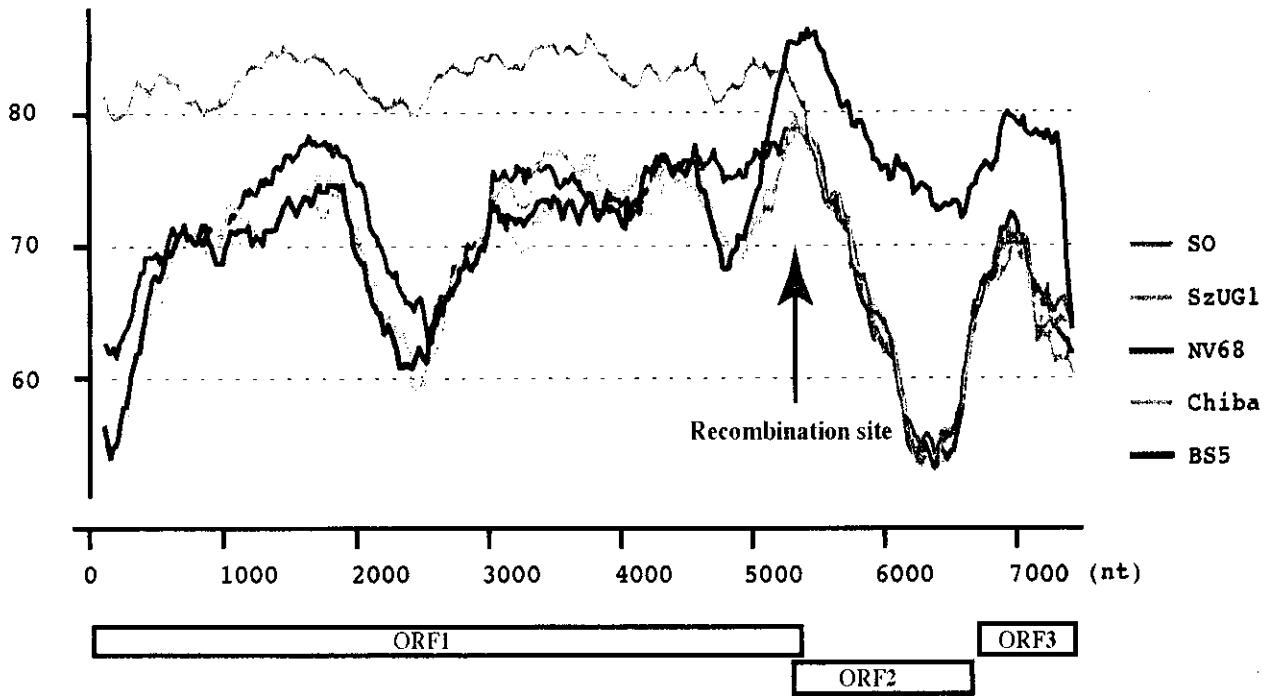


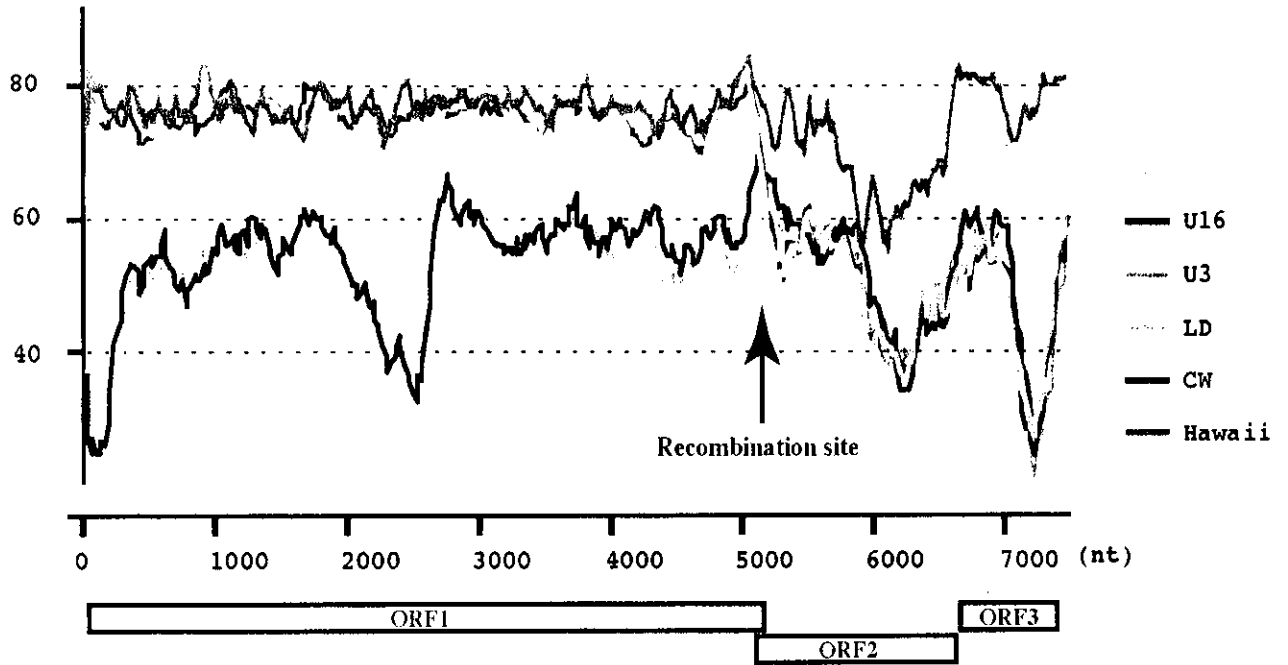
a) WUG1

similarity(%)

