

1	96	84	MARRTGGATGATYHTTGCTGC	247	GGTGGWAGTCAGGGAGGCGC	620
1	96	77	GAGGTGGWAGTCAGGGAGG	168	AYGARGAYAARGTDTGGGACA	210
1	96	47	ATGAGRAGTGGYTGGGCTGG	450	GAGGCGTRYTSHTCAGCGTC	860
1	96	84	MARRTGGATGATYHTTGCTGC	237	GTGGWAGTCAGGGAGGCGCT	620
1	96	107	GGTGGWAGTCAGGGAGGCC	168	AYGARGAYAARGTDTGGGACA	210
1	96	84	MARRTGGATGATYHTTGCTGC	35	GAGGTGGWAGTCAGGGAGGC	630
1	96	23	GAGRAGTGGYTGGGCTGGAC	460	GGAGGCGTRYTSHTCAGCGT	860
1	128	27	RRAAGAGGTGGWAGTCAGGG	91	GTGCYCTYCCRCARGGATGG	340
1	144	64	GTGTHCCBAARTGYTGGCTTG	77	YGAGGTGGWAGTCAGGGAGG	330
2	1	117	TCCTGCTTTGACAGCTGCACC	223	GGTTGGGATGAGGAGGCCCA	290
2	1	88	CTCACTAGAAGATTGGCAGGG	414	CCTCTGAACCCCTCAAAGGGCC	750
2	1	78	CACAACAGATGCCTACAGGC	230	TGCAAGCACTCACAGACCTGG	350
2	1	72	CAATTGTTGTGTTTTCCCATG	52	ATTTGTCGGATCTTGACAGGC	330
2	1	62	ACATATTGCCCCATCCAGCA	73	TCAAATTTACAAATGGTTGG	330
2	1	50	GCCAACTTCCCTGACAGGC	246	GGCTTGATTGCCAAACAGGC	360
2	1	44	GAAGGGCGCCAATTACTGAGG	138	GTTTGTCTCAGACCAAGTGGG	440
2	1	29	TGAGAGGTGGAGAGTCAGGGA	303	CTTTCAGCCACAGAATGGGCA	490
2	1	24	TATTTGACTGTGTAGAGCAGG	165	CATCAGGGGTCTATATGGGCA	230
2	1	15	GCACCATCCCTGGGAAGGG	19	GACATCTGTTGTGGGAAGGGC	360
2	1	7	GGCCCTTTGAGGGTTCAGAGG	141	CGGGATTGATCCAAATGCACC	540
2	1	117	TCCTGCTTTGACAGCTGCACC	73	TCAAATTTACAAATGGTTGG	300
2	1	169	AAGCCATTGTCAAGCTGGGCA	162	GATCTGCAGAGACTGAGGAGC	320
2	1	3	TTAAGAGGCAAGGAAGCACTC	372	CAAAGGCTAGGCTGCCAGACC	340
2	1	92	TTGGCAGGACTTTTACCTGG	390	TCAAAGGCTAGGCTGCCAGAC	820
2	1	84	TCCTACAGGCAATGTAGGGCC	217	TTTGAACAATCAATTTGGCAC	420
2	1	76	ATGAGGTCTGGCTATGGTTGG	6	CCATGACCTGGTCTTCAGAGG	960
2	1	62	ACATATTGCCCCATCCAGCA	239	TGGGATGAGGAGGCCCCAGCA	310
2	1	54	ATCGGCCAGATCCATCCCATG	292	TAAAAGCAGTTCTCGGGGCAA	430
2	1	48	GCATTGAAGAGATCGGCCAGA	259	TGCCTGTCAGGGGAAGGTTGG	350
2	1	35	CCACCTCTGAGAGGTGGAGAG	346	ATTGGCGCCCTTCCCAGGGA	360
2	1	24	TTAGTGACCAAATAGAGCAGG	380	TACACAATATACTGCCCATG	370
2	1	19	CACCATTCCCTGGGAAGGGC	134	TTTGTCTCAGACCAAGTGGGA	450
2	1	9	GAAGACCAGGTATGGGGCAG	134	GCAGGGCCACCCCAAGTGGGA	560
2	1	3	TTAAGAGGCAAGGAAGCACTC	126	AAGGCTAGGCTGCCAGACCTG	330
2	1	129	TCCAATGGGAAGACAACCTGG	373	ATATACTGCCCATGACCTGG	940
2	1	92	TTGGCAGGACTTTTACCTGG	126	AAGGCTAGGCTGCCAGACCTG	820
2	1	78	CACAACAGATGCCTACAGGC	246	GGCTTGATTGCCAAACAGGC	390
2	1	72	CAATTGTTGTGTTTTCCCATG	125	GTGCAAGCACTCACAGACCTG	380
2	1	62	ACATATTGCCCCATCCAGCA	145	CAATCTGACAACACAGCAGCT	360
2	1	54	ATCGGCCAGATCCATCCCATG	134	TTTGTCTCAGACCAAGTGGGA	390
2	1	44	GAAGGGCGCCAATTACTGAGG	259	TGCCTGTCAGGGGAAGGTTGG	380
2	1	29	TGAGAGGTGGAGAGTCAGGGA	320	GTTCATACATTTTACAGGGA	470
2	1	24	TATTTGACTGTGTAGAGCAGG	184	GAGTTAATGTCTTTAGCAGCT	300
2	1	15	GCACCATCCCTGGGAAGGG	215	TGTAGGACATCTGTTGTGGGA	370
2	1	7	GGCCCTTTGAGGGTTCAGAGG	308	AGTTGCTATCTTCAGCCACA	480
2	1	117	TCCTGCTTTGACAGCTGCACC	145	CAATCTGACAACACAGCAGCT	340
2	1	169	AAGCCATTGTCAAGCTGGGCA	189	GAACATTCTAAAAGTGGGCAG	250
2	1	3	TTAAGAGGCAAGGAAGCACTC	387	TTCAAAGGCTAGGCTGCCAGA	340
2	1	96	CTACTAGAAGATTGGCAGGGA	126	AAGGCTAGGCTGCCAGACCTG	830

