

総 説

プリオン病解明へのアプローチ Strategic approach to prion disease

八 谷 如 美
Naomi S. HACHIYA

東京医科大学生理学第二講座
Second Department of Physiology, Tokyo Medical University

はじめに

プリオンとは、ヒトのプリオン病であるクロイツフェルト＝ヤコブ病や昨今社会問題になっている牛海綿状脳症 (Bovine Spongiform Encephalopathy; BSE) の原因となる未だ謎の多い感染因子である。当初、プリオン病の原因はスローウイルスによるものとされていたが、1980年代になってカリフォルニア大の Prusiner は、プリオン病の原因が蛋白質のみからなるという「プリオン仮説」を提唱した。当時この大胆な仮説には多くの反論があり、その主なものは、感染の原因となるものなら増殖する必要があり、そのためには核酸成分が必要であろう、というものであった。そこで彼らは核酸を全く含まないに等しい蛋白質画分によって、プリオン病に罹患したハムスターから健康なハムスターに疾患が伝播することを示し、この成功によってプリオンという概念は受け入れられるようになったのである。

ヒトのプリオン病は、クロイツフェルト＝ヤコブ病 (CJD) と呼ばれる病気がその代表である。CJD には、原因不明の孤発性、遺伝性及び家族性を有するゲルストマン症候群 (GSS)、家族性致死性不眠症 (FFI)、感染性に分類される。感染性のプリオン病には、主に医療行為による医原性プリオン病 (乾燥硬膜移植後

CJD、いわゆる葉害ヤコブ病など) が挙げられる。さらには近年、ウシの BSE に由来するとされる変異型クロイツフェルト＝ヤコブ病 (variant CJD, vCJD) もイギリスを始め日本を含むいくつかの国において発症が認められている。さらに動物においては、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、ウシにおける海綿状脳症、所謂 BSE、サル、ネコ、ミンク、チーターをはじめ、野生鹿のプリオン病である CWD などが挙げられる (表 1)¹⁾。残念ながら、プリオン病は現時点においても致死性の疾患であることに変わりはない。

プリオン病の原因となるプリオン蛋白質はアミノ末端側に小胞体移行シグナル、カルボキシル末端に GPI アンカーシグナルを持つ糖蛋白質であり、分泌蛋

表 1 プリオン病

プリオン病の種類	
ヒト	弧発性クロイツフェルト＝ヤコブ病 (CJD) 家族性プリオン病 (GSS, FFI など) 感染性 (医原性) プリオン病 (硬膜移植など) 変異性 CJD (variant CJD; vCJD)
ウシ	牛海綿状脳症 (BSE)
ヒツジ	スクレイピー
シカ	Chronic Wasting Disease (CWD)
他サル、ネコ、ミンク、チーターなど	

2005年9月16日受付、2005年10月5日受理

キーワード: prion protein, prion disease, microtubule, apoptosis, molecular chaperone

(別冊請求先: 〒160-8402 東京都新宿区新宿 6-1-1 東京医科大学生理学第二講座 八谷如美)

白質の輸送経路を通して最終的に細胞膜上ラフトに局在する。正常型プリオン蛋白質 (PrP^C) とプリオン病を引き起こす異常感染型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})ではアミノ酸配列に違いはなく、その立体構造のみが異なっている。図1にハムスターにおける正常型と異常感染型のプリオン蛋白質の立体構造の違いを示す。正常型は α -ヘリックスを多く含み、可溶性で柔軟な構造をしているが、異常感染型は β -シート構造に富み、蛋白質分解酵素に耐性で凝集体を形成する。異常感染型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) によるプリオン病についてはこれまで多く研究報告があるにも関わらず、正常型プリオンタンパク質 (PrP^C) の生理的な機能は未だ明らかではない。最終的なプリオン病の治療法、予防法および病態の解明にはプリオン蛋白質そのものの細胞内挙動や生理機能を明らかにすることが重要であると我々は考えている。そこで、これまで主に3つのアプローチによって研究を行ってきた。即ち、(1) プリオン蛋白質の生理機能を解明するため PrP^C の細胞内輸送機構を可視化の系によって解析する、(2) プリオン病と神経細胞死の関連を培養細胞系を用いて解析する、(3) PrP^C が PrP^{Sc} へと変換する機構を明らかにする、である。本稿ではこれらの研究に付き概説する。

プリオン蛋白質の生理機能を解明するため PrP^C の細胞内輸送機構を可視化の系によって解析する

生体内における正常な代謝過程において、PrP^C はその中心領域で、未同定の分解酵素により切断を受けることが知られている (図2A)。切断される PrP^C のアミノ酸配列上の部分は PrP^{Sc} への変換に際して β -シート構造をとらうるのに必須な領域に相当するため²⁾、切断されるか PrP^{Sc} へ変換されるかという互いに相補的な関係を有する。言い換えれば、この部分で切断されてしまえばもはや PrP^{Sc} への変換は生じ得ないため、プリオン病の予防法・治療法開発の点から非常に重要である。そこで我々は、この切断の過程を細胞内可視化の系で生細胞を用いて観察する系を立ち上げた。まず、N末端、C末端両方に異なる色の蛍光蛋白質を融合したキメラプリオン蛋白質を作成しマウス神経芽細胞腫由来 N2a 細胞へ導入した。この融合プリオン蛋白質が細胞内で正しく発現し生理的な切断を受けることができれば、切断後の N末端側を含むペプチド、C末端側を含むペプチド、切断されていない全長のプリオン蛋白質、は3者とも蛍光顕微鏡下で異なる色で観察されるはずである (図2B)。これらは細胞内で生理的な切断を受け、N末端側を含む断片は「細胞内に局在」、一方、C末端側を含む断片は「細胞膜上に局在」していることが明らかになった³⁾ (図2C)。