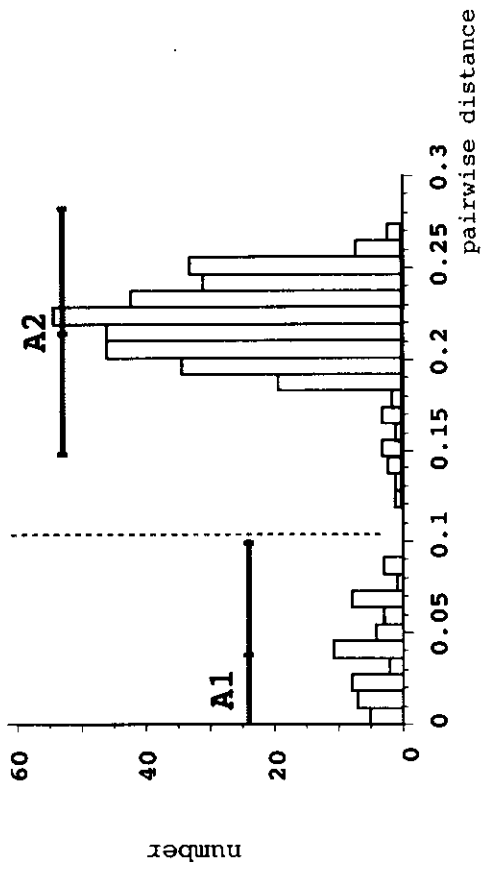


b) U1

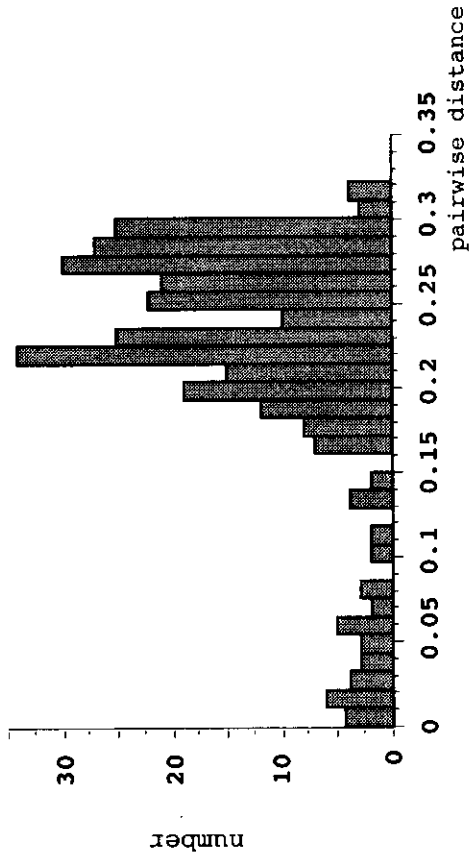
similarity(%)