表 25 LCMV ゲノムの SNS グループ用グループ内共通プライマー

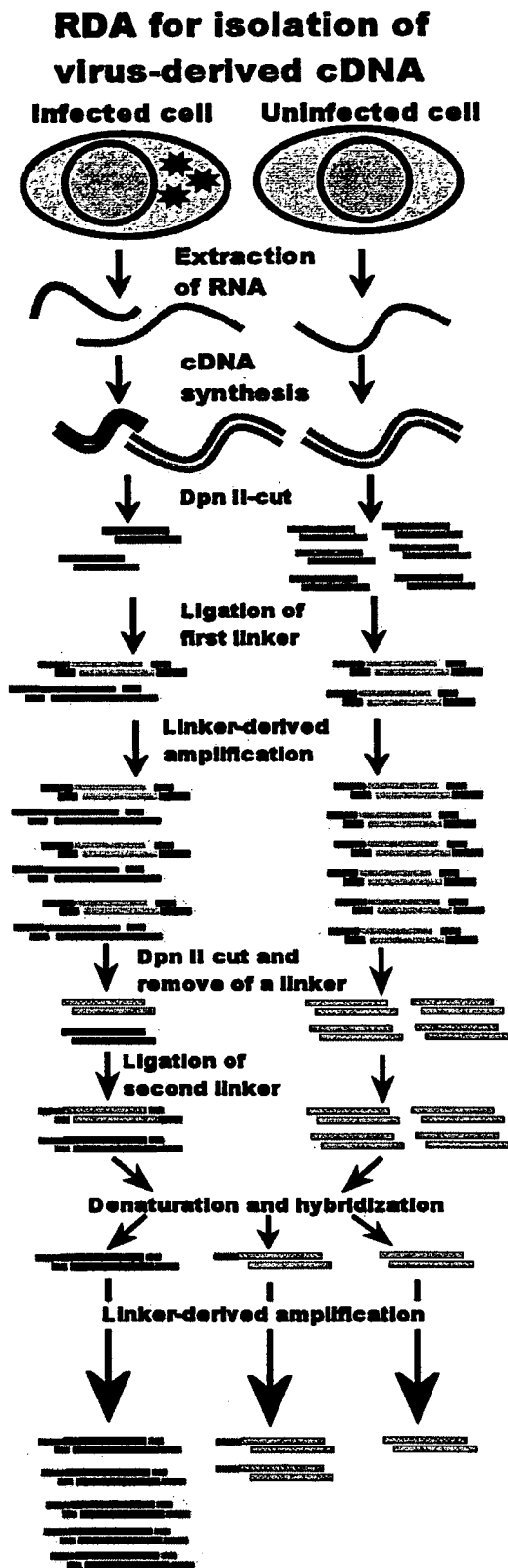
SNS グループ	Degeneracy	Fプライマーの位置	Fプライマーの配列	Rプライマーの位置	Rプライマーの配列	増幅産物
1	1	30	TGTGTACAATTCGCCACCTG	212	ACTCCTCATGTGTTTTCTCC	480
1	1	3	CTGTGTACAATTCGCCACCT	86	CTGTCCAACCCAGCCACTCC	490
1	1	66	AGTATAGTCTCGAGCCTGCAC	225	ATCTGAACCTGTCCAACCCCA	190
1	1	3	CTGTGTACAATTCGCCACCT	244	ATGTCCAAAACCTTCCCTG	440
1	1	69	GCCTCACATCTACAAGGGAGT	38	CTAATGCTGAGGTGCAGGCTC	220
1	1	30	TGTGTACAATTCGCCACCTG	350	GAAATCACAGGACACCCGCTT	350
1	1	3	CTGTGTACAATTCGCCACCT	316	GCTGAGGTGCAGGCTCGAGAC	300
1	1	33	TGTACAATTCGCCACCTGCG	64	GTTGTAAGTGAATAGTGATGCC	370
1	1	3	CTGTGTACAATTCGCCACCT	385	AACTCCAACCCAGAAAGTCCCC	190
1	1	33	TGTACAATTCGCCACCTGCG	225	ATCTGAACCTGTCCAACCCCA	500
1	1	6	CTTTTGAATCTGACCTCTGC	64	GTTGTAAGTGAATAGTGATGCC	110
1	1	69	GCCTCACATCTACAAGGGAGT	342	TTGAAATCACAGGACACCGCC	260
1	1	33	TGTACAATTCGCCACCTGCG	299	TTGTTGAAATCACAGGACACC	350
1	1	74	GTATAGTCTCGAGCCTGCACC	45	CTAGATATCCCGAAAGGCCT	290
1	1	6	CTTTTGAATCTGACCTCTGC	213	ACCTGTCCAACCCAGCCACT	230
1	1	6	CTTTTGAATCTGACCTCTGC	296	GTAAGTGAATAGTGATGCCGTT	110
1	1	74	GTATAGTCTCGAGCCTGCACC	234	TGTCCAAAACCTTCCCTGA	120
2	1	5	ACTTGAACCTGACTATGCCCA	102	CTTCTCATGTAAGTCCCCCA	330
2	1	12	CAATGTTTCGAGGCTTTGCCTC	221	CATTGGTAAAGGTCAGTCCA	290
2	1	23	GGGATACTCGCACTGGTCAGC	68	GGCAGAAGTCAAATTCAGTG	220
2	1	28	TGGGATACTCGCACTGGTCAG	208	GCTTGTAGTTTGTAGTCCCTC	310
2	1	36	ATGTATGGTCTTGATGGACCT	62	CCACTTCTCATGTAAGTCCCC	410
2	1	41	CAACTGAGTGCTGAACTCTGC	114	TTCTCATGTAAGTCCCCCAA	610
2	1	4	ACAATTTTGCACCTTGTTGGA	25	GGAGTCATTGGTAAAGGTCAG	200
2	1	4	TGGCTGGCAAGTCTTGTTGGA	212	CTTGTAGTTTGTAGTCCCTCT	270
2	1	5	ACTTGAACCTGACTATGCCCA	398	ACCACCAGGCTTTCCAGTCC	560
2	1	16	GTCAGCTTCTCTTTCTGGCT	71	GCAGAAGTCAAATTCAGTGG	210
2	1	31	TGTATGGTCTTGATGGACCTG	68	AGGACCTGCATACGTGCAGTG	520
2	1	36	ATGTATGGTCTTGATGGACCT	121	TCCACTTCTCATGTAAGTCCCC	410
2	1	41	CAACTGAGTGCTGAACTCTGC	260	TGGTAAAGGTCAGCTCCAGTC	330
2	1	5	ACTTGAACCTGACTATGCCCA	68	AGGACCTGCATACGTGCAGTG	450
2	1	4	TGGCTGGCAAGTCTTGTTGGA	102	CTTCTCATGTAAGTCCCCCA	420
2	1	23	GGGATACTCGCACTGGTCAGC	102	CTTCTCATGTAAGTCCCCCA	450
2	1	28	TGGGATACTCGCACTGGTCAG	228	GTCATTGGTAAAGGTCAGCTC	180
2	1	36	ATGTATGGTCTTGATGGACCT	68	AGGACCTGCATACGTGCAGTG	520
2	1	41	CAACTGAGTGCTGAACTCTGC	212	CTTGTAGTTTGTAGTCCCTCT	460
2	1	4	ACAATTTTGCACCTTGTTGGA	62	CCACTTCTCATGTAAGTCCCC	470
2	1	4	ACAATTTTGCACCTTGTTGGA	228	GTCATTGGTAAAGGTCAGCTC	200
2	1	12	CAATGTTTCGAGGCTTTGCCTC	25	GGAGTCATTGGTAAAGGTCAG	290
2	1	16	GTCAGCTTCTCTTTCTGGCT	102	CTTCTCATGTAAGTCCCCCA	440
2	1	20	CCTTTACCAATGACTCCATCC	68	AGGACCTGCATACGTGCAGTG	360
2	1	28	TGGGATACTCGCACTGGTCAG	25	GGAGTCATTGGTAAAGGTCAG	190
2	1	31	TGTATGGTCTTGATGGACCTG	71	GGACCTGCATACGTGCAGTGG	520
2	1	36	ATGTATGGTCTTGATGGACCT	212	CTTGTAGTTTGTAGTCCCTCT	250
2	1	4	ACAATTTTGCACCTTGTTGGA	71	GCAGAAGTCAAATTCAGTGG	240
2	1	5	ACTTGAACCTGACTATGCCCA	62	CCACTTCTCATGTAAGTCCCC	330
2	1	12	CAATGTTTCGAGGCTTTGCCTC	208	GCTTGTAGTTTGTAGTCCCTC	410