一方、この生細胞におけるプリオン蛋白質の分解過

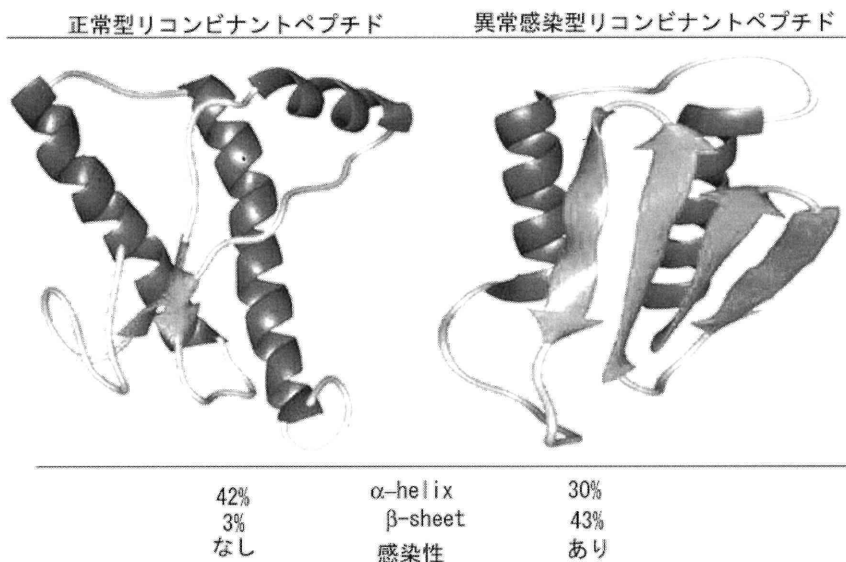


図1 ハムスター正常型と感染型のプリオン蛋白質立体構造の違い
 溶液 NMR によるハムスター正常型リコンビナントペプチド (SHaPrP90-231) の立体構造予測モデル (左のパネル) およびそれを元にした異常感染型リコンビナントペプチド (SHaPrP90-231) の立体構造コンピューターモデル予測図を示す。

程観察の際、我々は PrP^C N末端を含むフラグメントが細胞内を移動している様子を見出ししていた。そこで、この現象をさらに詳細に解析するために N末端に GFP を融合したプリオン蛋白質を新たに作成し、N2a 細胞に発現させたのち、その移動を生細胞におけるタイムラプス動画撮影にて詳細に記録し解析した。その結果、核近傍から細胞膜方向へ向かう正方向、および細胞膜側から核近傍へ向かう逆方向、の2つの輸送方向が存在することを見出した。これらの輸送は、阻害剤および阻害抗体を用いた実験結果から、正方向への移動に関するモータータンパク質としてキネシンが、逆方向への移動にはダイニンが関わっていることを明らかにした。また、これらの平均の移動速度は正方向

に 140-160 nm sec⁻¹、逆方向に 1-1.2 μm sec⁻¹ であることがわかった。次に、同定されたモータータンパク質が PrP^C のアミノ酸配列中どの部分と相互作用し機能しているのかを調べる目的で、様々な長さにトラン

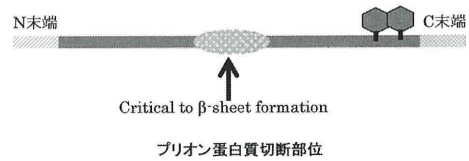


図 2A プリオン蛋白質の構造および切断箇所

● はプリオン蛋白質 C 末端側に付加される糖鎖、
 ■ は生理的に切断される箇所および異常感染型への高次構造変換に重要な箇所を示す。

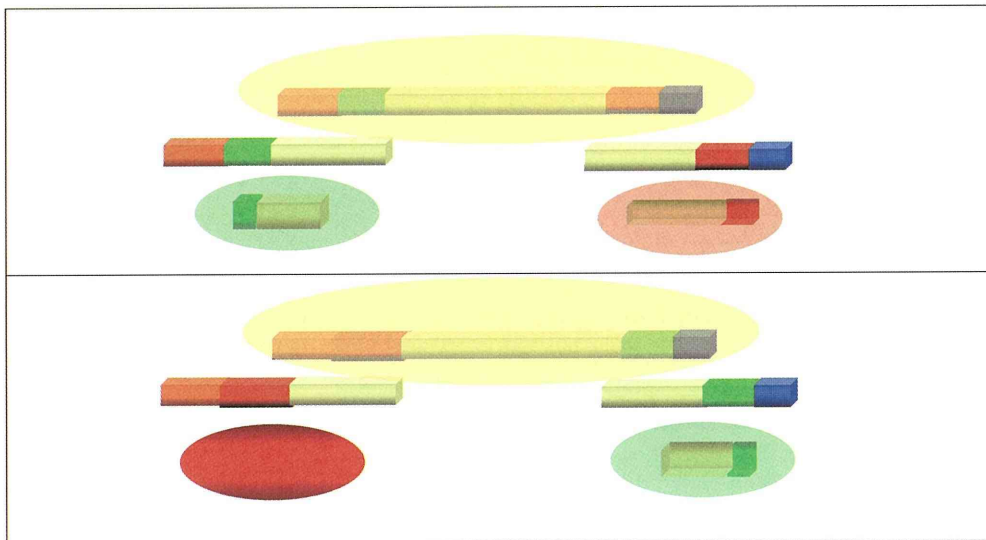


図 2B PrP^C の細胞内切断を生細胞で観察するために作成したコンストラクトの概要
 切断を受けたプリオン蛋白質は各フラグメントが異なる色で発色すると予想される。

