4. アミロイド蛋白凝集の生化学

柳 川 弘 志, 小 川 洋 子

プリオン病, アルツハイマー病, パーキンソン病, 筋萎縮性側索硬化症, ポリグルタミン病 (ハンチントン病) などの種々の神経変性疾患において, これらに関連のある蛋白質が細胞内で構造転移を起こして凝集・沈着することが, 神経細胞が変性を起こす原因の一つとして考えられている. プリオン病では, 正常型のプリオン蛋白質が, 構造転移を起こして異常型に変化し, この異常型が正常型を次々と異常型に変化させることにより, 異常型プリオン蛋白質が蓄積して, 感染性の凝集体をつくることが知られている. 我々は, これまでに, ヒトタウ蛋白質のC-テイル8とRNaseHIのプロイドモジュール5をモデルとして, 蛋白質の構造転移とそれに伴う蛋白質の凝集体の形成機構を分子論的に解明し, その機構を一般化することを試みてきた. 本稿では, 我々の研究結果を紹介し, アミロイド蛋白の凝集とプリオン病との関連を考えてみたい.

はじめに

種々の神経変性疾患, すなわち, プリオン病, アルツハイマー病, パーキンソン病, 筋萎縮性側索硬化症, ポリグルタミン病 (ハンチントン病) などにおいて, これらに関連のある蛋白質が細胞内で構造転移を起こして凝集・沈着することが, 神経細胞が変性を起こす原因の一つとして考えられている^{11, 30, 31)}. 例えば, ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病, ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病, ヒツジやヤギのスクレイピー病, ウシの海綿状脳症等のプリオン病では, プリオン蛋白質が関係していると考えられている^{5, 21, 36)}. プリオン蛋白質には, 正常型 (細胞性プリオン蛋白質) と異常型 (感染性プリオン蛋白質) が存在している. 正常型では α -ヘリックス構造である部分が, β -シート構造に構造転移を起こして異常型に変化する. この異常型が正常型を次々と異常型に変化させることにより, 異常型プリオン蛋白質が蓄積して, 感染性の凝集体をつくることが知られている^{3, 4, 20, 29)}. また, アルツハイマー

病では, その患者の脳内に老人斑や神経原線維変化などがみられる^{2, 14, 16, 38)}. 老人斑では, β -アミロイドの蓄積^{14, 38)}が, 神経原線維変化では, 線維状構造物 (paired helical filament: PHF) の蓄積^{1, 8, 25, 35)}が特徴である. PHFの構成成分の一つとして, 微小管結合蛋白質の一種であるタウ蛋白質が異常にリン酸化された状態で存在していることが明らかにになっている^{17, 24, 28, 33)}. 最近, これらの疾患すべてを含めてコンフォーメーション病とも言われている⁴⁾.

このように, 蛋白質の構造転移とそれに伴う蛋白質の凝集体の形成機構を解明することは, これらの疾患の原因を究明する上で, 一つの手がかりとして重要である. 本稿では, ヒトタウ蛋白質のC-テイル8 (55残基) とRNaseHIのプロイドモジュール5 (27残基) の2つのペプチドをモデルとして, これらの構造転移とそれに伴う凝集体の形成について調べた結果を紹介し, アミロイド蛋白の凝集とプリオン病との関連を考えてみたい.

I. ヒトタウ蛋白質のC-テイル8

1. ヒトタウ蛋白質のペプチド断片の構造転移とアミロイド線維の形成

アルツハイマー病に関連のある蛋白質の一つとして知られている微小管結合蛋白質の一種であるタウ蛋白質は, その脳内にみられるPHFの構成成分の一つとして, 異常にリン酸化された状態で存在していることが明らかになっている. このようなタウ蛋白質をモデルとして, その構造転

慶應義塾大学大学院理工学研究科生命理工学専修 (〒223-8522 横浜市港北区日吉 3-14-1)

Biochemistry of conformational transition and aggregation of amyloid proteins

Hiroshi Yanagawa and Yoko Ogawa

Graduate School of Science and Technology, Keio University, 3-14-1 Hiyoshi, Kouhoku-ku, Yokohama 223-8522, Japan

