされる段階を経ると考えられている。我々は、この解きほぐし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 因子と相同である（図1）。

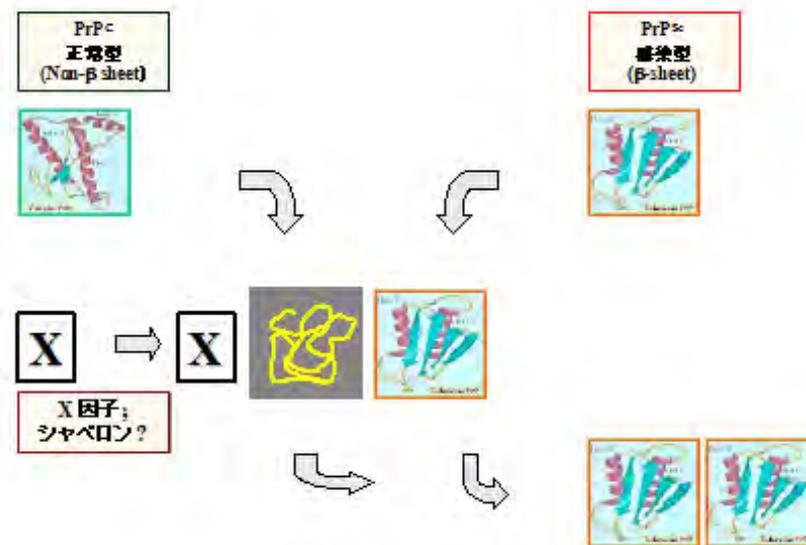


図1：プリオン複製の模式図

我々の最も大きな研究テーマは、この X 因子を代表とするプリオン複製に関与する補助因子の同定が挙げられる。すなわち、正常に folding された PrP^{C} を標的とする解きほぐし活性の同定と言い換えることができるが、この活性は従来から知られている misfolding タンパク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。我々は、このような性質を有する新しい概念に属するシャペロン、つまり正常分子に対

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、まず出芽酵母の系において検討した。我々は、出芽酵母細胞からこのような解きほぐし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、新しいシャペロン様分子を同定した。精製標品の分子量は 58kDa で、試験管内でタンパク質の高次構造をほぐす活性からアンフォルジンと命名した。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 2nm のホールを持つリング状構造が観察された (図 2)。

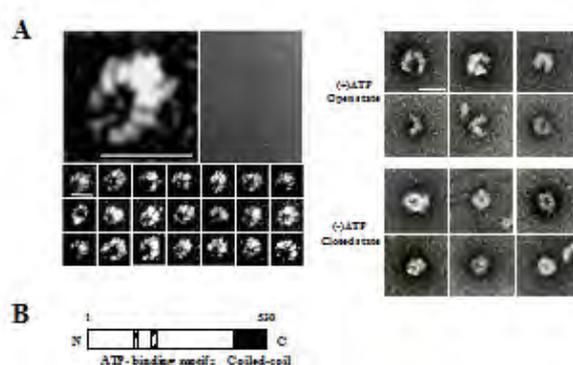


図 2 : アンフォルジンの構造と ATP 依存性の開閉口

試験管内においては、アンフォルジンの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解きほぐすことができた。その一例として、図 3 に heavy meromyosin を基質とした unfoldin の作用を示すが、2つの球状に巻かれた頭部と、一本の尾部が、アンフォルジンによりほぐされている様子が観察できる。

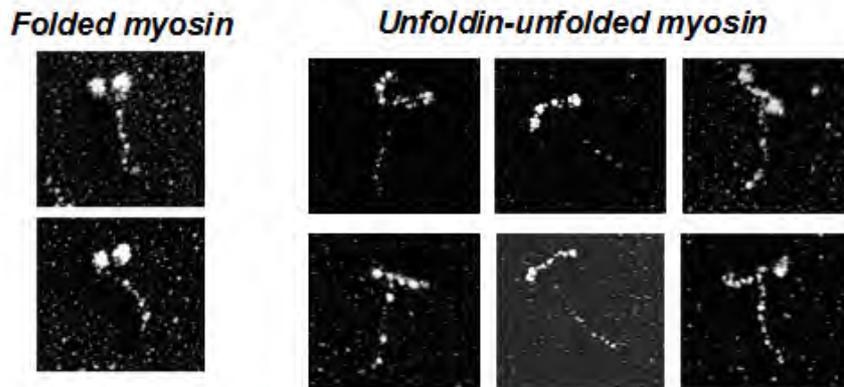


図3：アンフォルジンによる正常立体構造の解きほぐし

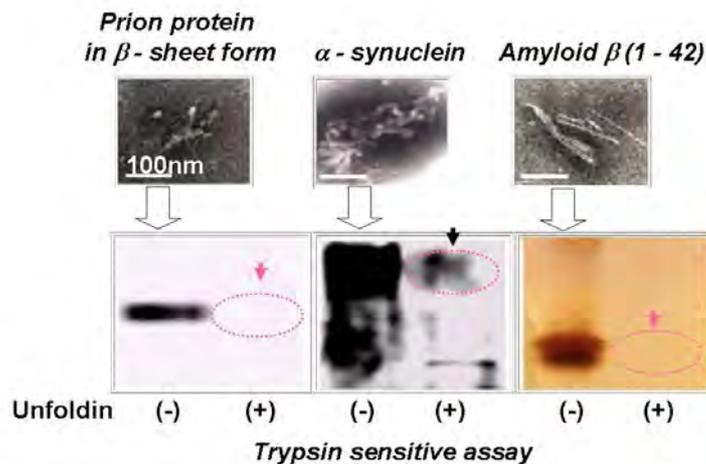


図4：アンフォルジンによる異常立体構造の解きほぐし

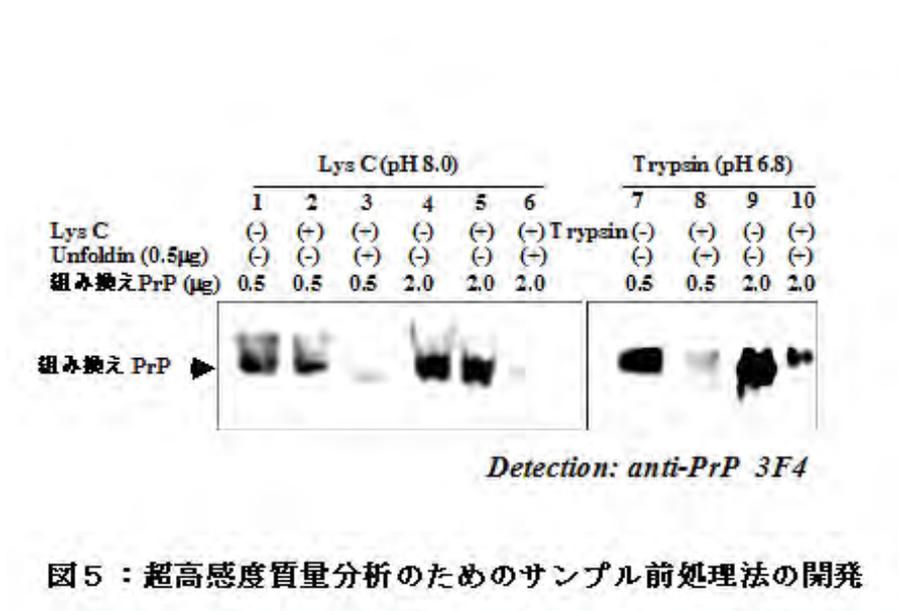
さらにアンフォルジンは、正常に folding された分子を標的にし得るのみならず、プリオンタンパク質、アミロイドβペプチド(1-42)、α-シヌクレインなどの異常凝集体の高次構造を解きほぐす活性を有していた (図4)。

この極めてユニークな解きほぐし活性をプリオン病の治療法開発に応用するため、次にその活性調節機構についての検討を行った結果、アンフォルジンの細胞内局在とその活性が、細胞周期によって変化していることを見出した。すなわち、(1) 出芽酵母分裂期において、アンフォルジンが分裂溝に集積すること、(2) 分裂溝に集積したアンフォルジンが極めて高い活性を示すことが確認された。さらに、その活性には ATP の結合が関与していることを明らかにした。

タンパク質全体 (プロテオーム) を網羅的に解析するプロテオミクスには、遺伝子の

翻訳産物としてのタンパク質レベルでの発現解析を意味する“発現プロテオミクス”と、タンパク質の機能の網羅的解析を目指す“機能プロテオミクス”が含まれる。従来のプロテオーム研究は、主に二次元電気泳動 (2D-PAGE)によるタンパク質の分離と質量分析計 (MS)の組み合わせにより行われてきたが、現在その主流は液体クロマトグラフィー (LC)との組み合わせ (LC-MS/MS) に移っている。しかしながら、試料調整の段階において、対象となる生体細胞・組織の構成タンパク質群の難溶性、高凝集性が大きな課題となっていた。中でも特に、細胞表面の脂質マイクロドメインである“ラフト”に存在するタンパク質群の解析に関しては、我々自身の報告を含め、その網羅的解析が極めて困難であるという結果が示されてきた。

しかしながら我々は、解析試料をアンフォルジンにより事前処理することで、この問題を大幅に改善できる可能性を示した。一例として、β型組み換えPrPを用い、ペプチド断片化に常用されるタンパク質分解酵素 (LysC) に対する感受性を検討した結果、効率よく断片化を生じていた (図5)。また、同様にピック病脳に沈着するピック小体に対する解きほぐし能を、ウエスタンブロット法における抗体との反応性を指標として検討したが、アンフォルジンはサンプルバッファー処理にすら極めて抵抗性の高いピック小体を容易に解きほぐし、抗体による検出能を100倍程度改善した (図6)。



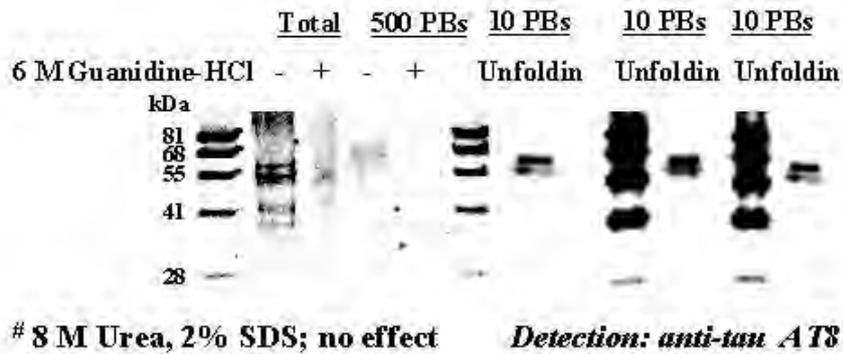
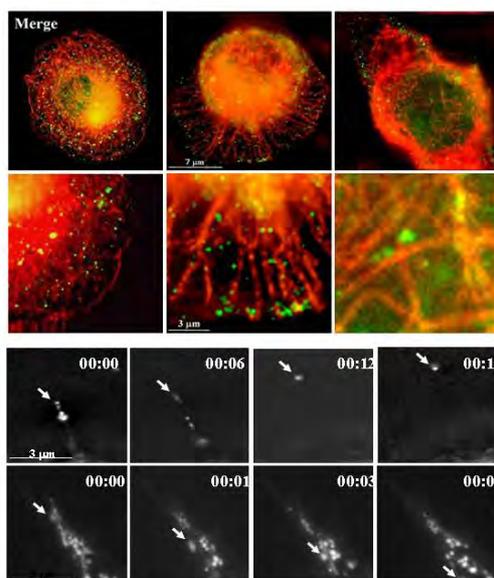


図6：アンフォルジンによるPick小体の解きほぐし

次に、プリオンタンパク質の代謝機構の解明に関連して、(1)PrP^Cの細胞内輸送、(2)プリオンタンパク質過剰発現によって惹起される細胞死機構についても検討した。

PrP^Cの細胞内輸送：PrP^CのN末端側断片は細胞内に取り込まれた後に、種々の細胞骨格タンパク質との相互作用の検討の結果、microtubules上を順行性及び逆行性に移動していることが確認された（図7）。さらに、移動速度の測定、並びに種々の阻害剤や抗体を用いて検討を行ったところ、順行性、逆行性の輸送が、それぞれKIF4、Dyneinの関与が明らかとなった。



Tubulin (赤) 依存性の
PrPC (緑) 細胞内輸送

順行性輸送：140-160 nm/sec

逆行性輸送：1.0-1.2 μm/sec

図7：正常型プリオン蛋白質 (PrP^C) の細胞内輸送

プリオン感染に際しての神経細胞死には、PrP^{Sc}のみならず、PrP^Cの存在が必須であることが知られている。そこで、我々は、プリオンタンパク質過剰発現による細胞死機構：過剰発現トランスジェニックマウス脳を用いた検討を行った。その結果、加齢に伴いPrP^Cは最終的にミトコンドリアへ標的化されアポトーシスを起こすことを見出した。さらに、マウス神経芽細胞腫由来N2a細胞を用いた検討の結果、PrP^Cがミトコンドリアへ標的化するときのタンパク質を同定し、その標的化機構におけるミトコンドリア外膜上のレセプターを同定した（図8）。

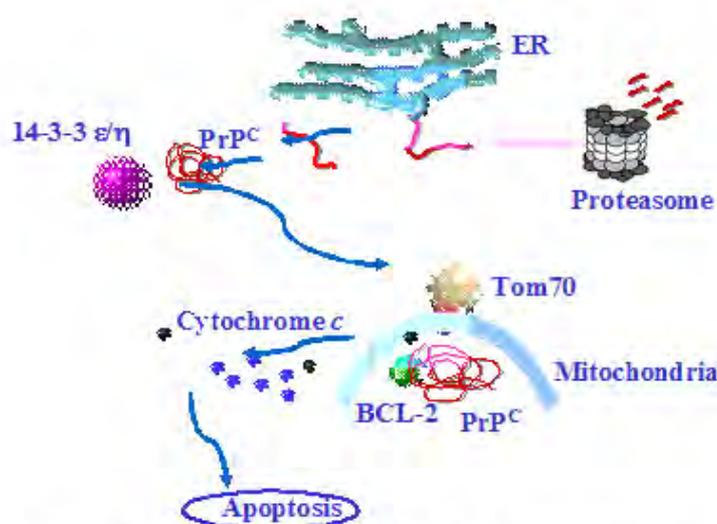


図8：正常型プリオン蛋白質（PrP^C）過剰による神経細胞死

実際に、遺伝性プリオン病の一型であるGSS with Y145STOP、すなわちプリオンタンパク質のコドン145にアンバー変異が入ったtruncated PrP^C発現型のプリオン病の細胞培養モデルを作成し検討したところ、Y145STOPを発現した細胞は、ミトコンドリアアポトーシスによる細胞死を来していることが確認された。このことは、ミトコンドリアアポトーシスが、プリオン病の神経細胞死、ひいては海綿状変化に、幅広く関連している可能性を示している。今後さらに、こういった他のプリオン病との関連について注目していく必要がある。

現在のプリオン病治療・予防法開発の試みは、大きく2つのアプローチに分けられる。一つは、基礎実験の積み重ねから導かれてきたアプローチ、もう一つは、理論はともかく現在医薬品として承認されている薬を幅広く調べることで、プリオン病に効果のある薬を見つけ出そうというアプローチである。我々は、前者のアプローチとして、（1）ドミナントネガティブ効果を持つ防御型プリオンタンパク質を利用する方法、（2）抗プリオン抗体を用いる方法、（3）感染型プリオンタンパク質を直接不活化する方法な

どを検討した (図9)。

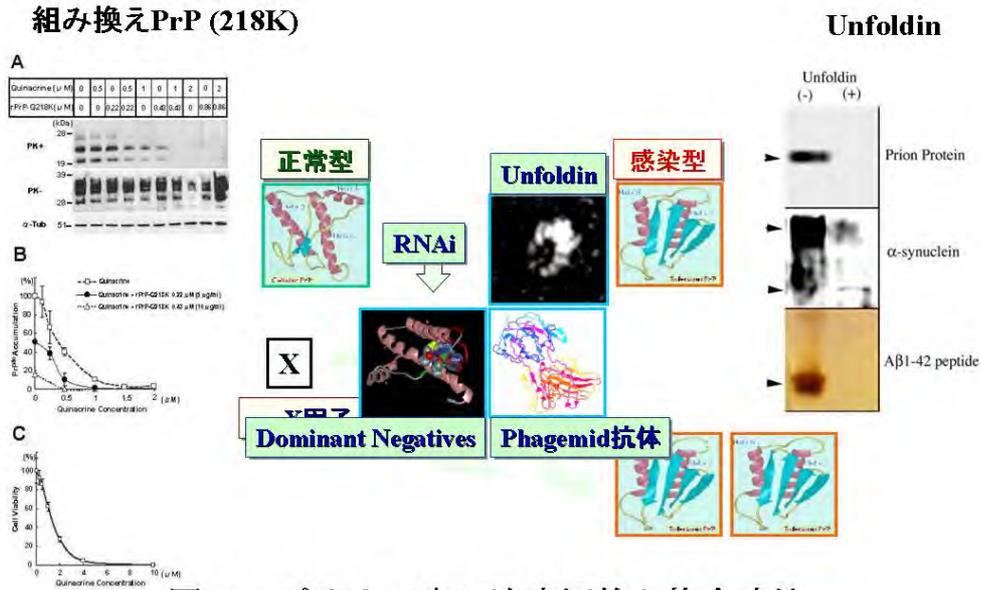


図9：プリオン病の治療標的と複合療法

防御型プリオンタンパク質を発現させた transgenic mice による実験では、プリオン病の発症予防が可能であることを確認したのみならず、大腸菌で大量発現させた組み換え防御型 PrP^C でも、こうしたプリオン複製抑制効果を確認した。PrP^C を認識する抗プリオン抗体を先に PrP^C と反応させることで、PrP^{Sc} と PrP^C との反応を阻害し、結果的に PrP^{Sc} の増殖を抑制しようとするアプローチに関しては、実際に培養細胞を用いた実験では、抗プリオン抗体によって PrP^{Sc} の増殖が押さえられ、最終的には PrP^{Sc} が消滅してしまうことが確認された (図10)。感染型プリオンタンパク質を直接不活化する方法に関しては、既述のためここでは割愛する。