■ GFP ■ DsRedGFP ■ 小胞体移行シグナル ■ GPI アンカー付加シグナル

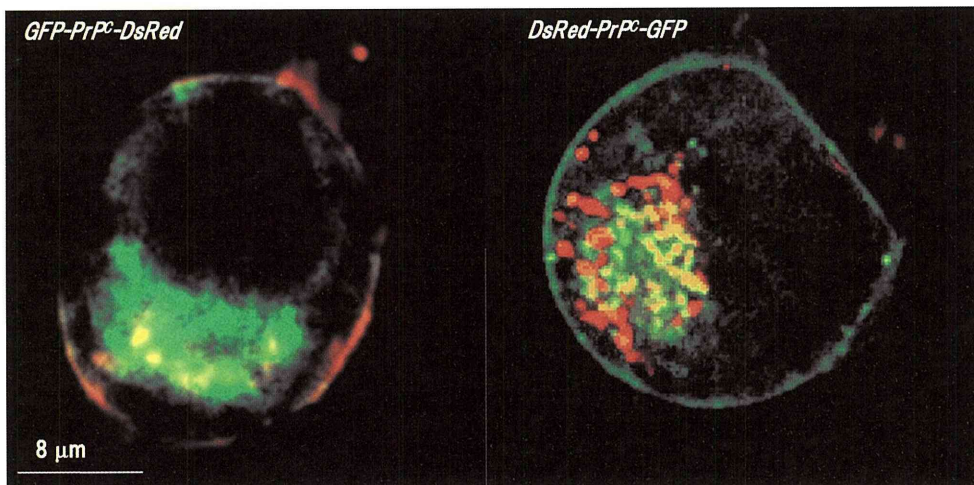


図 2C 切断を受けたプリオン蛋白質
 各フラグメントが異なる色で発色し切断を生細胞で可視化することができた。

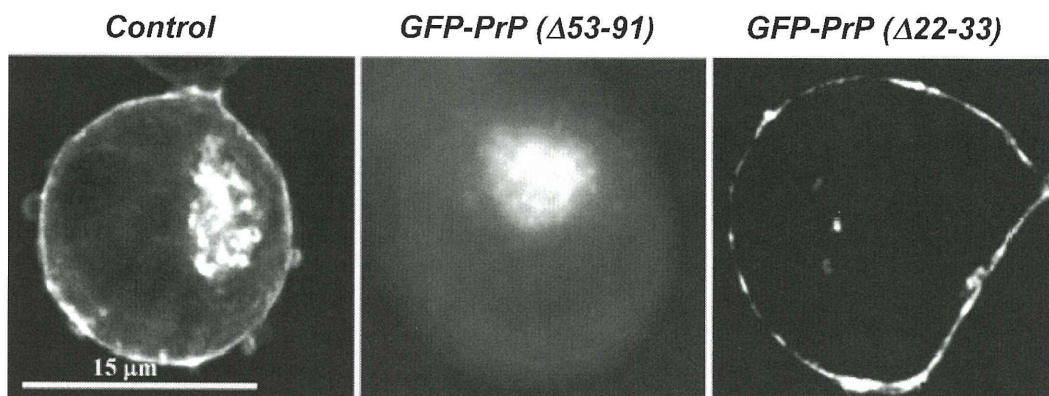


図 2D プリオン蛋白質上の正方向、逆方向の輸送に関する領域
PrP^c は細胞内および細胞膜状にその局在を持ち通常末端を含むフラグメントは正方向・逆方向の輸送を行っている (Control)。
様々な長さのトランケート PrP^c を作成し発現させた結果から正方向の輸送にはアミノ酸配列上 53 番目から 91 番目までが関わっておりこの領域を欠損したプリオン蛋白質は細胞膜側へと移動できない (GFP-PrP Δ53-91)。一方、逆方向には 53 番目から 91 番目までが関わっている (GFP-PrP Δ22-33)。

