

## Cell-PMCA法を用いたヒトプリオンの増幅

研究分担者: 東北大学大学院医学系研究科病態神経学分野 竹内敦子

### 1. 目的

CJDプリオンをより効率よくPMCA法により増幅させるため、ハムスターPrP型の変異を入れたヒトPrP<sup>C</sup>を大量発現させた細胞ライセートを用いてマルチラウンドPMCAを行った。

#### 129M: 13種類

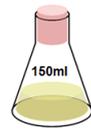
(S143N, Y145W, H155N, M166V, E168Q, S170N, 231R, I215V, E219Q, Q227E, R228G, G229R, M232R)

#### 129V: 16種類

(Y145W, H155N, M166V, E168Q, I215V, E219Q, R220K, 231R, S97N, S143N, Q227E, R228G, G229R, 231A, M232R, 234L)

### 2. 材料と方法

Seed : 10% (w/v) CJD 脳ホモジネート  
Substrate; 20% 293F細胞ライセート (Hu129MまたはHu129V過発現)



FreeStyle™  
293-F Cells (Invitrogen)  
(ヒト胎児腎臓細胞)



細胞を回収  
PMCAバッファー中で  
超音波ホモジナイザーにて破砕

#### PMCA・PK処理

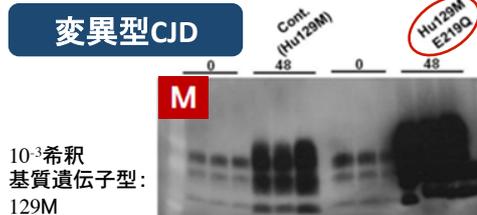
・交差超音波破砕器&反応装置使用  
(エレコン株式会社を用い、  
37°Cで振とう培養  
・全量 100 µl で反応  
・超音波条件:  
(5sec.ON + 1sec.OFF) x  
5/1 hr を1サイクルとし、48hrで1ラウンド  
・PK処理 (50µg/ml, 37°C, 1hr)  
・ウェスタンブロッティング法にて検出

### 3. 結果

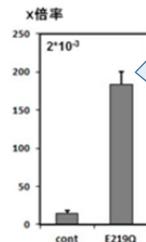
増幅効率の向上 ■ > ■ > ■

	129M	129V
MM1		Y145W, M166V, E168Q, E219Q, R220K
MV2	E219Q	E168Q
VV2	Y145W, S170N, E219Q, M232R	
MMi	Y145W, E168Q, S170N, E219Q, M232R	E168Q, 231A,
vCJD	E219Q, M232R	

#### 変異型CJD

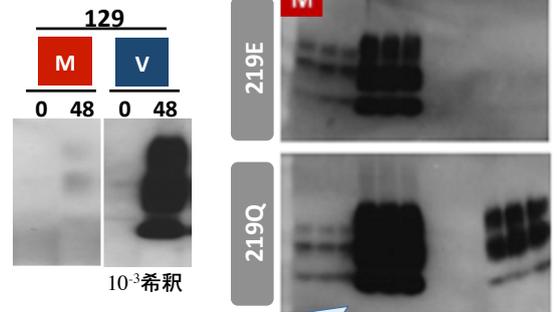


10<sup>-3</sup>希釈  
基質遺伝子型:  
129M



現時点では  
vCJDプリオンの  
検出限界は  
感染脳10<sup>-11</sup>希  
釈である。  
219Qの場合顕  
著に増幅効率  
が上がる

#### 硬膜移植後CJDプ ラク型



通常dCJD-PLは基質遺伝子型が129Vの時高感度検出が可能であるが、219Qに変えたと129Mの基質でも増幅効率が向上する

10<sup>-3</sup>希釈  
基質遺伝子型:  
129M

## 解 説

- 多くの変異導入は増幅効率を低下させる傾向があったが、変異型CJDプリオンの検出感度向上に貢献する可能性のある変異として219Qが見つかった。
- 硬膜移植後CJDプラーク型は129Mの基質では増幅効率が悪いが、219をEからQに変えた場合に増幅効率が向上することが分かった。