さらに、ここに述べたような様々な治療戦略を組み合わせた治療効果についても検討した。抗マラリア薬の一種であるキナクリンが、プリオン病の経過を遷延させる可能性が指摘されているが、現在のところ、その肝臓障害等の副作用が問題視されている。そこで我々は、先の防御型プリオンタンパク質とキナクリンの複合投与によるプリオン複製阻害効果の増強並びに副作用低減効果について、プリオン感染培養細胞系で検討したところ、併用療法が効果増強と副作用低減をもたらすことを確認した。

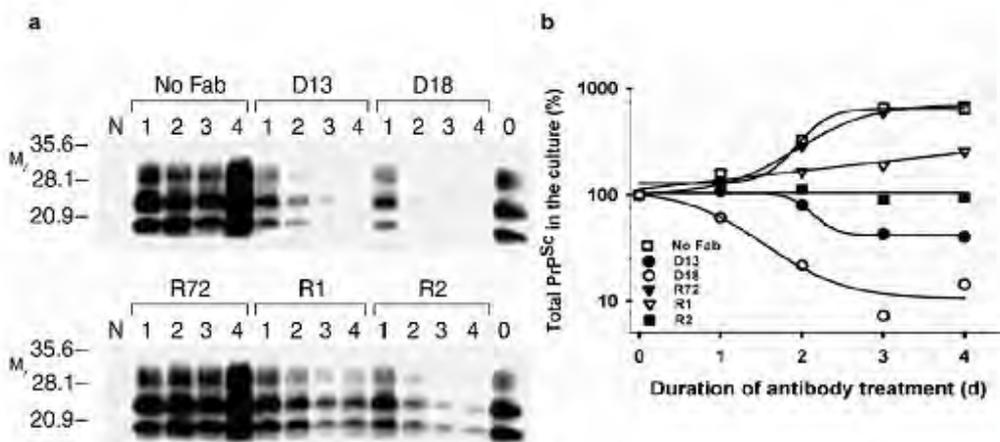


図10: 抗プリオン抗体(D13, D18, R72, R1, R2)によるPrP^{Sc}産生抑制効果
PrP^{Sc}産生マウス神経芽細胞腫由来細胞に各Fab抗体を投与

(2) 研究成果の今後期待される効果

アンフォルジンがプリオンタンパク質、アミロイドβペプチド(1-42)、α-シヌクレインの高次構造を試験管内で解きほぐし、トリプシン感受性をあげる事ができた。アンフォルジンには試験管内での基質特異性が認められないにもかかわらず、細胞内においては、細胞周期依存性に活性調節機構が存在しており、それにはATPの結合が関与していると示唆された。このATP結合調節には、おそらく未知の因子が関与していることが推測される。これらのアンフォルジン活性調節機構を踏まえることで、プリオン病のみならず、いわゆるタンパク質凝集病における新しい治療法開発の可能性が示唆される。

アンフォルジンの高度の解きほぐし活性は、様々な分野に応用が可能である。LC-MS/MS解析を例に取れば、膜タンパク質等の可溶化、断片化の困難なタンパク質群の効率的な解析が可能となれば、タンパク質の網羅的解析(プロテオーム解析)における飛躍的な進展が期待されるであろう。さらに、アンフォルジンを用いた種々の疾患における異常凝集体の構成成分を一括して解明することができれば、疾患の本体に迫る大きな手がかりとなる。

またX因子の同定に向けて、現在我々は哺乳動物細胞からアンフォルジンアッセイ系を応用し、新規解きほぐし活性の同定を行っている。今後X因子の同定が可能となれば、プリオン複製の機構解明に向けて、PrP^{Sc}ないしPrP^Cの発見に匹敵するプリオン研究における20年ぶりの大きなブレークスルーとなるであろう。

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として、プリオンタンパク質の順行性並びに逆行性輸送の詳細を明らかにすることが出来た。今後さらに PrP^C と神経細胞死との関連に関する理解を深めることができれば、例え PrP^{Sc} の増殖が防ぎきれなくとも、神経細胞死を抑制し、生存させることが可能となるかもしれない。すなわち、プリオン病の発症予防という観点からも、全く新しい治療戦略を構築することが可能となる。

20 世紀において、医学の前に大きく立ちはだかった疾患、例えば癌や AIDS に関わる HIV 感染における治療法開発の歴史を振り返ってみると、長年にわたる膨大な努力の結果、複数の治療法の組み合わせによる相乗効果に加え、副作用の少ない治療法が開発されてきた経緯がある。癌における手術療法、抗がん剤による化学療法、放射線療法、免疫療法の組み合わせ、HIV 感染におけるカクテル療法などである。プリオン病のみならず、21 世紀における医学研究の最も重要な標的としての神経疾患の治療法開発を考えた場合には、癌や HIV 感染症と同じ取り組みが有効ではないかと推測する。

これまで述べてきたような研究結果は、培養細胞系ないしはマウスモデル系での検討であるため、実際のヒトへの応用までには、ヒトプリオン感受性マウスを用いた検討が必要である。しかしながら、たとえ動物モデル系であっても、治療ないし進行阻止の可能性が出てきたという事実そのものが、既に発症された方々のみならず、プリオン病発症の危険を有する方々やその後家族にとっての福音となり得るであろう。イギリスのみならず、欧州本土（フランス、ドイツ、スペイン、等々）やブラジル、北米大陸や、日本においても、プリオン病は重大な社会問題となっており、そういった意味からも我々の研究成果は、プリオン病に対抗するための強力な手段として、世界的にも大きな波及効果が期待される。

3. 2 “リジン型 219 番プリオンタンパクを用いたプリオン病発症予防法の検討（東北大学 村本 環グループ）”

(1)研究内容及び成果

(A) GPIアンカー欠損プリオンタンパク発現トランスジェニックマウスにおけるプリオン病の解析（東北大学 北本哲之博士、三好一郎博士、九州大学 毛利資郎博士との共同研究）

はじめに

プリオンタンパクはglycosyl-phosphatidylinositolアンカー（GPIアンカー）を介して脂質二重膜に繫留されている膜タンパク（GPIアンカー型膜タンパク）であり、生体の正常構成成分（正常型プリオンタンパク）である。感染因子プリオンの主要構成成分である異常型プリオンタンパクは、正常型プリオンタンパクの構造が変化し、それと共にタンパク分解酵素耐性、不溶性等の異常な性状と病原性を獲得したものである。正常型プリオンタンパクの大部分と異常型プリオンタンパクの少なくとも一部は、多くの他のGPIアンカー型膜タンパクと同様に、ラフトと呼ばれる細胞膜上の特異な小ドメインに集積して存在している（Vey et al, Proc Natl Acad Sci USA 1996）。それゆえ、正常型プリオンタンパクと異常化プリオンタンパクの相互作用、およびその結果としての正常型プリオンタンパクの異常化も主にラフトで起こっていると想定されている。プリオンタンパクの異常化に関してのラフトの重要性は以下のような実験データによっても支持されている（Taraboulos et al, J Cell Biol 1995; Kaneko et al, Proc Natl Acad Sci USA 1997）。プリオン感染培養細胞において、1）ラフトの重要な構成成分であるコレステロールを欠乏させると、プリオンタンパクの異常化が抑制され、2）プリオンタンパクのGPIアンカー付加シグナルを他のGPIアンカー型膜タンパクのGPIアンカー付加シグナルと置換しても、その異常化能は妨げられないが、ラフトに局在しない膜貫通型タンパクの膜貫通ドメインと置換すると、その異常化が抑制される。

以上のような事実から、ラフトはプリオンタンパクが効率良く異常化する上で重要な働きをしていることが強く示唆される。しかしながら、以下の点については依然として不明である。1）ラフトは正常型プリオンタンパクと異常型プリオンタンパクの両者を集積させることによって、両者が効率良く出会い、効率よく異常化が起きるための単なる「出会いの場」として働いているのか、あるいは、ラフトの他の構成成分であるタンパク質、脂質等が、プリオンタンパクの異常化メカニズムに積極的に関与しているのか。2）GPIアンカーがプリオンタンパクの異常化能、プリオン形成能、神経変性形成能に必要な構造であるのか。

我々は、トランスジェニックマウスの作成、マウスへのプリオン感染実験での経

験を生かして、上記の不明の課題に取り組んだ。具体的には、GPIアンカーを欠損するプリオンタンパクを発現するトランスジェニックマウスにおけるプリオンタンパクの異常化、プリオン形成、神経変性形成を検討することにより、プリオンタンパクの異常化、プリオン形成、神経変性形成にGPIアンカーが必要であるか否かを検証した。

GPIアンカー欠損プリオンタンパクを発現するトランスジェニックマウスの作製

マウスのプリオンタンパクアミノ酸配列のカルボキシル末端230番セリンから254番グリシンまでの部分は、GPIアンカー付加のためのシグナル配列として働いており（図1）、リボソームで新生したプリオンタンパクペプチド鎖が小胞体膜を通過する際に、230番セリンと231番セリンの間が酵素により切断され、230番セリンのカルボキシル末端にGPIアンカーが付加される。我々は、マウスのプリオンタンパクの231番セリンのコドンを終止コドンで置換したプリオンタンパク遺伝子を作成し（図1）、これを、マウスのゲノムから採取した「プリオンタンパクプロモーター領域を含む全長約24 kbのプリオンタンパク遺伝子」のタンパクコード領域に組み込んだ。この変異によって、新生プリオンタンパクペプチド鎖はGPIアンカー付加のためのシグナル配列を欠損することになる。次に、この24kbのトランスジーンをBDF1マウス受精卵に注入し、代理母マウスの卵管に戻して出生させた。出生したマウスのゲノムDNAを用いたサザンブロットにより、トランスジーンが組み込まれたマウスを選別した。2匹のマウス（#19, #24）がトランスジーンを持つことが確認された。この2匹のマウスをC57BL/6系マウスと交配することにより繁殖させ、GPIアンカー欠損プリオンタンパクと「マウスが元々持っている野性型プリオンタンパク」の両方を発現するマウスを作出した。一方、理化学研究所の糸原重美博士が作出された「プリオンタンパク遺伝子欠損マウス」を供与して頂き、我々の作成したトランスジェニックマウスと交配させることによって、GPIアンカー欠損プリオンタンパクを発現するが野性型プリオンタンパクを発現しないマウスを作出した。

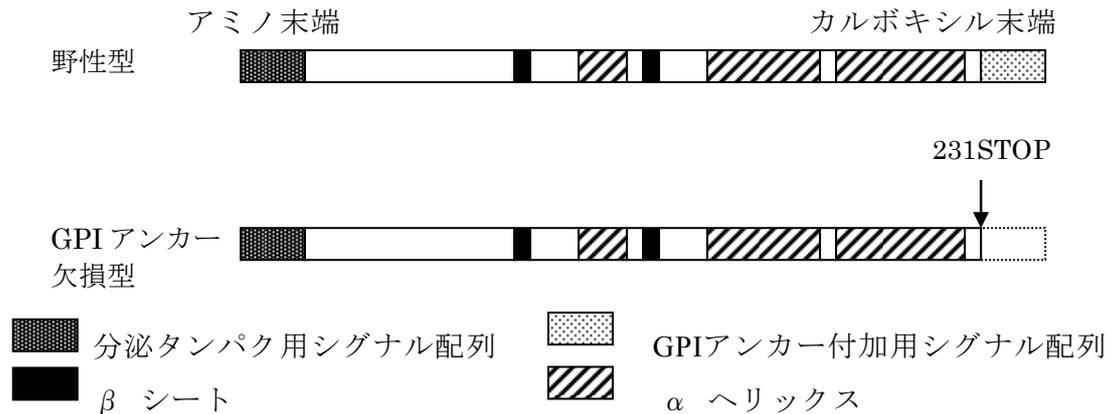


図1 プリオンタンパクの構造

トランスジェニックマウスにおけるGPIアンカー欠損プリオンタンパク

2つの系統のトランスジェニックマウスにおけるGPIアンカー欠損プリオンタンパクの脳組織における発現量を、野性型マウスにおけるプリオンタンパク発現量に対する相対量として評価したところ、#19系統が約25%、#24系統が3-6%であった。

GPIアンカー欠損プリオンタンパクは脳組織の乳剤を用いたウエスタンブロットで調べると、主として約24-5 kDaの分子種として認められ、一部がそれより遅く泳動される分子種として認められた。タンパクの糖鎖を除去する酵素処理を行うと、全ての分子種が24-5 kDaに収束したことから、GPIアンカー欠損プリオンタンパクの大部分が糖鎖を持たない分子種として発現していることが明らかとなった。これは、すでに報告されている（我々も再現性を確認している）培養細胞でのデータと一致していた。

トランスジェニックマウスへのプリオン接種実験

接種用プリオン株としては、遺伝型プリオン病の一種であるゲルストマン・ストロイスラー症候群の患者より単離され、マウス脳への接種により継代され樹立されたプリオン株（福岡1株、立石潤博士より供与）を用いた。

GPIアンカー欠損プリオンタンパクと野性型プリオンタンパク両者を発現するマウスへのプリオン接種実験では、#19、#24両系統ともに約90-100日の潜伏期間の後に発病した。トランスジーンを持たない兄弟マウスに同じプリオン株を接種した場合の潜伏期間は約160日であるので、GPIアンカー型プリオンタンパクの発現によって潜伏期間が大幅に短縮したことになる。マウス脳組織の病理学的検索では、プリオン病の典型的な病理所見（海綿状変性、灰白質へのびまん性異常プリオンタンパク沈着）に加えて、多数の斑状のプリオンタンパク沈着が認められ、その一部はアミロイドの性状を有していた。野性型マウスへの福岡1株の接種では斑状の異常プ

リオンタンパク沈着やアミロイド形成は生じない。また、野性型プリオンタンパクを過剰発現するトランスジェニックマウスへ福岡1株を接種しても斑状の異常プリオンタンパク沈着やアミロイド形成は生じない（未発表データ）。したがって、斑状の異常プリオンタンパク沈着やアミロイド形成は、GPIアンカー欠損タンパク発現によって特異的に生じたプリオン病表現型であると考えられた。発病したトランスジェニックマウスの脳組織の生化学的検索では、タンパク分解酵素耐性のプリオンタンパクが検出された。また、発病したトランスジェニックマウスの脳組織の乳剤をプリオン濃度測定用のNZWマウスへ接種すると約140日で発病した。トランスジーンを持たない兄弟マウスにプリオンを接種し、発病したマウスの脳乳剤をNZWマウスへ接種するとやはり約140日で発病するので、トランスジェニックマウスの脳組織内にはプリオンが高度に増殖していたと言える。

GPIアンカー欠損プリオンタンパクを発現するが野性型プリオンタンパクを発現しないマウスへのプリオン接種実験は、主として#19系マウスを用いて行われた。マウスはプリオン接種後400-500日の間、明瞭な神経障害症候を呈することなく生存した。しかし、脳組織の病理学的検索では極めて高度のアミロイド形成が認められた。これらのアミロイド斑はすべて抗プリオンタンパク抗体を用いた免疫組織化学染色により強く染色された。一方、プリオン病の特徴的所見である海綿状変性や灰白質へのびまん性異常プリオンタンパク沈着は認められなかった。トランスジェニックマウス脳組織の生化学的検索では、異常化したGPIアンカー欠損プリオンタンパクが検出された。トランスジェニックマウス脳組織の乳剤をNZWマウスへ接種すると約140日で発病し、高度のプリオン増殖が確認された。

トランスジェニックマウスにおける上述の異常所見は全て、プリオンを接種された場合にのみ認められ、正常対象のトランスジェニックマウス群（非接種のトランスジェニックマウス群、または非感染マウスの脳乳剤を接種されたトランスジェニックマウス群）には認められなかった。

GPIアンカー欠損プリオンタンパクを発現するが野性型プリオンタンパクを発現しないマウスへのプリオン接種実験の結果から、以下の事が結論された。1) GPIアンカー欠損プリオンタンパクはマウス脳組織内でプリオン接種に依存して異常化し、プリオンを形成した。2) GPIアンカー欠損プリオンタンパクはプリオン接種に依存して、アミロイドを形成した。これらの観察から、GPIアンカーはプリオンタンパクの異常化、アミロイド形成、プリオン形成に不必要であることが明らかとなった。言い換えると、プリオンタンパクのペプチド部分には、少なくともin vivoにおけるプリオン形成に必要な条件が全て備わっていると言える。この事実によって、他のアミロイド形成性タンパクが一般にプリオン形成能に乏しいのは、GPIア

ンカーを持たないためではなく、ペプチド部分の構造がそれに適していないためであることが示唆された。この見解は、逆に「アミノ酸配列がある条件を満たせばプリオンタンパク以外のタンパクがプリオン様の振る舞いをする可能性がある」という考えを支持する。

最近、カリフォルニア大学のグループが、組換えプリオンタンパクペプチドの構造をアミロイド形成性構造に変化させることによって、感染性を獲得させることにも成功した (Legname et al, Nature 2004)。これは、我々が得た「プリオンタンパクのペプチド部分には、少なくとも *in vivo* におけるプリオン形成に必要な条件が全て備わっている」とする結論と符合し、両者を考え合わせると、GPI アンカーは、プリオンタンパクの異常化、プリオン形成、アミロイド形成に関して *in vitro* でも *in vivo* でも不必要であるということになる。また、我々のデータから導き出される「アミノ酸配列がある条件を満たせば、プリオンタンパク以外のタンパクがプリオン様の振る舞いをする可能性がある」との考えは、すでに複数の酵母のタンパクに関して実証されている。

GPI アンカー欠損プリオンタンパクを発現するが野性型プリオンタンパクを発現しないマウスへのプリオン接種実験で、異常化した GPI アンカー欠損プリオンタンパクの蓄積と高濃度のプリオン蓄積にも拘わらず海綿状変性が生じなかったことは、脳組織に蓄積した異常型プリオンタンパクが神経変性を惹起する上で、GPI アンカーが重要な役割を果たす可能性を示唆している。GPI アンカーの欠損はプリオンタンパクの構造、局在、さらにはプリオンタンパクと他の分子との相互作用に影響を与えうる。どの要素への影響が神経変性の防止をもたらしたかについては、さらに検討が必要である。この問題と関連して、GPI アンカー欠損プリオンタンパク (正常型、異常型の両者) が組織内、あるいは細胞内のどこに局在するかを、今後明らかにすることが重要である。現在、同タンパクがラフトに局在しているか否かを生化学的に検討している。今後さらに、電子顕微鏡レベルの形態学的解析を行い、異常化した GPI アンカー欠損プリオンタンパクの局在についての情報を得る予定である。本研究のデータは、「異常型プリオンタンパクによる神経変性の惹起には、神経細胞表面におけるプリオンタンパクの発現が必要である」とする考えを支持する。