図3 C-テイル 8 から形成されるアミロイド線維
0.088mM C-テイル 8 水溶液を20℃で反応させた時の、a) 9日目、b) 18日目、c) 26日目、
d) 29日目で形成されるアミロイド線維。スケールバーは、100nm。

も形成しなかった。以下では、顕著な二次構造転移を起こし、アミロイド線維を形成するC末端テイル領域の55残基のペプチドであるC-テイル 8 に注目し、その二次構造転移とアミロイド線維の形成について詳しく述べる。

2. C-テイル 8 の二次構造転移反応

C-テイル 8 の水溶液中での二次構造転移を CD スペクトルで測定した (図2)。C-テイル 8 (0.088mM) の水溶液は、反応初期は、198nm に負の極大をもつランダム構造であるが、時間経過に伴い、非常にゆっくりと218nm に負の極大をもつβ-シート構造に変化し、20℃では26日以降、明確なβ-シート構造に変化した。この構造転移の反応速度は、C-テイル 8 の濃度と反応温度に依存していた。

このような二次構造転移とアミロイド線維形成の関係を調べたところ、ランダム構造からβ-シート構造に変化するに伴い、明確なアミロイド線維を形成した (図3)。0.088 mM のC-テイル 8 水溶液を20℃に放置しておくと、まだランダム構造の9日目では細かい粒子が付着した短く細い線維の形成が少量見られるだけであるが (図3a)、時間経過に伴い、線維は長くなり粒子は次第に消失した (図3b)。β-シート構造に変化した26日目には粒子は完全に消え、長い平行2本鎖のアミロイド線維が全体を占めるようになった (図3c)。その後、その線維はさらに平行に集ま

図4 β-シート構造を形成したC-テイル 8 の添加効果
0.2mM C-テイル 8 水溶液に、すでにβ-シート構造を形成しているC-テイル 8 を加えて20℃で反応させた時の、218nm における負の分子楕円率 $[\theta]$ の増加。加えたβ-シート構造のC-テイル 8 の濃度は、0 μ M (○), 1 μ M (●), 2 μ M (▲), 4 μ M (■)。

り、幅広い線維に変化した (図3d)。アミロイド線維の形成は、pH 3～pH5.5の範囲で見られた。さらに低いpHや、pH 6～pH7.5では、アミロイド線維の形成は見られなかった。このようなアミロイド線維形成はどのように起こるのであろうか。初めにC-テイル 8 が凝集し始めると粒子が形成され、この粒子が核となり、時間経過に伴って

さらに集合し、短い線維状のものが形成され始める。これらがさらに集まり、しだいにゆっくりと長い線維に変化して行くらしい。実際に、C-テイル8の反応液に種(seeds)を添加すると二次構造転移が速く起こることが明らかになっている(図4)。反応前のランダム構造のC-テイル8に、すでに β -シート構造を形成しているC-テイル8をごく少量(1/50, 1/100, 1/200)加えて反応させ、CDスペクトルを測定すると、二次構造転移が促進された。その促進の度合いは、加えた β -シート構造を形成しているC-テイル8の量に依存していた。これは、加えたごく少量の β -シート構造のC-テイル8が核となり、まだ反応していないランダム構造のC-テイル8の β -シート構造への転移を

図5 全長タウ蛋白質とC-テイル8の混合液から形成されるアミロイド線維
0.124mM 全長タウ蛋白質と0.146mM C-テイル8の混合液を、20mM MES緩衝液(pH6.0)、20℃で、154日反応させた時に形成されるアミロイド線維。スケールバーは、100nm。

促進したためと思われる。二次構造転移反応が起こるには、反応の初期段階でどのようなきっかけで構造転移が起こってアミロイド線維が形成されるのかが、重要であると思われる。

