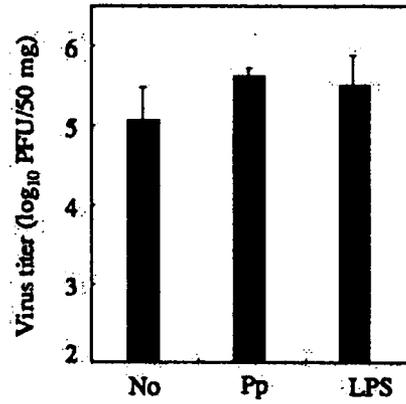


図 3

図 3



マウス肺でのSARS-CoV感染量の比較：LPS投与マウス (LPS)、Pp感染マウス (Pp) 及び未処理マウス (No)にFr-mo株を経鼻感染し、4日後にマウス肺中のウイルス量を比較した。

厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の確立及び
予防・治療法の開発に関する研究

分担研究課題：新興ウイルスが出現した場合の迅速なウイルス同定法の開発

分担研究者：遠藤 大二（酪農学園大学獣医学部放射線学教室）

研究要旨：新興ウイルスが出現した場合のウイルス同定方法として、ウイルスの塩基配列に依存せずにウイルスゲノム断片を検出する方法(非特異ウイルス検出法)の改善を行うとともに、既知のウイルス塩基配列からウイルスグループを共通して増幅するプライマー(共通プライマー)の設計を実施した。設計されたプライマーを用いたモデル実験では、不特異配列の検出法の感度は低く、方法の実施には時間を要するが、共通プライマー法では、感度の高さが期待できるが、多数のウイルス種に対応するためにはグループ形成とプライマー設計双方の自動化の必要性が示唆された。本研究では、塩基配列データ相互の相同性に関する社会ネットワーク分析と塩基配列データ間での共通モチーフを元にしたプライマー設計により共通プライマー設計を自動化可能なプログラム群を開発し、モデル実験で実用性を示した。これらの結果から、既知のウイルス全体のグループ化と共通プライマー群による既知ウイルスと変異株の網羅的カバーと非特異的ウイルス検出方法による見落としウイルスの検出を組み合わせることによる新興ウイルスの出現に対する対策が提起された。

A. 研究目的

新興ウイルスが出現した場合、病原体の塩基配列が既知のウイルスのいずれとも大きく異なっている場合と、いずれかの既知の配列と十分な相同性がある場合が想定される。新興出現ウイルスの塩基配列が既知の配列と大きく異なる場合を想定した検出方法として、分担者らは、ウイルスの既知の塩基配列のみに依存する事無くウイルスを検出する方法を考案した。具体的には、感染細胞に特異的な塩基配列としてウイルスを検出するためのサブトラクション法である Representational difference analysis (RDA)法を改良することにより、PCRにお

けるウイルスの増幅効率を高める方法を公表した。本報告では、まず、鳥類のウイルスを想定上の検出対象として RDA 法の改良のための Reverse transcriptase (RT) 用プライマーの選択を試みた。併せて、RDA 法によるウイルスの検出感度をモデル遺伝子を用いて検討した。

現在知られている、ウイルス種をあらかじめ想定しない検出法として、DNA ウィルス粒子内のウイルスゲノムが DNA 分解酵素耐性であることを利用し、ウイルス DNA を選択的に増幅する方法である、Sequence-Independent, Single-Primer Amplification (SISPA)法、感染細胞に特

異的な核酸としてウイルスを増幅する Representational Difference Analysis (RDA) 法および Mizutani らによって開発された RDV 法などが知られている。このうち RDA 法は、これまでに G 型肝炎ウイルス、TT ウイルスおよび Kaposi-associated virus の 3 種の病原ウイルスを同定するきっかけとなっており、新種のウイルスを同定する方法としての利用価値が広く認知されている。RDA 法は DNA のためのサブトラクション法として開発され、2 種の試料のうち一方にのみ存在する DNA の制限酵素切断断片を効率良く増幅する方法であり、ウイルス感染細胞には、非感染細胞には存在しない DNA としての DNA ウイルスが存在するため利用された。また RDA 法は 2 種の試料間の mRNA 発現量を検出する方法としても利用されており、その場合、mRNA から cDNA を合成した後に、ゲノム DNA の場合と同様にサブトラクションを実施する。mRNA のサブトラクションに関しては、細胞内における遺伝子機能の変化と関連して多くの検出例が報告されている。このサブトラクション法は mRNA を精製することを前提としているが、これは生体内で転写される RNA は宿主由来のリボソーム RNA (rRNA) が圧倒的に多く、転写される全 RNA の約 95% を占めており、この大量の rRNA 由来 cDNA がサブトラクションを阻害するためである。mRNA を対象とした RDA 法においては、サブトラクションを阻害する大量の rRNA を oligo(dT) カラムを用いて除去し、その上 mRNA の 3' 端に存在する poly(A) に結合する oligo(dT) をプライマーとして用いて逆転写反応 (RT) を行うことにより、対象を mRNA に限定する。一方、DNA ウイルス

での成功を想定して RDA 法を RNA ウイルスに適用する際にはこのような mRNA への限定はできない。すなわちレオウイルス科、ビルナウイルス科、パラミクソウイルス科、ラブドウイルス科、およびオルトミクソウイルス科の RNA ウイルスゲノムは mRNA のように poly(A) tail をもたないので、oligo(dT) カラムを利用した場合、rRNA と同様に反応液から除去されてしまう。そのため RNA ウイルスを検出するための RDA 法では total RNA から非特異的に感染細胞由来 cDNA を合成した後に RDA 法を実施することになる。その場合、rRNA に由来する cDNA の比率が極端に高くなり、ウイルス由来の cDNA 比率は低くなることが予想される。RDA 法は全 cDNA 中である程度の比率を占める cDNA 断片しか検出されないため、感染細胞に特異的な cDNA を効率的に増幅することは非常に困難となる可能性が高い。この問題点を解決する方法として、rRNA の RT 効率は低く、ウイルスの RT 効率は落とさないプライマーセット (Non Ribosomal Hexamers) が設計された (Endoh et al., 2005)。Endoh らはそのプライマーを RT に用いることにより、ウイルス RNA は保存しつつ、大量に存在する rRNA 量を減少させることにより RNA ウイルスの検出を行った。本研究では、適度なサイズの対象ウイルス群として鳥類感染ウイルスを対象にして、Non Ribosomal Hexamers を改良した。

RDA 法などのウイルスの塩基配列に依存しない方法は、従来塩基配列が報告されていない新種のウイルスを検出する場合には最も有効な方法と考えられる。しかしながら、これらの方法は、いずれも通常の PCR に比べて、工数が多くなり、また、

技術上の習熟や高価な試薬が必要になる。したがって、多数の検体について新興ウイルスを検出するためには、より単純で迅速な方法の準備が必要であると考えられた。分担者らは、予備的に、鳥類感染ウイルスについて、広い範囲のウイルスを検出可能なプライマーの設計を試みた。その結果、特定の位置に二種以上の塩基が混合したオリゴマーをプライマーとして用いる方法 (degenerate primer PCR) が有効な方法であることが考えられた。たとえば、Hepatitis E virus (HEV) など、多様な塩基置換を生じているウイルスを鋳型として PCR 法を実施する場合には、この degenerate プライマーを使用することにより、多くの変異株を同時に検出することが可能となると考えられた。