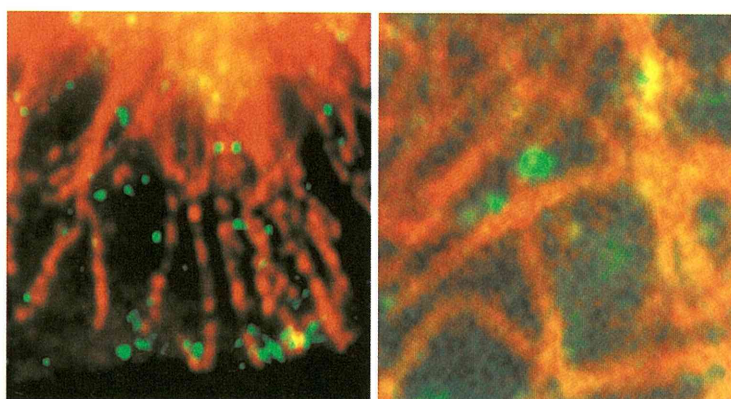


図 2E 微小管上に局在するプリオン蛋白質
赤は抗チューブリン、緑が内在性プリオン蛋白質を示す。微小管上に PrP^c が局在している様子が観察された。

トランケートしたプリオン蛋白質を作成し N2a 細胞に導入した。同様のタイムラプス撮影による観察の結果、キネシンとは PrP^c のアミノ酸配列上 53 番目から 91 番目、ダイニンとは 23 番目から 33 番目のアミノ酸で相互作用していることを明らかにした⁴⁾ (図 2D)。観察された PrP^c の細胞内での動きは微小管阻害剤であるノコダゾールにより顕著に阻害されたことから、その細胞内の局在には微小管が関与していることが示唆された。そこで、チューブリンを認識する抗体および内在性の PrP^c を認識する抗体を用いて蛍光抗体法により観察したところ、細胞内の PrP^c は微小管上に局在していることが判明した³⁾ (図 2E)。

プリオン病と神経細胞死

PrP^c は分泌系を経由して輸送され細胞膜上に提示される分子であるが、小胞体内で正しい立体構造を形成できなかった場合は小胞体から逆輸送され細胞質

へ蓄積し、結果的に細胞死を引き起こすことが知られている。そこで、我々は PrP^c を正常よりも 3-5 倍程度多く発現しているトランスジェニックマウスを材料に、加齢による PrP^c 依存性神経細胞死の有無に着目し、解析を行った。野生型、PrP^c 過剰発現型、各々について生後 50 日目の若齢マウス (野生型; WT50、過剰発現型; TG50)、および 520 日目 (WT520、TG520) の老齢マウスにて比較検討したところ、TG520 のみ PrP^c の細胞内局在パターンが変化していることを見出した。TG520 においては、合成された PrP^c のほぼ半量がミトコンドリアへと異常標的化を起しており (図 3A)、最終的にミトコンドリア由来のアポトーシスが観察された。しかもこのミトコンドリアへの PrP^c の局在異常によるアポトーシスは、マウス脳内で海馬特異的に起こっており、このとき、細胞質にあるプロテアソームの活性が老齢マウスでは若齢マウスに比較して 1/5 に低下していることを見出した⁵⁾。

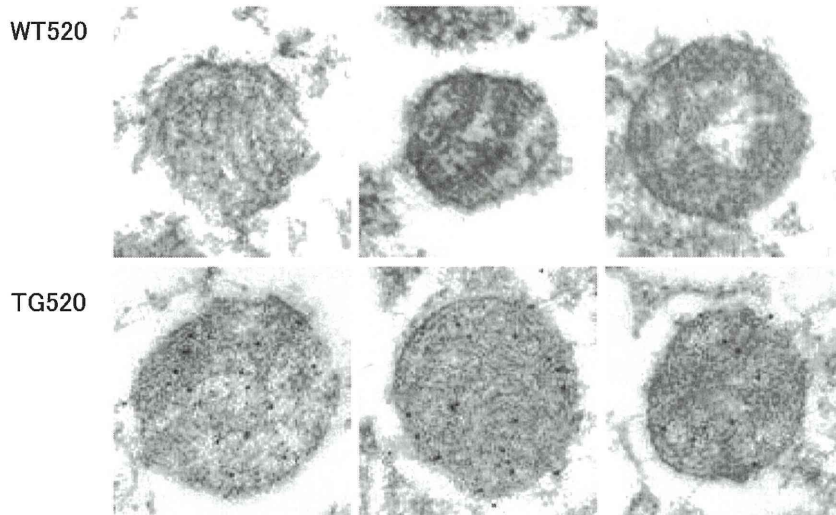


図3A ミトコンドリアへ異常標的化をおこなっている PrP^C TG520 マウス脳切片を用いた PrP^C 抗体による免疫電顕で PrP^C がミトコンドリアへ異常標的化している様子が観察された。

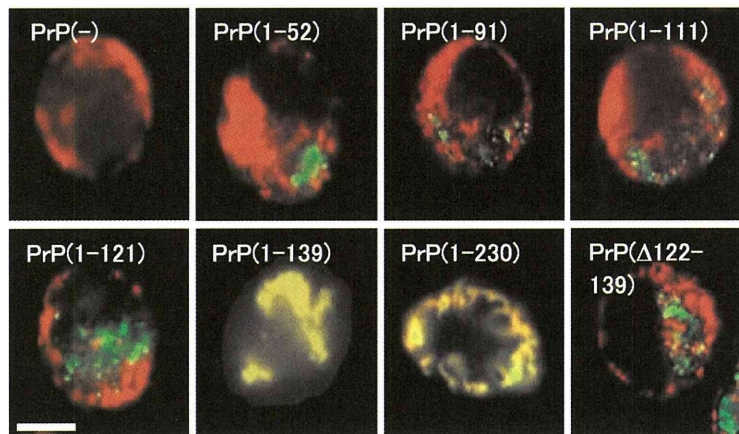


図3B ミトコンドリアへ異常標的化を起こすのに必要な PrP^C の領域の同定
赤はミトコンドリア、緑は PrP^C を示す。PrP^C がミトコンドリアへ標的化すると両者が重なり黄色を示す。