3. 全長タウ蛋白質とC-テイル8との相互作用

全長タウ蛋白質とC-テイル8との20mM MES緩衝液(pH6)中での相互作用を調べた(図5)。20mM MES緩衝液(pH6)中では、全長タウ蛋白質もC-テイル8も単独では二次構造転移を起こさないが、全長タウ蛋白質とC-テイル8をほぼ等量ずつ混合して反応させることにより、両者は相互作用し、非常にゆっくりとアミロイド線維を形成した。全長タウ蛋白質とC-テイル8からは、約2ヵ月後に、2本の線維がしっかりと燃れた長いアミロイド線維が少量形成され、5ヵ月後には、ほぼ全体を占めるほどに増加した。このアミロイド線維は、C-テイル8単独から形成されるアミロイド線維とは異なった形態を示した。この全長タウ蛋白質とC-テイル8の反応液に、すでに β -シート構造を形成しているC-テイル8を1/100加えると、相互作用の反応速度が促進された。単独では、いかなる条件でもアミロイド線維を形成しない全長タウ蛋白質と、水や20mM酢酸緩衝液(pH4)中ではアミロイド線維を形成するが、20mM MES緩衝液(pH6)中ではアミロイド線維を形成しないC-テイル8とが相互作用することにより、それぞれの潜在能力が引き出され、pH6でも二次構造転移を起こしてアミロイド線維を形成するようになったと考えられる。この場合も、全長タウ蛋白質に対して、アミロイド線維を形成する能力をもつC-テイル8が核となり、両者の相互作用により、アミロイド線維の形成を導いたと思われる。

図6 大腸菌 RNaseHI のプソイドモジュール5 (ψ M5) のアミノ酸配列と二次構造
番号は、大腸菌 RNaseHI のアミノ酸残基に相当する。 ψ M5 は、大腸菌 RNaseHI の α -ヘリックス I の領域と、 β -ストランド D の領域を含み、63番目のシステインをアラニンに置換した、27アミノ酸残基のペプチドである。

図7 ψM5のCDスペクトル

30μM ψM5の10mM塩酸溶液(pH2)を20℃で反応させた時の、0日目、1日目、2日目、3日目、4日目、5日目、8日目、11日目でのCDスペクトルの変化。時間経過に伴って、204nmの吸収が減少し、215nmの吸収が増大する。

図8 ψM5から形成されるアミロイド線維

30μM ψM5の10mM塩酸溶液(pH2)を20℃で5日間反応させたときに形成されるアミロイド線維。スケールバーは100 nm。

II. RNaseHIのプロイドモジュール5 (ψM5)

1. ψM5の二次構造転移

もう一つのモデルでは、短いペプチドを用いて、二次構造転移とアミノ酸配列との関係を解明することを試みた。モデルペプチドとして用いたψM5は、大腸菌のRNaseHI⁽³⁾のα-ヘリックスI領域(αI)とβ-ストランドD領域(βD)を含む27アミノ酸残基のうち、63番目のシステインをアラニンに置換したペプチドであり、化学合成により得た(図6)。ψM5の水溶液中での二次構造の変化をCDスペクトルと、アミロイド線維と特異的に結合するコンゴアレドとの結合量を測定することによって調べた。

ψM5は、10mM塩酸(pH2)中で二次構造転移を起こした。しかし、ψM5もC-テイル8と同様にpH6以上では二次構造転移を起こさなかった。このように、ψM5の二次構造転移もpH依存性であった³²⁾。CDスペクトルを測定すると、ψM5は10mM塩酸(pH2)に溶解した直後は、204nm付近と222nm付近に負の極大をもつα-ヘリックス構造をとるが、時間経過に伴い、215nmに負の極大をもつβ-シート構造にゆっくりと変化した(図7)。この二次構造転移反応をコンゴアレドとの結合量で測定すると、β-シート構造に変化するに従って、ψM5とコンゴアレドとの結合量は増加し、CDスペクトルの変化と共に、アミロイド線維が形成されていることが明らかになった。