検出可能なウイルス株の範囲を広めるための degenerate プライマーを設計する場合、既知の塩基配列をデータベース上から取得し、配列を整列(アライメント)させ、株間での塩基置換または変異が少ない領域を目視した上、プライマー合成配列が決定される。実際には、多くの領域が候補に挙がるため、多数の候補配列から実験的にプライマーを絞り込む作業が行われる。この作業には複数の設計支援プログラムが利用され、設計者の試行を支援する。生命科学を支援するソフトウェア関連研究分野である Bioinformatics 分野からは、このようなプライマー設計支援プログラムが多数提供されている。一般的に、設計支援プログラムでは、塩基配列の整列、相同性の表示に加え、限定された領域で最適プライマーの予測が行われる。ただし、このようなプライマー設計作業は、プライマーが鋳型に結合する際の物理化学的な性質へのプライマ

ー上の degenerate 塩基の位置の影響や、degenerate 塩基を最小にとどめるための配列の選択などの塩基配列のみから決定される情報に加え、プライマーの利用者が希望する検出範囲、作業量、正確さおよび検出感度などの人的要因からの複雑な因子が多数関係するため、自動化が難しい。結果として、実用性の高いプライマーの設計には、設計支援プログラム群を使いこなした研究者がいかにか多くの対象配列を整理して設計を進めるかが研究上重要となっている。一方では、既知の配列は経常的に報告数が増加しており、極めて多数の変異株の多様性が把握できるため、多数の塩基配列情報を自動的に整理してプライマーを設計する技術の必要性が高まっている。

ソフトウェアによるプライマーの設計技術についての研究は 1980 年代から行われており、近年は、数学的アルゴリズム研究者によるプライマー設計の検討が盛んになっている。数学的アルゴリズム研究者は、多数の鋳型塩基配列に共通する degenerate プライマーの設計について検討し、多くの場合、可能なプライマーのすべてを検討する方法では 100 年を超す莫大な時間がかかることを考察している。Linhart と Shamir は、degenerate プライマーの選択方法を下記の三つの問題に整理し、それぞれについてプログラム可能な計算方法を提案した。

- 1). 各 degenerate プライマーが最大数の鋳型を増幅可能にするためのプライマーの塩基長および degeneracy(縮重塩基の多様性の程度)を求める。
- 2). 各 degenerate プライマーが最小の degeneracy を取るためのプライマーの塩基長および最小の degeneracy を求める

3). 複数の degenerate プライマーが必要となる場合、最少数のプライマーにより全鋳型を増幅するためのプライマーの選択。上記の問題設定は、プライマー設計を自動化するための指針として良く出来ており、複数の研究グループが、これらの指針に基づいて、プライマー設計するプログラムを公表している。しかしながら、上記の手法では、非常に多数のプライマーが予測される場合や、逆に全く予測されないなどの実用上の問題に加え、実際に使用する研究者が設計手法について理解することが難しいため、提示されたプライマーの評価が難しいという問題がある。これらのプログラムを利用する場合には、最適なプライマーを選定するために、多数のプライマー候補の優劣を決めるための多数回の実験が必要となる。結果的には、設計の自動化によって、所期の目的が達成されているとはいえない現状であり、プライマー設計の自動化を再検討する必要が示されている。

上記のプログラムでは、検出対象の塩基配列群として数学的にランダムな塩基配列を想定している。しかしながら、実際の対象配列にはほとんどの場合、プライマー設計に影響する塩基配列上の偏りが存在する。たとえば、ウイルスの塩基置換は、完全にランダムではなく、ある傾向を持つことが予想されており、また、宿主のゲノムの塩基配列についても一定の志向性があることが知られている。このような傾向は、A, T, G, Cの構成比率などの単純な指標では見られないが、生物のゲノム DNA 塩基配列上の 6-10 塩基程度のパターン(motif)の頻度を調べた場合、動物種ごとに出現頻度の傾向が存在していることが明らかにされている。分担者は、RNA についても同様にウ

イルスと宿主の間には motif の出現頻度の相違があることを見出し、PCR 法にも適用可能であることを示した。このような、6-10 塩基程度の短い配列の出現頻度の傾向は、ウイルスにおいても認められている。従って、ウイルス検出にこのような motif の傾向をプライマーの設計に利用することにより、有効性の高いプライマーを提示することが可能であることが予想される。従来提唱されているプライマー設計アルゴリズムの中では、CODEHOP などのようにアミノ酸の出現頻度と縮重の影響を利用する方法が知られているが、ウイルスのようにゲノムサイズが小さい場合には、アミノ酸配列の限定は最適な選択肢を示すとは限らず、宿主と類似した配列を誤って選択してバックグラウンドの原因になる可能性もある。本研究では、ウイルス内の 6-12 塩基の塩基配列パターンの傾向をプライマー設計に応用するプログラム群を開発し、HEV での degenerate プライマーの設計への適用を試みた。このようなプライマーの設計アルゴリズムは既知の分離株間で共通する motif を集めることから CoCoMo 法(Collection of common motifs)と称し、また、実際の PCR 法は 3' 末端の配列のみが鋳型と正確に整列可能であることから TA-PCR 法と称することとする。

B. 研究方法

1. 塩基配列の記載方法

塩基配列および degenerate 配列は、Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) による Nomenclature for Incompletely Specified Bases in Nucleic Acid Sequences, Recommendations 1984

(<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html>)に従った。

塩基の縮重性(degeneracy)は表 1 に従い、積算縮重値 Sd は塩基配列内の全ての degenerate nucleotide の degeneracy を積算した値とした。例えば、ATRYBNCC の場合、積算縮重値は $2 \times 2 \times 3 \times 4 = 48$ とした。

2. Reverse transcriptase(RT)用プライマーの設計

鶏感染 RNA ウイルスを検出するための RT のプライマーとして、RDA 法に適用する cDNA を作成するため、鶏 rRNA 由来 cDNA 逆転写効率を低くしつつ、RNA ウイルスの逆転写率を下げないようなプライマーの設計を検討した。対照としては、塩基配列がランダムになるよう合成された 6~9 塩基のランダムオリゴマーの混合物(Random プライマー)を RT 用のプライマーを想定した。合成時、この Random プライマーは各位置の塩基が A、T、G、C の 4 種類の塩基が等しい割合で混合されており、結果として全ての塩基配列の組み合わせが均等に混合した 6~9mer のオリゴマーとなっている。

Endohらは、RNA ごとに RT の効率をコントロールするための方法として、ランダムオリゴマーの塩基配列を人為的に制限する方法を検討した(図 1)。cDNA は RNA にオリゴマーがハイブリダイズした箇所から合成が開始されるため、RT の効率はオリゴマーがハイブリダイズする配列の出現頻度に依存している。従って、高頻度に転写する rRNA に結合する頻度の高いオリゴマーをランダムなオリゴマーから除けば、その RNA に由来する RT の効率を下げるこ

ができると考えられた。本研究ではプライマー長を 8 塩基とし、鶏 rRNA および鳥類に感染する全 RNA ウイルス(表 2)の双方について、遺伝子データバンクより塩基配列を入手した後、8 塩基の配列パターンについて塩基配列上での出現頻度を分類および集計した。