PrP^C は分泌経路を経由して移動する糖蛋白質であるから、通常はミトコンドリアへと標的化することはありえない。そこで我々は、この異常なミトコンドリアへの PrP^C 輸送経路を詳細に解析することにした。まず、PrP^C アミノ酸配列上のミトコンドリア標的化領域を同定するため、ここでも様々な長さにトランケートした PrP^C を作成した。次に N2a 細胞にプロテアソーム阻害剤ラクタシスチンを添加し PrP^C がミトコンドリアへ標的化されアポトーシスを起こす再構成系を構築した。その結果、PrP^C のアミノ酸配列上 122 番目から 139 番目までのアミノ酸がミトコンドリアへの標的化には必須であることを明らかにした (図 3B)。この再構成系においてもマウス脳同様、PrP^C がミトコンドリアへ異常標的化した細胞ではアポトーシスの状態を示しており、ミトコンドリアの膜電位の消

失、チトクローム c の細胞質への流出、およびカスパーゼ 3 の活性化による DNA の分断化が観察された⁶⁾。

ミトコンドリアへの蛋白質輸入には細胞質の因子が必要であることが知られている⁷⁾。そこで我々は次に、PrP^C が細胞質からミトコンドリアへと標的化するための細胞質因子を見つけるアッセイ系の構築に着手した。すでにミトコンドリアへ標的化させる細胞質因子として N-エチルマレイミド (NEM) 感受性のミトコンドリアインポート促進因子 MSF が知られていることから⁸⁻¹⁰⁾、ミトコンドリアへ蛋白質が移行する試験管内アッセイ系および培養細胞を用いたセミインタクトセルアッセイ系を作成し、PrP^C のミトコンドリアへの異常標的化も NEM 感受性であることを見出した。MSF は 14-3-3 ファミリーの蛋白質であり、7

つの14-3-3蛋白質アイソフォームのうち ϵ と γ がその機能を担っている¹⁴⁾。PrP^Cがミトコンドリアへ標的化するには14-3-3蛋白質のどのアイソフォームが関わっているのかを免疫沈降とウェスタンブロットを組み合わせた系を作成して解析し2種類のアイソフォームであることを新たに発見した。(Hachiya, NS et al., paper in preparation)

解析したPrP^Cのミトコンドリアへの異常標的化による神経細胞死機構が実際に遺伝性プリオン病の原因であった例を紹介する。PrPは全長253個のアミノ酸からなるポリペプチドであるが、このアミノ酸配列中145番目のチロシンをコードするコドンがストップコドンに変異し、短いフラグメントしか産生されないY145STOPと呼ばれる遺伝性プリオン病が存在する。ミトコンドリアへの異常標的化に関するPrP^C上の配列を探している際、136番目までの長さのトランケート産物が非常に効率よくミトコンドリアへと標的化したことから、このY145STOPにおいても同様に、ミトコンドリアへ異常標的化を起し神経細胞死をおこすことがこのプリオン病の原因ではないかと考えられた。そこで我々は、Y145STOPに相当するコンストラクトを作成しN2a細胞へ導入、その挙動を解析した。その結果、Y145STOP変異を持つPrP^CはN2a細胞内でミトコンドリアへ異常標的化を示しアポトーシスを起こしていた。さらに興味深いことにY145STOPを発現させたN2a細胞では細胞内に巨大な封入体を形成しており、電顕観察の結果、この封入体はPrP^Cが異常標的化したミトコンドリアの凝集体であることが判明した⁵⁾ (図3C)。

PrP^CがPrP^{Sc}へと変換する機構を明らかにする

蛋白質が細胞内で正しく機能するには、ポリペプチドが正しく折りたたまれて、機能をもった高次構造を形成し、機能すべき細胞内外の場所に正しく輸送されなくてはならない。また、遺伝子の変異などによって誤った構造の蛋白質が作られた場合にそれらを監視して分解してしまうこと、が極めて重要である。細胞は、これらの要請に応えるために、分子シャペロンという一群の蛋白質による、きわめて巧妙な細胞機能調節機構を備えている。ちなみに「シャペロン」とはフランス語で、若い未婚の婦人が社交場に出る時の付き添い人のことで、多くは年配の婦人であり社交上の行儀作法が守られているかを監督する人たちのことである。

細胞内でPrP^CとPrP^{Sc}が何らかの相互作用を起し、細胞内のPrP^Cが次々とPrP^{Sc}へ構造変換を起してしまうことがプリオン病の原因であり、このように蛋白質の高次構造変換が病因となることから、分子シャペロンとプリオン蛋白質とは何か深い関係があるものと思われる。

生体内における正常な代謝過程において、PrP^Cが中心領域で、未同定の分解酵素により切断を受けることは先に述べた。興味深いことに、この切断箇所には相当するアミノ酸配列は非常に疎水性に富んでいる。そのため、分解酵素によってPrP^Cが切断されるための領域は立体構造の内部に閉じ込められていると予測される。従って分解酵素がこの領域を切断するには高次構造がアンフォールドされる必要があると考えられ、このPrP^Cのアンフォールドの過程がうまく働かない