3	1	10	TACAATTCGCCACCTGTGGG	183	AAGACACTGCTTTGTGGTTGG	330
3	1	8	TCAGCTTCCTTTTTTGGCTG	19	GATAGCTTGTGGCTGCACC	500
3	1	4	TTTGGCTGGTAGGTCTGTGG	19	GATAGCTTGTGGCTGCACC	490
3	1	1	GTACAATTCGCCACCTGTGG	121	GTATTTTCTCCAAGGCAGT	470
3	1	71	ACTTAAATCTGACGATGCCCA	427	TCCTGAGGAGTCTGACAGGT	550
3	1	67	TATCCAATAAAAGGATGGGTC	221	TCTTTTTGTTGAAAGCGGAGG	370
3	1	64	TCCAATAAAAGGATGGGTCAG	221	TCTTTTTGTTGAAAGCGGAGG	370
3	1	60	GATTGTGACAATGTTTGAGGC	226	ACTGAGGTGCAGACTCGAGAC	400
3	1	49	CCTGTGGGATATTAGCACTGG	251	GCTGCACCAAGTGGTCTTGCC	510
3	1	45	ACATCAGTATGGGAAGCTCTG	427	TCCTGAGGAGTCTGACAGGT	490
3	1	42	CTGTGTACAATTCGCCACCT	207	CTTATAGCGCTCTGTGGTCC	410
3	1	37	TTTTTGGCTGGTAGGTCTGTG	245	GTTTGGCTGCACCAAGTGGTC	480
3	1	33	TTTACCAGTTCAAATCAGTGG	251	GCTGCACCAAGTGGTCTTGCC	410
3	1	31	TGTGTACAATTCGCCACCTG	207	CTTATAGCGCTCTGTGGTCC	410
3	1	26	TGGGATATTAGCACTGGTCAG	207	CTTATAGCGCTCTGTGGTCC	380
3	1	21	TATCCAATAAAAGGATGGGTC	221	TCTTTTTGTTGAAAGCGGAGG	380
3	1	14	TATTAGCACTGGTCAGCTTCC	270	ATAGCTTGTGGCTGCACCA	510
3	1	10	TACAATTCGCCACCTGTGGG	116	ATGTCCAAGACTCTACCTCTG	440
3	1	14	TATTAGCACTGGTCAGCTTCC	179	GTTAAAATCACAAGACTGC	320
3	1	8	TCAGCTTCCTTTTTTGGCTG	183	AAGACACTGCTTTGTGGTTGG	300
3	1	4	TTTGGCTGGTAGGTCTGTGG	195	GTTGTATTGAATGGTATGCC	320
3	1	1	GTACAATTCGCCACCTGTGG	188	TTTGTGGTTGGAATTCOCTCT	330
3	1	73	TCACTTAAATCTGACGATGCC	175	TATAGCGCTCTGTGGTCCGA	260
3	1	71	ACTTAAATCTGACGATGCCCA	116	ATGTCCAAGACTCTACCTCTG	300
3	1	67	TATCCAATAAAAGGATGGGTC	175	TATAGCGCTCTGTGGTCCGA	520
3	1	64	TCCAATAAAAGGATGGGTCAG	179	GTTAAAATCACAAGACTGC	460
3	1	60	GATTGTGACAATGTTTGAGGC	179	GTTAAAATCACAAGACTGC	440
3	1	49	CCTGTGGGATATTAGCACTGG	175	TATAGCGCTCTGTGGTCCGA	390
3	1	45	ACATCAGTATGGGAAGCTCTG	19	GATAGCTTGTGGCTGCACC	340
3	1	42	CTGTGTACAATTCGCCACCT	159	CTCTAATACTGAGGTGCAGAC	310