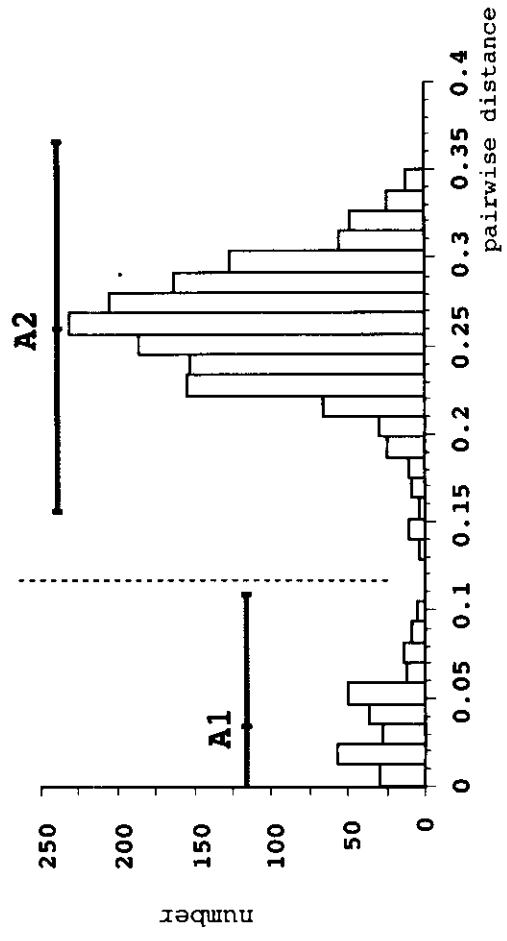
a) GI-capsid N/S



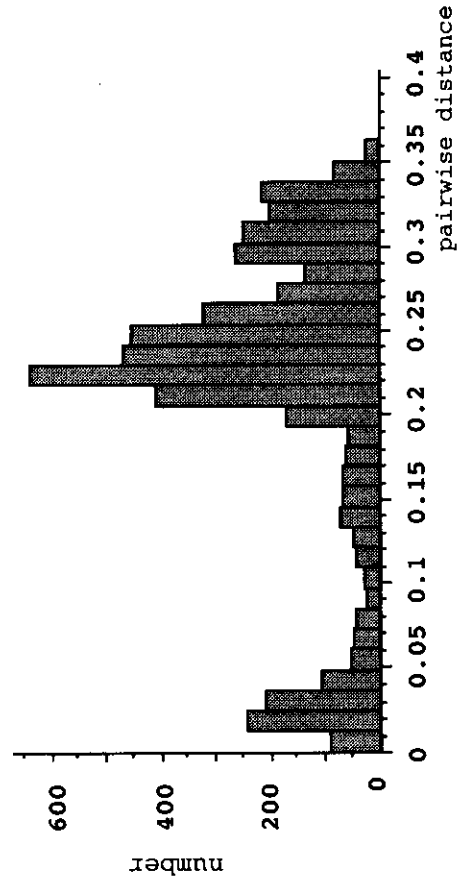
c) GI-polymerase



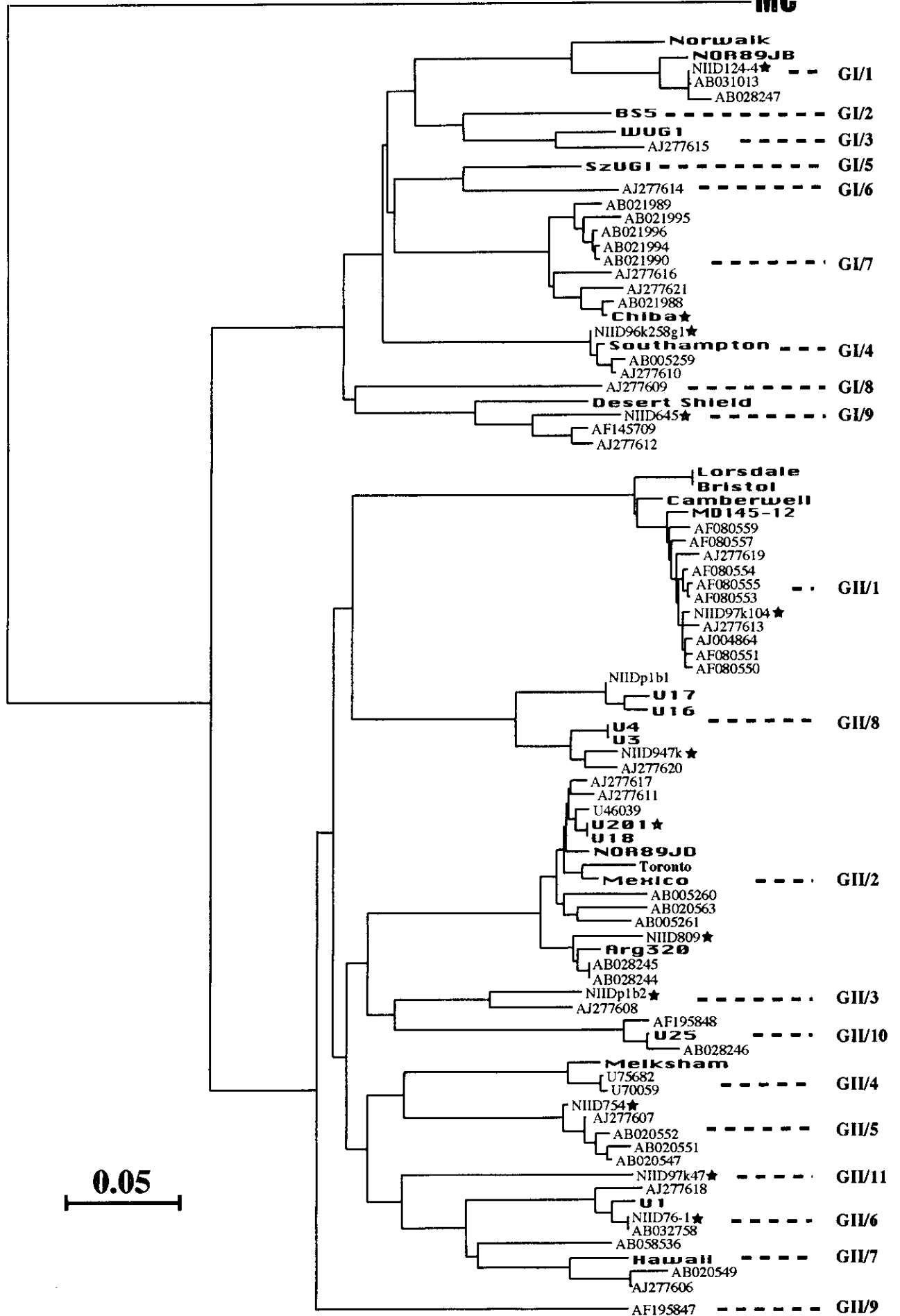
b) GII-capsid N/S



d) GII-polymerase



MC



0.05

分担研究報告

ノーウォークウイルス中空粒子および抗血清の作製

分担研究者 名取克郎 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官
協力研究者 武田直和 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
片山和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官
鎌田公仁夫 デンカ生研ウイルス試薬製造部 研究員

研究要旨

今までに Genogroup-I の 4 種、Genogroup-II の 8 種、計 12 血清型のノーウォーク様ウイルス (NLV) を検出する EIA キットを開発し評価した。結果は電子顕微鏡で NLV が確認された検体の 20-30 %が EIA で陰性を示し、血清型の異なると考えられる株が見い出された。それらは遺伝学的に Mexico クラスタに分類される株が多く、同クラスタの血清学的多様性が考えられた。EIA 陰性の検体からウイルス様中空粒子 (VLP) の作製を試み、Mexico クラスタに属す 4 株で VLP が作製出来た。抗原性の検討を行い、Mexico クラスタを効率良く検出するためにあらたに 2 株の抗血清を EIA キットに追加した。

A. 研究目的

ノーウォーク様ウイルス (NLV) は冬期に頻発するウイルス性集団食中毒の原因ウイルスの一つである。また必ずしも食品が直接の原因とは考えられない、急性胃腸炎施設内集団発生の原因ウイルスとして近年注目されているウイルスである。NLV は依然として培養増殖できないことから遺伝子診断および電子顕微鏡にすることが見つかっている。それらは血清学的にも異なることが予想され、かつ明らかになりつつある。本研究では組換えバキュロウイルス発現系を用いて血清型の異なる多くの NLV 中空粒子を作出し、それに対する高力価免疫血清

による病原診断が長年行われて来た。しかしながら同方法での診断が可能なのは限られた施設であり、また多くの検査材料を処理するのに困難である。そのため簡便で有効な迅速診断法の開発が望まれている。NLV は現在、遺伝学的に大きく Genogroup-I (GI) と Genogroup-II (GII) に分類され、GI は約 10 種、GII には約 20 種の異なる株が存在
を作成して患者材料から NLV を迅速に検出する EIA キットを開発し評価してきた。本年度は検出率が低かった遺伝学的に GII の Mexico クラスタに属す他の株の VLP 作出を試み、新たに高力価免疫血清をキットに追加すること

によって抗原検出効率の上昇を目的とした。

B. 研究方法

昨年度に作成した EIA キットで検出できなかった検体から、NLV 構造蛋白をコードする ORF2 の 5' 末端、約 300 ベースを増幅して遺伝子配列を解析し、血清学的に差があると思われる株を選出した。候補株の ORF2 領域を、或いは ORF2 から ORF3 までを PCR で増幅してクローニング後、組換えバキュロウイルスの作出を試みた。ウイルス様中空粒子 (VLP) が産生できたものについてウサギで高力価免疫血清を作成して、ELISA 法による交差反応試験で抗原性を検討した。Mexico クラスタを可能な限り検出するための抗血清の組み合わせ決定し、抗原検出 EIA キットに追加した。

C. 研究結果

遺伝学的には Mexico クラスタに属すが、塩基配列のホモロジーがわずかに異なる 5 株について組み換えバキュロウイルスを作出し、VLP の発現を試みた。4 株 (r18-3, r336, r201, r1152) で VLP の発現ができ、従来作製した r809 株を加えて計 5 株の Mexico クラスタに属す VLP の大量発現が可能となった。VLP を精製してウサギで免疫血清を作製し、今までに発現が出来ている GI の 4 株、GII の他のクラスタ 8 株を加えて交差反応試験を行った。遺伝学的に Mexico クラスタに属した株は血清学的にも同様に分類された。しかし同クラスタ内でもわずかに血清学的な違いが見いだされた。例えば昨年に開発したキットに加えられた r809 株は他の同クラスタの株とは 12.5 %以下の