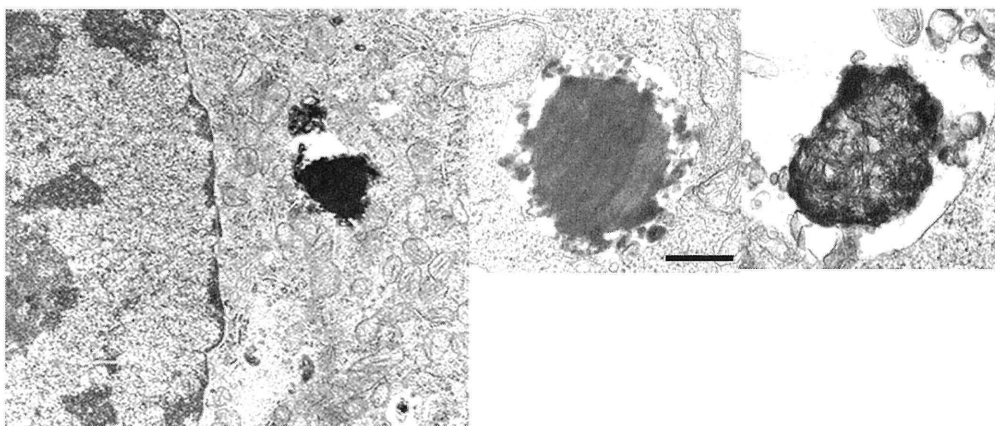


図3C Y145STOP変異におけるミトコンドリアとPrP^Cから形成される細胞内凝集体
Y145STOPをN2a細胞に発現させたのちグルタルアルデヒドとオスミウムによる固定を行い電子顕微鏡にて微細構造を観察した。細胞内にPrP^Cが異常標的化したミトコンドリアで構成される巨大な凝集体が見られた。

と分解酵素による切断が阻害されることになる。その結果、高次構造が変化した PrP^{Sc} へと移行しプリオン病を発症してしまうのではないかと考えられている¹²⁾。つまり、蛋白質の立体構造をモジュレートする所謂分子シャペロン様の活性の存在が示唆されているのである。

しかしながら、ここで推察されるアンフォールディング活性は正常にフォールディングされた分子 (PrP^C) を標的としているため、従来から知られているミスフォールディング蛋白質やアンフォールディング蛋白質を標的とする一般的な分子シャペロンの範疇には該当しない。そこで我々は、このような「正常な高次構造を持つ分子に対し、その構造を変化させるような活性を発揮する分子シャペロン様活性が実際に細胞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。その結果、正常にフォールディングされた蛋白質をアンフォールドする新規クラスの分子を同定し¹³⁾、“Unfoldin/Oliomeric Aip2p”と命名した。Unfoldin (アンフォルジン) は 58 キロダルトンの単量体分子が、その C 末端に局在するコイルドコイル領域で 10-12 個会合したリング様構造をしており、中央に Cavity を有している¹⁴⁾。ATP 存在下においては開口部が開き、基質と相互作用可能になる。ATP 非存在下では閉口し、閉口時のアンフォルジンの直径はほぼ 10 nm、このとき基質との相互作用は起こらない (図 4)。

アンフォルジンは、酵母細胞内においてはアクチン繊維の制御および出芽に関り、細胞周期によりその活性・局在を変化させ厳密な活性制御が起こっていることが示唆された。一方、試験管内においては基質特異性を持たず、ATP 存在下で極めて強い蛋白質アン

フォールド活性を示した。この強力な蛋白質アンフォールド活性は正しくフォールディングされている蛋白質に対してのみならず、様々な神経変性疾患に見られる凝集体を形成する病因蛋白質、アミロイド β (1-42)、 α -シヌクレイン、 β 構造を持つプリオン蛋白質に対しても極めて有効であり、ATP 存在下でアンフォルジンとインキュベートすることにより、これらの蛋白質異常凝集体はわずか 200 ng ml⁻¹ の低濃度トリプシンによって分解された¹⁵⁾。

そこで、我々はこのアンフォルジンの持つ非常に強力な蛋白質高次構造アンフォールド活性をプリオン病以外の神経疾患の解析にも応用した。神経変性疾患 (neurodegenerative disease) は、「原因不明の代謝障害」により、疾患ごとに決まった種類の神経細胞群が進行性的変性・脱落を生じたり、ミスフォールドした蛋白質が神経細胞内に封入体を形成する結果、様々な神経・精神症状を呈する一群の疾患である。アルツハイマー病やパーキンソン病など、きわめて頻度が高くその殆どが孤発性であるもの、ポリグルタミン病のように、比較的稀であるが様々な病型が存在し、そのすべてが遺伝性を示すもの、そのほかにもピック病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)¹⁶⁾ など、多種多様な病態が存在する。さらに、昨今の高齢化社会の到来に伴い、アルツハイマー病、パーキンソン病など、加齢と関係の深い神経変性疾患の頻度は急増してきており、これらの神経変性疾患患者総数は全世界でほぼ 2,220 万人以上といわれている。今後、更に人口の高齢化が進み患者数が増加すると考えられ、より効果的な予防法・治療法に対する社会的需要が高まっていくと予想されるにも関わらず、これら進行性疾患群の様々な病因をはじめ、予防・治療手段は未だ不明である。神経変性疾

