

平成15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

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

目 次

課題番号

20030933A KH51041	臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究	梨井 康 …… 1
934A KH51042	組換えDNA食品遺伝子産物の慢性経口毒性評価モデルの確立	廣瀬 雅雄 …… 5
935A KH51043	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦 善治 …… 10
936A KH51044	細胞内脂質輸送系に着目した血清脂質改善薬の開発のための基礎的研究	最上 知子 …… 16
KH51045	粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究	佐多 徹太郎 …… 21
937A KH51046	日本人糖尿病感受性遺伝子に基づく脂肪細胞を分子標的とした糖尿病・肥満の予防及び治療薬の開発	門脇 孝 …… 24
938A KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチン開発のための基礎研究	竹森 利忠 …… 27
939A KH51048	ノーウォークウイルスの超高感度核酸定量システム、及びベッドサイド抗原検出システムの開発	武田 直和 …… 31
940A KH51049	ワクチン創製の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島 朝人 …… 38
941A KH51050	食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する免疫学的高感度検出法に関する研究	五十君 静信 …… 43
942A KH51051	安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究	後藤 紀久 …… 48
943A KH51052	リポソーム表面結合型抗原のアレルギー予防・治療への応用に関する研究	内田 哲也 …… 55
944A KH51053	肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定方法の確立に関する研究	岡部 信彦 …… 61
945A KH51054	PPAR α をターゲットとした生活習慣病予防薬の開発	片山 茂裕 …… 64
946A KH51055	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	薄井 貢 …… 68
947A KH51056	乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究	西尾 治 …… 71
948A KH51057	可溶性ウイルス受容体等によるウイルス吸着阻止を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口 文広 …… 77
949A KH51058	EPA・DHA含有エステル交換構造脂質の体脂肪蓄積抑制効果に関する研究	斎藤 衛郎 …… 86
950A KH51059	エネルギー消費調節機構に立脚した生活習慣病予防薬に関する基礎研究	大坂 寿雅 …… 89
951A KH51060	遺伝子解析によるヒトエンテロウイルス同定の標準化	清水 博之 …… 93
952A		

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 株式会社パルマビーズ研究所

研究者 薄井 貢

研究要旨 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）を応用し、MRSA を対象に感染症の診断に適した新しい検出系の確立を試みた。

分担研究者

(1) 国立感染症研究所 感染病理部 阿部賢治

(2) 東京大学大学院 医学系研究科 牛島廣治

A. 研究目的

一定の条件下で特異的に自己集合する特殊な一対の DNA プローブ（以下、Honey Comb probe:HCP）を工夫することにより LCR 法をはじめ、PCR 法、NASBA 法における遺伝子増幅法で増幅した遺伝子を、自己集合体として簡便に検出する方法を開発し、感染症領域の診断に有用な新しい遺伝子診断方法を確立する。

B. 研究方法

本研究に用いる一対の HCP は、お互いに相補的になるようにデザインされた 3つの領域から構成されており (Fig.1)、A 領域は A' 領域、B 領域は B' 領域、C 領域は C' 領域とそれぞれが相補的な塩基配列となっている。そのため HCP は、それぞれの領域がハイブリダイゼーションすることによって限りなく自己集合反応 (以下、Probe alternation link self-assembly reaction:PALSAR 法) して特徴的な高分子物質を形成する。また、PCR 法を応用した検出に用いたプローブは、4本のプローブから構成されており、相補的な配列を持つ領域が、HCP と同様にそれぞれの領域とハイブリダイゼーションすることにより限りなく自己集合反応して特徴的な高分子物質を形成する。PALSAR 法の結果をこのとき形成された高分子物質 (ポリマー) の存在から容易に確認することができる。本年度は、DNA の検出として PCR 法を、RNA の検出として NASBA 法を HCP に応用した。また、LCR 法では、これまでの成果をまとめ、MRSA の検出を行った。

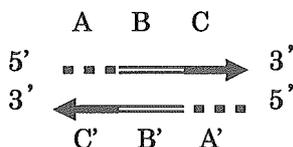


Fig.1 HCP

1. PCR 法を応用した検出

B 型肝炎ウイルス (HBV) のタイピングを目的に、HBV の A 型のタイプ特異的な配列から HCP を作製し、PA 法による検出を試みた。

- ① HBV ゲノタイプ A~F 株のうち A 株のゲノタイプに特異的な配列をもとに、PALSAR 法のプローブの設計を行った。(Fig. 2)