(B) ヒトのプリオン病の解析

はじめに

1998 年、Shibuya らは日本の孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病患者のプリオンタンパク遺伝子多型に関して、検索した 85 名の患者の全てが 219 番グルタミン酸をホモに持ち、グルタミン酸/リジンヘテロに持つ者が存在しないこと、および、この頻度が日本人の正常対象 100 名における同多型の頻度 (グルタミン酸/グルタミン酸 ホモ 88%、

グルタミン酸/リジン ヘテロ 12%)と有意に異なっていることを報告した (Shibuya et al, Lancet 1998)。これと関連して、Kaneko らはマウスのプリオンタンパクの 218 番グルタミン (ヒトのプリオンタンパクの 219 番に相当) をリジンで置換することにより、その変異タンパク自身が異常化しなくなるのみならず、「共発現されている野性型マウスプリオンタンパクの異常化を抑制する」という特異な性質を獲得することを発見した (Kaneko et al, Proc Natl Acad Sci USA 1997)。同変異タンパクの効果は後にトランスジェニックマウスの系で確認された (Perrier et al, Proc Natl Acad Sci USA 2002)。ヒトのプリオンタンパク遺伝子多型と孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病の関係については、129 番多型についてメチオニンをホモに持つ個体が有意に多く、メチオニン/バリンをヘテロに持つ個体が有意に少ないことが英国での研究で明らかにされている (Palmer et al, Nature 1991)。これらのことは、プリオン病の遺伝子多型が孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病の発症に大きく影響していることを示している。Kaneko らは、マウスのプリオンタンパクが 218 番リジン置換によって獲得する特異な性質が、プリオンタンパク立体構造上の 218 番を含む部位を認識する未知の分子の存在と、同分子のプリオンタンパク構造変換への関与を示唆するものであることを提唱した。

このように、ヒトのプリオン病患者の多様性の解析は、プリオン病の発生メカニズムに関して他では得られない多くの重要な示唆を与える。我々は、金子チームの一端としての役割に鑑み、ヒト・プリオンタンパク 219 番多型の役割に注視しつつ、さらに大きな視野を持って以下に述べる様なヒトのプリオン病の多様性の解析を行った。これらの作業は、すでに定着している (あるいは定着したかに見える) プリオン病の理解や概念の正当性を再検討する上で重要であるとともに、新しい理解や概念に通じる貴重な資料をもたらす点で重要である。

ヒト・プリオンタンパク 219 番多型を識別する抗体の作製 (和歌山医科大学 田中智之博士、姫路工業大学 北元憲利博士、国立循環器病センター 由谷親夫博士、東北大学 北本哲之博士との共同研究)

組換えヒト・プリオンタンパク 23-230 (219 番グルタミン酸) で Balb/c マウスを免疫し、採取した脾臓細胞を利用してハイブリドーマを作製した (Muramoto et al, Neurosci Lett 2000)。ハイブリドーマ培養上清中の抗プリオンタンパク抗体の有無を、クロイツフェルト・ヤコブ病患者脳組織切片上の異常プリオンタンパクに対する免疫組織化学反応でアッセイしたところ、2つのハイブリドーマ・クローン (#41, #71) 由来の上清が反応した。2つのクローンのエピトープマッピングを行ったところ、両抗体はヒトのプリオンタンパク 163-230 とは反応するが、プリオンタンパク 197-230 とは反応しなかった。また、両抗体はマウスのプリオンタンパクとは反応しなかった。両抗体が、ヒトの

プリオンタンパク 163-230 に含まれるヒト特異的アミノ酸配列 (図 2) のどの部位を認識するかを調べたところ、215 番イソロイシン、219 番グルタミン酸、220 番リジンのヒト特異配列クラスターがエピトープとして重要で、中でも 219 番グルタミン酸をマウス型のグルタミンに置換すると抗体の反応性が失われることが判明した。このことは、219 番グルタミン酸を他のアミノ酸で置換した場合に抗体の反応性に大きな影響があること、それはすなわち抗体がヒト・プリオンタンパク 219 番リジン型を認識しない可能性があることを示唆していた。そこで、両抗体のヒト・プリオンタンパク 23-230 の 219 番リジン型との反応性を調べてみると、反応しないことが確かめられた (図 3)。この新しい抗ヒト・プリオンタンパク抗体は、219 番多形をヘテロに持つヒトに生じたプリオン病において脳内に蓄積している異常プリオンタンパクが 219 番グルタミン酸型かリジン型かを解析する上で有用である。

	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Human	YRPM ¹⁶⁶ DE ¹⁶⁸ YS--	--MCI ²¹⁵ TQYE ²¹⁹ R ²²⁰	ESQAYYQ ²²⁷ RGS ²³⁰
Mouse	YRPV ¹⁶⁵ DQ ¹⁶⁷ YS--	--MCV ²¹⁴ TQYQ ²¹⁸ K ²¹⁹	ESQAYYD ²²⁶ GRRS ²³⁰

図 2 ヒトとマウスのプリオンタンパクカルボキシル末端アミノ酸配列

Segments 1, 2, 3 はヒト配列とマウス配列でアミノ酸が異なる部位が集積している 3 つの領域を示す。

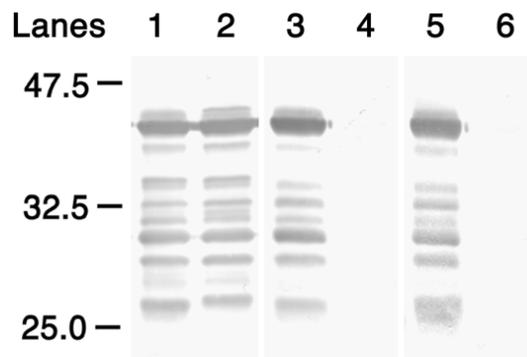


図 3 ヒト・プリオンタンパク 23-230 と GST との融合タンパクを発現している大腸菌の溶解液と抗ヒト・プリオンタンパク抗体との反応性を示すウエスタンブロット

奇数番号の lane は 219 番グルタミン酸型、偶数番号の lane は 219 番リジン型タンパクを発現する大腸菌がサンプル。反応に使用した一次抗体は lanes 1, 2 が 3F4、lanes 3, 4 が #41、lanes 5, 6 が #71。アルカリフォスファターゼ標識二次抗体・NBT/BCIP のシステムで発色。

新しい抗ヒト・プリオンタンパク抗体の219番多型識別能力のヒト・プリオン病症例解析への応用（和歌山医科大学 田中智之博士、姫路工業大学 北元憲利博士、国立循環器病センター 由谷親夫博士、東北大学 北本哲之博士との共同研究）

#41, 71 モノクローナル抗体が、ヒト・プリオンタンパク 219 番グルタミン酸型と反応し、219 番リジン型と反応しないことを利用して、ヒトの遺伝性プリオン病の一種であるゲルストマン・ストロイスラー症候群の患者で 219 番多型グルタミン酸/リジンをヘテロに持つ個体（病原性プリオンタンパク 102 番ロイシン変異は 219 番リジンを持つ allele 上にある）の脳組織中の不溶性プリオンタンパクおよび、脳組織切片上の斑状プリオンタンパク沈着が 219 番グルタミン酸型、リジン型どちらの allele に由来するかを調べた（Muramoto et al, Neurosci Lett 2000）。その結果、不溶性プリオンタンパクと斑状プリオンタンパク沈着の両方が、3F4 モノクローナル抗体（219 番グルタミン酸型、リジン型両方を認識）で認識される一方、#71 抗体では認識されず、これらの異常プリオンタンパクは 102 番変異を持つ allele（219 番多型はリジン型）に由来するものであり、102 番変異を持たない allele（219 番多型はグルタミン酸型）には由来しないことが明らかとなった（図 4）。これらの所見は、ゲルストマン・ストロイスラー症候群において 102 番ロイシン変異はプリオンタンパクを異常化させる上で決定的な役割を果たすことを確認する一方、219 番リジンは必ずしも絶対的なプリオンタンパク異常化の抑制因子ではないことを示唆している。

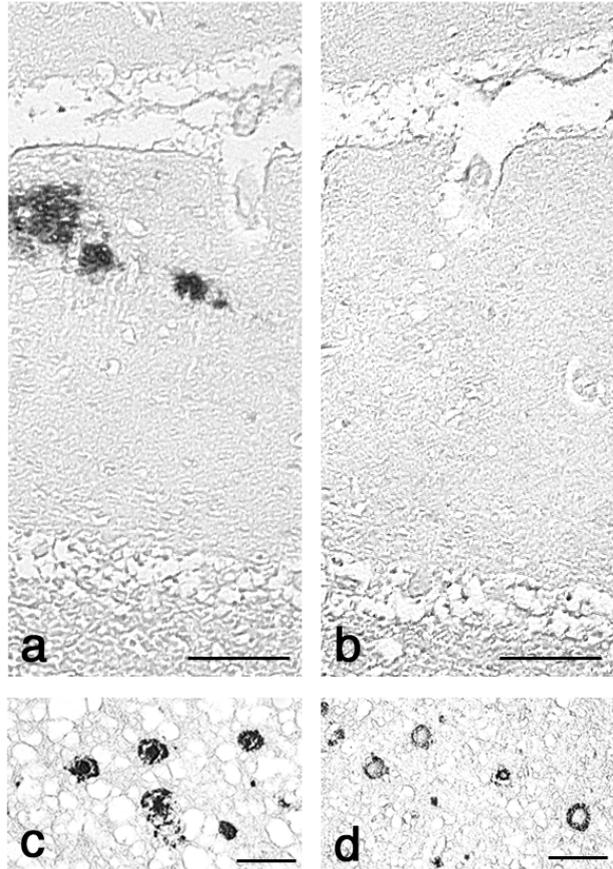


図4 219番グルタミン酸型ヒト・プリオンタンパク特異抗体を用いたゲルストマン・ストロイスラー症候群患者脳組織の免疫組織化学的解析

a と b のサンプルは、プリオンタンパク 219 番多型に関してグルタミン酸/リジン ヘテロであり、病原性 102 番ロイシン変異が 219 番リジン型の allele 上に存在している患者由来のもの。a) 患者小脳皮質分子層内の斑状の異常プリオンタンパク沈着を 3F4 抗体で検出したもの。b) a と連続する組織切片を#71 抗体で染色したもの。#71 抗体は異常プリオンタンパク沈着と反応していない。c と d のサンプルは、プリオンタンパク 219 番多型に関してグルタミン酸 ホモであり、病原性 102 番ロイシン変異を片方の allele 上に持つ患者由来のもの。患者大脳の前角質異常プリオンタンパク沈着が 3F4 抗体 (c) と#71 抗体 (d) の両方で検出される。

#41/71 抗体を用いたクロイツフェルト・ヤコブ病患者の解析 (堺市衛生研究所 田中智之博士、姫路工業大学 北元憲利博士、エジンバラ大学 James W. Ironside 博士、北海道大学 長嶋和郎博士、金沢大学 山田正仁博士、国立精神神経センター国府台病院 佐藤 猛博士、九州大学 毛利資郎博士、東北大学 北本哲之博士との共同研究)

ヒト乾燥硬膜の移植後に発生するクロイツフェルト・ヤコブ病は、近年最も多発して

いる医原性プリオン病である。この疾患は日本で特に多発しており、2000年7月までに全世界で114例が報告されたうちの実に67例が日本の症例であるなど、深刻な問題となっている。

我々は、この疾患に病理学的相違のある2つのサブタイプが存在することを指摘してきた (Shimizu et al, Arch Neurol 1999)。1つのサブタイプは孤発性のクロイツフェルト・ヤコブ病の典型的所見 (海綿状変性、灰白質のびまん性異常プリオンタンパク沈着あり、斑状異常プリオンタンパク沈着なし) を持つタイプ (非プラーク型硬膜 CJD) であり、もう1つは海綿状変性と灰白質のびまん性異常プリオンタンパク沈着に加えて、多数の斑状異常プリオンタンパク沈着が認められるタイプ (プラーク型硬膜 CJD) である (図5)。我々は、この2つのサブタイプの正当性を確立するために、両サブタイプの症例の臨床所見の解析、プリオンタンパク遺伝子の解析、脳組織中の異常型プリオンタンパク分子種のサイズの解析 (異常型プリオンタンパクタイピング)、および脳組織の感染性の解析を行った (Sato et al, J Gen Virol 2003 ; Taguchi et al, Am J Pathol 2003)。

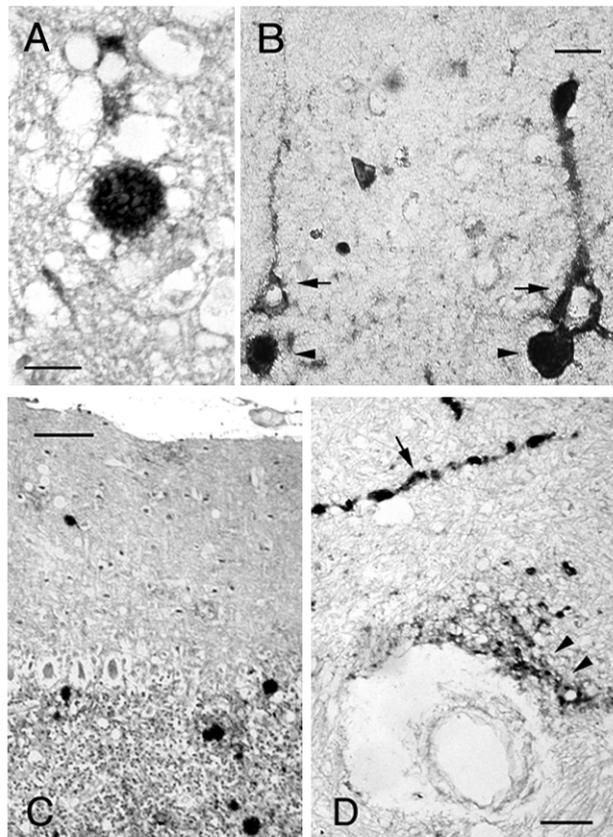


図5 プラーク型硬膜移植後クロイツフェルト・ヤコブ病患者脳組織への斑状異常プリオンタンパク沈着の免疫組織化学染色

A) 大脳の花冠状沈着。 B) 大脳における神経細胞周囲への沈着 (矢印)、および斑状の沈着 (矢頭)。 C) 小脳皮質における斑状沈着。 D) 小脳白質における粗大顆粒状

沈着（矢頭）、および線状沈着（矢印）。抗体は3F4を使用。

まず、臨床所見の解析では3つの点でサブタイプ間に違いが認められた。第一は、非プラーク型では脳波上クロイツフェルト・ヤコブ病の典型的所見である *periodic synchronous discharge* が罹病期間（平均 16.3 ヶ月、例数 6）中の早期（発症後平均 3.2 ヶ月）に認められたが、プラーク型では認められない（7例中 5例）か、罹病期間（平均 16.7 ヶ月）の最後（発症後平均 16.6 ヶ月）にのみ認められた（7例中 2例）。第二に、ミオクローヌスが非プラーク型では 6例全例に認められたが、プラーク型では 7例中 4例にのみ認められたのみであった。第三に、高度の脳機能障害を示す症候である無動性無言状態に至るまでの期間が非プラーク型では平均 3.5 ヶ月であったのに対して、プラーク型では 10.3 ヶ月と大きく延長していた。両サブタイプの全罹病期間には差が認められなかった（非プラーク型 16.3 ヶ月、プラーク型 16.7 ヶ月）ので、この差はプラーク型において神経機能障害の進行が比較的ゆっくりしていることを反映していると考えられる。プリオンタンパク遺伝子に関しては、両サブタイプともに患者は全て変異を持たず、129 番多型がメチオニン ホモ、219 番多型がグルタミン酸 ホモであった。脳組織中の異常型プリオンタンパクのサイズに関しては、3F4 モノクローナル抗体で認識される主要 3 分子種は両サブタイプにおいて、糖鎖の除去により約 21 kDa へ収束したことから *Parchi* 分類のタイプ 1 であると判定され、差が認められなかった。これは、#71 抗体でも確認された（図 6）。しかしながら、#71 抗体による反応では、主要 3 分子種に加えて、非プラーク型では約 12 kDa の小断片が認められたのに対し、プラーク型ではこれが存在せず、サブタイプ間の差が存在することが明らかとなった（図 6）。この小断片は 6H4 モノクローナル抗体（144-152 番がエピトープ）と反応せず、171-216 番にエピトープを持つ別のモノクローナル抗体と反応したことから、主要 3 分子種に比べて、アミノ末端側がより大きく欠落している分子種であると考えられた。この小断片は主要 3 分子種（分子量 21 kDa）と同様に不溶性、タンパク分解酵素耐性であり、正常対象群には検出されなかった（図 6）。また、同断片が、他のプリオン病の病型において検出されるか否かを検討したところ、他のプリオン病に関しても病型（あるいはサブタイプ）特異的に検出されることが判明した（図 6、表 1）。さらに、この 12 kDa 断片がタンパク分解酵素処理によって生じた人工産物であるのか、あるいは患者脳組織内で産生された分子であるのかについて示唆を得るために、タンパク分解酵素処理前の患者脳組織サンプルを解析したところ、タンパク分解酵素処理前のサンプルにすでに同じサイズと抗体反応性を持つプリオンタンパク分子種が含まれていることが判明した。これらの結果は、プリオンタンパク 12 kDa 断片が、プリオン病の病型（あるいはサブタイプ）特異的な過程で産生されること、あるいは病型特異的な異常型プリオンタンパク