図1 ウイルス RT 用プライマーNR96 の設計方法

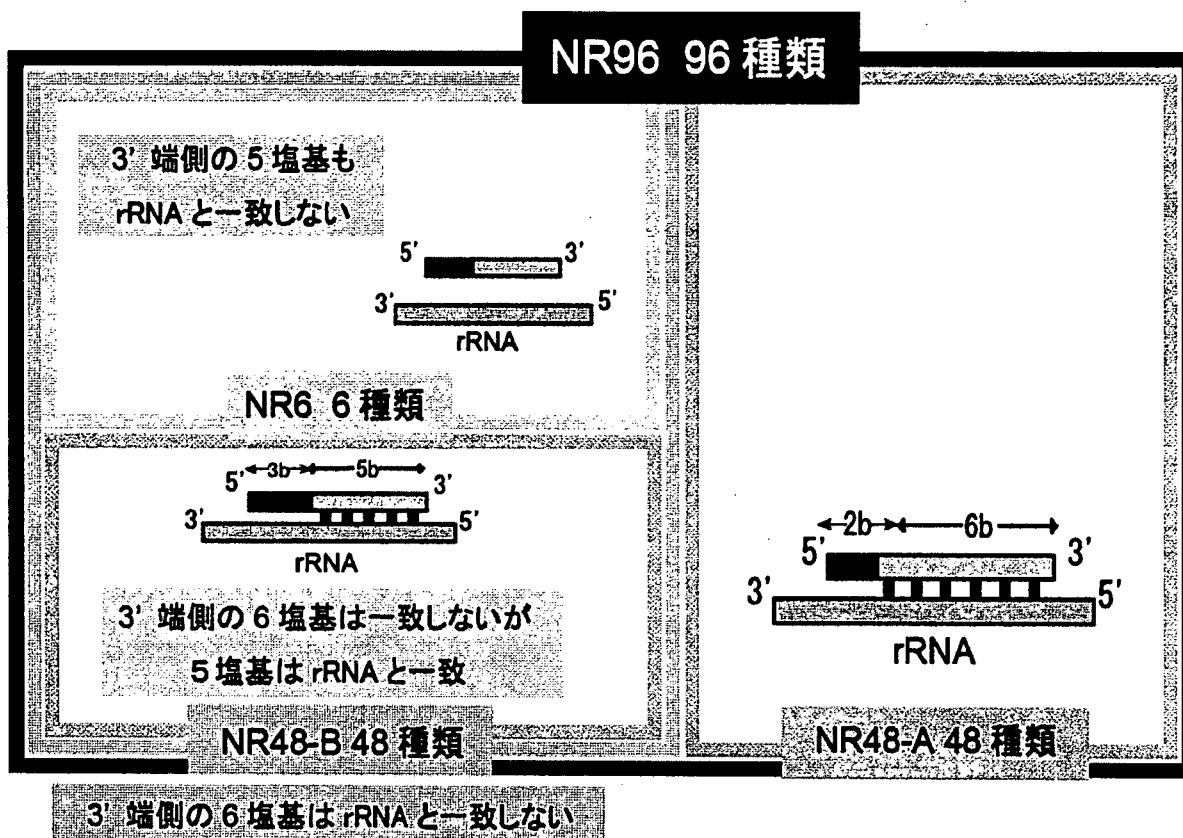
コンピュータ	パターン頻度の解析
AMD64, 2GBmem, Linux データベース: MySQL 4.1.10 解析用プログラム: 独自開発 (C および Ruby)	対象遺伝子群 ↓ 公開サーバーからダウンロード コンピュータ上のテキストデータ ↓ MySQL データベースにインポート 遺伝子名、生物分類および塩基配列データ ↓ オリゴマー頻度解析プログラム オリゴマーのパターンと頻度データ

図2 RDA法の概略。
各行程の番号に対応して本文中で詳細を記載する。



- ①感染細胞からのウイルスゲノムを含んだRNAの精製
- ②cDNA合成
- ③制限酵素切断
- ④リンカーの接続
- ⑤非特異的PCR産物(Amplicon)の合成
- ⑥Ampliconの制限酵素切断
- ⑦第2のリンカー接続
- ⑧ハイブリダイゼーション
- ⑨感染細胞特異的 Amplicon のPCR増幅