形成されるアミロイド線維を透過型電子顕微鏡で観察した(図8)。ψM5は、10mM塩酸(pH2)中でβ-シート構造に変化するに従い、規則的に捻れた長いアミロイド線維を形成した。初期のα-ヘリックス構造の状態では不定形の塊がごく少し見えるだけであるが、β-シート構造に変化し始めるに従い塊は消失し、アミロイド線維が少しずつ形成してくる。その後、β-シート構造が増加するに従い、アミロイド線維は長くなり、その量も増加する。このアミロイド線維は、数ヶ月後でも安定であった。ψM5のアミロイド線維形成においても、初期に形成される塊が核となり、これらが集合し、線維状のものに変化していくものと考えられる。また、ψM5の場合でも、C-テイル8と同様に、種(seeds)の添加効果がみられた。反応前のα-ヘリックス構造のψM5に、すでにβ-シート構造を形成しているψM5と、まだα-ヘリックス構造のψM5を加えた場合とで、二次構造転移速度を比較した。ψM5の二次構造転移反応は、C-テイル8に比べて速いので、種の効果がはっきりと見えにくい。しかし、加えたψM5の割合が20%以上では、すでにβ-シート構造を形成しているψM5を加えた方が、二次構造転移速度が促進され、種としての効果がみられた。このことは、ψM5の二次構造転移反応においても、β-シート構造を形成している少量のψM5が核となり、反応を促進しているものと考えられる。

2. ψ M5の変異体の二次構造転移

ψ M5の二次構造転移にそのアミノ酸配列がどのように関与しているかを明らかにするために、 ψ M5の変異体を化学合成し、それらの10mM HCl (pH 2) 中での二次構造転移を調べた。変異体は、図6に示した ψ M5の27個のアミノ酸のうち、 α I領域の6カ所と β D領域の2カ所のアミノ酸を1カ所ずつ別のアミノ酸に置換した31種類である。その結果、置換した位置やアミノ酸の種類によって、 ψ M5に比べて二次構造転移速度が速い変異体、遅い変異体、まったく構造転移を起こさない変異体と様々であった。グルタミン酸をグルタミンやアラニンに置換した変異体は、 ψ M5より速く二次構造転移を起こした。負電荷を持つグルタミン酸を弱い疎水性を示すグルタミンやアラニンに置換することにより、静電的反発が抑えられて疎水的相互作用が強まり、集合しやすくなったものと思われる。 ψ M5が酸性溶液中で二次構造転移を起こすことも、10mM 塩酸はpH 2位であるために ψ M5に含まれる4つのグルタミン酸が中和され、静電的反発が抑制されるためと考えられる。アラニンやバリンをグルタミン酸やグリシンに置換した変異体も ψ M5より速い二次構造転移を起こした。疎水性のアラニンやバリンを親水性のグルタミン酸やグリシンに置換することにより、疎水性が適度に弱まり、二次構造転移を起こすのにバランスがよくなったものと考えられる。一方、アラニンをさらに疎水性の強いバリンに置換した変異体は、二次構造転移速度が ψ M5より遅く、転移反応はすぐに飽和してしまった。この時のコンゴーレッドとの結合量は少なく、規則的な β -シート構造をとっていないと思われる。また、疎水性が強いイソロイシンや、正電荷をもつアルギニンに置換すると、二次構造転移をまったく起こさなくなった。 ψ M5が二次構造転移を起こす要因の一つとして、27個のアミノ酸残基の中の、グルタミン酸の解離を抑えることにより、適度に疎水的相互作用が強まり集合しやすくなることが考えられる。

3. ψ M5とその変異体の相互作用

ψ M5とその変異体の10mM 塩酸 (pH 2) 中における相互作用を調べた。単独で ψ M5より速く二次構造転移を起こす変異体は、 ψ M5と相互作用し、加えた濃度に依存して、 ψ M5の二次構造転移速度を促進した。一方、単独で二次構造転移を起こさない変異体は、促進、促進と抑制、抑制、無効果と様々な効果を示した。特に興味深いことに、単独で二次構造転移を起こさない、アラニンをアルギニンに置換した変異体は、 ψ M5の二次構造転移速度を抑制した。単独で二次構造転移を起こす変異体が促進効果を示すのは、相乗効果と思われるが、単独で二次構造転移を起こさない変異体が、様々な効果を示すことは、 ψ M5の二次構造転移やアミロイド線維の形成には、 ψ M5のアミノ酸配列が重要であることを示唆している。言い換えれば、ア