の性状（異常型プリオンタンパクの構造等）と関係していることを示唆している。

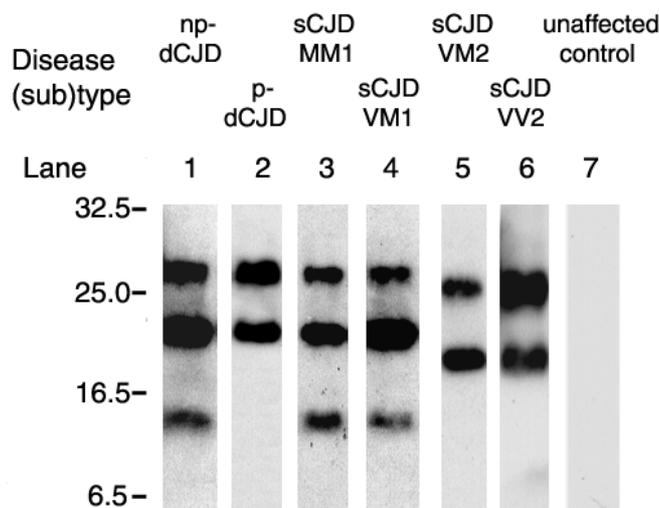


図6 クロイツフェルト・ヤコブ病患者脳組織由来の異常型プリオンタンパクの電気泳動度の比較

#71 抗体によるウエスタンブロット。異常型プリオンタンパクの主要3分子種のうち、糖鎖が2箇所結合している分子種は#71抗体との反応性が低く、このブロットでは見えない。残りの主要2分子種は、糖鎖が1箇所結合している分子種（1-6の各laneに認められる25-27 kDaの分子種）も、糖鎖が結合していない分子種（1-6の各laneに認められる19-21 kDaの分子種）も、抗体と強く反応している。図の一番上に各サンプルを採取した患者の病型が記載してある。Lane 1, 非プラーク型硬膜例；lane 2, プラーク型硬膜例；lane 3, 孤発例（129番多型メチオニン ホモ）；lane 4, 孤発例（129番多型メチオニン/バリリン ヘテロ）；lane 5, 孤発例（129番多型メチオニン/バリリン ヘテロ）；lane 6, 孤発例（129番多型バリリン ホモ）；lane 7, 非プリオン病罹患脳。Parchi分類による異常型プリオンタンパクのタイプはlanes 1-4がタイプ1（21 kDa）、lanes 5, 6がタイプ2（19 kDa）である。約12 kDaの小さな分子種がlanes 1, 3, 4にのみ認められる。

上述の見解は、次に行われた両サブタイプの感染性を検討する研究によって強く支持された。我々はすでに、ヒトおよびマウスのプリオンタンパクのキメラタンパクを発現する遺伝子改変マウスを作成し、同マウスが孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病の典型例（プリオンタンパク129番多型メチオニン ホモ、219番多型グルタミン酸 ホモ、異常型プリオンタンパクタイプ1）に高感受性であることを報告した（Kitamoto et al, *Biochem Biophys Res Commun* 2002）が、本研究では同マウスに硬膜CJDの両サブタイプの脳乳剤を接種し、発病するか否かを検討した（Taguchi et al, *Am J Pathol*）。その結果、

非プラーク型の 1 例ではマウスは接種後平均 167 日で全個体が発症したが、プラーク型の 3 例では接種後 518-885 日のマウスで発症や病理学的病変が全く認められなかった。このことは、サブタイプ間で脳組織内に増殖している感染因子プリオンの性状が大きく異なっていることを示している。

本研究の結果は、プリオン病の臨床病理学的病型の多様性は、病型ごとの異常型プリオンの多様性と相関しており、同時にそれは病型ごとの感染因子プリオンの性状とも深く結びついていることを示している。

表 1 クロイツフェルト・ヤコブ病患者脳組織中の異常型プリオンタンパク：主要 3 分子種のタイプと 12 kDa 断片の存在の有無

	異常型プリオンタンパクタイプ	
	タイプ 1	タイプ 2
12 kDa 断片 有り	孤発例(M/M)11 孤発例(V/M)1 硬膜例非プラーク型(M/M)3 遺伝型 200 番リジン変異(M/M)2 遺伝型 232 番アルギニン変異(M/M)2 遺伝型 232 番アルギニン変異(M/V)1	孤発例視床型(M/M)3
12 kDa 断片 無し	硬膜例プラーク型(M/M)5	孤発例(V/M)2 孤発例(V/V)1 変異型(M/M)3

括弧内の M, V は 129 番多型のメチオニン、バリンを示す。遺伝型 232 番アルギニン変異例(M/V)では、232 番変異は 129 番メチオニン allele 上にあった。括弧の右の数字は調べた症例数。

(2)研究成果の今後期待される効果

GPIアンカー欠損プリオンタンパクがプリオンを形成・伝搬しうることの証明は画期的であり、プリオンの増殖・伝搬に関する大きなコンセプト上の前進である。本研究では、プリオンタンパクの異常化におけるラフトの役割について今後さらに画期的なデータが出る可能性がある。GPIアンカー欠損タンパクが蓄積した脳に神経変性が認められなかったことは、プリオン病における神経変性機序を考察する上で重要な所見である。

今後、本研究と類似のストラテジーを用いてプリオンタンパク構造と神経変性の関係を調べることにより、神経変性が生じるためのプリオンタンパクの側の必要条件を同定することが可能であり、プリオン研究における全く新しいパラダイムを切り拓くことになる。

我々のヒト・プリオン病症例の研究は、硬膜移植後クロイツフェルト・ヤコブ病の2つのサブタイプを確立した点で、画期的である。本研究で得られた同病型への理解は、日本で多発している同病型に関する対策を立てる上で極めて重要である。

3. 3 プリオン病発症過程におけるマウス脳のタンパク質の変動解析（国立感染症研究所 西島正弘グループ）

(1) 研究内容及び成果

はじめに

プリオン病の患者では正常個体の神経細胞の膜に多量に発現している正常型プリオンタンパク質 (PrP^C) の構造異性体で、感染性の異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) が中枢神経に蓄積している。しかし、PrP^{Sc} が細胞障害因子として神経細胞の変性死に直接に係わっているか否かは不明である。また、PrP^{Sc} 持続感染神経芽細胞株を用いた実験から、PrP^C は PrP^{Sc} を鋳型として細胞膜のマイクロドメインであるラフト上で PrP^{Sc} に変換されると考えられている。このときに、PrP^C と結合してその構造変化を惹起して PrP^{Sc} との相互作用を容易ならしめる“種”特異的な因子の存在が強く示唆されている。このようなシャペロン様の活性を持つ物質は“プロテイン X”と仮称され、やはりラフトに多く存在することが推定されるが、その本体に付いても未だ明らかとなっていない。本研究では、プリオン病の発症過程で PrP^{Sc} の蓄積と相関して変動するタンパク質群を解析することにより、PrP^{Sc} が神経細胞／組織に及ぼす影響を明らかにする事や、プロテイン X の候補タンパク質を検索することなどを目的として、マウス順化スクレーパー病原体（帯広1株）を接種し、マウス脳のタンパク質の変動を経時的、網羅的に解析した。その結果、PrP^{Sc} が蓄積し始める接種後約 100 日以降で各種のタンパク質の発現変動が顕著になった。可溶性画分の分析では、異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の増加に伴ってアストログリアの骨格タンパク質である glial fibrillary acidic protein (GFAP) 及び anti-oxidant protein 2 (peroxiredoxin 6)、thiol specific antioxidant protein (peroxiredoxin 2)、Glutathion S-transferase などの抗酸化ストレスタンパク質群の顕著な増加が認められた。GFAP の増加は神経細胞の変性死に伴うアストログリアの増加に起因すると考えられ、

抗酸化ストレスタンパク質の増加は PrP^{Sc} の細胞・組織への蓄積が何らかの酸化ストレスを細胞に与えていることが起因すると推定される。また、Rho-kinase の基質タンパク質で、神経軸索の伸展に関わると考えられている CRMP-2 (Collapsin response mediator protein-2) の不活性型のリン酸化型分子と思われるアイソマーが PrP^{Sc} の増加に比例して増加するが、これに伴い活性型の非リン酸化型アイソマーの減少が顕著に認められた。一方、raft 画分の分析では、細胞の酸性顆粒の膜に局在して顆粒内の pH を調節するプロトンポンプである vacuolar ATPase (vATPase) の A subunit の量的減少が PrP^{Sc} の増加に伴って認められた。PrP^{Sc} 持続感染神経芽細胞を用いた実験で、PrP^{Sc} が酸性顆粒であるリソソームやエンドソームに蓄積することが知られているが、その理由の一つとして、A subunit の脱離に伴うプロトンポンプの活性低下により、リソソーム内のタンパク分解酵素が充分活性化されないことが原因の一つであることが示唆された。

異常型プリオンタンパク質の蓄積と発症

PrP^{Sc}を含む膜画分を脳内接種することにより、マウスは濃度依存的にプリオン病を発症する。我々の用いた病原体（マウス順化スクレーパー：帯広1株）とマウス（ICRマウス、♀、8-10週齢）の組み合わせでは図1に示すように、接種後100日程度でPrP^{Sc}の蓄積がウエスタンブロット法あるいは免疫組織化学的に認められ、若干遅れて、プリオン病に特徴的な脳組織の空胞変性 (spongiform) が観察された。なお、体重減少やプリオン病に特徴的な異常挙動が認められのもPrP^{Sc}がある程度蓄積してくる120日前後であった。なお、マウスは170日から180日で全例が死亡する。図1にPrP^{Sc}の蓄積の経時変化と発症マウス（152日）の小脳の病理組織像を示す。

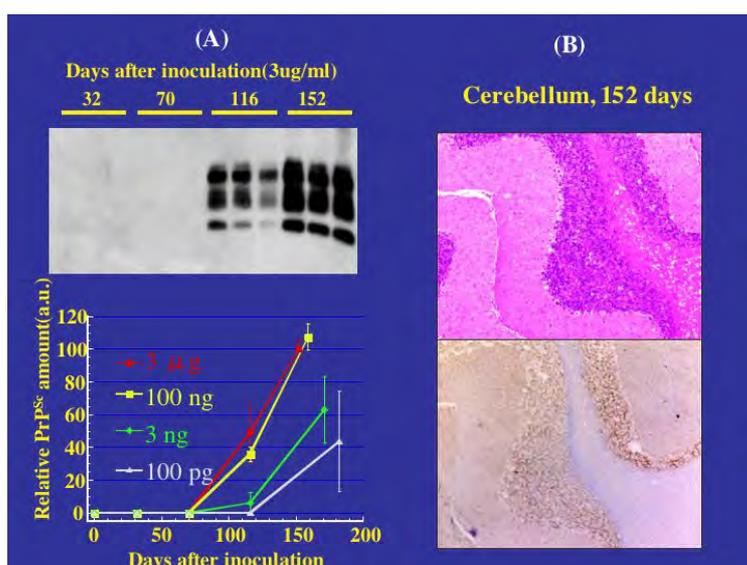


図1マウス順化スクレーパー(帯広1株)の脳内接種によるプリオン病の発症過程における異常型プリオンの蓄積 (A) と発症マウスの小脳の病理組織像 (B)

可溶性画分のタンパク質の変動解析：可溶性画分の二次元電気泳動ではCBB染色で250-300のスポットが検出されたが、それらの約85%には発症の前後で顕著な量的変動は認められず、プリオン病を発症した脳だけに特異的に存在するタンパク質も認めることは出来なかった。量的変動が認められたのは約30個のスポットであるが、図に示した6箇所の領域についてタンパク質の増減が顕著であった。分子量46kD、pI 5付近に泳動される領域4近辺の幾つかのスポットが152日に顕著な増加が観察された。これらのスポットは何れもPMF (peptide mass finger printing) 法により、アストロサイトに発現しているGlial fibrillary acidic protein (GFAP) と同定された。図2に示した様に、GFAPの発現量の増加はウェスタンブロット法でも異常型プリオンの蓄積と平行して増加していることを確認した。

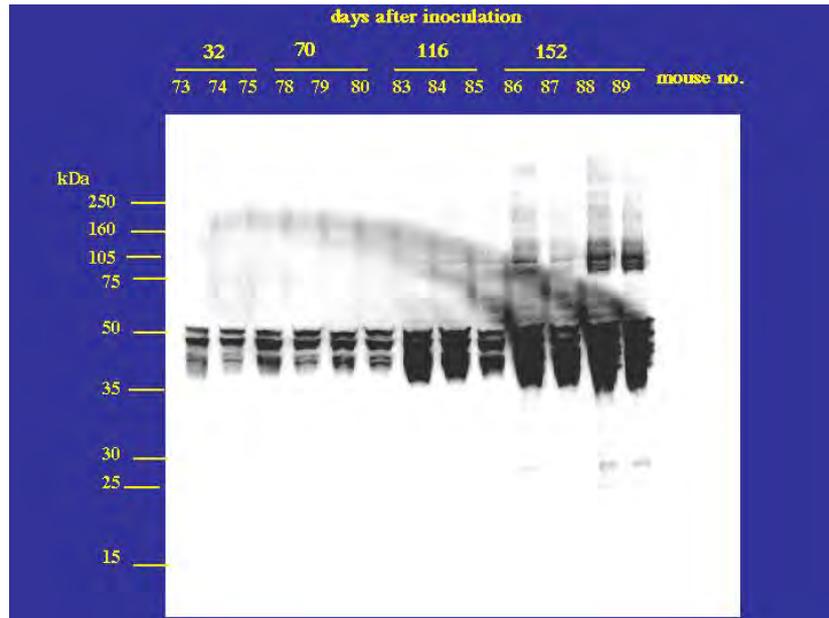


図2 プリオン病発症に伴う Glial fibrillary acidic protein (GFAP) の増加 (ウエスタンブロット法)

これらの事からアストログリアの増殖が推察されるが、このことはプリオン病末期において神経細胞の脱落とそれに伴うアストログリアの増殖が報告されていることと整合性がある。実際に、ヒトのプリオン病であるクロイツフェルトーヤコブ病 (CJD) やゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群 (GSS) 発症脳の免疫組織染色でGFAPの増加が観察された (図3)。

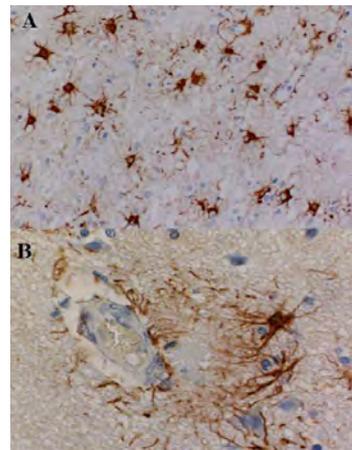


図3 ヒト・プリオン病患者の脳切片の抗 GFAP による免疫組織染色 (A) 狐発性 CJD、(B) GSS

可溶性画分における顕著なプロテオーム変化として、Glutathion S-transferase (スポット #1)、anti-oxidant protein 2 (peroxiredoxin 6; スポット #2) および、Thiol specific antioxidant protein (peroxiredoxin 2; スポット #3) 等の抗酸化ストレスタンパク質群が PrP^{Sc} の蓄積に伴って顕著に増加していた。これらのタンパクは、図4に示すように、異常型プリオンが検出可能となる116日から増加し始めて、152日では発症前の2-3倍の発現量となっていた。anti-oxidant protein 2の増加は、ヒトCJD罹患脳でも観察されており、PrP^{Sc} の蓄積が何らかの酸化ストレスを引き起こし、これが細胞死の原因となっている可能性が示唆された。

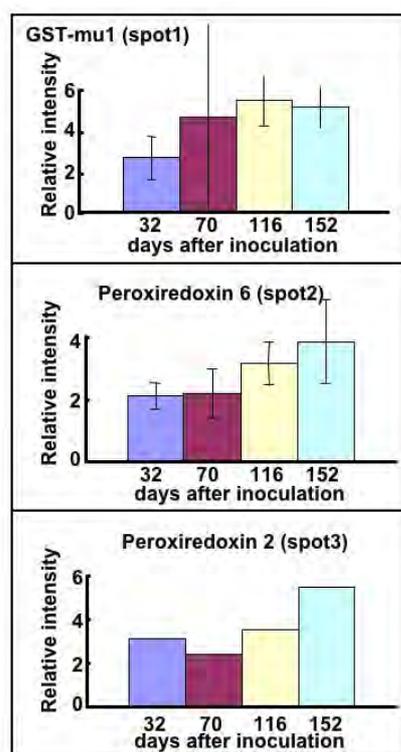


図4 異常型プリオンの蓄積に伴う antioxidant proteins の発現の増加
(peroxiredoxin 2 はウエスタンブロット法で定量した)

さらに、可溶性画分の興味あるタンパク質の変化としてRho-kinaseの基質タンパクで、軸索の形成分化に重要な役割を果たしている Collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2 / Upip2 / TOAD-64) のアイソフォームの相対量の変化がPrP^{Sc}の蓄積と関連していた。すなわち、図5において青矢印で示されるアイソフォームはPrP^{Sc}が脳に蓄積していない30、75日では量的に殆ど変化してない。しかし、PrP^{Sc}が蓄積し始める116日以降には経時的に減少する。これに反して赤矢印で示されるアイソフォームはPrP^{Sc}が蓄積し始める116日以降に増加することが観測された。これらのアイソフォームでは分子量は変化しておらず、青矢印のアイソフォームでは等電点が赤矢印のそれに比べて酸性側にシフトしていることから、リン酸基の付加による翻訳後修飾が不均一性の原因と考えられる。

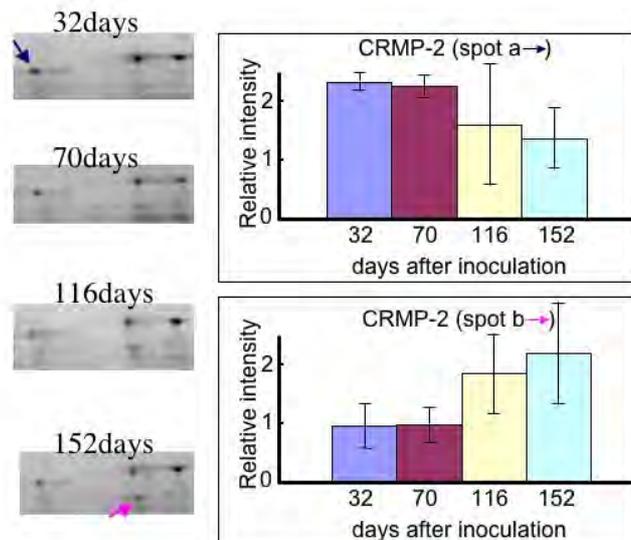


図5 異常型プリオンの蓄積に伴う Collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) のアイソフォームの相対含量の変化

ラフト画分のタンパク質の解析

当初は、2次元電気泳動に拠るラフトタンパク分離を試みたが、試料に大量に混在する脂質の妨害によって一次元目の等電点電気泳動で分子量5万以上の高分子量タンパクの回収率が極端に低下したために、図6に示す様に SDS-PAGE で構成タンパクを分離し、PMF法で約30種のタンパク質を同定した。