オリゴマー選択のためのプログラムを実行するにあたって、考えうる 8 塩基オリゴマーの塩基配列(8 塩基モチーフ)を全て作成し、データベース上のテーブル(8 塩基表)として設定した。続けて、rRNA の相補鎖の塩基配列をコンピュータ上でテキストデータに変換した後、8 塩基ずつテキストを読み込み、該当する 8 塩基表の各行に頻度としての配列を累積した。同様に 8 塩基の設定位置を順次ずらしながら rRNA の塩基配列の末端に至るまで出現頻度を累積することにより、各 8 塩基のモチーフ出現頻度が分類および集計した形で作成された。続けて、この出現頻度の計算を RNA ウイルスのデータについて同様に実施し、rRNA と RNA ウイルス双方についてのモチーフの出現頻度に関するテーブルをデータベース上に作成した(表 3)。これらのデータを 8 塩基のモチーフをキーとしてデータベース上で連結することにより、各 8 塩基モチーフの rRNA および RNA ウイルス上での出現頻度が算出された。両者を比較することにより、RNA ウイルスには通常に頻度で存在しているが、リボソーム RNA には存在しない 96 種の 8 塩基モチーフを決定し、NR96 とした(表 4)。NR96 の結果を参照し、さらに rRNA の転写効率を下げたプライマーも設計した(図 3)。設計についての詳細は結果で述べる。

3. RDA 法

RDA法は基本的に、Lisitsynらの方法に従って行った(RDA法概略:図2)。以下に本研究での具体的操作を述べる。

●感染組織からのウイルスゲノムを含んだRNAの精製(図2①)

RNAの抽出には、Isogen(Nippongene)を用いて定法に従った。

●cDNA合成(図2②)

RTには、RandomプライマーもしくはNR96をプライマーとして、M-MLV Reverse Transcriptase(SIGMA)およびSuperscriptIII(INVITROGEN)を用い、1本鎖cDNAを合成し、*E.coli* DNA Ligase、*E.coli* DNA Polymerase I、*E.coli* RNase Hにより2本鎖cDNAを合成した。方法は各製品の説明書に従った。

2本鎖cDNAは、SpinClean PCR Purification Kit(M-Biotech)で精製した。

●制限酵素切断(図2③)

続けて、cDNAをRDA法に適した分子量の断片に分割すると共にリンカーの接続を可能にするため、2本鎖cDNAを4塩基認識制限酵素であるDpnIIで切断し、DNA Clean & Concentator-5(ZYMO RESEARCH)で精製した。

●リンカーの接続(図2④)と非特異的PCR産物(Amplicon)の合成(図2⑤)

DpnII切断した2本鎖cDNAに12mer-BamHI Linker-1を付加し、cDNA末端に結合したリンカー領域をプライマーとしてPCRを実施することにより、cDNAのDpnII切断断片を非特異的に増幅した。このPCR産物(Amplicon)はcDNAからの非特異的増幅産物で、RDA法サブトラクションのための基本単位として使用した。Ampliconはウイルス感染細胞由来

のcDNAより合成(Tester Amplicon)または非感染細胞由来のcDNAより合成(Driver Amplicon)した。

●Ampliconの制限酵素切断(図2⑥)と第2のリンカー接続(図2⑦)

Tester AmpliconおよびDriver AmpliconをDpnII切断で切断した。

サブトラクションの過程に先立ち、Ampliconを制限酵素(DpnII)で切断後、感染細胞由来のTester Ampliconには第2のBglIIリンカーを接続した。

●ハイブリダイゼーション(図2⑧)

第2のリンカーを接続したTester Ampliconと10倍量のリンカーが接続されていないDriver Ampliconを変性・混合した後ハイブリダイゼーションした。

●感染細胞特異的AmpliconのPCR増幅(図2⑨)

ハイブリダイゼーション終了後BglII LinkerをプライマーとするPCRを20サイクル実施し、制限酵素切断断片を増幅した(DP1)。ここで増幅された感染細胞特異的Ampliconを、前述と同様にDpnIIでの切断以降の操作を再度繰り返した(DP2)。

3-2. リアルタイムPCR

NR96およびRandomプライマーを用いたcDNA、Amplicon、およびDP1を鋳型にFullVelocity SYBR Green QPCR Master Mix(STRATAGENE)を用いてリアルタイムPCRを行った。すなわち、インフルエンザH1N1株のSegment1、Segment3それぞれの一部のDNA断片を増幅するようなプライマーを設計し(表5A)、PCR反応液中に加えた蛍光色素(Cyber green)で増幅産物を標識することにより、それらの増幅反応曲線を作成し、その結果

を基にインフルエンザ由来 DNA 断片の初期鋳型量を測定した。また同様に、鶏 rRNA 由来 cDNA 断片の一部を増幅するようなプライマーを作成し(表 5B)、初期鋳型量を測定することによって cDNA 溶液中のインフルエンザ由来 cDNA 断片量と鶏 rRNA 由来 cDNA 断片量の比率を測定した。すなわち、1/200 希釈した Reference Dye 0.3 μ l、プライマー (50 pmol/ μ l、Segment1 Forward および Reverse プライマー、Ribosorm 18S Forward および Reverse プライマー、表 5) 0.08 μ l、SYBR Green 10 μ l、DDW 7.54 μ l、template (RT 産物、Tester Amplicon および DP1 の 1/100 および 1/1000 希釈液) 2 μ l をそれぞれ混合し、95 $^{\circ}$ C 5 分 \times 1、[95 $^{\circ}$ C 10 秒、52 $^{\circ}$ C 15 秒および 72 $^{\circ}$ C 20 秒] \times 40、47 $^{\circ}$ C \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 毎 5 秒ごとに 1.0 $^{\circ}$ C 低下 4 $^{\circ}$ C 保温 の PCR 反応を行った。

その後、Ct 値より Rel.Quantity を算出し、インフルエンザ/鶏 rRNA 比率を求めた。Ct 値とは、PCR 増幅産物がある一定値に達したときのサイクル数のことを示しており、増幅曲線から求められる。Rel.Quantity とは、同じサンプル中に発現している DNA 量の比率を示している。Rel.Quantity はリアルタイム PCR に用いられるのと同様の指標として設定された。

すなわち、図 4 で記した Rel.Quantity は鶏 rRNA 由来 DNA 断片の初期鋳型量に対するインフルエンザ由来 DNA 断片の初期鋳型量を示す。

3-3. PCR によるインフルエンザおよび鶏 rRNA 由来 DNA 断片の確認

NR96 および Random プライマーを用いた 1 回目の PCR 産物を鋳型とし、またイ

ンフルエンザおよび鶏 rRNA 由来 DNA の一部の断片を増幅するようなプライマー(表 5)により、PCR 反応を行い、増幅産物の分子量を確認した。

3-4. 限界希釈 PCR

NR96 および Random プライマーを用いた DP1 を鋳型として限界希釈 PCR を行った。すなわち、DP1 を 10^{-1} ~ 10^{-4} まで希釈し、表 5 で作成したプライマーを用いて PCR 反応を行い、アガロースゲル上で電気泳動し、バンドの有無を確認した。

4. プライマー設計プログラム群の開発環境

(ハードウェアおよびオペレーティングシステム)

CoCoMo アルゴリズムを実施するためのコンピュータとしては、64bit CPU (Athlon64) および 2 G バイトのメモリーを搭載した DOS/V 仕様パーソナルコンピュータを用いた。プログラムを稼働するためのオペレーティングシステムとしては、Linux (SUSE10.2 または Ubuntu7.10) を用いた。

4-2. 開発言語およびデータベース

開発言語としては、Ruby 1.86 を、同言語のバイオインフォマティクス用の拡張モジュールとしては bioruby を、データベースとの接続モジュールとしては MySQL/Ruby を使用した。鋳型上の 6-12 塩基の motif の出現頻度を累計するための gas ソフトをコンパイルおよび稼働するためには、gcc C コンパイラを使用した。一組の塩基配列についての相同性の算出には、blast 解析プログラム群のうち bl2seq を使