ミノ酸配列に適切な変異を加えることにより、ペプチドの凝集を阻止することが可能になると思われる。

III. モデルペプチドの二次構造転移機構とプリオン蛋白質

これら2つのモデルペプチドの構造転移が、どのようにして起こるのかを考えてみる。

タウ蛋白質のC-テイル8は、ランダム構造から β -シート構造への二次構造転移で、 ψ M5に比べると非常にゆっくりとした変化である。しかも、長いラグタイムの後に急速に構造転移が起きている。図1に示したように、ヒトタウ蛋白質のC末端テイル領域の細分化した断片のうち、二次構造転移とアミロイド線維の形成を起こすC-テイル5、C-テイル7、C-テイル8は、C-テイル4領域を含んでいる。一方、転移を起こさないC-テイル6はC-テイル4領域を含んでいない。C-テイル4領域は疎水性で、Chou-Fasmanの二次構造予測により、 α -ヘリックス構造を形成していることがわかっている。C-テイル4をヘリックス形成試薬であるトリフルオロエタノール (TFE) やドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の水溶液に溶かしてCDやNMRで二次構造形成を調べてみると、ヘリックス構造を形成する^{7,37)}。C-テイル5、C-テイル7、C-テイル8も同じ様にヘリックス構造を形成する。しかし、C-テイル6はヘリックス構造を形成せず、ランダム構造のままである。全長の蛋白質が断片化されて、短いペプチドとなった時に、そのペプチドが持つ二次構造が、もとの蛋白質の中にある場合とでは、異なる可能性が考えられる。つまり、二次構造転移反応が進むにつれて、ゆっくりと β -シート構造に変化するという事は、このペプチド断片領域のヘリックス構造が、潜在的にシート構造に変わりやすい能力をもっているのかもしれない。このようなことから、タウ蛋白質のC-テイル8は、初期のランダム構造が非常にゆっくりと目には見えないほどに α -ヘリックス構造に変化し（この変化をとらえることはできていない）、その後は速やかに β -シート構造に変化するのではないだろうか。つまり、 α -ヘリックス構造が、中間体の役割をして、 β -シート構造への構造転移を起しやすくしていると考えられる。

一方、 ψ M5の場合は、 α -ヘリックス構造から β -シート構造への二次構造転移である。図6に示したように、 ψ M5は大腸菌のRNaseHIの α -ヘリックスI領域 (α I) と β -ストランドD領域 (β D)) を含んでいる。この両領域のペプチドについて、二次構造を調べてみたところ、 α I (16残基) は、10mM 塩酸中ですぐに β -シート構造を形成し、短い線維状構造体を形成した。 β D (7残基) は、ランダム構造であり、構造体を形成しなかった。どちらも構造転移はみられなかった。この結果から、 α I領域の存在が ψ M5の二次構造転移に重要であり、 β D領域があることによって、安定な β -シート構造を形成すると考えられる。ま

た、 ψ M5では、ランダム構造から α -ヘリックス構造への変化が急速に起こるために、本来は初期にみられるランダム構造をとらえることができていないのかもしれない。 ψ M5を10mM塩酸に溶解してすぐのCDスペクトルは、204nm付近と222nm付近に負の極大をもつが、204nm付近の吸収が222nm付近の吸収よりもかなり大きく、222nm付近の吸収は肩に近い。 α -ヘリックス構造には見えるが、ランダム構造が混在しているようにも見える。中性溶液中では、 ψ M5はよりランダム構造に近い構造をとっている。 ψ M5もC-テイル8と同じように、もとの蛋白質で、 α -ヘリックスをとる領域がペプチド断片として切り出されたときに、そのペプチドが持つ潜在的に β -シート構造を形成しやすい能力が表面化し、その結果、二次構造転移を起こすようになるのではないだろうか。

これら2つのモデルペプチドから、ペプチドの二次構造転移は、もとはランダム構造であったものが、 α -ヘリックス構造を経て β -シート構造に変化したために起こり、それによって規則的な分子間相互作用が生じ、集合しやすくなり、アミロイド線維を形成するということが明らかになった。そして、二次構造転移を起こして、アミロイド線維を形成するに至るには、環境条件や時間経過などにより、転移反応のほんの初期に形成されるごく少量のアミロイド線維が核となることにより、転移反応が起こり、次々と反応が促進されるものと考えられる^{15,18,27,34)}。