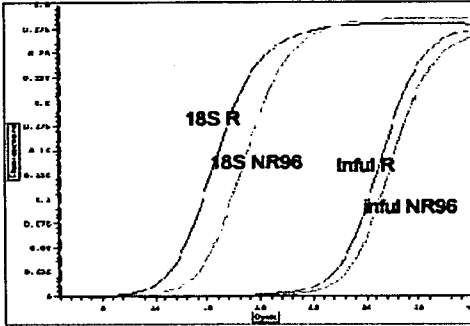
図3 ウイルス RT 用プライマー-NR6 の設計



cDNA の段階では、NR96 は Random Primer と比較し、インフルエンザの増幅効率が約 2.53 倍増加していた。そこで、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 から 3 種類のプライマーミックスを作成した。8 塩基で構成されたオリゴマーの 3' 端 6 塩基のみに着目し、鶏 rRNA に一致する配列が存在する 6 塩基をもつオリゴマー 48 種類を NR48-A とした。逆に 3' 端の 6 塩基が鶏 rRNA と一致する配列を持たない 48 種類のオリゴマーを NR48-B とした。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。これらのプライマーミックス NR48-A、NR48-B および NR6 でそれぞれ 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。

図4 リアルタイムPCRによるインフルエンザ/鶏由来 DNA 断片量の比較

A cDNA Random-NR96



インフルエンザ

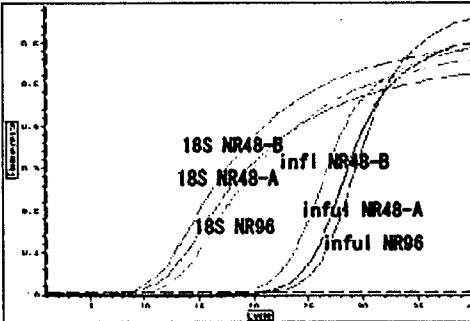
Template	Ct
Random	30.77
NR96	32.205

リボソーム

Template	Ct
Random	13.025
NR96	15.785

Sample-Control	Rel.Quantity	1/Rel.Quantity
Random-NR96	0.395174997	2.530524471

B cDNA NR96-NR48



インフルエンザ

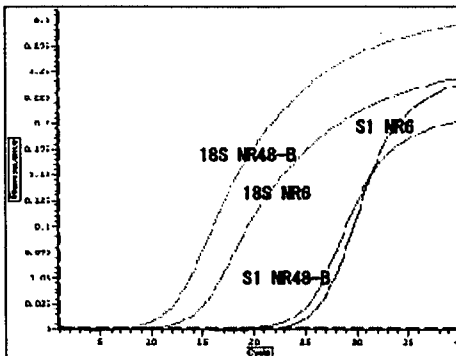
Template	Ct
NR96	23.67
NR48-A	22.505
NR48-B	20.905

リボソーム

Template	Ct
NR96	9.565
NR48-A	8.505
NR48-B	5.925

Sample-Control	Rel.Quantity	1/Rel.Quantity
NR96-NR48-A	1.823211195	0.54848281
NR48-A-NR48-B	0.509197526	1.963874428
NR96-NR-B	1.413970789	0.707228189

C cDNA NR48-B-NR6



インフルエンザ

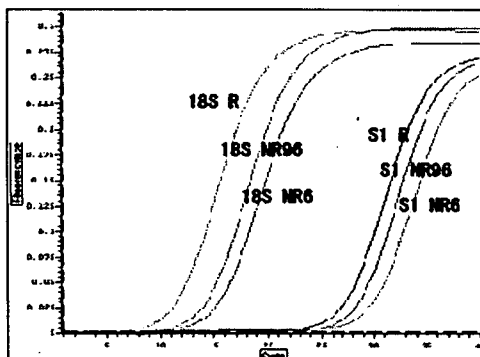
Template	Ct
NR48-B	21.88
NR6	24.35

リボソーム

Template	Ct
NR48-B	11.115
NR6	14.35

Sample-Control	Rel.Quantity	1/Rel.Quantity
NR6-NR-B	1.699676297	0.588347323

D cDNA Random-NR96-NR6



インフルエンザ

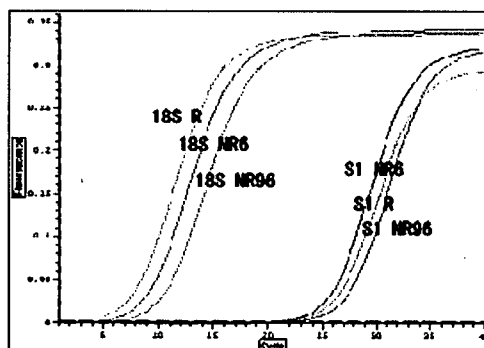
Template	Ct
Random	30.77
NR96	32.205
NR6	33.61

リボソーム

Template	Ct
Random	13.025
NR96	15.785
NR6	16.92

Sample-Control	Rel.Quantity	1/Rel.Quantity
Random-NR96	0.395174997	2.530524471
NR96-NR6	1.199763276	0.833497757
Random-NR6	0.474116449	2.109186471

E Amplicon Random-NR96-NR6



インフルエンザ

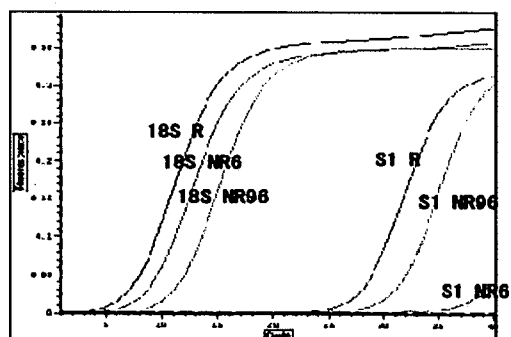
Template	Ct
Random	32.41
NR96	32.81
NR6	31.31

リボソーム

Template	Ct
Random	7.59
NR96	10.31
NR6	8.815

Sample-Control	Rel.Quantity	1/Rel.Quantity
Random-NR96	0.201822068	4.954859545
NR96-NR6	0.998059704	1.001944068
Random-NR6	0.201430473	4.96449214