用した(<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast>)。

元遺伝子データ、処理過程の一時データ、予測プライマー塩基配列、位置情報および方向等の付随情報を格納するためのデータベースには MySQL 5.0 を使用した。

4-3. 開発用検証用データ

開発中の小規模データおよび各ウイルスの既知の全遺伝子データは、EMBLまたは GenBank より各ウイルスごとにダウンロードし、Ruby で加工後 MySQL に格納して使用した。

5. CoCoMo アルゴリズムおよび実行用プログラム群の構成

CoCoMo アルゴリズムでは、基本的なプライマー選定方針を提示し、実際の設計においては、実施中の結果に応じて、実施条件や使用プログラムの一部を変更可能な様に、各ステップ用のプログラム群を個別に準備した。

5-2. CoCoMo アルゴリズム

CoCoMo アルゴリズムでは、degenerate プライマーを設計するために下記の基本的には下記の処理を実施した。

① 検索後ダウンロードされた遺伝子データのデータベースへの格納

遺伝子データとしては、EMBLまたは GenBank データベース上で、種名としてウイルス種を特定した検索を実施し、探索された塩基配列データをすべてダウンロードした。

② 格納された遺伝子データのサイズおよび相同性を用いた類似塩基配列群(一次グループ)への分類

格納されたデータは、前述のように、

ゲノムや特定の抗原遺伝子のみではなく、名称の異なる様々な断片を含んでいる。しかしながら、CoCoMo アルゴリズムでは、塩基配列間で共通する motif の頻度を参照してプライマーを設計するため、設計に先だって、塩基配列データを特定遺伝子領域やゲノム全長に分ける必要が生じた。塩基配列に付随する Annotation 情報では必ずしも遺伝子名称やゲノムの記載方法が統一されているわけではないため、Annotation 記載に基づく分類は十分な実用性を示さなかった。そのため、データの分類は、塩基配列長と配列の相同性に基づいて実施された。通常、サイズの差を 30%以内で、50塩基以上の相同領域が存在する条件を設定することにより、ゲノムや主要抗原ごとにグループとしてまとめることが可能であった。

③ プライマー設計対象塩基配列群の選定と、塩基配列相互の組み合わせについての相同性の算出

②においてグループ化された塩基配列のうち、ゲノムに相当する塩基配列グループと、250塩基以上のサイズで、100以上の塩基配列から構成されるグループについては、塩基配列相互の相同性を算出した。

④ 対象塩基配列相互の相同性に基づいた社会ネットワーク分析による二次グループへの分類

社会ネットワーク分析は、人間同士の親密性や交流範囲に基づいてグループ分けを行う手法で、交通網やインターネット網の分析に用いられてきた。近年、広い分野において活用され始め、たんぱく質の形成するネットワークの分析にも用いられる様になっている。塩基配列間でも一定以上の相同性の存在やその相同性の数値によって

グループ化が可能になる。本研究では、サイズや最低限の相同性によって分類された塩基配列データを、degenerate primer 設計に適したグループに再分類するために、この手法を用いた。

⑤ (二次グループ数が 20 程度の場合) 各グループから代表のデータを選別して、グループ代表による代表グループを作出

PCR の位置にあるオリゴマーを選択するプログラムは、その第一段階で大量の計算容量を必要とした。たとえば、HEV ゲノム程度の大きさの塩基配列の場合には、対象塩基配列数を 20 程度以内に抑えなければ、計算時間が予測不可能となる現象がみられた。そのため、いったん形成されたグループ内でのバランスをとりつつ、塩基配列数を減らすための方法として、相同性の高いウイルス群から代表を選択するという方法が用いられた。

⑥ degenerate プライマーの 3' 共通 motif の設計(図 8)

適切な範囲の延べ塩基配列数に限定された塩基配列データについて、一旦、可能な 6 塩基 motif をすべて想定した上、対象塩基配列上で PCR の位置となる 6~10 塩基 motif が選択された(図 1)。6 塩基 motif のレパートリー数は 4,096 種であり、プライマーを予測するための計算の実行可能性が十分に高いことから、motif セットを予測する基本長を 6 塩基とした。6 塩基の配列のみでは、オリゴマーを合成した場合でもプライマーとして働くことはできないが、PCR プライマーと同様に対象塩基配列上に向かい合わせの位置に設定されるような 6 塩基 motif を選択することにより、degenerate プライマーの 3' 端の領域を設計した。予備実験では、この 3' 端の motif

は長いほど PCR での検出感度が高かったため、6 塩基の予測終了後、motif を伸長した。

プログラム上での motif の選択は、対象塩基配列上のいずれかの場所で相補的な位置に存在する motif の一方を候補から削除することにより実施された。この motif の選択方法は、3' 端が相補的な degenerate プライマーが相互の二重鎖形成により PCR 効率を著しく下げることのないように考えられた。通常塩基配列上には、極めて多数の 6 塩基相補 motif が存在し、それを無くした motif が適切なレパートリーとなったことから、この選択方法は、多数の候補から最適な 6 塩基 motif を選択する方法としても有効であることが示唆された。

以下に 5' -ATGGATGTGGCAT-3' (相補鎖: 5' -ATGCCACATCCAT-3') という配列を事例として 3mer motif の選択を説明する。

まず、センス鎖、相補鎖の両方において 5' 側から 3mer ずつ読み、その総数を数え(表 6)、また、鋳型鎖上の位置を特定した(表 7)。続けて 2 塩基以上が重なる組み合わせの 3mer を全てリストアップした。事例では、ATG と CAT、ATG と CCA などが相補的な 3mer の組み合わせとして示される(表 8)。次に、相補的な 3mer の組み合わせのうち、片方を候補群から削除するため、PCR 可能な 3mer の組み合わせを全て列挙した。具体的には、表 7 で算出された対象塩基配列上の位置を基に生成する可能性のある PCR 産物を全て想定し(表 9)

、この事例ではオリゴマー間の間隔が 3 塩基以上開いている場合に PCR の位置にあるとして、各 motif について、プライマーとして寄与する PCR 産物の数を積算し

た (表 10)。たとえば、ATG が 6 件の PCR 産物を生成することが予想される (表 9)。

続けて、相補的 3mer motif の組み合わせのうち、PCR に利用される頻度の少ない側を候補から削除した。この削除は、存在頻度が大きい順に motif セットごとに実施された。たとえば、GTG-CCA の相補的組み合わせでは、CCA が仮想 PCR での利用頻度が高いが、CCA は、ATG-CCA 間での比較で削除されているため、GTG は削除する必要がなくなっている。次に、削除されなかった motif について前述同様に相補性と PCR での利用回数を調べ、PCR に利用される頻度の低さに応じて motif が候補から除去された。この相補的な motif の除去は、相補的な組み合わせが存在しなくなるまで繰り返し実施された。

3mer の事例では、一回目の削除で全ての相補的組み合わせが無くなったが、6 塩基 motif についての 200 塩基以上の配列グループで実施する場合には、リストからの削除作業が多数回繰り返された。3mer の事例では相補的組み合わせの片方の削除により、仮想 PCR は下表のように変更され、PCR 予想数は 12 件に減少した (表 12)。

3mer の事例では、ATG-ATG および ATG-TGC の組み合わせについて 5 件の PCR が予想されるため、これらが選択されることとなる。実際の実施時には、完全に対象ゲノム上での重複がない 6 塩基 motif が選択され、degenerate プライマーの設計に用いられた。