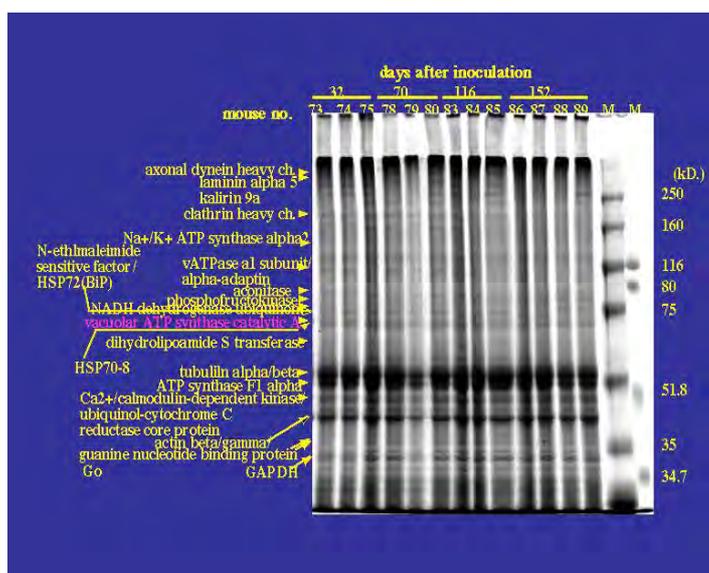
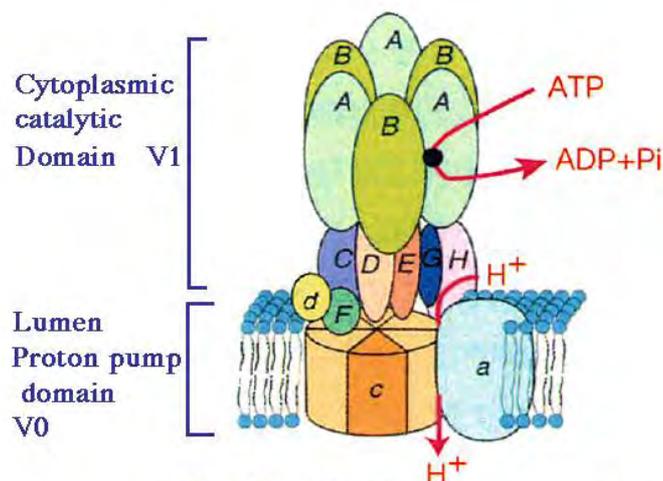


図6 マウス脳組織の Triton X100 不溶性画分(ラフト)のSDS-PAGE (異常型プリオンタンパク(PrP^{Sc})の増加に伴って赤字で示したvATPase のA subunit の減少が認められた)

これらのタンパク質についての比較では分子量 70kDa の vacuolar ATPase subunit A (vATPase A) が、PrP^{Sc}が蓄積し始める 116 日以後に顕著に減少していた。vATPase は細胞内のゴルジ体、分泌顆粒、エンドソーム、リソソーム等の内腔を酸性に保つために必須のプロトンポンプであり、図 7 に示すように複雑なサブユニットから構成されている。



Ge-Hong Sun-wada et.al.
Protein Nucleic acid and enzyme: vol. 46, 2140-2146

図 7 vATPase の構造

A サブユニットは膜表在性のサブコンプレックス (V1、触媒ドメイン) の構成成分であるが、同様に V1 の構成成分である E, G サブユニットも減少していることがウエスタンブロット法でも確認された。しかし、膜内在性のサブコンプレックス (V0、H⁺輸送ドメイン) の構成成分である a サブユニットにはそのような減少は認められず、全期間を通じて一定量が存在していた (図 8)。これらのことから、vATPaseA の生合成が PrP^{Sc} の蓄積によって低下したとは考え難く、触媒ドメインのみが選択的に解離したものと思われる。培養細胞の実験では、PrP^{Sc} は細胞表面のラフトで変換された後にエンドソームやリソソームに蓄積されと考えられているが、上記の結果から vacuolar ATPase の活性の低下が酸性小胞に存在するカテプシンなどのプロテアーゼ類の活性低下をもたらし、その結果、PrP^{Sc} が細胞から排除されず細胞内に蓄積する原因となっている可能性が示唆される。

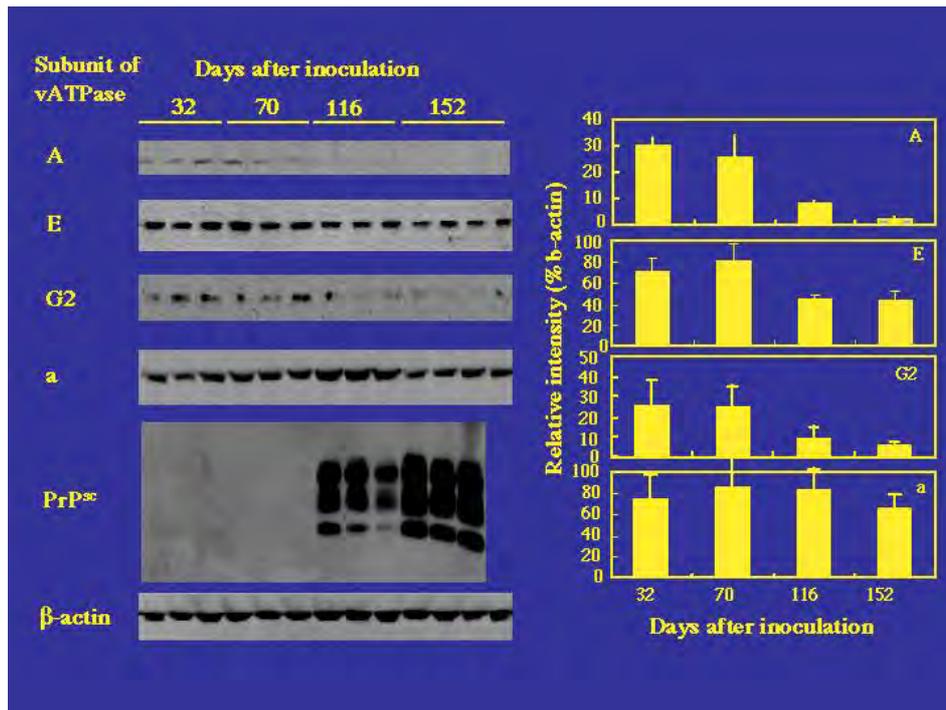


図8 異常型プリオンの蓄積とvATPaseの触媒ドメイン構成サブユニットタンパク質の減少

(2) 研究成果の今後期待される効果

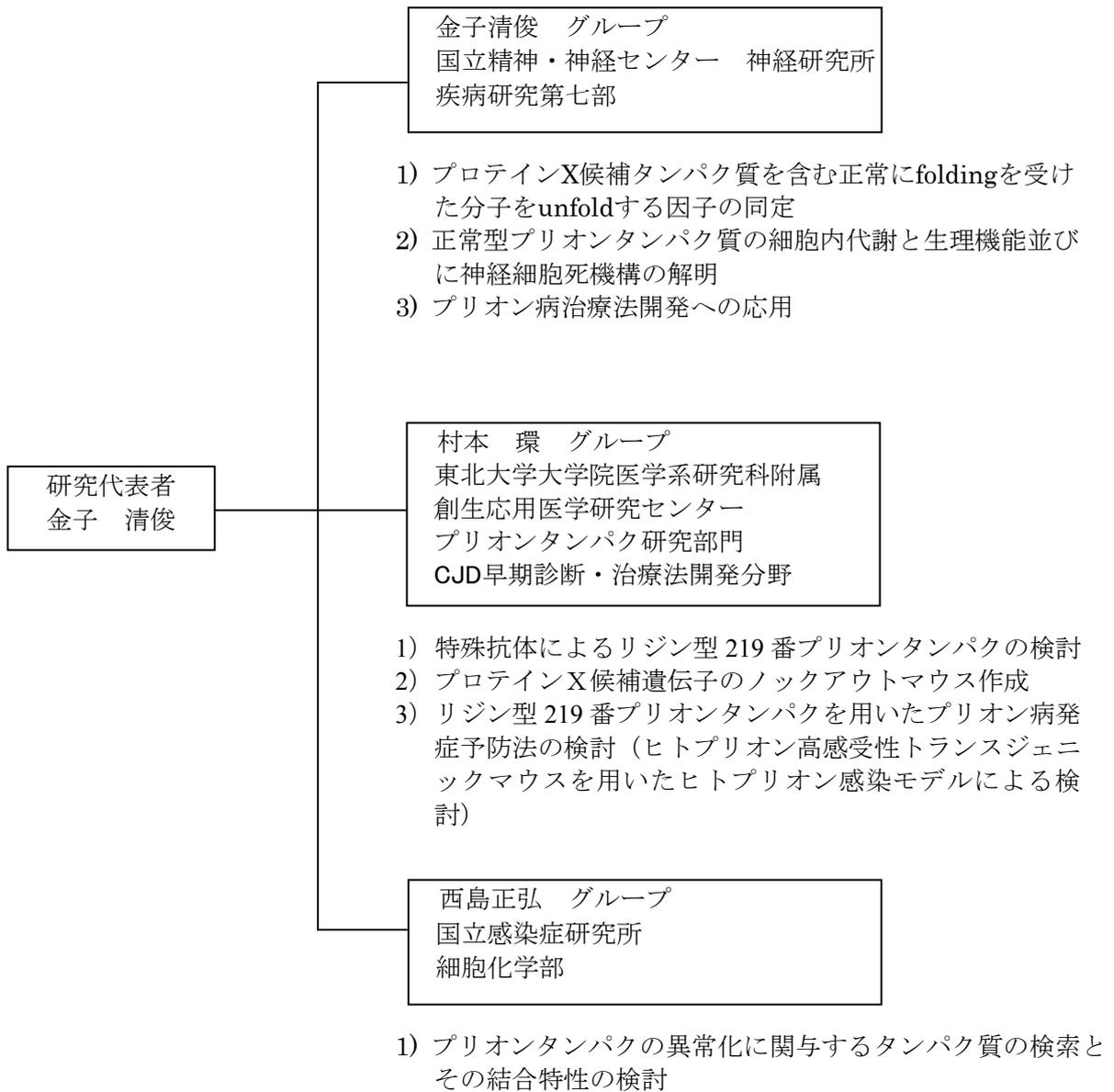
プリオン病は長期の潜伏期を置いて発症する致死性の神経変性疾患であり、病理学的には脳組織の海綿状変性とプロテアーゼ抵抗性の異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の蓄積により確定診断される。PrP^{Sc} はプリオン病の唯一の原因物質と考えられているが、PrP^{Sc} の蓄積が細胞・組織にどのような影響を与えるのかは全く不明である。本研究で、PrP^{Sc} の蓄積に伴って量的・質的に変化する幾つかの抗酸化ストレスタンパクを同定することができたが、さらに多数のタンパク質を同定し、その動態を明らかにする事により PrP^{Sc} の蓄積と発症との関係を解明することが可能になるものと考えられる。一方、もうひとつの目的であったプロテインXの検索は技術的な問題もあって期間中に目立った進展が無かったことは残念であった。現在、Tagを付したプリオンタンパクを神経芽細胞 N2a に発現させ、これと相互作用をする物質を分離する試みを行っている。いくつかの recPrP がラフトに発現していることを確認しており、今後の発展が期待できる。

外科治療 (輸血/臓器移植等) や食の安全性を確保する為にはプリオン病の発症以前の潜伏期にも適用可能な生前診断系の開発が望まれている。しかし、現在のプリオン病の絶対的なマーカーである PrP^{Sc} は蓄積が中枢神経系に限られている事や蓄積が確認できるのが、図-1 に示す様に発症の直前である事を考え併せると、PrP^{Sc} を生前診断のマ-

カーとして使うことは事実上不可能である。今後、尿、血液等の体液あるいは摘出可能なリンパ組織を用いてプリオン病に特異的な診断のマーカの探索及を行い、生前診断を可能にしたいと考えている。

4. 研究実施体制

(1)体制



(2)メンバー表

①金子グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
金子 清俊	国立精神・神経センター	部長	研究統括	平成11年11月～平成17年3月
逆瀬川如美	国立精神・神経センター	CREST 研究員	正常プリオンタンパク質分解酵素の同定	平成13年10月～平成17年3月
笹岡 俊邦	国立精神・神経センター	室長	プロテインX候補タンパク質の精製	平成12年4月～平成13年3月
田中 寅彦	国立精神・神経センター	室長	新規プロテオーム解析手法の開発	平成11年12月～平成13年3月
北條 浩彦	国立精神・神経センター	室長	CJD治療法開発への応用	平成16年5月～平成17年3月
古田 大	国立精神・神経センター	流動 研究員	新規プロテオーム解析手法の開発	平成11年11月～平成14年3月
伊藤 卓	国立精神・神経センター	流動 研究員	プロテインX候補タンパク質の同定	平成12年1月～平成14年1月
高井恵理子	国立精神・神経センター	流動 研究員	プロテインX候補タンパク質の同定	平成12年4月～平成13年9月
逆瀬川裕二	国立精神・神経センター	流動 研究員	プロテインX候補タンパク質の精製	平成13年10月～平成17年3月
前野 愉香	国立精神・神経センター	流動 研究員	プロテインX候補タンパク質の精製	平成14年1月～平成15年3月
斎藤 直子	国立精神・神経センター	流動 研究員	CJD治療法開発への応用	平成14年4月～平成17年3月
桜井 総子	国立精神・神経センター	研究員	正常プリオンタンパク質分解酵素の同定	平成12年12月～平成14年7月
松田由紀子	国立精神・神経センター	研究員	プロテインX候補タンパク質の同定	平成12年9月～平成14年3月
田村 美子	国立精神・神経センター	研究員	CJD治療法開発への応用	平成16年5月～平成17年3月

三辺 義雄	国立精神・神経センター	客員 研究員	プリオン斑特異抗体 の同定	平成11年11月～ 平成12年5月
石倉 菜子	国立精神・神経センター	研究員	プリオン斑特異抗体 の同定	平成11年11月～ 平成12年5月
石田 和之	国立精神・神経センター	研究員	プリオン斑特異抗体 の同定	平成12年4月～ 平成13年3月
岸田 日帯	国立精神・神経センター	研究生	C J D 治療法開発へ の応用	平成12年10月～ 平成15年3月
戸田 和之	国立精神・神経センター	研究生	C J D 治療法開発へ の応用	平成13年4月～ 平成15年3月
大久保卓哉	東京医科歯科大学大学院	大学院生	正常プリオンタンパク質分解酵素の同定	平成15年1月～ 平成17年3月
小見 和也	東京大学大学院	大学院生	C J D 治療法開発へ の応用	平成16年5月～ 平成17年3月
大西 悠亮	東京大学大学院	大学院生	C J D 治療法開発へ の応用	平成16年5月～ 平成17年3月
江口 睦志	国立精神・神経センター	技術員	新規プロテオーム解析手法の開発	平成12年4月～ 平成14年1月
青砥久美子	国立精神・神経センター	CREST 研究補助員	正常プリオンタンパク質分解酵素の同定	平成11年12月～ 平成14年11月
犬上 京子	国立精神・神経センター	CREST 研究補助員	プリオン斑特異抗体 の同定	平成12年1月～ 平成12年12月
鎌田 礼子	国立精神・神経センター	CREST 研究補助員	正常プリオンタンパク質分解酵素の同定	平成12年4月～ 平成14年12月
錦織 大祐	国立精神・神経センター	CREST 研究補助員	正常プリオンタンパク質分解酵素の同定	平成12年7月～ 平成13年3月
高越奈緒美	国立精神・神経センター	研究 補助員	プロテイン X 候補タンパク質の同定	平成12年9月～ 平成13年7月
進 町子	国立精神・神経センター	CREST 研究補助員	新規プロテオーム解析手法の開発	平成13年4月～ 平成13年7月
渡辺 直子	国立精神・神経センター	CREST 研究補助員	正常プリオンタンパク質分解酵素の同定	平成13年4月～ 平成13年9月

定塚 昌子	国立精神・神経センター	CREST 研究補助員	正常プリオンタンパク質分解酵素の同定	平成13年8月～ 平成17年3月
渡邊 光太	国立精神・神経センター	CREST 研究補助員	正常プリオンタンパク質分解酵素の精製	平成13年8月～ 平成17年3月
石橋貴代子	国立精神・神経センター	CREST 研究補助員	正常プリオンタンパク質分解酵素の同定	平成14年1月～ 平成17年3月
南里エヴァ・アグネス	国立精神・神経センター	研究 補助員	正常プリオンタンパク質分解酵素の同定	平成14年8月～ 平成17年3月
山田真紀子	国立精神・神経センター	CREST 研究補助員	正常プリオンタンパク質分解酵素の同定	平成15年1月～ 平成17年3月
宮村 操子	国立精神・神経センター	CREST 研究補助員	研究チーム事務員	平成11年11月～ 平成12年3月
岡田 恵	国立精神・神経センター	研究 補助員	研究チーム事務員	平成12年7月～ 平成13年7月
菊地 令子	国立精神・神経センター	CREST 研究補助員	研究チーム事務員	平成12年9月～ 平成14年10月
山浦 優子	国立精神・神経センター	CREST 研究補助員	研究チーム事務員	平成14年10月～ 平成15年12月
太田 千秋	国立精神・神経センター	研究 補助員	研究チーム事務員	平成14年11月～ 平成17年3月
和島 修子	国立精神・神経センター	CREST 研究補助員	研究チーム事務員	平成16年1月～ 平成17年3月

②村本グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
村本 環	東北大学	助教授	脳組織の病理学的解析 脳組織の生化学的解析 抗体のエピトープマッピング	平成11年11月～ 平成17年3月
佐藤 克也	東北大学	大学院生	脳組織の病理学的解析 脳組織の生化学的解析	平成11年11月～ 平成14年3月

田口 讓	東北大学	大学院生	脳組織の病理学的解析 脳組織の生化学的解析	平成11年11月～ 平成15年3月
渡部 由実	東北大学	研究補助員	遺伝子クローニング	平成11年11月～ 平成13年3月
木村 雅恵	東北大学	CREST 研究補助員	症例の遺伝子解析 抗体のエピトープマッピング	平成11年11月～ 平成17年3月
工藤 博子	東北大学	研究補助員	脳組織標本の作製	平成13年4月～ 平成17年3月
吉川 祐子	東北大学	研究補助員	マウスの遺伝子解析	平成13年4月～ 平成17年3月
阿部久美子	東北大学	研究補助員	マウスの遺伝子解析	平成13年4月～ 平成17年3月
韓 芝影	東北大学	大学院生	脳組織標本の染色	平成13年4月～ 平成14年3月
浅野 昌宏	東北大学	大学院生	脳組織標本の染色	平成13年4月～ 平成17年3月
小林 篤史	東北大学	大学院生	脳組織標本の染色	平成13年4月～ 平成17年3月