F DP1 Random-NR96-NR6



インフルエンザ

Template	Ct
Random	36.405
NR96	33.515
NR6	0

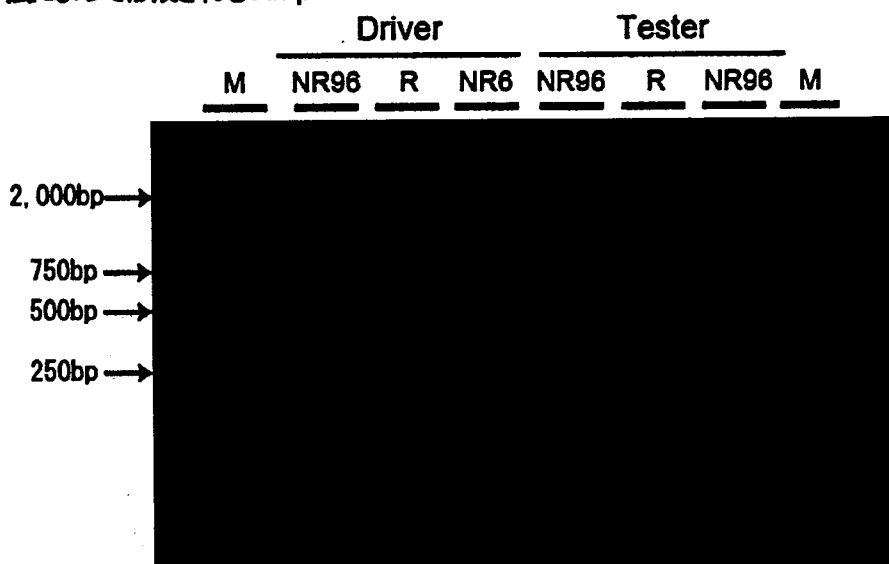
リボソーム

Template	Ct
Random	11.085
NR96	7.145
NR6	8.49

Sample-Control	Rel.Quantity	1/Rel.Quantity
Random-NR96	0.009028702	110.7578919
NR96-NR6	56734600000	1.76259E-11
Random-NR6	5.1224E+12	1.95221E-13

Random Primer(A,D,E,F)、NR96(A,B,D,E,F)、NR48-A(B)、NR48-B(B,C)、NR6(C,D,E,F)をRT用プライマーとして用いて合成したcDNA(A-D)、Amplicon(E)、DP1(F)を鋳型とし、リアルタイムPCRを実施した。プライマーは、インフルエンザ Segment1 および鶏 rRNA 18S 由来 DNA 断片の一部を増幅させるよう設計されたものを使用した(表5)。

図5 RDA 法によって形成される Amplicon



Random Primer、NR96 および NR6 を RT 用プライマーとして合成した cDNA を鋳型とし、合成した Driver Amplicon および Tester Amplicon をそれぞれ 2.0%アガロースゲル上で電気泳動した。Random Primer を用いた Driver Amplicon では 220bp、240bp、280bp、380bp 付近に、Tester Amplicon では 240bp、280bp、300bp、380bp 付近にバンドが認められた。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6 サブトラクション後の増幅産物

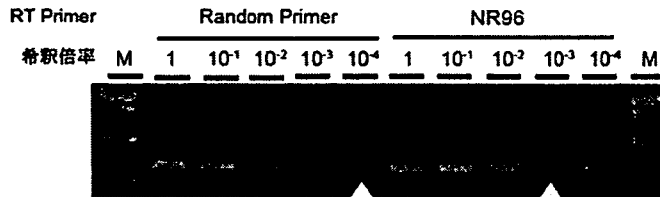


NR96 および NR6 を用いた DP1 および DP2 を 2.0%アガロースゲル上で電気泳動した。Random Primer を使用した場合、Tester Amplicon と比較すると 420bp、480bp 付近のバンドが強調され、380bp、400bp 付近のバンドが見られなくなった。一方 NR96 ではバンドパターンの変化は見られなかった。また、NR6 で認められるバンドも Tester Amplicon と変化が認められなかった。DP2 については、認められるバンドは DP1 と同じであったが、Random Primer では 480bp 付近、NR96 では 380bp および 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7 限界希釈PCR

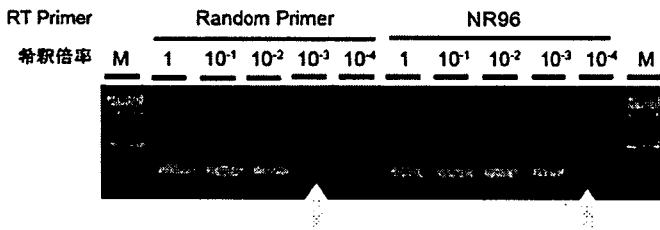
エラー!

A rRNA 18S

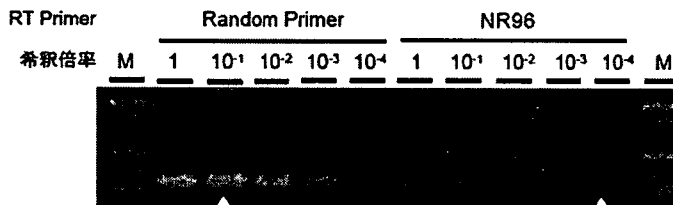


エラー!