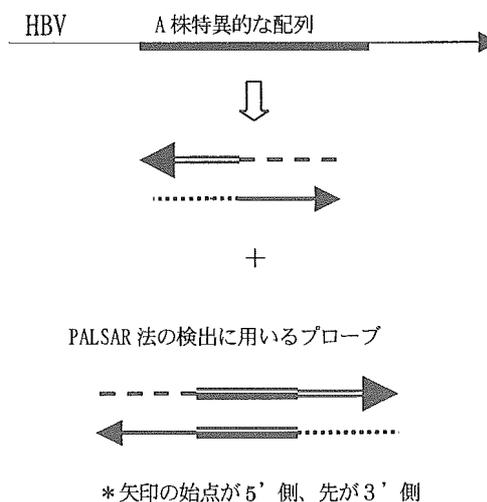


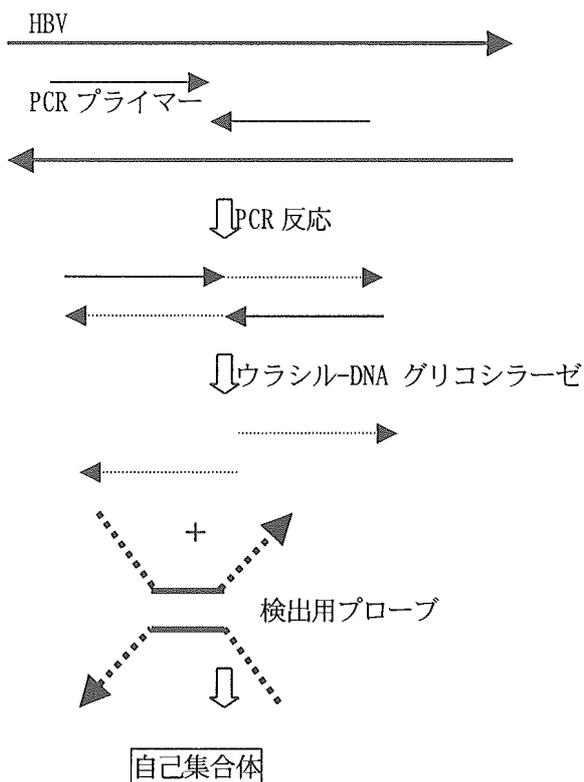
Fig.2 PALSAR 法に用いるプローブ

(各相補的な領域がハイブリダイゼーションして自己集合体となる)

- ② HBV の A 株のタイプ特異的な配列のオリゴヌクレオチドを作製し、ターゲット遺伝子とした。
- ③ PALSAR 法で検出するために、T (チミン) の代わりにデオキシウリジンをを用いた PCR プライマーを用い

て、Fig. 3 に示したように PCR 反応を行った。

- ④ 反応後、ウラシル-DNA グリコシラーゼにより PCR プライマーを消化し、PALSAR 法に用いるプローブとする。
- ⑤ PALSAR 法による検出をするために、検出用のプローブを添加し、加温により自己集合体を形成させる。
- ⑥ 反応液に、終濃度が $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $5.0 \mu\text{g/ml}$ となるようにエチジウムブロマイドを添加し、自己集合体を確認する。



* 矢印の始点が5'側、先が3'側

Fig. 3 PCR法を用いたPALSAR法による検出 (ウラシル-DNA グリコシラーゼで消化後のPCR産物と検出用プローブの点線部位が相補的配列)

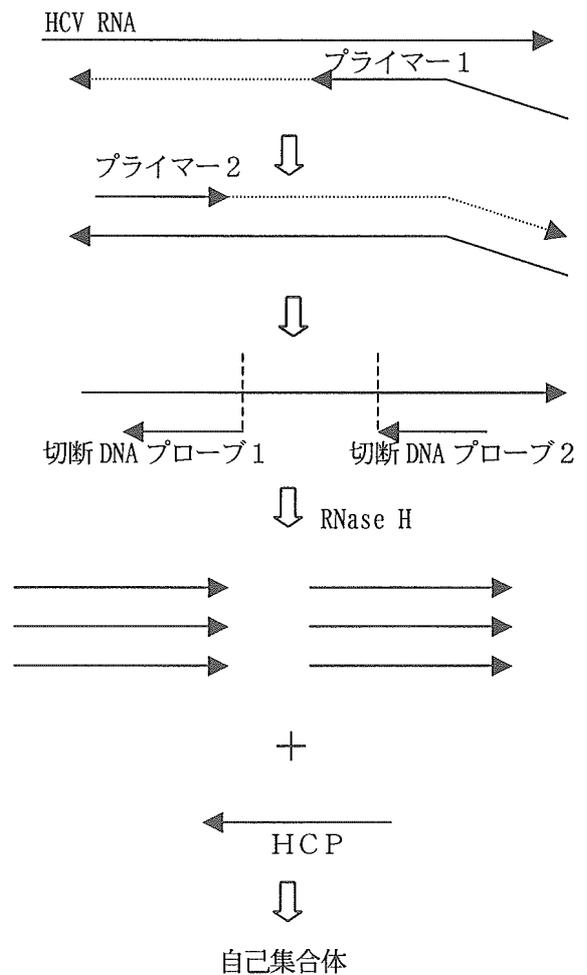
2. NASBA法を応用したPALSAR法による検出

RNA 遺伝子の検出として NASBA 法を HCP に応用し、C 型肝炎ウイルス (HCV) の 5' 側の NCR 領域を対象に検出系の確立を試みた。(Fig. 4)