交差性しか見られなかった。このことが遺伝学的に Mexico クラスタに分類されるがキットで検出されない原因と考えられた。今回 VLP が発現出来た 4 株と r809 株の計 5 株から Mexico クラスタ全体をカバーすると考えられる組み合わせを決定し、新たに r336 と r18-3 株の高力価免疫血清を抗原検出抗体としてキットに加えた。その結果、新しい NLV 抗原検出 EIA キットは GI が 4 血清型の 4 種、GII は 7 血清型の 10 種の抗血清が使用されることとなった。

D. 考察

昨年開発した NLV 抗原検出 EIA キットの評価の結果において、特に遺伝学的に Mexico クラスタに属すウイルスの検出が悪かった。本年は同クラスタに入る株を遺伝学的に選出して VLP 発現を試み新たに 4 株の発現に成功した。血清学的に解析した結果、同クラスタ内でも微妙に交差性に違いがあることが明らかになった。昨年のキットに本年発現した 2 株を加えることによって、Mexico クラスタの抗原検出率はかなり向上すると考えられる。

本年度に VLP 作製に成功したものを加えて、現在ウイルス抗原として使える 17 種の NLV 発現蛋白 (VLP) を持っている。VLP を用いて血清学的に NLV の診断を行うことも可能になっている。食中毒事例、特に生カキが原因と考えられる食中毒事例では複数の NLV が原因ウイルスと診断されること、それに対し施設内集団発生などでは単一の株が原因と考えられる事が多いことなどが血清学的診断によって明らかになってきた。また健常人の抗体調査を行う

と NLV は実に広く、また多くの血清型が分布していること、そしてそれは日本においては少なくとも 30 年も前から同様だったことが明らかにされつつある。 107-114.

NLV は遺伝学的にも血清学的にも実に多様なウイルスであることが知られている。 遺伝子の解析も年々進んでおり、血清学的にも新種と考えられるウイルスが同定されつつある。特に GI に分類される株の VLP 発現はまだ不完全であり、現在日本で流行した遺伝子型の異なる GI 株数株の VLP 発現を実施中である。

E. 結論

NLV はウイルス性食中毒の重要な原因ウイルスの一つである。 食中毒事例は行政的に対応する必要があることから迅速診断が望まれる。 患者糞便中から NLV を短時間で検出できる抗原検出 EIA キットは原因ウイルスの迅速診断にすぐれている。 昨年開発した同キットの検出効率をさらに上げるために、本年度は血清学的に異なる 4 種類の VLP を作出して高力価免疫血清を作製し、有効と考えられた 2 種の抗血清を抗原検出キットに追加した。

F. 健康危険情報

F. 研究発表

Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. J Virol Methods 2002;100:

チバウイルス 3C 様プロテアーゼの活性中心アミノ酸残基の同定と
3次元立体構造解明に向けた結晶化の検討

分担研究者 染谷 雄一 （国立感染症研究所・ウイルス第2部・研究員）

研究要旨：ノーウォーク様ウイルス感染による急性胃腸炎に対して有効な治療薬の創出を目指し、ノーウォーク様ウイルスのひとつ、チバウイルスが有する 3C 様プロテアーゼに着目し、遺伝子工学的的手法によりその活性中心アミノ酸残基の同定と X線結晶構造解析による立体構造解明に向けて 3C 様プロテアーゼの結晶化を試みた。本プロテアーゼはキモトリプシン様プロテアーゼファミリーに属するが、タンパク質分解に直接関わる活性中心残基が Ser ではなく、Cys であるという特徴を持つ。GDCG モチーフに保存されるこの Cys 残基と 37ヶ所の荷電アミノ酸残基をひとつずつ他のアミノ酸残基に置換し、プロテアーゼ活性の有無を検討したところ、チバウイルス 3C 様プロテアーゼの活性中心は His30 と Cys139 の 2 残基で構成される catalytic dyad であることが明らかになった。N 末端に His タグを導入した 3C 様プロテアーゼを大腸菌で発現させ、アフィニティ精製し、結晶化条件を検討したところ、2 M 硫酸アンモニウム、5 %イソプロパノールを含む試薬で再現的に結晶成長が認められた。今後 X線結晶構造解析に用い、立体構造を解明したい。

A. 研究目的

生カキなどの喫食に伴うノーウォーク様ウイルス感染による急性胃腸炎は毎冬流行し、大きな社会的問題となっている。しかし、ウイルス増殖を抑えるといった、根本的な治癒に導く有効な治療薬はない。ノーウォーク様ウイルスはゲノム上に 3C 様プロテアーゼのほか、RNA ヘリカーゼ、RNA ポリメラーゼといったウイルスゲノムの複製に関わると思われる酵素を持っている。これら酵素の阻害剤は急性胃腸炎治療薬の候補として期待できる。そこで、本研究では、ノーウォーク様ウイルスのひとつである、チバウイルスの 3C 様プロテアーゼに着目し、まず、部位特異的変異導入法を用

いた遺伝子工学的的手法により、活性中心アミノ酸の同定を行った。次いで、その結果を検証することも考えながら、3C 様プロテアーゼを精製し、X線結晶構造解析の試料とすべく、結晶化を試みた。

B. 研究方法

1. 活性中心アミノ酸残基の同定

チバウイルスゲノムの 3B VPg、3C 様プロテアーゼをコードする領域を PCR で増幅し、N 末端に His タグが付加するよう大腸菌発現ベクターに組み込んだ (pUCHis3BC)。このプラスミドをもとに部位特異的変異導入を施し、種々の変異プラスミドを作成した。各プラスミドを大腸

菌 BL21-CodonPlus-RIL 株に導入し、IPTG 添加で発現を誘導し、lysate を調製した。タンパク質発現およびプロテアーゼ活性の有無を抗 His タグ抗体、抗プロテアーゼ抗血清を用いた Western blotting により検出、判断した。

2. 3C 様プロテアーゼの結晶化

N 末端に His タグを導入した 3C 様プロテアーゼをコードするプラスミド (pUCHisPro) を大腸菌 BL21-CodonPlus-RIL 株に導入し、IPTG 添加により発現を誘導した。菌体を超音波破碎後、超遠心により可溶性画分を調製した。この画分より TALON Metal Affinity Resin (Clontech) を用いて目的タンパク質 (HisPro) を精製した。結晶化条件は、Crystal Screen および Crystal Screen II (Hampton Research) を用い検討した。

