

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

感染症領域における先端的遺伝子診断技術の開発に関する研究

所 属 三光純薬株式会社 研究開発部
研究者 薄井 貢

分担研究者

- (1) 三光純薬(株)研究開発部 薄井 貢
- (2) 国立感染症研究所 阿部賢治
- (3) 東京大学大学院医学研究科 牛島廣治

要旨

感染症領域における新しい遺伝子診断技術として、特異的に自己集合する一対の DNA プローブ（以下、Honey Comb probe:HCP）を用いた検出方法の検討を行なった。本年度は、HCP のデザインを中心にその検出系の確立と検出のための試料作製を行なった。

1. 研究目的

特異的に自己集合する一対の HCP を用いて、感染症領域における原因微生物の遺伝子診断の確立と POCT としてのシステム開発を目的に研究を行なった。診断の対象は迅速な診断が必要とされる MRSA、結核菌、血液媒介性の肝炎ウイルス、HIV、ウイルス性下痢症とした。

2. 研究方法

(1) 本研究に用いた HCP のデザインと自己集合反応。

図 1 に示した基本デザインをもとに 3 つの領域からなる互い違いに相補的な配列をもつ一対の HCP を作製した。この HCP は、A は A'、B は B'、C は C' と相補的な配列となるため、反応温度に依存した自己集合反応（以下、Probe alternation link self-assembly reaction:PALSAR 法）により特異的に増幅してポリマーを形成することが可能である（図 2 の矢印）。

一方、HCP はその中央領域が切断されていた場合、図 3 に示したように反応温度にかかわらず PALSAR 法によるポリマーの形成は認められないことから、本研究ではこの HCP の性質を利用して新しい遺伝子診断技術の開発を検討した。