- ① HCV RNA の 5' 側の NCR(non coding region) 領域を対象に T7RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を含むプライマー 1 及び HCV RNA の cDNA に相補的な配列からなるプライマー 2 (Table 1) を用いて NASBA 反応を行った
- ② NASBA 反応は、市販の NASBA AMPLIFICATION KIT (TOYOBO) の緩衝液 (4×反応液;ヌクレオチド、

DTT、 MgCl_2 他含 100% DMSO 溶液 2M KCl 溶液 NASBA 水) 及び、酵素溶液 (AMV-RT、RNase H、T7RNA ポリメラーゼ、BSA 含) を用いた。

- ③ 増幅した RNA の塩基配列から HCP に適した配列を切り出すため、HCP として設定した増幅 RNA 領域の 5' 末 3' 末にそれぞれ隣接した増幅 RNA 部位に相補的な配列をもつ切断 DNA プローブ 1 及び、切断 DNA プローブ 2 を設計し用いた。(Table 1)
- ④ 増幅された RNA に切断プローブ 1 と切断プローブ 2 (Table 1) 及び RNase H を添加後、 60°C 1 分、 37°C 40 分間反応させ、増幅 RNA を切断した。
- ⑤ 切断した増幅 RNA に DNA-HCP を加え、 94°C 30 秒、 56°C 1 時間で反応させ、自己集合体形成を行った。
- ⑥ 自己集合体形成反応後の反応液に 0.01mg/ml のエチジウムブロマイドを等量加え、15 分後に蛍光顕微鏡 (580nm) にて観察した。



* 矢印の始点が5'側、先が3'側

Fig. 4 NASBA法を応用したPALSAR法による検出

3. ライゲーションを用いた検出

目的とする遺伝子と相補的な配列の1箇所が切断されたHCPを用いて、目的遺伝子とハイブリダイゼーションさせた後、耐熱性リガーゼ酵素の下ライゲーション反応により1本の連結したHCPを生成させ、自己集合反応により高分子産物を形成させる方法である。

(Fig. 5) 目的遺伝子が存在しない場合は、ライゲーション反応によって連結されたHCPが生成されないため、自己集合反応による高分子産物は形成されない。この方法を用いて、MRSAの検出を行った。

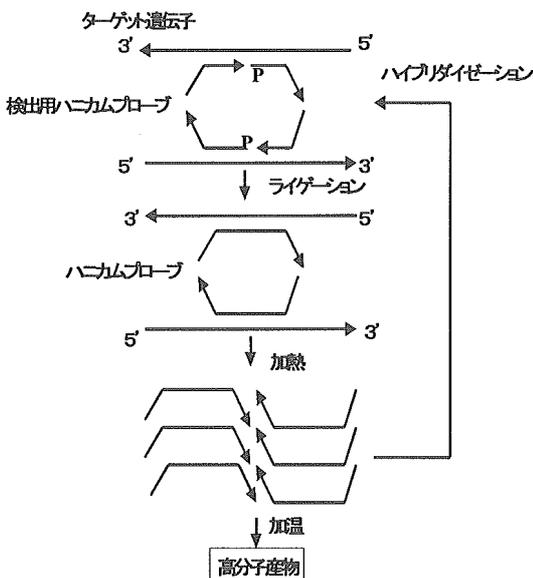


Fig. 5 HCPのライゲーションによるターゲット遺伝子の方法

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いた研究は、所属機関の承認を得た。また、検体の採取は家族の協力のもとで行われた。

C. 研究結果

① HBVのタイプA型と同じ配列を持つオリゴヌクレオチドを作製し、PCR法を用いたPALSAR法による検出システムの検討を行った。PALSAR法の検出のためのPCRプライマーのデザイン、UNGによる消化、自己集合反応等検討し、反応溶液にエチジウムブロマイドを添加したところ、自己集合体を目視することができた。

② HCVの5'-NCR領域を対象に、NASBA法により増幅を行い、PALSAR法により検出を行った。反応溶液にエチジウムブロマイドを添加したところ、自己集合体を蛍光顕微鏡下で粒子として観察することができた。MRSAのPBP遺伝子を対象にプローブをデザインし検出を試みたところ、アガロースゲル電気泳動で 10^4 cells/mlにおいて自己集合体が確認された。

D. 考察

各遺伝子増幅法で増幅された遺伝子を、PALSAR法による検出を行い検出出来ることが確認された。これらの結果はまだ基礎段階であり、さらに研究を進めることにより目的とする遺伝子の検出に要する時間の短縮や簡便化、検出感度の向上が期待されるものとする。

E. 結論

一対のHCPは、一本のオリゴヌクレオチドの中に3つの領域が設定されており、もう一方のオリゴヌクレオチドと互い違いに相補的となるようにデザインされたDNAプローブである。このHCPを用いたPALSAR法は、各種遺伝子増幅法で増幅された遺伝子を自己集合体として目視等で容易に確認することが可能であった。今後は臨床での実用化を考え、HCPで形成された自己集合体を一つの粒子としてさらに簡便に捕らえる検出方法の開発を検討する。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成15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

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

平成16年9月30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