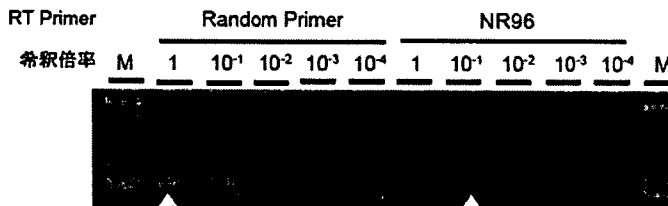
B rRNA 28S



C インフルエンザ Segment1



D インフルエンザ Segment 3



鶏rRNA 18S(A)、28S(B)、インフルエンザSegment1(C)およびSegment3(D)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、Random PrimerおよびNR96を用いたDP1を1/10ずつ5段階に希釈(1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4})し、鋳型としてPCR反応に使用した。続けてそれらのPCR産物を1.0%アガロースゲル上で電気泳動した。インフルエンザSegment1においてはRandom Primer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率は 10^{-4} 倍であった。同様にインフルエンザSegment3では、Random Primer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。一方rRNA 18Sにおいては、Random Primer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8 CoCoMo におけるPCR位置 motif 選定アルゴリズムの流れ図

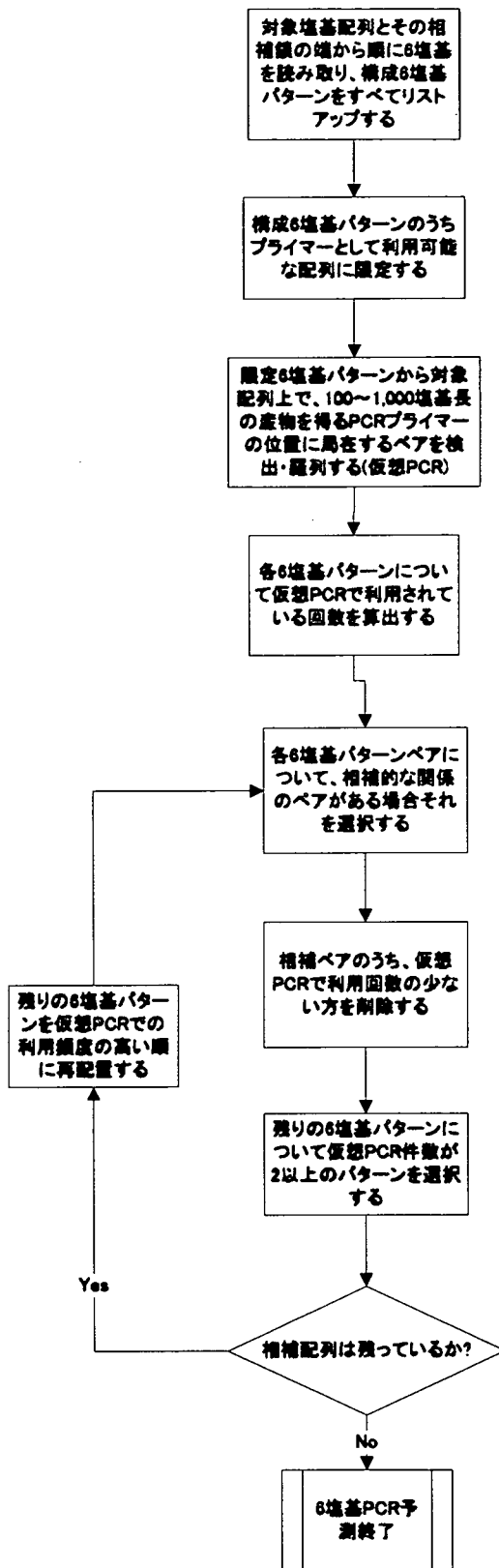
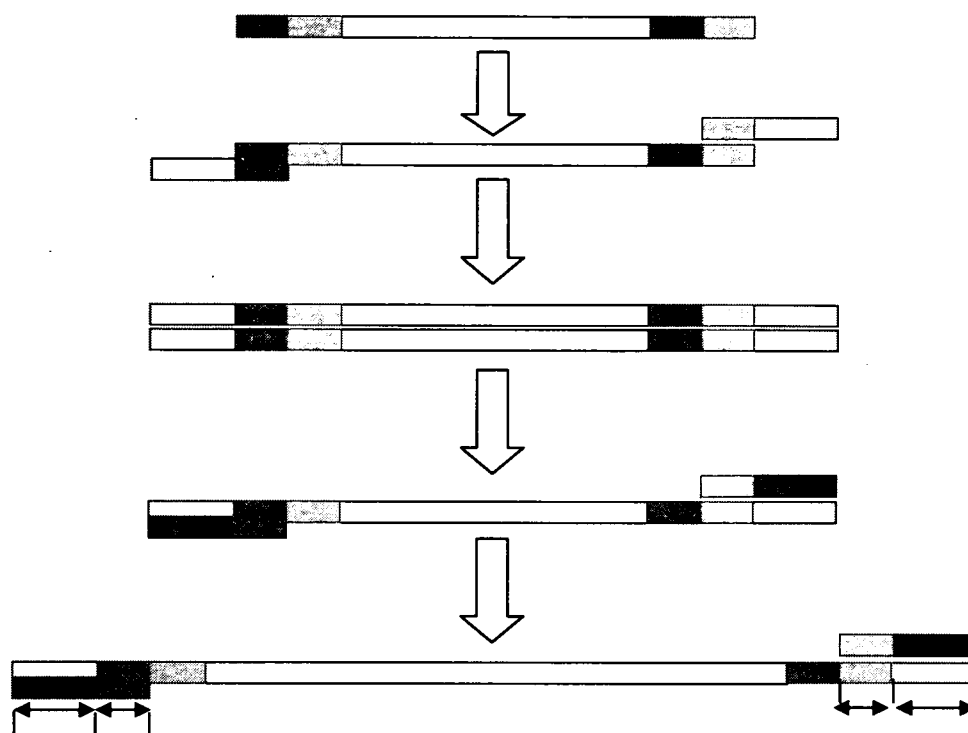