③西島グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
西島正弘	国立感染症研究所 細胞化学部	部長	研究統括	平成11年11月～ 平成17年3月
山河芳夫	国立感染症研究所 細胞化学部	室長	CLDs構成タンパクの 分析・病態関連タンパ クの検索と同定	平成11年11月～ 平成17年3月
花田賢太郎	国立感染症研究所 細胞化学部	室長	CLDs構成タンパクの 分析・病態関連タンパ クの検索と同定	平成11年11月～ 平成17年3月
深沢征義	国立感染症研究所 細胞化学部	研究員	CLDs構成タンパクの 分析・病態関連タンパ クの検索と同定	平成11年11月～ 平成14年3月

絹見朋也	国立感染症研究所 細胞化学部	流動 研究員	プリオン病発症過程 における異常型プリ オンの蓄積に関する 研究	平成11年11月～ 平成13年3月
萩原健一	国立感染症研究所 細胞化学部	主任 研究官	PrP ^{Sc} の生合成の研究	平成12年11月～ 平成17年3月
中村優子	国立感染症研究所 細胞化学部	研究員	PrP ^{Sc} の生合成の研究	平成13年4月～ 平成17年3月
佐藤滋子	国立感染症研究所 細胞化学部	臨時職員	PrP ^{Sc} の生合成の研究	平成13年4月～ 平成13年11月
大内史子	国立感染症研究所 細胞化学部	CREST 技術員	CLDs 構成タンパク の分析・病態関連タ ンパクの検索と同定	平成12年10月～ 平成14年11月
日下芳友	国立感染症研究所 細胞化学部	CREST 研究員	recPrP ^c 結合タンパク の精製	平成15年8月～ 平成17年3月
井上雄嗣	東京大学大学院 (農) 応用免疫 教室	大学院生 修士過 程)	プリオン病発症過程 における異常型プリ オンの蓄積に関する 研究	平成12年4月～ 平成13年3月

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成12年 9月20日	「脳を守る」金子チームワークショップ	東京ベイ有明 リゾートホテル	23名	研究チームの情報共有を目的に、それぞれのチームによるデータのプレゼンテーションを行った後に、総合討論を行った。今後の研究の進め方等について、有益な結果が得られた。
平成13年 10月19日	「脳を守る」金子チームワークショップ	椿山荘	29名	各チームの研究進捗状況を把握するために、それぞれデータのプレゼンテーションを行った後に、総合討論を行った。研究の進捗状況を踏まえた上での研究の進め方等について、有益な情報交換がなされた。
平成16年 11月4日	プリオン病ワークショップ	国立精神・神経センター	20名	外国における最新の研究情報を得るために、スイスよりDr. Markus Gratzelを招いてセミナーを行った。セミナー後の意見交換を通じ、今後の研究の位置づけ及び進め方についての有用な情報が得られた。

(2) 招聘した研究者等

氏名（所属、役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Markus Glatzel(マークス グラツェル) チューリッヒ大学 助教授	プリオン研究に関するセミナーでの講演	国立精神・神経センター神経研究所	平成16年 11月4日～ 11月5日

6. 主な研究成果物、発表等

(1)論文発表 (国内 82件、海外 40件)

英文原著論文

- 1) Kaneko K, Ball HL, Wille H, Zhang H, Groth D, Torchia M, Tremblay P, Safar J, Prusiner SB, DeArmond SJ, Baldwin MA, Cohen FE: A Synthetic Peptide Initiates Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) Disease in Transgenic Mice. Running title: A peptide causes Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *J. Mol. Biol.* 295: 997-1007, 2000
- 2) Zulianello L, Kaneko K, Scott M, Erpel S, Han D, Cohen FE, Prusiner SB: Dominant-negative inhibition of prion formation diminished by deletion mutagenesis of the prion protein. *J. Virol.* 74: 4351-4360, 2000
- 3) Perrier V, Wallace A, Kaneko K, Safar J, Prusiner SB, Cohen FE: Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 6073-6078, 2000
- 4) Korth C, Kaneko K, Prusiner SB: Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrP (Sc) formation in neuroblastoma cells infected with different prion strains. *J Gen Virol.* 81 Pt 10: 2555-2563, 2000
- 5) Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB: Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature.* 412: 739-743, 2001
- 6) Laws DD, Bitter HM, Liu K, Ball HL, Kaneko K, Wille H, Cohen FE, Prusiner SB, Pines A, Wemmer DE: Solid-state NMR studies of the secondary structure of a mutant prion protein fragment of 55 residues that induces neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 11686-11690, 2001
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) Sasaoka T, Imamura M, Araishi K, Noguchi S, Mizuno Y, Takagoshi N, Hama H, Wakabayashi-Takai E, Yoshimoto-Matsuda Y, Nonaka I, Kaneko K, Yoshida M, Ozawa E:

- Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in gamma-sarcoglycan-deficient mice. *Neuromuscul Disord.* 13: 193-206, 2003
- 11) Korth C, Kaneko K, Groth D, Heye N, Telling G, Mastrianni J, Parchi P, Gambetti P, Will R, Ironside J, Heinrich C, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB: Abbreviated incubation times for human prions in mice expressing a chimeric mouse-human prion protein transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 4784-4789, 2003
 - 12) Yamazaki K, Yamada E, Kanaji Y, Yanagisawa T, Kato Y, Sato K, Takano K, Sakasegawa Y, Kaneko K: Stimulation of cellular prion protein expression by TSH in human thyrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 305: 1034-1039, 2003
 - 13) Sekijima M, Motono C, Yamasaki S, Kaneko K, Akiyama Y: Molecular dynamics simulation of dimeric and monomeric forms of human prion protein: insight into dynamics and properties. *Biophys J.* 85: 1176-1185, 2003
 - 14) Sakasegawa Y, Hachiya NS, Tsukita S, Kaneko K: Ecm10p localizes in yeast mitochondrial nucleoids and its overexpression induces extensive mitochondrial DNA aggregations. *Biochem Biophys Res Commun.* 309: 217-221, 2003
 - 15) Ohkubo T, Sakasegawa Y, Asada T, Kinoshita T, Goto Y, Kimura H, Mizusawa H, Hachiya NS, Kaneko K: Absence of association between codon 129/219 polymorphisms of the prion protein gene and Alzheimer's disease in Japan. *Ann Neurol.* 54: 553-554, 2003
 - 16) Hachiya NS, Sakasegawa Y, Kaneko K: Therapeutic approaches in prion disease. *J Health Sci.* 49: 267-272, 2003
 - 17) Sakasegawa Y, Kishida H, Sakurai M, Asada T, Kinoshita T, Goto Y, Kimura H, Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K: Lack of association between TrkA single nucleotide polymorphisms and sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neurosci Lett.* 353: 49-52, 2003
 - 18) Hachiya NS, Watanabe K, Sakasegawa Y, Kaneko K: Microtubules-associated intracellular localization of the NH2-terminal cellular prion protein fragment. *Biochem Biophys Res Commun.* 313: 818-823, 2004
 - 19) Tremblay P, Ball HL, Kaneko K, Groth D, Hegde RS, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB, Safar SJ: Mutant PrP^{Sc} Conformers Induced by a Synthetic Peptide and Several Prion Strains. *J Virol.* 78: 2088–2099, 2004
 - 20) Hachiya NS, Watanabe K, Yamada M, Sakasegawa Y, Kaneko K: Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 315: 802-807, 2004
 - 21) Kishida H, Sakasegawa Y, Watanabe K, Yamakawa Y, Nishijima M, Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K: Non-glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant-negative mutation inhibits PrP^{Sc} replication *in vitro*. *Amyloid.*

- 11: 14-20, 2004
- 22) Hachiya NS, Sakasegawa Y, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Interaction of D-lactate dehydrogenase protein 2 (Dld2p) with F-actin: Implication for an alternative function of Dld2p. *Biochem Biophys Res Commun.* 319: 78-82, 2004
 - 23) Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Oligomeric Aip2p/Dld2p forms a novel grapple-like structure and has an ATP-dependent F-actin conformation modifying activity *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 320: 1271-1276, 2004
 - 24) Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Oligomeric Aip2p/Dld2p modifies the protein conformation of both properly-folded and misfolded substrates *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 323:339-344, 2004
 - 25) 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^C) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP^C. *Neurosci Lett.* in press
 - 26) Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. A disease isoform of fluorescent prion protein (PrP) with Y145STOP induces mitochondria-mediated apoptosis and forms PrP aggregates. *Biochem Biophys Res Commun.* in press
 - 27) Shimizu S, Hoshi K, Muramoto T, Homma M, Ironside JW, Kuzuhara S, Sato T, Yamamoto T, Kitamoto T: Creutzfeldt-Jakob disease with florid-type plaques after cadaveric dura matter grafting. *Arch Neurol.* 56 (3): 357-362, 1999
 - 28) Supattapone S, Bosque P, Muramoto T, Wille H, Aagaard C, Peretz D, Nguyen HOB, Heinrich C, Torchia M, Safar J, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB, Scott M: Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell.* 96 (6): 869-878, 1999
 - 29) Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Sano C, Hayashi Y, Kutomi T, Yutani C, Kitamoto T: Analyses of Gerstmann-Straussler syndrome with 102Leu219Lys using monoclonal antibodies that specifically detect human prion protein with 219Glu. *Neurosci Lett.* 288 (3): 179-182, 2000
 - 30) Supattapone S, Nguyen HOB, Muramoto T, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB, Scott M: Affinity-tagged miniprion derivatives spontaneously adopt protease-resistant conformations. *J Virol.* 74 (24): 11928-11934, 2000
 - 31) Supattapone S, Muramoto T, Legname G, Mehlhorn I, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB, Scott MR: Identification of two prion protein regions that modify scrapie incubation time. *J Virol.* 75 (3): 1408-1413, 2001

- 32) Kitamoto T, Mohri S, Ironside JW, Miyoshi I, Tanaka T, Kitamoto N, Itohara S, Kasai N, Katsuki M, Higuchi J, Muramoto T, Shin R-W: Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. *Biochem Biophys Res Commun.* 294 (2): 280-286, 2002
- 33) Satoh K, Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Ironside JW, Nagashima K, Yamada M, Sato T, Mohri S, Kitamoto T: Association of an 11-12 kDa protease-resistant prion protein fragment with subtypes of dura graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease and other prion diseases. *J Gen Virol.* 84 (10): 2885-2893, 2003
- 34) Taguchi Y, Mohri S, Ironside JW, Muramoto T, Kitamoto T: Humanized knock-in mice expressing chimeric PrP showed varied susceptibility to different human prions. *Am J Pathol.* 163 (6): 2585-2593, 2003
- 35) T. Oishi, K. Hagiwara, T. Kinumi, Y. Yamakawa, M. Nishijima, K. Nakamura and H. Arimoto: Effects of β -sheet breaker peptide polymers on scrapie-infected mouse neuroblastoma cells and their affinities to prion protein fragment PrP(81-145), *Org. Biomol. Chem.*, 1, 2626-2629, 2003
- 36) Y. Yamakawa, K. Hagiwara, K. Nohtomi, Y. Nakamura, M. Nishijima, Y. Higuchi., Y. Sato, T. Sata and the Expert committee for BSE diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan: Atypical Proteinase K Resistant Prion Protein (PrP^{res}) observed in an apparently healthy 23-Month-Old Holstein Steer. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 56, 221-222, 2003

英文著書

- 37) Prusiner SB, Peters P, Kaneko K, Taraboulos A, Lingappa V, Cohen FE, DeArmond SJ. *Cell Biology of Prions. Prion Biology and Diseases.* New York: Cold Spring Harbor; 349-391, 1999.
- 38) Prusiner SB, Kaneko K, Cohen FE, Safar J, Riesner D. *Some Strategies and Methods for the Study of Prions. Prion Biology and Diseases.* New York: Cold Spring Harbor; 653-716, 1999.
- 39) Prusiner SB, Legname G, DeArmond SJ, Cohen FE, Safar J, Riesner D, Kaneko K. *Some Strategies and Methods for the Study of Prions. Prion Biology and Diseases (2nd edition).* New York: Cold Spring Harbor; 857-920, 2003.
- 40) Sekijima M, Motono C, Yamasaki S, Kaneko K, Akiyama Y. *Molecular Dynamics Simulation of Prion Protein by Large Scale Cluster Computing. Lecture Notes in Computer Science (LNCS).* 2858, pp.476-485, Springer-Verlag, 2003

和文総説等

- 1) 金子清俊. プリオン病 -最新の知見-. *医学のあゆみ.* 189: 89-94, 1999

- 2) 金子清俊. 異常プリオンの形成と細胞障害. 神経内科. 52: 386-392, 2000
- 3) 石倉菜子, 金子清俊. てんかん動物の分子遺伝学. 医学のあゆみ. 193: 505-510, 2000
- 4) 金子清俊. 序に代えて. 脳の科学. 22: 721-722, 2000
- 5) 金子清俊. Protein X-異常プリオン増殖に関与する新しいプレイヤー-. 脳の科学. 22: 743-749, 2000
- 6) 戸田宏幸, 金子清俊. 『Cognitive Disorder –内科医が知っておくべき認知機能障害』 認知機能障害を呈する疾患-プリオン病-. Medicina. 38: 1370-1371, 2001
- 7) 岸田日帯, 戸田宏幸, 金子清俊. 遺伝子改変動物からみたプリオン病研究の進歩. 脳と神経. 53: 821-827, 2001
- 8) 岸田日帯, 戸田宏幸, 金子清俊. 神経変性疾患の最前線-分子病態と治療に向けて-4. プリオン病 分子と治療に向けて. Molecular Medicine. 38: 1254-1260, 2001
- 9) 桜井総子, 伊藤卓, 金子清俊. 神経変性疾患, 異常タンパク質の形成・毒性・分解: プリオン病 プリオンの代謝経路の解明と治療への応用. 細胞工学. 20: 1485-1488, 2001
- 10) 戸田宏幸, 金子清俊. プリオン病の感染対策. 国立医療学誌「医療」. 55: 592-596, 2001
- 11) 桜井総子, 戸田宏幸, 岸田日帯, 八谷如美, 黒岩義之, 金子清俊. プリオンタンパクの代謝と二次構造. ウイルス. 51: 159-162, 2001
- 12) 八谷如美 金子清俊. プリオン病を感染症の立場から考える. 病態から考える感染症 up to date. 1: 1-6, 2001
- 13) 金子清俊. 狂牛病を神経内科医の目で見ると その一 プルシナー教授との思い出. ミクロスコピア. 18: 1-6, 2001
- 14) 金子清俊. 狂牛病を神経内科医の目で見ると その二 死の病原体の実態を求めて. ミクロスコピア. 19: 24-29, 2002
- 15) 金子清俊. 狂牛病を神経内科医の目で見ると その三 プリオン病の現状と近未来への夢. ミクロスコピア. 19: 22-25, 2002
- 16) 八谷如美, 金子清俊. プリオン病. 医学のあゆみ. 200: 1241-1242, 2002
- 17) 金子清俊. ヤコブ病. 医学最前線 132, 健康な子ども,. 352: 38-39, 2002
- 18) 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
- 19) 桜井総子, 金子清俊. プリオンタンパク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

- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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). 月刊保団連. 767: 49-53, 2002.
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 金子清俊. プリオン病の分子生物学. 臨床検査. 46: 1501-1508, 2002
- 28) 金子清俊. Prion 病発症のメカニズム. 神経内科. 57: 377-383, 2002
- 29) 金子清俊. プリオンタンパク関連疾患. 医学のあゆみ. 203: 855-857, 2002
- 30) 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. 医学のあゆみ. 203: 877-880, 2002
- 31) 金子清俊. プリオン病の分子生物学. 臨床検査. 46: 1501-1508, 2002
- 32) 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
- 33) 金子清俊. プリオンタンパク質異常化のメカニズム. 神経研究の進歩. 47: 37-44, 2003
- 34) 金子清俊. 病原体プリオンに強い遺伝子. *Medical Technology*. 31: 351-352, 2003
- 35) 金子清俊. プリオン説. 脳の科学. 25: 365-368, 2003
- 36) 金子清俊. プリオン病研究の歴史と最近の進歩. 最新医学. 58: 959-964, 2003
- 37) 八谷如美, 金子清俊. リコンビナント抗体によるプリオン複製阻止効果および感染細胞からの異常プリオン除去効果. *Brain and Nerve*. 12: 4, 2003
- 38) 逆瀬川裕二, 八谷如美, 金子清俊. プリオン病とラフト. 生体の科学. 54: 316-320, 2003
- 39) 金子清俊: タンパク質のフォールディングとプリオン病. 炎症と免疫. 11: 30-36, 2003

- 40) 八谷如美、逆瀬川裕二、金子清俊: プリオンタンパク質関連因子としての unfolding chaperone. 臨床神経学. 43: 817-819, 2003
- 41) 八谷如美, 金子清俊: プリオン病 最近の知見: 老年精神医学雑誌. 14: 12, 2003
- 42) 大久保卓哉, 水澤英洋, 金子清俊: 変異型 Creutzfeldt-Jakob 病: 日本臨床 62 卷 (増刊号 1), 痴呆症学. 2: 252-256, 2004
- 43) Paul Brown, Rainer Seitz, 水澤英洋, Henry Baron, 金子清俊: プリオンに関する日本と欧米の現状と今後-特に血漿分画製剤に関連して-. JAMA. 2: 120-121, 2004
- 44) 金子清俊: BSE-最新の知見. 日本医事新報. 4165: 46-51, 2004
- 45) 八谷如美, 金子清俊: プリオン病の現況と将来. Current Concepts in Infectious Disease. 23: 18-19, 2004
- 46) 金子清俊: BSE, SARS, 鳥インフルエンザ等の感染症とつきあう方法. 環境会議. 21: 214-217, 2004
- 47) 八谷如美, 金子清俊: プリオン病治療の新たな可能性. バイオインダストリー. 21: 60-66, 2004
- 48) 金子清俊: BSE (牛海綿状脳症)とその食へのリスクについて. 日本食肉加工情報. 647: 19-29, 2004
- 49) 八谷如美, 金子清俊: BSE とプリオンの増殖・感染機構. タンパク質・核酸・酵素. 49: 1005-1007, 2004
- 50) 八谷如美, 金子清俊: プリオン病とミトコンドリアの接点. 医学のあゆみ. 209: 1015-1017, 2004
- 51) 金子清俊: プリオン病. 小児内科. 36: 1166-1169, 2004
- 52) 金子清俊: プロテオミクスによる神経疾患の病態解析. 神経研究の進歩. 48: 700-706, 2004
- 53) 金子清俊: ウシ海綿状脳症 (BSE) . 現代化学. 404: 32-36, 2004
- 54) 金子清俊: プルシナー論文を読む コッホの四原則を証明. 現代化学. 404: 39, 2004
- 55) 金子清俊: B S E 検査. 日本医事新報. 4200: 88-89, 2004
- 56) 金子清俊: プリオンタンパク, プリオン遺伝子. 医学大辞典. 印刷中
- 57) 金子清俊: プリオン病. Medical View. 印刷中
- 58) 金子清俊: 牛海綿状脳症/プリオン病. 日本内科学会誌. 印刷中
- 59) 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 神経. 第 4 章. 印刷中
- 60) 金子清俊: Prion 病の治療法開発. 先端医療, 第 10 章. 印刷中
- 61) 逆瀬川裕二, 八谷如美, 金子清俊: プリオン病. 国立医療学誌「医療」. 印刷中

- 62) 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. 印刷中
- 63) 村本 環: プリオン蛋白の構造と病原性—欠損変異体によるアプローチ. 脳の 科学 22 (7): 737-742, 2000
- 64) 田中智之, 北元憲利, 村本 環, 藤井秀治, 阪本晴彦, 吉田宗平, 辻 力, 北本哲之: ヒト型プリオン蛋白のコドン 219polymorphism を認識する新しい単クローン抗体の作製—その診断的価値—. 病理と臨床, 19 (1): 91-93, 2001
- 65) 村本 環: プリオン病予防・治療法の開発. BIO Clinica, 17(4): 373-377, 2002
- 66) 村本 環: プリオンの感染から中枢神経侵入まで. ファルマシア, 38 (7): 649-652, 2002
- 67) 村本 環: 異常型プリオン蛋白: その検出法, タイピング, プリオン病診断への応用. 医学のあゆみ, 203 (10): 881-887, 2002
- 68) 村本 環: プリオン蛋白変異と発病メカニズム. 神経研究の進歩, 47 (1) : 29-35, 2003
- 69) 村本 環: プリオン蛋白の構造と病原性. 臨床神経学, 43 (11) : 813-816, 2003
- 70) 絹見朋也, 西島正弘, 山河芳夫, プリオン蛋白異常化のメカニズム“脳の科学”22, 731-736, 2000
- 71) 萩原健一, 山河芳夫, 非定型 BSE プリオン “感染・炎症・免疫”, pp 44-46, vol.34, No.3, 2004.