C. 研究結果

1. 活性中心アミノ酸残基の同定

キモトリプシンの活性中心 Ser195 残基に相当すると思われる、GDCG モチーフ内の Cys139 残基と 3C 様プロテアーゼのすべての荷電アミノ酸残基 37 ヶ所をひとつずつ Ala に置換した変異 His3BC タンパク質を作成、発現させた。野生型および大部分の変異体において、抗 His タグ抗体で 23 kDa の His3B と抗プロテアーゼ抗体で 22 kDa の 3C 様プロテアーゼが検出され、プロテアーゼ活性を有していることが示された。Arg8、His30、Lys88、Arg89、Asp138、Cys139、His157 の Ala 変異体は両抗体で 45 kDa の His3BC を検出し、プロテアーゼ活性が消失していた。これら 7 残基につい

て、他のアミノ酸残基にも置換し調べた。Arg8、His30、Lys88、Asp138、His157 は他のアミノ酸には活性を保持したまま置換することはできなかった。Arg89 は Lys 変異体のみ活性を保持していた。Cys139 は Ser 変異体で活性が認められた。

2. 3C 様プロテアーゼの結晶化

N 末端に His タグを導入したチバウイルス 3C 様プロテアーゼ (HisPro) を精製し、遠心式限外濾過膜にて 4 mg/ml 程度に濃縮した。濃縮精製タンパク質を用いて、ハンギングドロップ蒸気拡散法で結晶化条件を検討したところ、2 M 硫酸アンモニウム、5 % イソプロパノールを含む試薬で再現的に結晶成長が認められた。また、重原子導入誘導体を得るため、セレノメチオニン (SeMet) を添加した培地で生育させた大腸菌より HisPro タンパク質 (SeMet-HisPro) を同様に精製、濃縮した。SeMet-HisPro も 2 M 硫酸アンモニウム、5 % イソプロパノールを含む試薬で再現的に結晶成長が認められた。

D. 考察

1. 活性中心アミノ酸残基の同定

上記 3C 様プロテアーゼの変異導入解析と、RHDV、ポリオウイルス、ライノウイルス、A 型肝炎ウイルスの 3C プロテアーゼのアミノ酸配列との配列比較、ポリオウイルス、ライノウイルス、A 型肝炎ウイルスの 3C プロテアーゼの結晶構造を考慮し、チバウイルス 3C 様プロテアーゼの活性中心は、His30 と Cys139 の 2 残基から成る catalytic dyad であると考えられる。そのほかの残基 (Arg8、Lys88、Arg89、Asp138、

His157) は詳細な役割はまだわからないが、構造の維持や基質認識に関与している可能性が考えられる。

2. 3C 様プロテアーゼの結晶化

今後、HisPro および SeMet-HisPro から得られた結晶を用いて X 線照射実験を行い、回折データを収集する。最終的に 2 Å を切る高解像度の立体構造を得るため、良好な結晶を得られる条件を詳細に検討する。

E. 結論

部位特異的変異導入解析により、チバウイルスを含めて、ノーウォーク様ウイルスの 3C 様プロテアーゼの活性中心アミノ酸残基は His30 と Cys139 の 2 残基であることが示された。これは、キモトリプシン様プロテアーゼが通常 His/Asp/Ser の 3 残基を活性中心として持つことを考えると、極めてユニークな特徴といえる。X 線結晶構造の解明は、活性中心の原子レベルでの理解を可能にし、さらには、詳細なプロテオリシスの分子機構を明らかにできるものと期待される。更に、構造情報に基づいたプロテアーゼ阻害剤の開発を可能にし、将来的に治療薬として用いられる物質の創出につながるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Y. Someya, N. Takeda, and T. Miyamura. (2002) Identification of active-site amino acid residues in the Chiba virus 3C-like protease. *J. Virol.* (in press)

2. 学会発表

- (1) Y. Someya, N. Takeda, and T. Miyamura. Molecular cloning of the Chiba virus genome and functional expression of the Chiba virus 3C-like protease in *E. coli*. Sixth International Symposium on Positive Strand RNA Viruses. May 28 – June 2, 2001. Paris, France.
- (2) Y. Someya, N. Takeda, and T. Miyamura. Functional consequences of mutations of charged amino acid residues in the Chiba virus 3C-like protease. Thirty-fifth Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program. Aug. 7-9, 2001. Hawaii, USA.
- (3) 染谷雄一、武田直和、宮村達男 「チバウイルスプロテアーゼの活性中心アミノ酸残基の同定」第 74 回日本生化学会大会 2001 年 10 月 25-28 日 京都
- (4) 染谷雄一、武田直和、宮村達男 「チバウイルス 3C 様プロテアーゼの活性中心アミノ酸残基の同定」第 74 回日本ウイルス学会学術総会 2001 年 11 月 18-20 日 大阪

研究成果の刊行に関する一覧表

1. Someya Y, Takeda N, Miyamura T: Identification of Active-Site Amino Acid Residues in the Chiba Virus 3C-Like Protease. *J. Virol.* 2002;76: in press.
2. Ishko H, Shimada Y, Yanoha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, Takeda N: Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification using the VP4 sequence. *J. Infect. Dis.* 2002;185: 744-754.
3. Kitamoto N, Tanaka T, Natori K, Takeda N, Nakata S, Jiang X, Estes MK: Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. *J. Clin. Microbiol.* 2002. in press.
4. Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods* 2002;100: 107-114.
5. Niikura M, Takamura S, Kim G, Kawai S, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Li T-C, Takeda N, Yasutomi Y: Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology* 2002;293: 273-280.
6. Utagawa ET, Nakazawa E, Matsuo K, Oishi I, Takeda N, Miyamura T: Application of an automated specimen search system installed in a transmission electron microscope for the detection of caliciviruses in clinical specimens. *J. Virol. Methods* 2002;100: 49-56.
7. Li T-C, Takeda N, Miyamura T: Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine* 2001;19: 3476-3484.
8. Lin K-H, Chern C-L, Chu P-Y, Cheng C-H, Wang H-L, Sheu M-M, Huang W-L, Pongsuwanna Y, Yamamoto S, Yoshino S, Ishiko H, Takeda N: Genetic Analysis of of Recent Taiwanese Isolates of a Variant of Coxsackievirus A24. *J. Med. Virol.* 2001;64: 269-274.
9. Magden J, Takeda N, Li T-C, Auvinen P, Ahola T, Miyamura T, Merits A, Kaariainen L: Virus-Specific mRNA Capping Enzyme Encoded by Hepatitis E Virus. *J. Virol.* 2001;75.
10. Sasaki J, Kusahara Y, Maeno Y, Kobayashi N, Yamashita T, Sakae K, Takeda N, Taniguchi K: Construction of an infectious cDNA clone of Aichi virus (a new member of the Family Picornaviridae) and mutational analysis of a stem-loop structure at the 5' end of the genome. *J. Virol.* 2001;75: 8021-8030.
11. Sheikh S, Sugitani M, Kinukawa N, Moriyama M, Arikawa Y, Komiyama K, Li T-C, Takeda N, Ishaque SM, Hasan M, Suzuki K: Hepatitis E virus infection in fulminant hepatitis patients and apparently healthy population in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 2002;in press.
12. Tanaka E, Takeda N, Li T-C, Orii K, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Iijima T, Takayama T, Miyamura T, Yoshizawa K: Seroepidemiological study of hepatitis E virus infection in Japan using a newly developed antibody assay. *J. Gastroenterol.* 2001;36: 317-321.
13. Pongsuwanna Y., Guntapong R., Chiwakul M., Tacharoenmuang R., Onvimala N., Wakuda M., Kobayashi N., and Taniguchi K. Detection of a human rotavirus with G12 and P[9] specificity in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2002 (in press)
14. Adah M. I. Abel W., Oseto M., Kuzuya K., and Taniguchi K. First detection of human group C rotaviruses in Nigeria and sequence analysis of their genes encoding VP4, VP6 and VP7