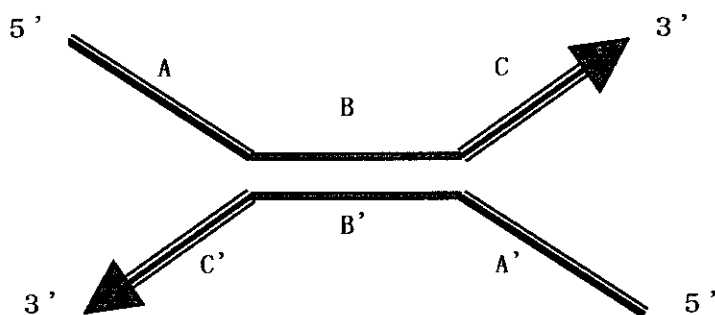


図 1 HCP の基本デザイン

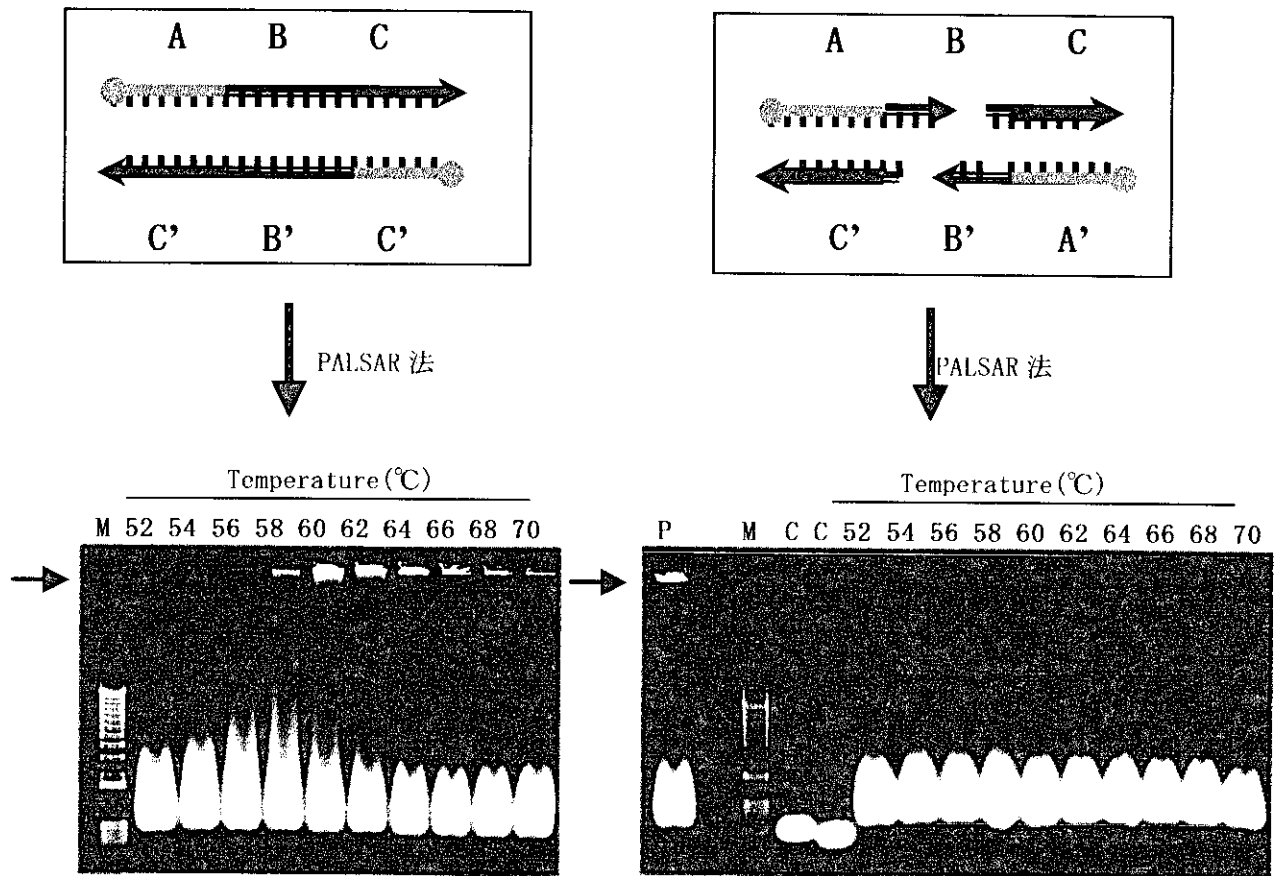


図2 HCPによる自己集合反応。

図3 中央領域が切断されHCPによる自己集合反応。

(2) HCPを用いたライゲーション反応による目的遺伝子の検出。

目的遺伝子と相補的な塩基配列を有するHCPの1箇所を切断したHCPを作製し、この切断されたHCPを目的遺伝子とハイブリダイゼーションさせ、耐熱性リガーゼ酵素を用いてライゲーション反応を行ない1本に連結させた後、自己集合反応によりポリマーを形成させた。目的遺伝子が存在しない場合は、ライゲーション反応が行なわれないためHCPは切断されたままあり、自己集合によるポリマーの形成も確認されないことから、この性質を利用して新しい遺伝子診断技術の開発を試みた。

①. MRSAを用いた検出。

MRSAのPBP遺伝子の検出に適したHCPをデザインした。また、作製したHCPによるポリマーの形成を確認した。

②. HBVを用いた検出。

HBVのS遺伝子とX遺伝子の検出に適したHCPをデザインした。また、作製したHCPによるポリマーの形成を確認した。

③. 結核菌を用いた検出。

Mycobacterium属の16S rRNA遺伝子領域の検出に適したHCPをデザインした。また、作製したHCPによるポリマーの形成を確認した。

④. HIVを用いた検出。

HIVの検出に適したHCPをデザインした。

(3) 自己集合反応の効率を向上させた HCP のデザインに関する研究。

互いに相補的な塩基配列領域が 3ヶ所以上の数から構成される HCP を用いて、効率的にポリマーを形成させるために、一对の HCP が互い違いに交差してハイブリダイゼーションする時の分岐点における塩基配列を G (グアニン) と C (シトシン) を中心にすることにより、「stacking of base」という塩基の積み重ねにより塩基の π 電子の特殊な相互作用を生じさせ、安定したポリマーを形成させることに成功した。

(4) 血液から簡便に血液媒介性ウイルスの核酸を抽出する方法。

セパジーン RV-R™ (三光純薬) を対象にして血液 (全血) 中の血液媒介性ウイルスを特殊なメンブレンを用いて簡便に分離し、分離されたウイルスから核酸を抽出する方法を目的に今年度は探索を行った。

(5) ウイルス性下痢症における検討。

下痢症ウイルス遺伝子の遺伝子の検出に適した HCP をデザインした。また、下痢症ウイルス遺伝子を迅速かつ簡便に検出するシステム開発のためにオリジナルサンプルとしてノーウォーク用ウイルス (N) のスクリーニングを行った。得られた NLV 陽性検体については段階希釈し、PCR 法を用いて検出感度を検討した。