和文著書

- 72) 金子清俊, 宮武 正. 第3編感染症, 第II部感染症と病態, 薬物治療 (薬物の選択と使用) 5. 「プリオン病」. 医療薬学III免疫・がん・感染症. 井上圭三編, 東京化学同人, 東京, 326-329, 2000
- 73) 金子清俊. IV コンフォメーション病. 「プリオン病」. 神経難病の分子機構. タンパク質のコンフォメーション異常による疾患. 石浦章一編, シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京, 138-145, 2000
- 74) 戸田宏幸, 金子清俊. 第6章 感染症と脱髄疾患1, 「プリオン病」. 先端医療シリーズ14 神経・筋疾患 「神経・筋疾患の最新医療」. 杉田秀夫編, 先端医療技術研究所, 東京, 143-148, 2001
- 75) 金子清俊. 日本臨床 (増刊号3), 新世紀の感染症学 (下). 日本臨床社, 東京, 61: 9-16, 2003.
- 76) 金子清俊: プリオン病の治療法: 牛海綿状脳症と人変異型CJD. 老年医学

update2003-04. Medical View社, 171-176, 2003

- 77) 金子清俊. プリオン病の謎に挑む. 岩波 科学ライブラリー 93巻. 岩波書店, 東京, 2003
- 78) 金子清俊. プリオン病の治療法開発. 先端医療シリーズ 30 神経内科「神経内科の最新医療」. 金澤一郎, 柴崎浩, 東儀英夫編, 先端医療技術研究所, 東京, 255-259, 2004

和文学術刊行物

- 79) 金子清俊, 有馬邦正, 小村健, 鈴木ゆめ, 黒岩義之, 児玉南波雄, 後藤雄一, 信国圭吾. クロイツフェルト病感染予防ガイドライン. 厚生労働科学研究費補助金特別事業. P.1-53, 2003
- 80) 金子清俊, 西嶋正弘, 武田伸一, 北條浩彦. 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. 厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業). P. 1-32, 2004
- 81) 金子清俊, 逆瀬川裕二, 八谷如美. 正常プリオンタンパク質関連因子に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業). プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究. p. 173-177, 2004
- 82) 吉川泰弘, 金子清俊, 小野寺節, 甲斐諭, 甲斐知恵子, 北本哲之, 佐多徹太郎, 品川森一, 堀内基広, 山内一也, 山本茂貴, 横山隆. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 内閣府食品安全委員会プリオン専門調査会. p. 1-24, 2004

(2)口頭発表

①招待、口頭講演 (国内 90件、海外 14件)

②ポスター発表 (国内 53件、海外 19件)

海外招待、口頭講演

- 1) Korth C, Kaneko K, and Prusiner SB. Expression of underglycosylated mutant prion protein facilitates conversion into PrP^{Sc} by three different strains of mouse prions in neuroblastoma cells. International Symposium - Characterization and Diagnosis of Prion Diseases in Animals and Man. Tübingen, Germany, Sep 23-25, 1999
- 2) Korth C, Kaneko K, Heye N, Scott M, and Prusiner SB. Transgenic mouse models for Creutzfeldt- Jakob disease. Annual Meeting of Society for Neuroscience. New Orleans, Nov 4-9, 2000

- 3) Kaneko K. Recent progress in prion research. 8th CGGH Symposium. The Japanese Biochemical Society and CGGH Forum, Sapporo, Aug 6 - 9, 2001
- 4) Kaneko K. Attempts to identifying new players in prion propagation and its therapeutic applications. 4th Annual Symposium on Japanese-American Frontiers of Science, Tokyo Oct 9 - 12, 2001
- 5) Peretz D, Vergara J, Mehlhorn I, Williamson AR, Burton DR, Kaneko K, . Prusiner SB. Specific antibody fragments (Fabs) inhibit the formation of pathological prion protein. Poster "Therapeutic Opportunities in Neurodegenerative Diseases", first annual meeting, 2000. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, Nov 30 – Dec 3, 2001
- 6) 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
- 7) Kaneko K. Therapeutic Approaches in Prion Disease. The 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases [III]. Shonan, Oct 2-5, 2002
- 8) Tanaka T, Ito T, Furuta M, Eguchi C, Toda H, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K. In situ phage screening; screening a scFv library on nanogram-sized tissue samples. Understanding Phage Display 2003. Vancouver, Canada, Jan 17-20, 2003
- 9) Motono C, Sekijima M, Yamasaki S, Kaneko K, and Akiyama Y. Differences in dynamics of dimeric and monomeric human prion protein revealed by molecular dynamics simulations. 11th International conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB), Brisbane, 2003
- 10) Sekijima M, Motono C, Yamasaki S, Kaneko K, and Akiyama Y. Molecular Dynamics Simulations of monomeric and dimeric Human Prion Protein (Hu PrP) at normal and elevated temperature. 17TH SYMPOSIUM OF THE PROTEIN SOCIETY. Boston, 2003
- 11) Sekijima M, Motono C, Noguchi T, Kaneko K, and Akiyama Y. Molecular Dynamics Simulation of Wild-Type and Mutant Human Prion Protein: Effect of Pro102Leu. 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science (PRICPS2004). Yokohama, 2004
- 12) Sekijima M, Motono C, Noguchi T, Kaneko K, and Akiyama Y. Structural Changes in flexible region of the Prion Protein induced by P102L Substitution: Investigation through Molecular Dynamics Simulations. 18th Annual Symposium of the The Protein Society. San Diego, 2004

- 13) Kaneko K, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Sakasegawa Y, and Hachiya NS. Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein. 30th FEBS & 9th IUBMB Conference: The Protein World. Prague, July 2-7, 2005
- 14) Hachiya NS, Yamada M, Jozuka A, Sakasegawa Y, and Kaneko K. Prion disease and Unfoldase chaperone: an ATP-dependent novel protein-unfolding chaperone. 30th FEBS & 9th IUBMB Conference: The Protein World. Prague, July 2-7, 2005

国内招待、口頭講演

- 1) 金子清俊. 異常プリオンタンパク複製への新たな参加者-Protein X-. 新潟シンポジウム. 新潟, 11.13, 1999
- 2) 金子清俊. 異常プリオンタンパク複製への新たな参加者-Protein X-. 第4回静岡痴呆シンポジウム. 静岡, 11.20, 1999
- 3) 金子清俊. プリオン病-異常感染型プリオンの増殖機構と治療法開発に向けて-. 第7回東海ニューロサイエンス. 名古屋, 4.15, 2000
- 4) 金子清俊. プリオンタンパク (PrP)代謝・複製に関与する新しい分子群の同定. 長崎大学医学部大学院セミナー. 長崎, 9.27, 2000
- 5) 金子清俊. プリオン病について. 第5回中越老年医学懇話会. 長岡, 11.15, 2000
- 6) 金子清俊. ファージミド抗体ライブラリーを用いた新しいプロテオーム解析手法開発の試み. 所長招聘セミナー. 岡崎国立共同研究機構 生理学研究所, 岡崎, 7.18, 2001
- 7) 金子清俊. 人への感染と治療法. 東京都獣医師会. 牛海綿脳症シンポジウム. 東京, 12.1, 2001
- 8) 金子清俊. 牛海綿脳症と炭疽-人への感染の危険性と治療法. 日本食品衛生学会 日本食品微生物学会緊急公開シンポジウム, 12.19, 2001
- 9) Kaneko K. Therapeutic approaches to the prion disease, 国立精神・神経センター国際セミナー, 東京, Jan 24, 2002
- 10) 金子清俊. 狂牛病とプリオン病のかかわり. 日本臨床化学甲信越支部新潟分科会. 新潟, 2.16, 2002.
- 11) 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, 3.16, 2002
- 12) 金子清俊. プリオン病. 新潟大学脳研究所 新潟ニューロサイエンスセミナー. 新潟, 3.19, 2002

- 13) 金子清俊. 異常プリオンについて. (社)電子情報通信学会安全性研究専門委員会. 東京, 3.20, 2002
- 14) 金子清俊. もう一度, 牛肉の安全性を考える. (株)NHKソフトウェア映像事業部・パネルディスカッション. 大阪, 3.28, 2002
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 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
- 28) 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
- 29) 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

- 30) 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 ^{13}C -MRS への応用を考える会. 東京, 8.29, 2002
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 金子清俊. プリオンタンパク質解析-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
- 34) 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
- 35) 金子清俊. プリオンタンパク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
- 36) 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
- 37) 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
- 38) 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
- 39) Kaneko K. Therapeutic Approaches for Prion Disease. CJD Symposium, Tokyo, Nov 25, 2002
- 40) 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
- 41) 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). KIKUCHI バイオセミナー. 熊本, 2.14, 2003
- 42) 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. 「病原体プリオンの現状, そして高分子とのかかわり」東京工業大学国際高分子基礎研究センター. 東京, 2.18, 2003
- 43) Kaneko K. Protein unfolding assay and its application to identifying prion protein conformation changing factor. タンパク質ダイナミクスとプリオン機構研究会, 岡崎, 3.10-12, 2003

- 44) Kaneko K. Therapeutic approaches for prion disease. COE International Symposium on Recent Advances in Basic and Clinical Neuroimmunology. Nagasaki, Mar 10-12, 2003
- 45) 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). 第 16 回神経内科疾患治療カンファレンス, 宮崎, 3.20, 2003
- 46) 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. 徳島県病院薬剤師会. 徳島, 4.9, 2003
- 47) 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. 兵庫県病院薬剤師会. 神戸, 4.17, 2003
- 48) 金子清俊. プリオン病の免疫療法. 第 11 回神経免疫フォーラム. 金沢. 4.19, 2003
- 49) 金子清俊. プリオンタンパク質関連因子としての unfolding chaperone. 第 44 回日本神経学会総会, 横浜, 5.16, 2003
- 50) 金子清俊. プリオンタンパク質代謝に関与する因子 (群)の同定. BSE 等プリオン病の制圧のための技術開発プロジェクト. つくば, 6.30, 2003
- 51) Kaneko, K. Therapeutic Approaches in Prion Disease. The 2nd Plasma Protein Therapeutics Association (PPTA). Tokyo, Sep 5, 2003
- 52) 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. 日本赤十字社特別講演会. 東京, 9.8, 2003
- 53) 金子清俊. 牛海綿状脳症と人への感染. (社)日本臨床検査薬協会主催学術講演会. 東京, 9.26, 2003
- 54) 金子清俊. 正常型プリオンタンパク質のバイオイメーjing. 早稲田大学理工学部セミナー「システムとしての脳の働きを探る」. 東京, 10.1, 2003
- 55) 金子清俊. Conformation modulating factor and prion replication. 第 76 回日本生化学会大会. 東京, 10.16, 2003
- 56) 金子清俊. クロイツフェルト・ヤコブ病. 国際ヤコブデー. 東京, 11.12, 2003
- 57) 金子清俊. Prion protein and the conformation modifying activity. 分子研研究会 生体分子ダイナミクスと機能・立体構造形成研究会. 岡崎, 12.22, 2003
- 58) 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. 第 10 回原子力安全シンポジウム(原子力安全委員会). 東京, 2.7, 2004
- 59) 金子清俊. 欧州の食のリスクコミュニケーション. 食のリスクコミュニケーション意見交換会(内閣府). 東京, 2.16, 2004
- 60) 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. 食の安全安心フォーラム(内閣府). 大阪, 3.4, 2004

- 61) 金子清俊. BSE とその食へのリスク. 食のリスクコミュニケーション講演会(内閣府). 東京, 3.13, 2004
- 62) 金子清俊. プリオンタンパク質の複製に関与する因子. 産業総合研究所特別セミナー. 東京, 4.7, 2004
- 63) 金子清俊. BSE とその食へのリスク. 食のリスクコミュニケーション講演会(内閣府). 東京, 4.20, 2004
- 64) 金子清俊. BSE とその食へのリスク. 食のリスクコミュニケーション講演会(内閣府). 名古屋, 5.21, 2004
- 65) 金子清俊. BSE とその食へのリスク. 食のリスクコミュニケーション講演会(内閣府). 仙台, 6.8, 2004
- 66) 金子清俊. プリオンたんぱく質の細胞内輸送と細胞死のメカニズム. 第 8 回日本神経ウイルス研究会. 札幌, 6.12, 2004
- 67) 金子清俊. BSE とクロイツフェルト・ヤコブ病. 第 13 回 PCR 感染症検査研究会. 東京, 6.25, 2004
- 68) 金子清俊. BSE とその食へのリスク. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 東京, 8.4, 2004
- 69) 金子清俊. BSE とその食へのリスク. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (厚生労働省). 東京, 8.18, 2004
- 70) 金子清俊. BSE とその食へのリスク. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 大阪, 8.24, 2004
- 71) 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. 全国消費者団体連絡会. 東京, 8.27, 2004
- 72) 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 東京, 9.16, 2004
- 73) 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 大阪, 9.18, 2004
- 74) 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (厚生労働省). 神戸, 9.22, 2004
- 75) 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 岡山, 9.28, 2004

- 76) 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. 日本農芸化学会関東支部大会. 東京, 10.2, 2004
- 77) 金子清俊. プリオン病. 福島県立医科大学脳神経外科学教室招待講演. 福島, 10.21, 2004
- 78) 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. リスクコミュニケーション意見交換会 (農水省). 京都, 11.5, 2004
- 79) 金子清俊. Unfoldin -治療法への応用-. 国際ヤコブデー. 東京, 11.12, 2004
- 80) 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. リスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 鹿児島, 11.15, 2004
- 81) 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. リスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 宮崎, 11.16, 2004
- 82) 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. リスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 京都, 12.13, 2004
- 83) 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. リスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 名古屋, 12.13, 2004
- 84) 村本 環. プリオン蛋白—その構造と病原性. 日本生物物理学会第38回定例総会シンポジウム「タンパク質のフォールディング問題—立体構造予測から分子病理まで」. 和光市, 10, 1999
- 85) 村本 環. プリオン蛋白の構造と病原性. 第121回日本医学会シンポジウム「プリオン病」. 神奈川県足柄下郡箱根町 パレスホテル箱根, 8, 2002
- 86) 村本 環. 欠損変異プリオン蛋白を用いたプリオン構造の解析. 第75回日本生化学会大会シンポジウム「プリオン病」. 京都市, 10, 2002
- 87) 村本 環. プリオン蛋白の構造と病原性. 第44回日本神経学会総会シンポジウム「日本におけるプリオン病(神経系感染症最近の話題)」. 横浜市, 5, 2003
- 88) 村本 環. プリオン蛋白の構造と病原性. 第3回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「今日の蛋白質フォールディング研究 —フォールディング病研究をふくめて—」. 札幌市, 6, 2003
- 89) 山河芳夫. BSE 検査をめぐる問題 国際シンポジウム: 動物プリオン病の診断と疫学. 東京, 2.21, 2004
- 90) 山河芳夫. BSE 検査の現状: PrPBSE の生体内分布と非定型プロテアーゼ抵抗性プリオンタンパク質. 神奈川県食肉衛生技術研修会講演. 神奈川, 2.21, 2004

海外ポスター発表

- 1) Sasaoka T, Yoshimoto-Matsuda Y, Esumi E, Nabeshima Y, Kaneko K, Mishina M, Nabeshima Y. Conditional knock-in mice harboring an amino acid substitution of NMDA receptor. 40th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. San Francisco, Dec 9-13, 2000
- 2) Sasaoka T, Yoshimoto-Matsuda Y, Esumi E, Nabeshima Y, Manabe T, Noguchi S, Miyazaki J, Kaneko K, Mishina M, Nabeshima Y. Development of A New Method for An Amino Acid Substitution in Mice. 9th International Catecholamine Symposium (ICS 2001). Kyoto, Mar 31 - Apr 5, 2001
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) Yamazaki K, Yamada E, Kanaji Y, Sato K, Takano K, Sakasegawa Y, and Kaneko K. Regulation of Cellular Prion Protein (PrP^C) mRNA Expression by TSH in Human Thyroid Follicles. The 74th Annual Meeting of the American Thyroid Association. Los Angeles, Oct 9-13, 2002
- 8) Hachiya NS, Sakasegawa Y, Jozuka A, Sasaki H, Tsukita S, and Kaneko K. A novel ATP-dependent protein chaperone, Unfoldin. 42th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Francisco, Dec 14-18, 2002
- 9) Hachiya NS, Sakasegawa, and Kaneko K. Unfoldin, an ATP-dependent chaperone with novel grappling mechanism in a cell cycle-dependent manner. 43th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Francisco, Dec 13-17, 2003
- 10) Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, and Kaneko K. Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrP^C) invokes neuronal

- apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP^C. International Symposium of Prion Diseases in Sendai JAPAN. Sendai, Oct 31-Nov. 2, 2004
- 11) Hachiya NS, Yamada M, Jozuka A, Kozuka Y, Sakasegawa Y, and Kaneko K. Prion disease and protein unfolding chaperone:Unfoldin/Oligomeric Aip2p. International Symposium of Prion Diseases in Sendai, JAPAN. Sendai, Oct 31-Nov. 2, 2004
 - 12) Hachiya NS, Watanabe K, Sakasegawa Y, and Kaneko K. Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein. International Symposium of Prion Diseases in Sendai JAPAN. Sendai, Oct 31-Nov. 2, 2004
 - 13) Sakasegawa Y, Kishida H, Watanabe K, Hachiya NS, and Kaneko K. A non-glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant negative mutation inhibits PrP^{Sc} replication *in vitro*. International Symposium of Prion Diseases in Sendai JAPAN. Sendai, Oct 31-Nov. 2, 2004
 - 14) Iwanami N, Sankawa U, Saido TC, Yamakawa Y, Nishijima M, and Kaneko K. Screening study of prion binding agents and their inhibitory effect on the conversion of prion protein. International Symposium of Prion Diseases in Sendai JAPAN. Sendai, Oct 31-Nov. 2, 2004
 - 15) Hachiya NS, Yamada M, Jozuka A, Sakasegawa Y, and 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
 - 16) Kaneko K, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Sakasegawa Y, and Hachiya NS. Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrP^C) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP^C. KEYSTONE SYMPOSIA: Molecular Mechanisms of Transmissible Spongiform Encephalopathies. Colorado, Jan. 11 -15, 2005
 - 17) Yoshio Yamakawa, Kenichi Hagiwara, Kyoko Nohtomi, Yuko Nakamura, Yoshimi Higuchi, Yuko Sato, Tetutarō Sata and the expert committee for BSE diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan: BSE inspection in Japan and finding of atypical PK-resistant Prion Protein (PrP^{res}) in an apparently Health 23-month-old Holstein Steer, Prion 2004: First International Conference of the European Net Work of Excellence NeuroPrion, , Paris, France, May 24-25, 2004
 - 18) Masahiro Nishijima, Yoshio Yamakawa, Ken-ichi Hagiwara, Kyoko Nohtomi, Yuko Nakamura, Yoshimi Higuchi, Yuko Sato, Tetsutarō Sata: Pharmaceutical Sciences World Congress, Kyoto, Japan, May 30-June 3, 2004
 - 19) Takuji Yamamoto, Shunji Hattori, Yuko Ushiki, Takashi Yokoyama, Yuichi Tagawa, Hiroe Tsukagoshi-Nagai, Tetsutarō Sata, Yoshio Yamakawa, William W Hall, Noriaki Kinoshita, and Shinkichi Irie: BSE screening kit with simplified preparation method for EIA sample,

International symposium: Prion Diseases, Food and Drug Safety, Sendai, Japan, Oct. 31-Nov. 2, 2004.

国内ポスター発表

- 1) 古田大, 伊藤卓, 江口睦志, 高井恵理子, 田中寅彦, 金子清俊. フェージライブラリーを用いた二次元分離タンパク質群に対する特異抗体の取得. 第23回 日本分子生物学会年会. 神戸, 12.15, 2000
- 2) 笹岡俊邦, 松田由喜子, 江隅英作, 鍋島曜子, 真鍋俊也, 野口茂, 宮崎純一, 金子清俊, 三品昌美, 鍋島陽一. 新しい変異導入法の開発による NMDA 受容体アミノ酸置換マウスの作成. 第23回 日本分子生物学会年会. 神戸, 12.14, 2000
- 3) 古田大, 江口睦志, 伊藤卓, 高井恵理子, 田中寅彦, 金子清俊. 二次元分離タンパク質群に対する特異フェージ抗体の取得. 第24回日本分子生物学会年会. 横浜, 12.9-12, 2001
- 4) 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
- 5) 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タンパク質の新しい解析法. 第43回日本神経学会. 札幌, 5.29-31, 2002
- 6) 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
- 7) 渡邊光太, 逆瀬川裕二, 八谷如美, 金子清俊. プリオンタンパク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
- 8) 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
- 9) 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. プリオンタンパク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
- 10) 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
- 11) 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

- 12) 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
- 13) 戸田宏幸, 逆瀬川裕二, 有馬邦正, 黒岩義之, 金子清俊. Pick 小体のタンパク質解析. 第 75 回日本生化学大会. 京都, 10.14-17, 2002
- 14) 田中寅彦, 伊藤卓, 古田大, 江口睦志, 戸田宏幸, 若林 (高井) 恵理子, 金子清俊. フェージライブラリーを用いた, 組織切片上の微量抗原の同定 第 75 回日本生化学大会. 京都, 10.14-17, 2002
- 15) 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タンパク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
- 16) 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 フェ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
- 17) 岩浪直子, 三川潮, 西道隆臣, 金子清俊. プリオン結合物質によるプリオンタンパク構造変換阻害効果. 日本薬学会第 123 年会, 長崎, 3.27, 2003
- 18) 金子清俊. 血漿分画製剤の安全性, Consensus Conference on the Blood Product Safety. [東京, 3.28, 2003
- 19) 岸田日帯, 逆瀬川裕二, 山河芳夫, 黒岩義之, 八谷如美, 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 (第二報). 第 44 回日本神経学会総会. 東京. 5.15, 2003
- 20) 戸田宏幸, 逆瀬川裕二, 有馬邦正, 黒岩義之, 金子清俊. 神経変性疾患にみられる神経内封入体の構成タンパク質の解析. 第 44 回日本神経学会総会. 東京. 5.16, 2003
- 21) 八谷如美, 渡邊光太, 川端真紀子, 逆瀬川裕二, 金子清俊. Microtubule dependent intracellular traffic of prion protein. 第 76 回日本生化学大会. 東京. 10.16, 2003
- 22) 八谷如美, 定塚昌子, 逆瀬川裕二, 金子清俊. Making of F-actin ring formation through the Unfoldin's activity in vitro. 第 76 回日本生化学大会. 東京. 10.18, 2003
- 23) 逆瀬川裕二, 八谷如美, 金子清俊. Purification of an ATP-dependent protein unfolding ctivity from mouse neuroblastoma N2a cells. 第 76 回日本生化学大会. 東京. 10.16, 2003

- 24) 岸田日帯, 逆瀬川裕二, 山河芳夫, 西島正弘, 黒岩義之, 八谷如美, 金子清俊. Combination treatment with the recombinant prion protein (rPrP-Q218K) reduced cytotoxicity of quinacrine in mammalian culture cells. 第76回日本生化学会大会. 東京. 10.16, 2003
- 25) Iwanami N, Sankawa U, Saido TC, Yamakawa Y, Nishijima M, and Kaneko K. Screening study of prion binding agents and their inhibitory effect on the conversion of prion protein. 第76回日本生化学会大会. 東京. 10.16, 2003
- 26) 渡邊 光太, 八谷 如美, 逆瀬川 裕二, 金子 清俊. タンパク質高次構造を unfold するシャペロン: Unfoldin による病因性タンパク質凝集体の unfolding. 第26回日本分子生物学会年会. 神戸. 12.11, 2003
- 27) 渡邊 光太, 八谷 如美, 逆瀬川 裕二, 金子 清俊. Microtubule-dependent anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein. 第26回日本分子生物学会年会. 神戸. 12.11, 2003
- 28) 逆瀬川裕二, 岸田日帯, 桜井総子, 朝田隆, 木之下徹, 後藤雄一, 木村英雄, 黒岩義之, 八谷如美, 金子清俊. 日本人における NGF レセプター遺伝子 TrkA の一塩基多型とアルツハイマー病発症リスクとの関連性について. 第26回日本分子生物学会年会. 神戸. 12.13, 2003
- 29) 大久保卓哉, 逆瀬川裕二, 朝田隆, 木之下徹, 後藤雄一, 木村英雄, 水澤英洋, 八谷如美, 金子清俊. Absence of association between codon 129 / 219 polymorphisms of the prion protein gene and Alzheimer's disease in Japan. 第26回日本分子生物学会年会. 神戸. 12.11, 2003
- 30) 八谷如美, 大久保卓哉, 川端真紀子, 渡邊光太, 逆瀬川裕二, 金子清俊. 細胞質に蓄積したプリオンタンパク質 (PrP^C) によって惹起されるミトコンドリア由来アポトーシス機構の解析. 第3回ミトコンドリア学会年会. 福岡. 12.19, 2003
- 31) 池袋 一典, 小笠原大輔, 金子 清俊, 早出広司. 大腸菌組換え生産におけるプリオンの水溶性画分への発現. 日本生物工学会. 名古屋. 9.21, 2004.
- 32) 八谷如美, 定塚昌子, 逆瀬川裕二, 金子清俊. プリオン病とタンパク質アンフォールディング因子; Unfoldin. 第27回神経科学会・第47回日本神経化学会大会. 大阪. 9.21-23, 2004
- 33) 渡邊光太, 八谷如美, 定塚昌子, 逆瀬川裕二, 金子清俊. 正常型プリオンタンパク質の細胞内輸送機構の解析. 第27回神経科学会・第47回日本神経化学会大会. 大阪. 9.21-23, 2004

- 34) 逆瀬川裕二, 八谷如美, 金子清俊. HSP90 β による正常型プリオンタンパク質高次構造変換機構の解析. 第27回神経科学会・第47回日本神経化学会大会. 大阪. 9.21-23, 2004
- 35) 金子清俊, 山田真紀子, 定塚昌子, 大久保卓也, 逆瀬川裕二, 八谷如美. プリオンタンパク質過剰発現老齡トランスジェニックマウスに於けるミトコンドリア由来アポトーシス機構. 第27回神経科学会・第47回日本神経化学会大会. 大阪. 9.21-23, 2004
- 36) 八谷如美, 山田真紀子, 渡邊光太, 定塚昌子, 逆瀬川裕二, 金子清俊. プリオンタンパク質過剰発現によるミトコンドリア由来神経細胞死機構. 第77回日本生化学会大会. 横浜. 10.13-16, 2004
- 37) 金子清俊, 山田真紀子, 定塚昌子, 大久保卓也, 逆瀬川裕二, 八谷如美. プリオン蛋白質過剰発現老齡トランスジェニックマウスにおけるミトコンドリア由来神経細胞死. 第77回日本生化学会大会. 横浜. 10.13-16, 2004
- 38) 逆瀬川裕二, 岸田日帯, 渡邊光太, 八谷如美, 金子清俊. リコンビナントプリオンタンパク質のドミナントネガティブ効果による異常感染型プリオン感染機構の解析. 第77回日本生化学会大会. 横浜. 10.13-16, 2004
- 39) 岩浪直子, 三川潮, 西道隆臣, 金子清俊. プリオン結合物質によるプリオンタンパク構造変換阻害効果. 第77回日本生化学会大会. 横浜. 10.13-16, 2004
- 40) 池袋一典, 野間崇央, 早出広司, 大久保卓哉, 逆瀬川裕二, 八谷如美, 金子清俊. 組織切片中の標的タンパク質に結合するアプタマーの探索法の開発. 第27回日本分子生物学会年会. 神戸. 12.8-11, 2004
- 41) 田村美子, 功刀浩, 金子清俊, 北條浩彦. DNAメチル化によるエピジェネティックなヒトゲノム修飾に関する研究. 第27回日本分子生物学会年会. 神戸. 12.8-11, 2004
- 42) 大西悠亮, 小見和也, 田村美子, 徳永勝士, 金子清俊, 北條浩彦. 対立遺伝子特異的RNAi効果の簡易評価システム. 第27回日本分子生物学会年会. 神戸. 12.8-11, 2004
- 43) 池袋一典, 野間崇央, 早出広司, 大久保卓哉, 逆瀬川裕二, 八谷如美, 金子清俊. 組織切片中の標的タンパク質に結合するアプタマーの探索法の開発. 2005年度日本農芸化学会大会. 札幌. 3.28-30, 2005
- 44) 井上雄嗣¹, 大内文子², 神山恒夫³, 岩崎拓也⁴, 小野寺節⁵, 西島正弘², 山河芳夫²

¹ 東工大(資源化学研究所) ² 感染研・細胞化学部 ³ 同・獣医科学部 ⁴ 同・感

- 染病理部 5.東大(農) . マウスプリオン病発症過程における脳、脾臓への異常プリオンタンパク質の蓄積. 第74会日本生化学会大会. 京都. 10, 2001
- 45) 絹見朋也¹、山河芳夫¹、萩原健一¹、金子清俊²、西島正弘¹ ¹ 感染研・細胞化学部 ² 国立精神神経センター疾病研究部第7部 遺伝性プリオン病 M232R 変異とプリオンタンパクの異常化. 第74会日本生化学会大会. 京都. 10, 2001
- 46) 大内史子、山河芳夫、西島正弘 神山恒夫. プリオンタンパク質の competitive assay による定量. 第74会日本生化学会大会. 京都. 10, 2001
- 47) 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 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. 第75会日本生化学会大会. 京都. 10, 2002
- 48) 大内史子、山河芳夫、西島正弘 (国立感染研・細胞化学部) プリオン病のプロテオーム解析. 第75会日本生化学会大会. 京都. 10, 2002
- 49) Y. Yamakawa, K.Hagiwara, M.Nishijima, K. Nohtomi and T.Sata. Tissue distribution of Protease Resistant Prion Protein in Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) using Western Blotting Assay. 第76会日本生化学会大会. 横浜. 10, 2003
- 50) Y.Nakamura, K.Hagiwara, F.Ohuchi, K.Nohtomi, M.Nishijima and Y. Yamakawa, A synthetic Peptide Fragment from Prion Protein Inhibits the Accumulation of Proteinase K resistant Prion Protein. 第76会日本生化学会大会. 横浜. 10, 2003
- 51) 金井朋子、土屋耕太郎、山河芳夫、佐多徹太郎、小野寺節、上田 進. 牛プリオンタンパク質に対する新規抗体の作製と有用性の検討. 第138回日本獣医学会. 札幌. 9, 2004
- 52) 萩原健一、中村優子、日下芳友、納富香子、大内史子、西島正弘、山河芳夫. MHM2-正常プリオン蛋白質を発現する神経芽細胞 N2a を用いたプリオン蛋白質の構造変換の解析. 第77会日本生化学会大会. 横浜. 10, 2004
- 53) 土屋耕太郎、山河芳夫、佐多徹太郎、小野寺節、上田 進. プリオンタンパク質に対する新規抗体の作製と性状の解析. 第52回日本ウイルス学会. 横浜. 11.21-23, 2004

③プレス発表 なし

(3)特許出願（国内 2件、海外 1件）

①国内

- ・「高効率抗体スクリーニング法」（2D-PP法） 日本国特許庁（第3375941号）
11. 24, 2000 出願、29.11, 2002 公告
- ・「高効率抗体スクリーニング法」（組織ファージパニング法）
特願2000-373259 11. 24, 2000 出願

②海外

「高効率抗体スクリーニング法」/PCT/JP01/04732, 11. 24, 2000

(4)新聞報道等

①新聞報道

- 1) 2001年8月16日 「狂牛病の抗体作りに成功・・・日米の研究者」日本経済新聞
- 2) 8月16日 「ヤコブ病治療の抗体発見・・・日米共同チーム」 読売新聞
- 3) 8月16日 「ヤコブ病の治療につながる抗体作製・日米の研究者ら」 朝日新聞
- 4) 9月19日 朝日新聞
- 5) 9月30日 日経新聞
- 6) 10月6日 講談社週刊現代
- 7) 10月7日 サンデー毎日
- 8) 11月8日 日刊工業新聞 トリガー
- 9) 11月10日 日経メディカル
- 10) 2003年6月号 八谷如美, 金子清俊. プリオン病治療薬. 日経バイオビジネス
- 11) 2004年3月3日 大阪読売新聞 「ヤコブ病抑える防御型プリオン」たんぱく質
- 12) 5月31日 日経新聞掲載 「正常型プリオン: 過剰になると細胞死」
- 13) 9月21日 八谷如美、金子清俊. 異常プリオンを解く分子 国立精神・神経センターが発見 BSE 治療に期待. 日本経済新聞社など新聞各紙(数十誌)

②受賞

- 八谷如美 2003年 第31回 内藤コンファレンス記念特定助成金
- 八谷如美 2004年 The First Prize for the Poster Presentation in the International Symposium of Prion Disease
- 八谷如美 2005年 Keystone Symposium Scholarship Award

(5)その他特記事項 なし

7. 結び

「脳を守る」研究領域は、研究総括杉田秀夫先生により「脳の老化、疾病のメカニズムの理解と制御を目標とする研究を対象とする領域」とし、我々を含む3チームが最終年度を任されてまいりました。

我々のチームは、日本におけるプリオン研究のバックグラウンドを構築するところからスタートしなければならなかった上に、2001年度には牛海綿状脳症（BSE）の日本での発見という大激震に見舞われました。この問題は、日本における食品安全委員会の設立につながった上に、2003年度には北米大陸におけるBSEの発見といった政治的な局面も加わり、現在も社会的な注目を集め続けております。そのような状況下におきまして、いくつかの研究の”seeds”を得ることができましたことは、大変に有意義であったと考えます。今後は、これらの”seeds”をさらに成長させて、開花、結実させていく必要がございますとともに、社会的な要求にこたえるべく、社会とのコミュニケーションも重視していきたいと考えております。

最後になりますが、このような私たちに対し大変暖かいエールを送り続けていただきました杉田秀夫先生に心より感謝申し上げます。さらに、科学技術振興機構の本部の皆様や、田中建昭技術参事、矢野眞次、渡森一両事務参事を始めとする「脳を守る」事務所の方々の親身なお力添えに、厚く御礼申し上げます。そして何よりも、本研究に携わっていただいた研究員、研究補助員、事務の方々、共同研究者の方々に、感謝申し上げます。



金子研究代表チームメンバー

(平成16年4月14日撮影)