- proteins. *J. Med. Virol.*, 66:269-275, 2002
15. Takahashi K, Ohashi K, Abe Y, Mori S, Taniguchi K, Ebina T, Nakagomi O, Terada M, and Shigeta S. Protective Efficacy of a Sulfated Sialyl Lipid (NMSO3) against Human Rotavirus-Induced Diarrhea in a Mouse Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:420-424, 2002
 16. Adah MI, Wade A, and Taniguchi K. Molecular epidemiology of rotaviruses in Nigeria: detection of unusual strains with G2P[6] and G8P[1] specificities. *J. Clin. Microbiol.* 39:3969-3975, 2001
 17. Takahashi K., Matsuda M., Ohashi K., Taniguchi K., Nakagomi O., Abe Y., Mori S., Sato N., Okutani K., and Shigeta S. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Res.*, 49:15-24, 2001
 18. Kobayashi N., Naik TN, Kusahara Y. Krishnan T., Sen A., Bhattacharya SK, Taniguchi K, Alan MM, Urasawa T, and Urasawa S. Sequence analysis of structural and non structural proteins of a human group B rotavirus detected in Calcutta, India. *J. Med. Virol.*, 64:583-588, 2001
 19. Qiu-Hong Wang, Junko Kakizawa, Le-Ying Wen, Mitsugu Shimizu, Osamu Nishio, Zhaao-Yin Fang, and Hiroshi Ushijima. Genetic Analysis of the Capsid Region of Astroviruses. *J. Med. Virology.* 64: 245-255, 2001.
 20. 新川奈緒美、上野伸宏、本田俊郎、吉国謙一郎、有馬忠行、湯又義勝、伊東祐治、増満弘史、田中義文、中野秀人、馬場俊行、中俣和幸、西尾 治：ウチムラサキ貝が原因で夏季に発生したノーウォーク様ウイルスによる食中毒事例—鹿児島県—。病原微生物検出情報, 22:222-223、2001

20010716

以降 P.75-P.173は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
P.73-P.74「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。

ノーウオークウイルス (NLV) の RT-PCR 法

1. 必要な器具と試薬

1) 器具

サーマルサイクラー、超遠心器、冷却遠心器(5,000rpm)、マイクロ冷却遠心器(15,000rpm)、ホモジナイザーあるいはストマッカー、Vortex、恒温器、ヒートブロック、電気泳動装置、UV照射写真撮影装置、マイクロプレートリーダー、UV防御メガネ、ヘラ、ハサミ、メス、マイクロピペット(2、20、200、1000 μ l)、チューブ(0.5ml、0.2ml、1.5ml)、1ml注射器、18G注射針。

2) 試薬

SV Total RNA isolation system (Promegam, Cat.#Z3100)、エタノール、グリコーゲン(Boehringer Mannheim 901393)、NLVプライマー、ショ糖、ポリエチレングリコール6,000、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、リン酸二ナトリウム、核酸フリー精製水、EDTA・2NA(エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム)、電気泳動用アガロースME(岩井科学、250g入り Cat. No. 50013R)、TAE、エチジウムブロマイド、酢酸ナトリウム、イソプロピルアルコール、

M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Cat. No. 28025-013)

Random primer hexamer(Amersham Pharmacia,Cat.27-2166-01)

Oligo dt primer (Oligo dt(12-18) primer, Gibco BRL, Cat. No. 18418-012)

Super Script II (GibcoBRL, Cat. No. 18064-014)

100mM DTT (Super Script IIに添付)

QIA Viral RNA Mini Kit(Qiagen Cat.No.52904)

DNase I (Takara,Cat. No.2 215A)

Ribonuclease Inhibitor (Takara, Cat. 2310A)

Takara EX Taq (Takara, Cat. No. No.RR001A)

50倍濃度 TAE buffer [Tris 242g、氷酢酸 57.1ml、0.5M EDTA・2NA(pH8.0)100ミリリットルを蒸留水で1,000 mlとする]。

5倍濃度 TBE [Tris 54g、ほう酸 27.5g、0.5M EDTA・2NA(pH8.0)20mlを蒸留水で1,000mlとする]。

2. カキの前処理

本項では食品として最も重要視されているカキの方法について記す。他の食品においても基本的にはこの方法に準じて行える。

- 1) 殻付きカキはヘラ、メス等で貝柱を切り、殻を開く。
- 2) カキの外套膜を取り、次いで中腸腺の周りに付いている脂質部分をメス、ハサミ等で可能な限り取り除き、中腸腺を取り出す。中腸腺を摘出する際にはできる限り周りの白い組織(脂肪)を取り除くこと。
- 3) ホモジナイザーまたはサンプリングバッグに中腸腺をいれ、次いで5～10倍量 PBS(-)を加え良く粉砕する。
- 4) 粉砕した試料を遠心管に移す。
↓10,000 rpm. 20 分間冷却遠心し、上清を新しい試験管に取る。
- 5) 超遠心用遠心管に30%シヨ糖溶液を遠心管の10%程度入れ、それに4)の遠心上清を静かに重層させる(シヨ糖層を壊さないように初めは特に注意して少量ずつ入れる)
↓35,000 rpm. 180 分間 あるいは40,000 rpm. 120 分間 冷却遠心する。
- 6) アスピレーター、注射器等で液層を吸引し、沈渣のみとする。
- 7) 遠心管の管壁をPBS(-)で軽く洗い、管壁の周りの水分を滅菌した濾紙で吸い取る。
- 8) 沈渣に200 μ lのDDW(滅菌後、0.2 μ mで濾過したもの)を加え、浮遊させる。これをウイルスRNAの抽出に用いる。
(浮遊液に不純物が多いときには10,000 rpm. 20 分間遠心を行い、その上清をRNA抽出に用いる)