⑦ 3'共通領域への degenerate 領域の付加

⑥までの過程で選択された motif の 5' 端の配列を調べ、実際の対象配列上に存在

する塩基の多様性をすべて満たす degenerate 配列を 3'端の共通 motif に付加することにより degenerate プライマーを作出した。

6.degenerate プライマー設計に使用されたプログラム群

CoCoMo アルゴリズムを実際に処理するためには、下記のプログラム群が作出され、使用された。

① 検索後ダウンロードされた遺伝子データをデータベースへの格納するプログラム群

GenBank からダウンロードされた塩基配列などプライマー設計に必要な情報を選択してプライマー設計を実施するコンピュータ上の MySQL データベースに格納する。

②サイズおよび相同性を用いた類似塩基配列群(一次グループ)への分類プログラム

塩基配列を配列長の長い順に並べ、最長の塩基配列とサイズが一定比率以内で、最低限の有意な相同性が認められる配列をグループとして選別する。選別された配列は元リストから除去することにより、最終的には、塩基配列を均一な配列長を持つ遺伝子またはゲノム全長などのグループに分割される。

③ 選定されたグループについてプライマー設計対象塩基配列間の相同性を算出するプログラム

グループ内のすべての二つの塩基配列の組み合わせについて、相同性を算出する。相同性の指標としては、相同性領域長に相同性を掛けた値の、二個の比較配列のうち短い配列の比率を相対的相同性として算出する。相対的相同性は、通常 40~100 の値

を示す。

④ 対象塩基配列相互の相同性に基づいた社会ネットワーク分析によって二次グループに分類するプログラム

グループ内の塩基配列データを、最も相対的相同性の高い二つの塩基配列を開始点として相対的相同性の高い順に既出の塩基配列間の相同性と新出の塩基配列ペアの相対的相同性およびそれらの塩基配列と既出の塩基配列との相対的相同性の相対的相同性を比較する。既出の配列間の相対的相同性に比べ新出ペアとの相同性が比較して低ければ別グループとし、十分な相対的相同性が高ければ、同一グループとする分類を行い、同時に社会ネットワーク分析用データを作成する。

⑤ (二次グループ数が 20 程度の場合)各グループから代表のデータを選別して、グループ代表による代表グループを作成するプログラム

④で作出されたグループから一塩基配列を選択して新規グループを作成する。ただし、検出感度を重視し、検出範囲を狭めても良い場合には、`create_group_sns.rb` で作成されたグループについて⑥のプライマー設計を実施する。

⑥ 6塩基 motifを基盤とした degenerate プライマー選択プログラム

⑤で選択された motif をプライマーの 3' として利用することとし、その 5' 側の 15 塩基を対象塩基配列から選択して全ての配列をカバーする degenerate プライマーを設計する。相互に相補的ではない全ての motif から、塩基配列グループ内で PCR プライマーの位置になる回数が多い motif を選択する。同時に degeneracy の積算値を算出する。

7. 長鎖合成オリゴマーを用いた設計方法の検証実験

6-10 塩基の motif を 3' 端に存在するプライマーとして設計を行う場合、3' 端の配列間共通オリゴマーの長さが増幅能力に関する関係を検討する必要がある。そのため、長鎖の合成オリゴマー利用したモデル実験を実施した。

1) 鋳型の作成

TAP-PCR 法用のプライマー設計条件を導出する実験には、両端に degeneracy をもたせた合成オリゴマーを鋳型として用いた。まず核となる部分を合成オリゴマーとして準備し、その合成オリゴマーを鋳型としてそれぞれの degeneracy をもたせたプライマーで PCR をかけることで目的の鋳型を作成した(図 9. PCR による鋳型作成後は 2本鎖になるが、図では 1本鎖のみ示す)。このとき、核となる鋳型の末端で、プライマーが結合する種間共通配列を TAP 配列、またそのプライマーによって接続される degeneracy をもった領域のことを degenerate 配列と呼び、同様に TAP プライマーの種間共通配列を TAP region、またその 5' 側の degeneracy をもった領域を degenerate region と呼ぶこととした。

2) core 鋳型の合成

まず、ssRNA ウイルスの Influenza A virus (A/Puerto Rico/8/34(H1N1)) segment 1 と Newcastle disease virus から、共通の 8 塩基の配列(5' -AACCCAGC-3'、3' -CCTGGTCA-5')を in silico MolecularCloning(R) Standard Edition で検索した。5' -AACCCAGC-3' の配列は H1N1 では 151-158 に、NDV では 1599-1606 と 4568-4575 に存在した。また

3' -CCTGGTCA-5' の配列は H1N1 では 472-479 に、NDV では 12958-12965 と 14367-14374 に存在した。

実験に用いやすい長さにするため、H1N1 および NDV より共通の 8 塩基にはさまれる配列を選び出した。すなわち共通の 8 塩基の間を両端から同じ塩基数ずつ切り出し H1N1 は 50bp と 150bp とし、NDV は 4568-4575 と 12958-12965 の間から切り出し 100bp とし、それらの配列を core 配列として用いた。また、その後の実験で共通部分を延長するため、NDV の共通部分の内側には H1N1 の共通部分の両端の配列をそれぞれ 8 塩基ずつ接続させた。

以上のようにして合成した core 鋳型を、短いものから順に coreInfl50、coreNDV100、coreInfl150 と命名した (図 10)。

3) TAP-PCR 用鋳型の作成

次にこれらを核として両端に degeneracy をもたせた鋳型を PCR で作成した。鋳型としては、coreInfl50、coreNDV100、coreInfl150 を用いた。プライマーとしては、共通部分の 5' 側にそれぞれ 8 塩基の配列を接続したものを用いた。これは coreInfl150 で用いるプライマー (H1N1_f、H1N1_r) を基準とし、coreInfl50 と coreNDV100 は、この 5' 側の 8 塩基中に 1~5 塩基の degeneracy をもたせたプライマーを用いた (表 13)。鋳型が coreInfl50 の場合、プライマーは Infl50_f-1~f-5、Infl50_r-1~r-5 を用いた。同様に coreVDV100 の場合は NDV_f-1~f-5、NDV_r-1~r-5 を用い、coreInfl150 の場合は H1N1_f、H1N1_r を用いた。それぞれの PCR 産物を Infl50(1)~(5)、NDV(1)~(5)、Infl150 と命名した。

4) 作成された鋳型の確認

上記の作業により鋳型の両端に degenerate 配列を接続したが、これを PCR 法により確認した。

確認に用いる鋳型は Infl150 とし、TAP-PCR 用鋳型を作成するために鋳型としては coreInfl150 を用い、プライマーは Infl150_f-25-9 と Infl150_r-25-9 (表 14) を用いて PCR を行なった。この PCR 産物を d-Infl150 と命名した。

ここで作成した d-Infl150 が coreInfl150 の両端に degenerate 配列を接続したものであることを確認するために、片方に特異的なプライマーをそれぞれ用いた PCR を行なった。まず鋳型としては、coreInfl150 と d-Infl150 をそれぞれ用いた。プライマーとしては Infl150_degenerate-f と Infl150_degenerate-r、および Infl150_TAP-f と Infl150_TAP-r を用いた (表 14)。Infl150_degenerate は degenerate 配列に、Infl150_TAP は TAP 配列にプライミングするプライマーである。PCR 終了後、各サンプルを電気泳動し、バンドの有無を確認した。