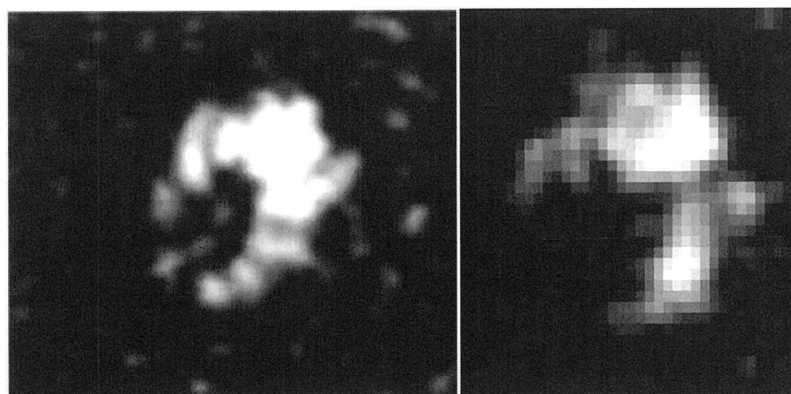


図 4 低角度回転蒸着法で観察された Unfoldin。ATP 存在下では開口し基質と相互作用をする (右パネル) が、非存在下では閉口状態で基質との相互作用が起こらない (左パネル)。

患の研究においては、これまでにポジショナルクローニングなど強力な分子遺伝学的手法が進歩し、単一遺伝子病型の神経変性疾患の病因遺伝子が相次いで明らかとなり病態解明の一步として大きな進歩をもたらした。しかしながら、同定された病因遺伝子の産物タンパク質には機能不明なものが多いことから、神経変性疾患は代謝酵素欠損による物質蓄積症とは大きく異なり、いまだその「代謝障害の本態」は原因不明と言わざるを得ない。また、多くの神経変性疾患に見られる細胞内封入体に関しては、蛋白質凝集体解析の困難さから、構成成分についての情報がほとんどないのが実情である。

我々の研究室では、将来的にすべての神経難病に見られる細胞内封入体を解析しこれら致死性疾患の発

症機構およびその治療の標的となる成分を同定することを最終目標とし、まずピック病におけるピック小体の構成成分を同定することに着手した。ピック病に見られる細胞内封入体ピック小体は非常に強い蛋白質凝集体であるため、いかなる変性剤、界面活性剤を用いてもその可溶化が不可能であり、これまでの解析手法においては、ピック小体を含む脳ホモジネートをウエスタンブロットし、そこに多くの異常リン酸化されたタウ蛋白質が主に含まれるということが解析されていた。しかしながらこの手法においては、ピック小体周辺の組織を多量に含むため、ピック小体そのものの構成成分を明らかにすることができず、病気の本体に迫れないのが実情である。そこで我々は、明視野顕微鏡と微小領域を切り出すことができるレーザー

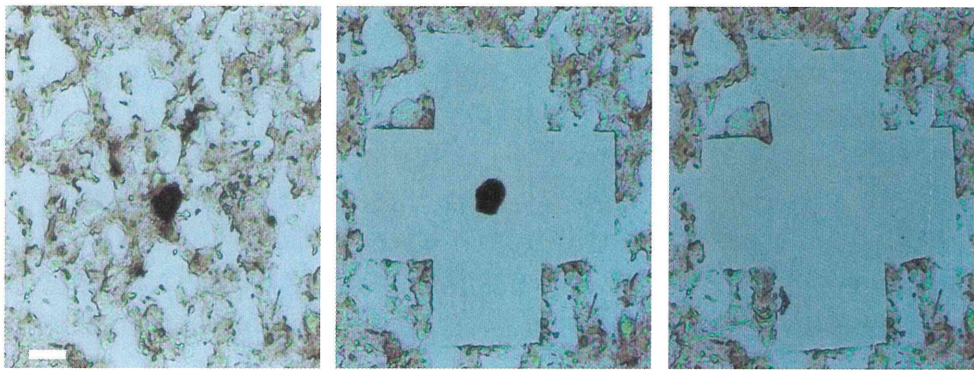


図5A レーザーマイクロダイセクションシステムにて切り出したピック小体
ピック病剖検脳を異常リン酸化タウを認識する抗体で染色しレーザーマイクロダイセクションシステムにてピック小体のみを単離した。

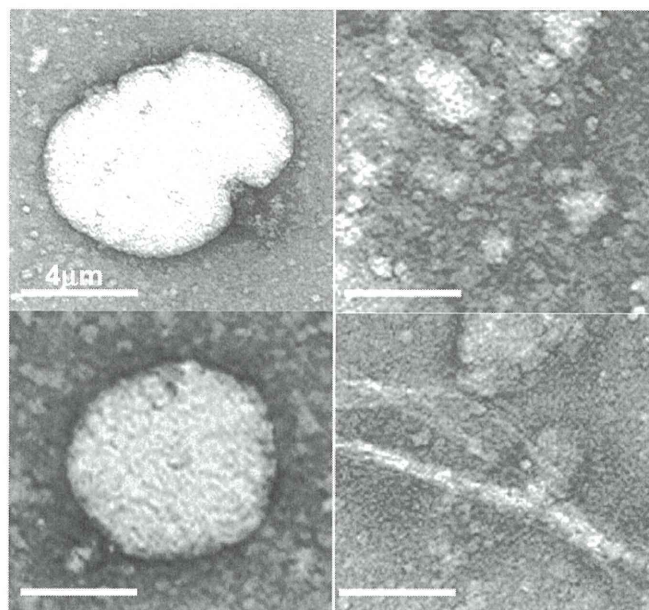


図5B ピック小体と Unfoldin
Unfoldin と 30 min, ATP 存在下でインキュベート後、脱凝集されたピック小体をネガティブ染色による電顕で観察した。