3. 研究成果

(1) 本研究に用いる DNA プローブのデザイン

HCP (図 2) と検出用に中央の領域を切断した HCP (図 3) をデザインした。それぞれの HCP に 20×SSC を加え反応液を調製する。これを至適温度で反応させると図 2 にみられるように特徴的なポリマーを形成した。しかし、図 3 に示したように検出用に作製した中央の領域が切断された HCP では、ポリマーの形成がみられなかった。

(2) HCP を用いたライゲーション反応による目的遺伝子の検出。

- ①. MRSA の PBP 遺伝子を目的遺伝子として検出するために、MRSA に相補的な配列をもつ HCP を作製した。作製した HCP は 68℃ で反応することにより、特徴的なポリマーの形成した。
- ②. HBV の S 遺伝子と X 遺伝子を目的遺伝子として検出するために、HCP をデザインした。作製したハニカムプローブは、60℃ で反応させることにより、特徴的なポリマーの形成した。
- ③. Mycobacterium 属の 16S rRNA 遺伝子領域の一部と相補的な領域を有する HCP を作製し、HCP の自己集合反応によるポリマーの形成を確認した。また、作製した HCP を用いてライゲーション反応による切断された HCP の連結を確認した。
- ④. HIV の検出に適した HCP をデザインするために、変異の少ない gag 遺伝子に検出部位を設定し、最もパルサー法での検出に適したプローブを探索、デザインした。

(3) 自己集合反応の効率を向上させた HCP のデザインに関する研究。

①. 反応温度によるポリマー形成の影響。

互い違いに交差してハイブリダイゼーションする時の分岐点における塩基配列を G (グアニン) と C (シトシン) の結合にした HCP-a において、安定した二本鎖のポリマーがより低い温度で効率的に形成されることが確認された。

②. 反応時間によるポリマー形成の影響

互い違いに交差してハイブリダイゼーションする時の分岐点における塩基配列を G (グアニン)

と C (シトシン) の結合にした HCP-a において、安定した二本鎖のポリマーがより短時間で効率的に形成されることが確認された。

③. HCP 濃度によるポリマー形成の影響

互い違いに交差してハイブリダイゼーションする時の分岐点における塩基配列を G (グアニン) と C (シトシン) の結合にした HCP-a において、安定した二本鎖のポリマーがより低い濃度で効率的に形成されることが確認された。

(4) 血液から簡便に血液媒介性ウイルスの核酸を抽出する方法。

血液 (全血) 中の血液媒介性ウイルスを簡便に分離できる特殊な膜を探索した結果、2 種類の分離膜が選出された。ひとつは、カートリッジ内の密閉された空間でウイルスやバクテリアの核酸を抽出するシステムで、もうひとつは、血漿分離用に開発された分離膜である。来年度は、選出された 2 つの分離膜の有用性を検討する。

(5) ウイルス性下痢症における検討。

ノーウォーク用ウイルス (以下 NLV) のスクリーニングから得られた NLV 陽性検体を段階希釈して PCR での検出感度を検討したところ、1 stPCR の結果、100 倍から 1000 倍に希釈した検体液が検出限界であった。来年度は、このオリジナルサンプルを対象に新しい遺伝子診断の性能試験を実施する。

4. 考察

HCP のデザインは、3 つの領域が互い違いに相補的となるような配列をもつプローブ対から形成される。本技術を応用した遺伝子診断技術の開発は、従来の遺伝子増幅法とは異なり酵素等を用いないため低コストであり、また、阻害物質の影響を受けにくいと思われる。本年度は、プローブデザインを中心に検出系の確立、及び HCP の基礎と検出のための試料作製を行なった。

HCP のデザインにおける基礎検討結果から、より反応効率を高めた HCP のデザインに成功した。またね HCP を用いたライゲーション反応による目的遺伝子の検出では、ライゲーションによる反応産物の確認が行なわれ実験系の構築が進められた。

血液から簡便に核酸を抽出する方法では、特殊な分離膜が選出され前処理として期待される。さらに、下痢症ウイルスの遺伝子診断では新しい遺伝子診断技術の評価用オリジナルサンプルが作製されたので、来年度はさらに具体的な検出系の確立をめざして検討を進める。

5. まとめ

PALSAR 法は操作性がシンプルであることから、POCT (ポイント・オブ・ケア・テクノロジー) として携帯性に優れた遺伝子診断システムの開発が可能である。来年度はこの HCP を用いて感染症領域における原因微生物の簡便な遺伝子診断を確立し、同時に POCT としてのシステム開発を進める。

6. 研究発表

なし

7. 知的所有権の習得状況

なし

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社