5) degenerate region の degeneracy の限界の検討

鋳型は前述のように作成し、両端に degeneracy をもたせた鋳型 [Infl50(1)~(5)、NDV(1)~(5)、Infl150] を用いた。プライマーは degenerate region の degeneracy がそれぞれ 1~5 塩基の TAP プライマーを用いた。鋳型は 3 種類を混合して用いた。すなわち、Infl50(1)、NDV(1)、Infl150 の混合に対しプライマーは Infl-NDV_F-1、Infl-NDV_R-1 を用いた (表 15)。degeneracy が 2~5 塩基の鋳型とプライマーに対しても同様にして混合して PCR を

行なった。

6) 感度の限界の検討

次に、プライマーの TAP region の塩基数を増加させ、degeneracy の影響を検討した。同時に、それぞれの塩基数において鑄型を限界希釈することで、感度の限界を検討した。

鑄型とプライマーは degenerate region の degeneracy が 4 塩基のものを用いた。鑄型は Infl50(4)、NDV(4)、Infl150 を 1 μ l あたり 10⁶~10¹コピーに希釈して、それぞれ同じ濃度のものを 3 種類混合して用いた。プライマーは TAP region が 8~12 塩基のものを用いた (表 16)。

7) degenerate region の長さの検討

実際のウイルス群では、degenerate 配列が長く、その中に degeneracy をもった塩基が点在している場合もあると思われる。よって、短い TAP region と長い degenerate region で構成される全長 25mer のプライマーで同様に鑄型の作成と TAP-PCR を行ない、degenerate region の長さやプライマー長の影響を調べた。

まず、TAP-PCR 用鑄型の作成を行なった。鑄型としては coreInfl50、coreNDV150、coreInfl150 を用いた。鑄型が coreInfl50 の場合、プライマーは Infl50_f-25-8 と Infl50_r-25-8、また Infl50_f-25-9 と Infl50_r-25-9 を用いた。プライマーが Infl50_f-25-8 と Infl50_r-25-8 のときの PCR 産物は Infl50(25-8) と命名した。他の鑄型に対しても同様に PCR を行い、その鑄型とプライマーの組み合わせ、またその反応で生成される TAP-PCR 用鑄型の名称は表 17 に示す。

次に TAP-PCR を行なった。鑄型は上記

で作成したものを 1 μ l あたり 10⁶~10¹コピーに希釈し 3 種類を混合して用いた。プライマーは TAP region が 8mer と 9mer のものを用いた (表 16)。PCR 終了後、各サンプルを電気泳動し、バンドの有無を確認した。

8) 完全一致のプライマーでの TAP-PCR

ここまで degeneracy をもった鑄型とプライマーの組み合わせで PCR を行なってきたため、次に degeneracy が PCR に与える影響を検討した。まず degeneracy をもたないように 3 種の core 鑄型全てに共通のプライマーで TAP-PCR 用鑄型を作成し、さらにそのプライマーで TAP-PCR を行なった。

TAP-PCR 用鑄型を作成するために、鑄型としては coreInfl50、coreNDV150、coreInfl150 を用いた。プライマーは Infl50_f-25-9 と Infl50_r-25-9 を用いた (表 18)。次に TAP-PCR を行なった。鑄型は上記で作成したものを 1 μ l あたり 10⁶~10¹分子に希釈し 3 種類を混合して用いた。PCR 終了後、電気泳動し、バンドの有無を確認した。

8. SARS コロナウイルスを用いた CoCoMo 設計プログラムの実効性の検証

プライマーの対象とするウイルスは SARS corona virus、Bat SARS corona virus、Civet SARS corona virus とした。これらのウイルスはコロナウイルス科において比較的近縁であることから、適用が容易な事例として用いられた (図 8)。

SARS coronavirus 感染細胞由来 cDNA を鑄型に用いて TAP-PCR を行なった。プライマーは SARS coronavirus、Bat

SARS coronavirus、Civet SARS coronavirus の 3 種に対応するものを、TAP region を 10mer として設計した (表 19. 増幅産物サイズは SARS コロナウイルスに基づく)。PCR は定法に基づいて行ない、電気泳動してバンドの有無を確認した。

9. E 型肝炎ウイルス (HEV) およびリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) における degenerate プライマーの設計

前述のプログラム群を利用して、種内の変異株全体をカバーするプライマーをデザインした (図 8)。

HEV については、社会ネットワーク分析で形成された一次グループの代表をグループとしてまとめなおした場合についても、プライマーが設計された。

C. 研究結果

1. RDA 法

1-1. cDNA におけるリアルタイム PCR

Random プライマーおよび NR96 で RT を行った cDNA を鋳型にし、インフルエンザ Segment1、鶏 rRNA 18S 由来 DNA 断片の一部を増幅するようなプライマーを用いてリアルタイム PCR を行った。続けてその結果を元に cDNA 中に含まれるインフルエンザ、鶏 rRNA の逆転写量の比率を算出した。その結果、Random プライマーを用いたときに比べ、NR96 を用いた方がインフルエンザ/鶏 rRNA 比率が約 2.53 倍に増加していた (図 4A)。さらにインフルエンザ増幅効率を増加させるようなプライマーを作成するため、8 塩基 96 種類の NR96 を、3' 端の 6 塩基のみに着目すると

鶏 rRNA と一致する配列が存在する 48 種類のオリゴマー (NR48-A) と、逆に 3' 端の 6 塩基が鶏 rRNA と一致する配列を持たない 48 種類 (NR48-B) のオリゴマーに振り分けた。さらに NR48-B を 3' 端の 5 塩基のみに着目し、3' 端の 5 塩基に鶏 rRNA と一致する配列が存在する 42 種類のオリゴマーと、一致する配列をもたない 6 種類のオリゴマー (NR6) に振り分けた (図 3)。続けてそれぞれのプライマーミックス NR48-A、NR48-B および NR6 で RT を行った cDNA を鋳型として、同様にリアルタイム PCR を行った。その結果、インフルエンザ/鶏 rRNA 比率は NR96 と比較し、NR48-A では約 1.08 倍で NR96 とほぼ同程度、NR48-B では約 2.19 倍、NR6 では約 4.41 倍であった (図 4)。この結果から、RT に用いるプライマーの配列は 3' 端の配列が重要で、3' 端の配列が鶏 rRNA と一致する塩基数が少ないプライマーを使用することで、インフルエンザ/鶏 rRNA 比率が増加することが示唆された。続けて、Random プライマー、NR96 および NR6 で RT を行った cDNA を使用して RDA 法を実施し、インフルエンザ、鶏 rRNA 由来 DNA 断片量の比較を行った。インフルエンザ/鶏 rRNA 比率を算出した。Random プライマーと比較し、インフルエンザ/鶏 rRNA 比率は NR96、NR6 で共に約 4.96 倍であり、インフルエンザ/鶏 rRNA 比率はほぼ同じであった (図 4)。

1-2. Amplicon の増幅

非感染組織および感染組織から抽出した RNA より Random プライマーを用いて RT した cDNA をそれぞれ *DpnII* 切断後に合成した Amplicon を 2.0% アガロースゲル上で電気泳動したところ、Driver

Amplicon では 220bp、240bp、280bp、380bp 付近に、感染組織由来 Tester Amplicon では 240bp、280bp、300bp、380bp 付近にバンドが認められた(図 5)。一方 NR96 を RT 用プライマーとして用いた場合には、Tester Amplicon では 220bp、280bp 付近にバンドが認められ、Driver では少量のバンドしか認められなかった。また、NR6 を RT 用プライマーとして用いた場合は、Driver Amplicon では 220bp 付近に 1 本、Tester Amplicon では 240bp、280bp、300bp、380bp 付近に 4 本のバンドが認められた(図 5)。このプライマー、感染の有無に伴うバンドパターンの相違から、感染に伴って増大した RNA を優先的に RT しており、またその効果は NR96 の方が大きいことが示唆された。