プリオン蛋白質においても、同じような現象がみられる。感染性プリオン蛋白質(PrP^{Sc})はプロテアーゼによる限定分解で、N末端部が除かれて PrP (90-231)の領域が残る¹⁹⁾。この領域は、立体構造のわかっている細胞性プリオン蛋白質(PrP^{C})の3つのヘリックス領域(H1, 144-153; H2, 172-194; H3, 200-224)を含んでいる^{6,9,23)}。H1のすぐN末端側の領域は、細胞性プリオン蛋白質(正常型)が構造転移を起こして感染性プリオン蛋白質(異常型)に変化する、すなわち、 α -ヘリックス構造から β -シート構造への転移に関与する重要な領域と考えられている。実際、 PrP (106-126)^{22,26)}や PrP (90-145)^{10,12)}に対応するペプチド断片は疎水性のアミノ酸を多く含み、中性溶液中でランダム構造、水/TFE溶液中でヘリックス構造、酸性溶液中で β -シート構造を形成する。形成された β -シート構造は凝集してアミロイド線維に変化する。このアミロイド線維は細胞性プリオン蛋白質と相互作用して、感染性プリオン蛋白質に変化させ、プロテアーゼ耐性や神経毒性を示す。これらのプリオン蛋白質のペプチド断片の性質は、タウ蛋白質のC-テイル8やRNase HIの ψ M5と非常によく似ている。

また、ペプチド断片が水溶液中で β -シート構造をとって、アミロイド線維を形成するには、疎水性のアミノ酸を多く含むことが必要である。特に、疎水性のアミノ酸(A, I, L, M, F, V, W)と極性アミノ酸(D, E, K, R)

の比が1.65以上であることが必要条件である³⁷⁾。タウ蛋白質のC-テイル8, RNase HIの ψ M5, プリオン蛋白質の PrP (106-126)や PrP (90-145)は、この条件を満たしている。

蛋白質やペプチドが二次構造転移を起こしてアミロイド線維を形成するためには、それらを構成しているアミノ酸の種類や配列、種々の環境条件が影響している。反応の初期段階で、どのようなきっかけで核となる構造転移とアミロイド線維の形成が始まるのかが鍵であろう。

変性が細胞の内外の環境変化(孤発性)や遺伝子の変異による変化(家族性)によってもたらされ、アミロイド線維が細胞内外に凝集・沈着し、細胞の正常な働きに障害を与えることにより疾患を引き起こす。蛋白質の変性、増殖、疾患などを解明するために、蛋白質やペプチドの凝集の要因を見つけることは、蛋白質の本質を理解する上で役立つものと思われる。

謝 辞

ペプチドを合成していただいた三菱化学生命科学研究所(現:福岡女子大)の佐藤一紀博士に感謝いたします。ここで紹介した我々の研究の一部は、農林水産省畜産対応プロジェクト研究「プリオン病の病態発生機構の解析」の一環として行われたものであり、厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Avila, J.: *FEBS Lett.*, **476**, 89-92 (2000)
- 2) Braak, H., Braak, E.: *J. Neural. Trans. Suppl.*, **53**, 127-140 (1998)
- 3) Brookes, J. P.: *Curr. Opinion Neurobiol.*, **9**, 571-577 (1999)
- 4) Carrell, R. W., Lomas, D. A.: *Lancet*, **350**, 134-138 (1997)
- 5) Chesebro, B.: *Neuron*, **24**, 503-506 (1999)
- 6) Donne, D. G., Viles, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Wright, P. E., Dyson, H. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13452-13457 (1997)
- 7) Esposito, G., Viglino, P., Novak, M., Cattaneo, A.: *J. Peptide Sci.*, **6**, 550-559 (2000)
- 8) Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1502**, 122-132 (2000)
- 9) Garcia, F. L., Zahn, R., Riek, R., Wuthrich, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8334-8339 (2000)
- 10) Inouye, H., Kirschner, D. A.: *J. Mol. Biol.*, **268**, 375-389 (1997)
- 11) 垣塚 彰: 蛋白質核酸酵素, **45**, 792-797 (2000)
- 12) Kaneko, K., Wille, H., Mehlhorn, I., Zhang, H., Ball, H., Cohen, F. E., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B.: *J. Mol. Biol.*, **270**, 574-586 (1997)
- 13) Katayanagi, K., Miyagawa, M., Matsushima, M., Ishikawa, M., Kanaya, S., Nakamura, H., Ikehara, M., Matsuzaki, T., Morikawa, K.: *J. Mol. Biol.*, **223**, 1029-1052 (1992)
- 14) 川原正博, 黒田洋一郎: 蛋白質核酸酵素, **44**, 1982-1987 (1999)
- 15) Laurent, M.: *FEBS Lett.*, **407**, 1-6 (1997)
- 16) Mandelkow, E. M.: *Trends Cell Biol.*, **8**, 425-427 (1998)
- 17) Mandelkow, E.: *Nature*, **402**, 588-589 (1999)