カッターを搭載した独自のマイクロダイセクション系を開発した。このシステムを用いて切り出した500個ものピック小体は(図5A)¹⁷⁾、確かに2%のSDSや8Mのウレアで処理をしても全く可溶化されず凝集体は電気泳動においてゲル中を流れることができなかった。ところがこれらのピック小体をまずアンフォルジンを用いてATP存在下でunfolding反応を行ったところ凝集体は容易に脱凝集し(図5B)可溶化され、ウエスタンブロットにて検出することができた。このようにアンフォルジンを用いることにより、ウエスタンブロットでの検出感度を数百倍以上に上げることができたため、さらにどれくらいまで感度を上昇させることができるかを調べたところ、たった1個のピック小体で充分検出することが明らかになった¹⁸⁾。さらにこのアンフォルジンによる可溶化法を用いて、これまででできなかった細胞内蛋白質封入体の蛋白定量を可能にした。即ち、ピック小体には1個当たりほぼ2ngの蛋白質を含むことが明らかになった。

終わりに

プリオン仮説が提唱されてからすでに四半世紀が経とうとしているが、未だにプリオン病へ至るプリオン蛋白質の高次構造変換過程のみならず、その生理的な機能すら明らかになっていない。その一方で、BSEや薬害ヤコブ病などプリオン病は様々なところで我々の身近になってきている。このような状況下、我々はプリオン蛋白質の生理機能を解明することを目的として、PrP^Cの細胞内輸送機構を可視化の系によって解析する、プリオン病と神経細胞死の関連を培養細胞系を用いて解析する、PrP^CがPrP^{Sc}へと変換する機構を明らかにする、ことを重点的に研究し、ここにのべたような成果を挙げてきた。これからさらにプリオン蛋白質の生理機構や高次構造変換に関する因子の同定がなされればさらにこの分野の研究を進めるものと考えられる。

また、我々の研究室で同定したアンフォルジンは正常な立体構造を持つ相手に対しても作用する新しい範疇の分子シャペロンである。アンフォルジンの持つ試験管内での強力な高次構造変換活性は、これまで我々が手をつけることができなかった各種の神経変性疾患における細胞内封入体の解析だけでなく様々な分野での応用が考えられており、プリオン病はじめ多くの難治性疾患の病態解明をはじめ治療法・予防法において更なる進展が期待される。

謝 辞

本稿執筆の機会を与えてくださいました伊東洋学長に深謝申し上げます。また執筆に当たっては生理学第二講座の皆様の多大な御協力を頂きました。この場を借りてお礼申し上げます。

文 献

- 1) 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
- 2) Hung Z, Gabriel JM, Baldwin MA, Fletterick RJ, Prusiner SB, Cohen FE：Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**：7139-7143, 1994
- 3) Hachiya NS, Watanabe K, Sakasegawa Y, Kaneko K：Microtubules-associated intracellular localization of the NH(2)-terminal cellular prion protein fragment. *Biochem Biophys Res Commun* **313**：818-823, 2004
- 4) 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
- 5) 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* **374**：98-103, 2005
- 6) Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K：Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **327**：894-899, 2005
- 7) Schatz, G and Dobberstein, B：Common Principles of Protein Translocation Across Membranes. *Science* **271**：1519-1526, 1996
- 8) Hachiya N, Alam R, Sakasegawa Y, Sakaguchi M, Mihara K, Omura T：A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is an ATP-dependent conformational modulator for precursor proteins. *EMBO J* **12**：1579-1586, 1993
- 9) Hachiya N, Komiya T, Alam R, Iwahashi J, Sakaguchi M, Omura T, Mihara K：MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *EMBO J* **13**：5146-5154, 1994
- 10) Hachiya N, Mihara K, Suda K, Horst M, Schatz G, Lithgow T：Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature* **376**：705-709, 1995
- 11) Alam R, Hachiya N, Sakaguchi M, Kawabata S, Iwanaga S, Kitajima M, Mihara K, Omura T：

- cDNA cloning and characterization of mitochondrial import stimulation factor (MSF) purified from rat liver cytosol. *J Biochem (Tokyo)* **116**: 416–425, 1994
- 12) Kiyotoshi Kaneko, Laurence Zulianello, Michael Scott, Carol M. Cooper, Andrew C. Wallace, Thomas L. James, Fred E. Cohen, and Stanley B. Prusiner: Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 10069–10074, 1997
- 13) Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, 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
- 14) Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sakaki H, 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
- 15) Hachiya NS, Sakasegawa Y, 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
- 16) Kaneko K, and Hachiya NS. Hypothesis: Gut as source of motor neuron toxin in the development of ALS. *Med Hypotheses* **66**: 438–439, 2006
- 17) Ohkubo T, Sakasegawa Y, Toda H, Kishida H, Arima K, Yamada M, Takahashi H, Mizusawa H, Hachiya NS, Kaneko K: Three-repeat tau 69 is a major tau isoform in laser-microdissected Pick bodies. *Amyloid*. in press
- 18) Hachiya NS, Ohkubo T, Kozuka Y, Yamazaki M, Mori O, Mizusawa H, Sakasegawa Y, Kaneko K: More than a 100-fold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric actin interacting protein 2/d-lactate dehydrogenase protein. *Anal Biochem* **347**: 106–111, 2005