注)超遠心器を使えない時には以下の操作を行う。

前処理4)の遠心上清にポリエチレングリコール 6,000を8%量加え、NaClを2.1g/100mlになるように加え、軽く攪拌後、4℃の冷蔵庫に一晩置く、または室温で2時間攪拌する。

↓5,000～12,000 rpm. 20分間、冷却遠心する。

上清をアスピレーター、注射器等で吸引し、沈渣のみとし、管壁の周りの水分を濾紙(滅菌したものをを用いる)で吸い取る。

沈渣に200 μ lのDDWに浮遊させる。これをウイルスRNAの抽出に用いる。浮遊液に不純物が多いときには10,000 rpm. 20 分間の遠心を行い、その上清をRNA抽出に用いる。

3. RNA の抽出

RNA の抽出には多くの方法があり、またキットも多数市販されている。それぞれが良いと判断した方法を用いて良い。

A. SV Total RNA isolation systemによる方法

ウイルス RNA の抽出キットは、ここでは SV Total RNA isolation system について紹介する。このキットはふん便材料のフロン処理が不要であり、DNase の処理も含まれ、食品中に含まれている様々な DNA を消化するので非特異バンドの出現を抑える。また、他のキットを用いる時に DNase 処理が含まれていないものでは、DNase 処理を行った方が良い(DNase 処理の項を参照)。なお、DNase を取り扱うマイクロピペットは専用のものを用いる。

また、PCR を行う際には手袋をし、チューブの蓋を開ける時にはその前に軽く遠心した後、オープナーを用いること、また、RT-PCR の調製をする部屋と PCR 産物の電気泳動の部屋を分ける。それができない時にはそれぞれのクリーンベンチで行う。クリーンベンチで行う際にファンは止めて行う。コンタミ防止と RNase の混入の防止に細心の注意を払う。

1) 使用前に行う試薬の調製

添付の β -メカルプトエタノール(BME)を SV RNA Lysis buffer に加える。

95% エタノールを SV RNA Wash Solution と SV DNase Stop Solution に加える。

凍結乾燥の DNase I の入っている瓶に Nuclease-Free water を入れて、溶解する (Vortex はしない)。

2) 操作法

食品あるいはふん便の遠心上清を用いる (フロン処理は不要)。また、ふん便は乳剤でないものでも直接行える。

- (1) 滅菌チューブ(1.5ml)に SV RNA Lysis Buffer (BME を加えてあるもの) 350 μ l 入れる。それに検査材料を 100 μ l とポリオ 2 型ウイルス (Sabin 株、10,000 個程度の粒子数) を 2 μ l 入れた後、上下混合を 3~4 回行い、軽く遠心する。ふん便を直接用いるときには重量を測定し、175 μ l/30mg に比例して SV RNA Lysis Buffer を

加える。

(2) 次に SV RNA Dilution Buffer を $350\mu\text{l}$ 入れ、攪拌する。ふん便材料の時には完全に溶解させるため、良く混合する。溶解しない時には Vortex にかける。

(3) チューブを 70°C の water bath に 3 分間、直ちに on ice する。

↓ $12,000\sim 14,000\times g$ で 10 分間遠心する。

(4) 新しい 1.5ml のチューブに 95% エタノールを $300\mu\text{l}$ (ふん便 30mg を用いたときには $200\mu\text{l}$ を入れ、それに遠心上清を加え、攪拌(3~4 回上下混合)、軽く遠心。

(5) 新しい 1.5ml チューブに Spin Basket Assembly (Basket) をセットし、その Basket に (4) の溶液を入れる。

↓ $12,000\sim 14,000\times g$ で 1 分間遠心し、下のチューブ液を捨てる。

(6) Basket に SV RNA Wash Solution を $600\mu\text{l}$ 入れる。

↓ $12,000\sim 14,000\times g$ で遠心し、下のチューブの液を捨てる。

(7) Basket に DNase incubation mix を $50\mu\text{l}$ 入れ、室温に 15 分間置く。(この時間は厳守する)

(8) Basket に SV DNase Stop solution を $200\mu\text{l}$ 入れる。

↓ $12,000\sim 14,000\times g$ で 1 分間遠心、チューブの液を捨てる。

(9) Basket に SV RNA Wash Solution を $600\mu\text{l}$ 加える。

↓ $12,000\sim 14,000\times g$ で 1 分間遠心し、チューブの溶液を捨てる。

(10) Basket に SV RNA Wash Solution を $200\mu\text{l}$ 加える。

↓ $14,000\times g$ で 2 分間遠心する。

(11) Basket を新しいチューブ (Elution チューブ) にセットし、蓋を 2 分間開け、エタノールを飛ばす。

(12) 次いで Basket に食品の時には核酸フリー精製水を $100\mu\text{l}$ 、ふん便材料は $40\mu\text{l}$ を Basket に入れ、2 分間置く。

↓ $12,000\times g$ で 2 分間遠心する。

チューブに溜まった液が抽出 RNA で、ふん便材料はこれを RT-PCR に用いる。

注) 食品の時には以下の操作を続けて行う。

(13) Elution チューブに 95% エタノール $300\mu\text{l}$ 、グリコーゲン $2\mu\text{l}$ および 3M 酢酸ナトリウム $40\mu\text{l}$ を加え上下混合し、 -70°C 以下に 30 分置く (over night の

ときは-20℃に置く)。

↓15,000rpm. で30分間遠心し、上清を完全に除く。

(14) チューブに75%エタノールを400 μ l加え、上下混合する。

↓15,000rpm. で20分間遠心する。

(15) 上清を完全に除いた後、乾燥させる(完全に乾燥させない)。

(16) 核酸フリー精製水30 μ l加えたのち、70℃に5分間置き、RNAを溶解させる。

これをDNase処理済み抽出RNAとし、RT-PCRに用いる。-20℃以下で保存する。

B. QIAamp Viral RNA Mini キットによるRNAの抽出

このキットはRNA抽出にCarrier RNAが含まれており、RNA抽出効率はSV Total RNA isolation systemより10倍程度良い。しかし、10%ふん便乳剤を作製し、遠心する必要がある。またこのキットにはDNase処理が含まれていないので、各自が行わなければならない。