1-3. AmpliconにおけるリアルタイムPCR

cDNA と同様に、Amplicon を鋳型にしたリアルタイム PCR を行い、インフルエンザ/鶏 rRNA 比率を算出した。Random プライマーと比較し、インフルエンザ/鶏 rRNA 比率は NR96、NR6 で共に約 4.96 倍であり、インフルエンザ/鶏 rRNA 比率はほぼ同じであった(図 4E)。

1-4. Ampliconにおけるインフルエンザ由来 DNA 断片の確認

Amplicon にインフルエンザ由来 DNA 断片が含まれているかどうかを確認するために、それらの一部を増幅するようなプライマーを設計して PCR 反応を行った。その結果、NR96 および NR6 においてインフルエンザ由来 DNA 断片はすべて増幅された。そのため、Amplicon の合成を行った時点ではインフルエンザ由来 cDNA 断片は増幅

されていることが示唆された。

1-5. サブトラクション過程後の増幅産物

RDA 法による DP1 において、Random プライマーを使用した場合、Tester Amplicon と比較し、420bp および 480bp 付近のバンドが強調され、380bp および 400bp 付近のバンドが見られなくなった。一方 NR96 ではバンドパターンの変化は見られなかった。また、NR6 で認められるバンドも Tester Amplicon と変化が認められなかった(図 5、6)。

DP2 については、認められるバンドは DP1 と同じであったが、Random プライマーでは 480bp 付近、NR96 では 380bp、420bp 付近のバンドが強調されていた。一方 NR6 ではバンドに変化は認められなかった(図 6)。

1-6. DP1におけるリアルタイムPCR

cDNA および Amplicon と同様に、DP1 を鋳型にリアルタイム PCR を行った。その結果、Random プライマーおよび NR96 ではインフルエンザ Segment1 由来 DNA 断片の増幅が認められたが、NR6 においてはその増幅が認められなかったため、サブトラクションの過程でインフルエンザ断片が失われてしまったと推察される。一方、Random プライマーと比較して、NR96 でのインフルエンザ/鶏 rRNA 比率は約 110 倍と、Amplicon の時と比べて飛躍的に増加していた(図 4F)。

1-7. DP1における限界希釈PCR

DP1 において、リアルタイム PCR でインフルエンザ由来 cDNA 断片の増幅が認められた Random プライマーおよび NR96

を用いた DP1 を鋳型に限界希釈 PCR を行った。その結果、インフルエンザ Segment1 においては Random プライマーを使用した RDA 産物における増幅限界希釈率は 10^{-1} 倍で、NR96 を使用した RDA 産物における増幅限界希釈倍率は 10^{-4} 倍であった(図 7C)。同様にインフルエンザ Segment3 では、Random プライマーおよび NR96 における増幅限界希釈率はそれぞれ 1 倍、 10^{-1} 倍であった(図 7D)。一方 rRNA 18S においては、Random プライマーおよび NR96 における増幅限界希釈率はそれぞれ 10^{-4} 倍、 10^{-3} 倍であり、rRNA28S においてはそれぞれ 10^{-4} 倍、 10^{-3} 倍であった(図 7A, B)。つまり、NR96 を使用することで、Random プライマーと比較し 1 回目の RDA 産物中のインフルエンザ由来 cDNA 断片量は約 10~1,000 倍に増加し、鶏 rRNA 由来 cDNA 断片量はおよそ 1/10 程度に減少することが示唆された。このインフルエンザ由来の cDNA 量の増大は、Amplicon についてのリアルタイム PCR での結果と一致した。

これらの結果から、RDA 法での RNA ウイルスゲノムの検出には rRNA の 1/100 倍程度のゲノムコピー数が必要であることが示唆される。

1-8. サブトラクション産物中におけるインフルエンザ由来 DNA 断片の消失

Amplicon と同様に、NR96 および NR6 を用いたサブトラクション産物中にインフルエンザ由来 DNA 断片が含まれているかを確認するために、それらの一部を増幅するようなプライマーを用いて PCR 反応を行った。その結果、NR96 では DP1 および DP2 においてインフルエンザ由来 DNA 断

片 8 文節がすべて増幅された。一方 NR6 では、DP1 においてはインフルエンザ Segment3 が増幅されず、DP2 においては加えて Segment2 が増幅されなかった。そのためサブトラクションを行う過程で一部のインフルエンザ由来 DNA 断片は排除されてしまい、その排除されるインフルエンザ由来 DNA 断片の割合は NR96 と比較し NR6 の方が大きいことが示唆された。

2. TAP-PCR 試験用鋳型を用いた検討

2-1. TAP-PCR 試験用鋳型の作成

coreInfl150、coreNDV100、coreInfl150 を鋳型とし、5' 側の degenerate region が 1~5 塩基の degeneracy をもつプライマーでそれぞれ PCR を行うことにより、TAP-PCR 用の鋳型を作成した。最初に作成された degenerate region の degeneracy の限界の検討のために作成された鋳型の両端の配列を図 11 に示す。

また、coreInfl150、および PCR によりその両端に degenerate 配列を接続した d-Infl150 を鋳型とし、Infl150_degenerate および Infl150_TAP をプライマーとして用いて PCR を行った(図 9)。プライマーが Infl150_degenerate のとき、鋳型に coreInfl150 を用いた時はバンドが検出されなかったが、d-Infl150 を用いた時は検出された。また、Infl150_TAP を用いたときは鋳型が coreInfl150、d-Infl150 のどちらでもバンドは検出された(図 12)。この結果から鋳型 DNA が期待通り作出された事が示唆された。

2-2. degenerate region の degeneracy の限界

3 種類の core 鋳型と、8mer の TAP region の 5' 側に 1~5 塩基の degeneracy をもつ degenerate region を接続させたプライマーで TAP-PCR を行なうことにより、degenerate region の degeneracy の限界を検討した結果、degeneracy が 5mer まで Infl50、NDV、Infl150 の 3 本のバンドが明瞭であった (図 13)。以降の実験では感度の限界を検討するために鋳型の量を減らしていくため、比較的弱めの degeneracy を用いることとし、TAP プライマーの degenerate region の degeneracy の限界を $3^4=81$ と設定した。

本実験での増幅産物のバンドのうち、NDV は degeneracy の量の影響をほとんど受けなかったが、Infl50 と Infl150 は degeneracy が大きくなっていくにしたがってバンドが薄くなっていった。これは、NDV は TAP 領域の配列が、Infl より比較的 PCR がかかりやすい配列であったことが原因であると考えられる。

2-3. TAP-PCR 法の感度の限界

degeneracy が 3^4 の鋳型と、8mer から 12mer の TAP region の 5' 側に、degeneracy が 3^4 でかつ 8mer の degenerate region を接続させたプライマーを用いて限界希釈 PCR を行なうことにより、検出感度の限界の検討を行った。すなわち、1 反応当たり鋳型 DNA が $10^6 \sim 10^1$ コピーになるように 1/10 ずつ希釈していき、同じ濃度のものを 3 種類混合したものを鋳型として用いた (図 14)。11mer では negative control である DW でもバンドが検出された。これは実験の過程でプライマーの中に鋳型が混入してしまったことが原因であると考えられる。