- 18) Masters, C. L., Beyreuther, K. : *Nature*, **388**, 228-229 (1997)
- 19) Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D.C., Bendheim, P. E., Groth, D. F., Glenner, G. G. : *Cell*, **35**, 349-358 (1983)
- 20) Prusiner, S. B., Scott, M. R., DeArmond, S. J., Cohen, F. E. : *Cell*, **93**, 337-348 (1998)
- 21) Prusiner, S. B. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13363-13383 (1998)
- 22) Ragg, E., Tagliavini, F., Malesani, P., Monticelli, L., Bugiani, O., Forloni, G., Salmons, M. : *Eur. J. Biochem.*, **266**, 1192-1201 (1999)
- 23) Riek, R., Wider, G., Billeter, M., Hornemann, S., Glockshuber, R., Wuthrich, K. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11667-11672 (1998)
- 24) Roush, W. : *Science*, **267**, 793-794 (1995)
- 25) Ruben, G. C., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Wisniewski, H. M. : *J. Biol. Chem.*, **266**, 22019-22027 (1991)
- 26) Salmons, M., Malesani, P., De Gioia, L., Gorla, S., Bruschi, M., Molinari, A., Vedova, F. d., Pedrotti, B., Marrari, M. A., Awan, T., Bugiani, O., Forloni, G., Tagliavini, F. : *Biochem. J.*, **342**, 207-214 (1999)
- 27) Serio, T. R., Cashikar, A. G., Kowal, A. S., Sawicki, G. J., Moslehi, J., Serpell, L., Arnsdorf, M. F., Lindquist, S. L. : *Science*, **289**, 1317-1321 (2000)
- 28) Sontag, E., Nunbhakdi-Craig, V., Lee, G., Brandt, R., Kamibayashi, C., Kuret, J., White III, C. L., Mumby, M. C., Bloom, G. S. : *J. Biol. Chem.*, **274**, 25490-25498 (1999)
- 29) Soto, C. : *J. Mol. Med.*, **77**, 412-418 (1999)
- 30) Spillantini, M. G., Goedert, M. : *TINS*, **21**, 428-433 (1998)
- 31) Scherzinger, E., Sittler, A., Schweiger, K., Heiser, V., Lurz, R., Hasenbank, R., Bates, G., Lehrach, H., Wanker, E. E. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4604-4609 (1999)
- 32) Swietnick, W., Peterson, R., Gambetti, P., Surewicz, W. K. : *J. Biol. Chem.*, **272**, 27517-27520 (1997)
- 33) Trojanowski, J. Q., Lee, V. M.-Y. : *FASEB J.*, **9**, 1570-1576 (1995)
- 34) Tuite, M. F. : *Science*, **289**, 556-557 (2000)
- 35) Wille, H., Drewes, G., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. : *J. Cell. Biol.*, **118**, 573-584 (1992)
- 36) 山内一也 : 蛋白質核酸酵素, **43**, 65-74 (1998)
- 37) Yanagawa, H., Chung, S.-H., Ogawa, Y., Sato, K., Shibata-Seki, T., Masai, J., Ishiguro, K. : *Biochemistry*, **37**, 1979-1988 (1998)
- 38) 柳沢勝彦 : 細胞, **33**, 52-55 (2001)