1) 使用前に行う試薬の調整

サンプルを室温(15~20℃)に戻しておく、Buffer AVEを室温に置く。

Buffer AW1は96~100%エタノールを25ml加える)、Buffer AW2(Kit No. 51104では96~100%エタノール30mlを加える)およびCarrier RNA(凍結乾燥品)のチューブにBuffer AVL 1ml添加し、Carrier RNAを溶解させ、Buffer AVLに全量を添加する。添加したBuffer AVL/Carrier RNAは室温で2週間、2-8℃で6ヶ月間安定。Buffer AVL/Carrier RNA中に沈殿物がある場合には、加熱(80℃)により溶解し(但し、5分間以内で、6回以上の加熱は行わない)、使用前に室温に戻す。

2) 操作法

以下の操作は室温で行う。

(1) 1.5mlチューブにBuffer AVL/Carrier RNA 560 μ lを入れる。

(2) 10%ふん便乳剤遠心上清(10,000rpm. 10分間)を138 μ l(増量にすることも可能である。詳細はキットの添付マニュアルを参照)とポリオウイルス2型(Sabin株)を2 μ l(10,000個程度の粒子数)入れ、サンプルとBufferを充分混合するため15秒間Vortexにかけ、室温(15-25℃)に10分間置く。チューブをスピンドウンする。

- (3) エタノール(96~100%)560 μ l をチューブに加え、15 秒間 Vortex をかけた後、チューブをスピンドウンする。液が混濁した時には 9,000Xg (10,000rpm) 5 分間遠心する。
- (4) (3)の液 630 μ l を QIAamp スピнкаラム(2ml コレクションチューブ)に注入し、蓋を閉め、6,000Xg (8,100 rpm)、1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移し、残りの(3)の液 630 μ l を入れ、同様に遠心し、全ての液が無くなるまで行う(この操作は 2 回で終わる)。
- (5) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW1 500 μ l を入れる。
- (6) 蓋を閉め、6,000Xg (8,100 rpm)、1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。
- (7) QIAamp スピнкаラムに Buffer AW2 500 μ l を加え、20,000Xg (14,000 rpm)で 3 分間遠心する。Buffer AW2 とろ液等が接触した時には(8)を行う(このような事は通常起きない)。
- (8) QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。フルスピードで 1 分間遠心する(必ずしも必要でない)。
- (9) QIAamp スピнкаラムを新しい蓋つき 1.5ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。QIAamp スピнкаラムの蓋を開け、室温に戻した Buffer AVE 60 μ l を加え、蓋を閉めて 1 分間置いた後、6,000Xg (8,100 rpm)で 1 分間遠心する。
- (10) このろ液が抽出 RNA であり、RNA は-20 $^{\circ}$ C以下で 1 年間は安定。

4. DNase 処理

食品、人のふん便中には様々な DNA が含まれており、しばしば PCR で非特異バンドが出現するので、それらを抑制するため DNase 処理を行う。またこの時点までに DNA の混入が起きた時でも、それらを消化することができる。従って、キットに DNase 処理が含まれていない時にはこの操作を行うことが望ましい。注意として DNase I を使用するマイクロピペットは専用のもを用い、可能であればオートクレイブができるものが良い。検査終了後使用した DNase の含まれている液、チューブ等は全てオートクレイブにかける。

- 1) 表 1 に示したように DNase 処理混合液の調製を行う。

表 1. DNase 処理混合液

反応液量	15 μ l	30 μ l
Sample RNA	12.0 μ l	24 μ l
5XAMV Buffer ^註	1.9 μ l	3.8 μ l
DDW	0.1 μ l	0.2 μ l
DNase I (1U/ μ l)	1.0 μ l	2.0 μ l

注)使用する Reverse Transcriptase の buffer を用いる。

- 2) 混合液調製後、37°Cに 30 分間置く。
- 3) 次いで 75°Cに 5 分間置く。
- 4) 直ちに on ice(または 4°C)する。これが DNase 処理済み抽出 RNA である。

5. RT 反応

A. M-MLV RT (Gibco BRL) を用いる時

1) 操作法

表 2. A 混合液

1. Primer		
Oligo(dt) (12-18) (0.5 μ g)	1 μ l	
NLV(-)プライマー (25 μ M)	1 μ l	
SB2-R1 (25 μ M)	1 μ l	
2. DNase 処理抽出 RNA	5 μ l	

表 3. B 混合液

1. 5 X RT Buffer	4 μ l
2. 0.1M DTT	1 μ l
3. 2.5mM dNTP	4 μ l
4. M-MLV RT (200unit/ μ l)	1 μ l
5. RNase inhibitor (38unit/ μ l)	1 μ l

注#1) NLV の RT 反応を行う時に (-)プライマー (アンチセンスプライマー) の代わりに ORF1 領域を増幅する際にはランダムプライマーを、ORF2、ORF3 では Oligo(dt) (12-18) プライマーを用いて cDNA を作製するとプライマー毎の cDNA を作製しなくても良い。

ポリオウイルスの PCR はウイルス抽出のコントロールである。

- (1) A と B 混合液作製し 70 °Cに 10 分間置いた後、on ice する。
- (2) 次いで B 混合液を加える。

(3) 37 °Cに1時間、次いで98 °Cに5分間、直ちに on iceする。

(4) cDNA の作製終了

B. Super Script RT II (GibcoBRL) を用いる時

1) 操作法

(1) 表4のRT反応調製液を作製する。

表4. RT反応液調製液(Super Script RT IIを用いる時)

反応液量	15 μ l	20 μ l	30 μ l	50 μ l
DNase 処理 RNA	7.5 μ l	10.0 μ l	15.0 μ l	25.0 μ l
5X SS II Buffer	2.05 μ l	2.74 μ l	4.1 μ l	6.85 μ l
10mM dNTPs	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
Random Primer(1.0 μ g)	0.375 μ l	0.5 μ l	0.75 μ l	1.25 μ l
RNAasin(33unit/ μ l)	0.5 μ l	0.67 μ l	1.0 μ l	1.67 μ l
100m M DTT#	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
Super Script RT II (200u/ μ l)	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
DDW	2.325 μ l	3.09 μ l	4.65 μ l	7.73 μ l

注) Random Primer の代わりに NLV(-)プライマーを用いても良い。

(2) 反応は42°Cで30分から2時間行う。

(3) 次いで99°Cで5分間加熱し、on ice(または4°C)する。