2-4. TAP プライマーの長さの影響

ウイルスゲノムにおいて、degenerate 配列が長く、その中に degeneracy をもった塩基が点在している場合を想定し、短い TAP region と長い degenerate region で構成される全長 25mer のプライマーで同様に鋳型の作成と TAP-PCR を行ない、適切な degenerate region の長さやプライマー長を検討した。一方、コロナウイルス科で多種検出プライマーを設計したところ、degenerate 配列の degeneracy は比較的低いことが判明した。よってここからは degeneracy を $3^3=27$ に下げたものを用いた (図 15)。

PCR の結果、TAP region の長さにも関わらず、より少量の鋳型でもバンドが検出された。しかし、degenerate region が 8mer のものは Infl150 のバンドが全く検出されず、9mer のものは Infl50 と Infl150 のバンドがほとんど検出されなかった。

2-5. 完全一致のプライマーでの TAP-PCR

前記の 25mer のプライマーでは 3 本のバンドの増幅効率は大きく異なっていた。そこで、同一のプライマーで鋳型を作成し、さらにそのプライマーで TAP-PCR を行なうことによって、原因を検討した (図 16)。PCR の結果、 10^1 コピーまでバンドが明瞭であった。しかし Infl50 のバンドは薄く、増幅効率が低いことが示唆された。

3. TAP-PCR のウイルスへの適用

3-1. SARS コロナウイルスを対象とした試験

CoCoMo アルゴリズムで設計したプラ

イマーを実際のウイルスに用いることで、プライマーの自動化の有効性を検討した。鋳型としては SARS コロナウイルス感染細胞 RNA を用いて TAP-RT-PCR を行なったことから、感染細胞のゲノムが混入している状態での TAP-PCR の有効性もまた同時に検討した。33 セットのプライマー（表 19）による TAP-PCR を行なった結果、レーン 2 で PCR 産物が得られなかった事以外は全て予想されたサイズの増幅産物が見られ、CoCoMo アルゴリズムの有用性が検証された（図 18）。

3-2. HEV 検出用 degenerate プライマーの設計

GenBank で HEV のデータを検索したところ、3,414 件の塩基配列の登録があり、全てをダウンロード、MySQL データベースに格納後、サイズおよび相同性に基づいてグループに分類したところ、58 のグループに分かれた。これらのうち、全ゲノムのサイズと一致するグループには 104 件の塩基配列が分類された(表 20)ため、このグループについて、相互の相同性を求めた後、社会ネットワーク分析に基づいて 9 個のグループに分割した(表 21)。続けて、それぞれのグループから代表配列を選択して代表グループを形成した後、代表グループを網羅するプライマー（HEV ゲノム共通 degenerate プライマー）を設計した(表 22)。

3-3. LCMV ウイルス用 degenerate プライマーの設計

HEV と同様に LCMV 塩基配列データについても GenBank から入手後、サイズおよび相同性に基づいてグループへの分類を

おこなった(表 23)。整列に基づく分類では、GPC 遺伝子について最多の配列データが存在したが、それらのデータは相互に相同性が高く、社会ネットワーク分析においても単一のグループが予測された(データ示さず)。この単一グループについて degenerate プライマーを設計し、DNA チップ上の配列をコア鋳型としてそのプライマーによる増幅能を DNA チップ上での Hybridization として観察したところ、シグナルの強弱の差はあったが、80%以上の配列についてシグナルが認められた(図 20)。この結果から、社会ネットワーク分析で決定されたグループ(SNS グループ)内でのプライマーがグループ内塩基配列を増幅するために有効であることが示唆された。

LCMVについては、さらに、セグメント S 全長のデータおよび約 900 塩基の Glycoprotein1 遺伝子について社会ネットワーク分析を実施した。社会ネットワーク分析図示ソフトでは、相互に相同性のあるグループは明確に表示されるが、この描出されるグループを自動的に検出するプログラムは塩基配列データ用には知られていない。本研究では、複数の塩基配列データ間での相同性を元にグループを形成するプログラムを開発したところ、HEV(図 19)および LCMV(図 22)でのデータから、このプログラムによるグループ分類は SNS グループとかなり一致することが示唆された。

D. 考察

本研究では、まず、ウイルスの遺伝子配列情報に全く依存しない RDA 法によるウイルス遺伝子検出を改良するため、特に RT 反応におけるプライマーに関して検討した。その結果、NR96 および NR6 を用い

た RDA 法では、Random プライマーを使用した場合に生じる rRNA の増幅を避けることによって、ある程度の検出感度で未知のウイルスを検出することが期待された。また、cDNA の段階では NR96 と比較して、NR6 を RT に用いたほうが、ウイルスの検出感度は高かった。しかし、Amplicon の段階では NR96 と NR6 の検出感度は同程度となり、DP1 の段階では NR6 を用いた場合、一部のインフルエンザ由来 DNA 断片は失われてしまった。このことから、NR96 よりも rRNA の RT 効率抑制に主眼を置いた NR6 ではウイルスの RT も抑制され、RDA 法実施中にウイルス由来 DNA 断片が失われることが示唆された。未知のウイルスを検出することを目的としたとき、ウイルス RNA を網羅的に RT する確率と、ウイルスの RT 効率のバランスがとれた NR96 の有用性が示された。

ただ、一方では、rRNA とウイルス塩基配列の混合モル比と Amplicon の合成量の比較から、RDA 法による検出が有効な範囲として rRNA の 1/100 程度のコピー数が必要であることが示唆された。細胞内の rRNA のコピー数が非常に大きいことを勘案すると RDA 法によるウイルスの検出感度が低いことが定量的に示された。

次に、本研究で開発した CoCoMo アルゴリズムによって SARS コロナウイルス、HEV、及び LCMV を検出するためのプライマーを設計した。いずれの場合についても、基本的には、①対象塩基配列の入手、分類および対象塩基配列グループの選定→②塩基配列間の相同性と社会ネットワーク解析に基づくグループ化→③対象塩基配列上の 6 塩基 motif の選定→④PCR の位置にある相補的 6 塩基 motif の削除→④選定さ

れたオリゴマーの 5' 領域 15 塩基の選択と共通 degenerate 配列の決定、という処理順序で degenerate プライマーを抽出することができた。これらのステップのうち、③以降は塩基配列グループによって大きな差はなく、一旦対象グループが決定されれば自動的に進められることが示唆された。ただし、相補オリゴマーの削除ステップには多大な計算資源が必要とされるため、実際には処理が可能な各塩基配列の長さや塩基配列数は限定されている。その限界内にグループを設定するための①での分類グループの選定と②での効率的なグループの設定が設計されたプライマーの適用範囲と検出感度に大きく影響することが示唆された。

合成オリゴマーを用いた検証試験では、TAP region の延長にしたがって少量の鋳型でもバンドが検出されるようになり、感度の上昇が見られた。また、効率の良い増幅のためには TAP region と degenerate region の長さにはバランスが重要であり、degenerate region と比して TAP region 長すぎる場合には必ずしも感度を上げないことが示唆された。さらに、TAP-PCR の効率の差は鋳型の配列により影響されると思われた。よって、適切なプライマーが各対象ウイルスに対して検討する必要性が示唆された。

SARS コロナウイルス感染細胞 RNA から鋳型を作成することで、感染細胞のゲノムが混入している状態での自動化して設計されたプライマーの有効性を検討した結果、33 サンプル中 1 サンプル以外は全て予想された増幅産物が得られた。このサンプルに PCR がかからなかった原因としては、おそらく設計と実験に用いた株の差や、また