図9 鑄型作成およびその後の TAP-PCR の流れ



degenerated region TAP region TAP 配列 degenerated 配列

図10 TAP-PCR 効率検討用の合成鑄型

【coreInfl50】

5'-AACCCAGCACTTAGGATGAAATGGATGATGGCAAATACGTCGGAGAGTTGACATAAAATCCTGGTCA-3'

【coreNDV100】

5'-AACCCAGCACTTAGGATGCTGACTATCCGGGTCGCGCTGGTATTGAGITGCATCTGTGCGCAGCTACAATA
TCTCATCCTGTCAITTCATTCAAGGTTACATACATAAAATCCTGGTCA-3'

【coreInfl150】

5'-AACCCAGCACTTAGGATGAAATGGATGATGGCAAATGAAATATCCAATTACAGCAGACAAGAGGATAACG
GAAATGATTCTGAAGGCTAAAGCATGGAACCTTTGGCCCTGTCCATTTTAGAAACCAAGTCAAATACGT
CGGAGAGTTGACATAAAATCCTGGTCA-3'

5'-AACCCAGC-3' : 共通の 8 塩基の配列 (TAP 配列)

5'-CCTGGTCA-3' : 共通の 8 塩基の配列 (TAP 配列)

5'-ACTTAGGA-3' : H1N1 の共通部分 (5'-AACCCAGC-3') の 3' 側の配列

5'-ACATAAAT-3' : H1N1 の共通部分 (5'-CCTGGTCA-3') の 5' 側の配列

図 11 PCR で作成された TAP-PCR 用鋳型の両端(degeneracy の検討用)

【Infl50(1)】 5'-AACCTACGAACCCAGCACTTA.....TAAATCCTGGTCACCTTCTTG-3'
 【Infl50(2)】 5'-AATCTACGAACCCAGCACTTA.....TAAATCCTGGTCACCTTCCTG-3'
 【Infl50(3)】 5'-AATCTACCAACCCAGCACTTA.....TAAATCCTGGTCAGCTTCCTG-3'
 【Infl50(4)】 5'-GATCTACCAACCCAGCACTTA.....TAAATCCTGGTCAGCTTCCTA-3'
 【Infl50(5)】 5'-GATCTTCCAACCCAGCACTTA.....TAAATCCTGGTCAGCCTCCTA-3'

【NDV(1)】 5'-AACCGACGAACCCAGCACTTA.....TAAATCCTGGTCACCTGCTTG-3'
 【NDV(2)】 5'-AAGCGACGAACCCAGCACTTA.....TAAATCCTGGTCACCTGCATG-3'
 【NDV(3)】 5'-AAGCGACTAACCCAGCACTTA.....TAAATCCTGGTCATCTGCATG-3'
 【NDV(4)】 5'-TAGCGACTAACCCAGCACTTA.....TAAATCCTGGTCATCTGCATC-3'
 【NDV(5)】 5'-TAGCGGCTAACCCAGCACTTA.....TAAATCCTGGTCATCGGCATC-3'

【Infl150】5'-AACCCACGAACCCAGCACTTA.....TAAATCCTGGTCACCTCCTTG-3'

図 12 作成された鋳型の正確性

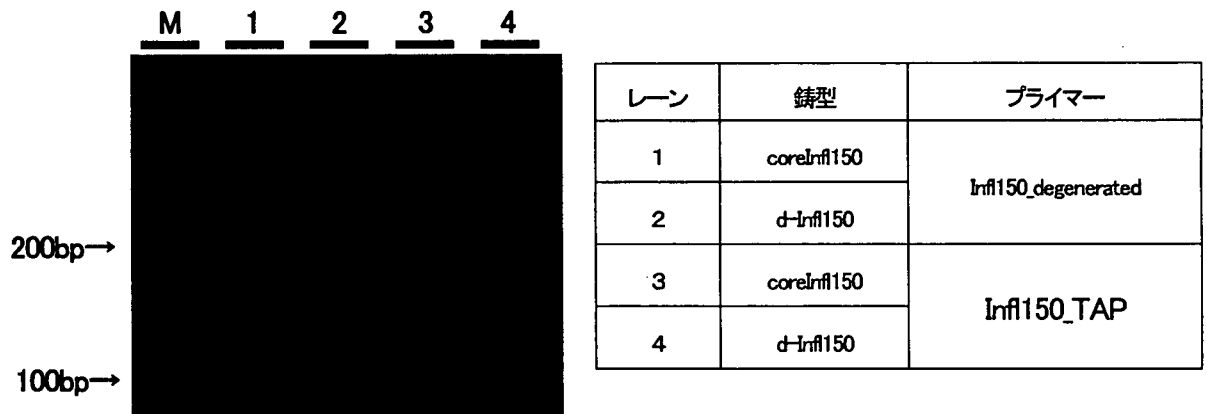


図 13 degenerate region の degeneracy の限界

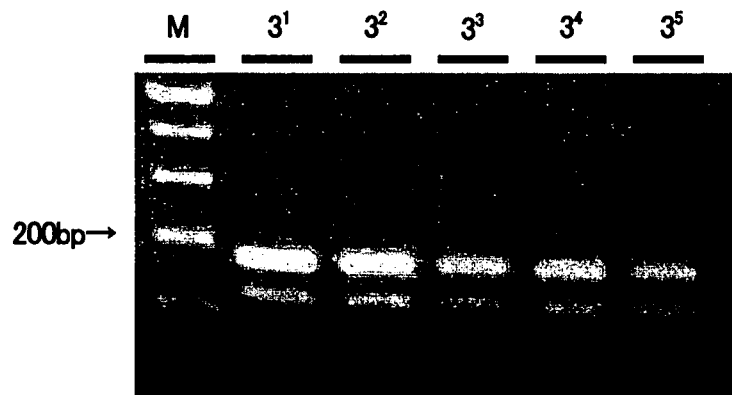


図 14 TAP-PCR の感度の限界と TAP region の長さの影響

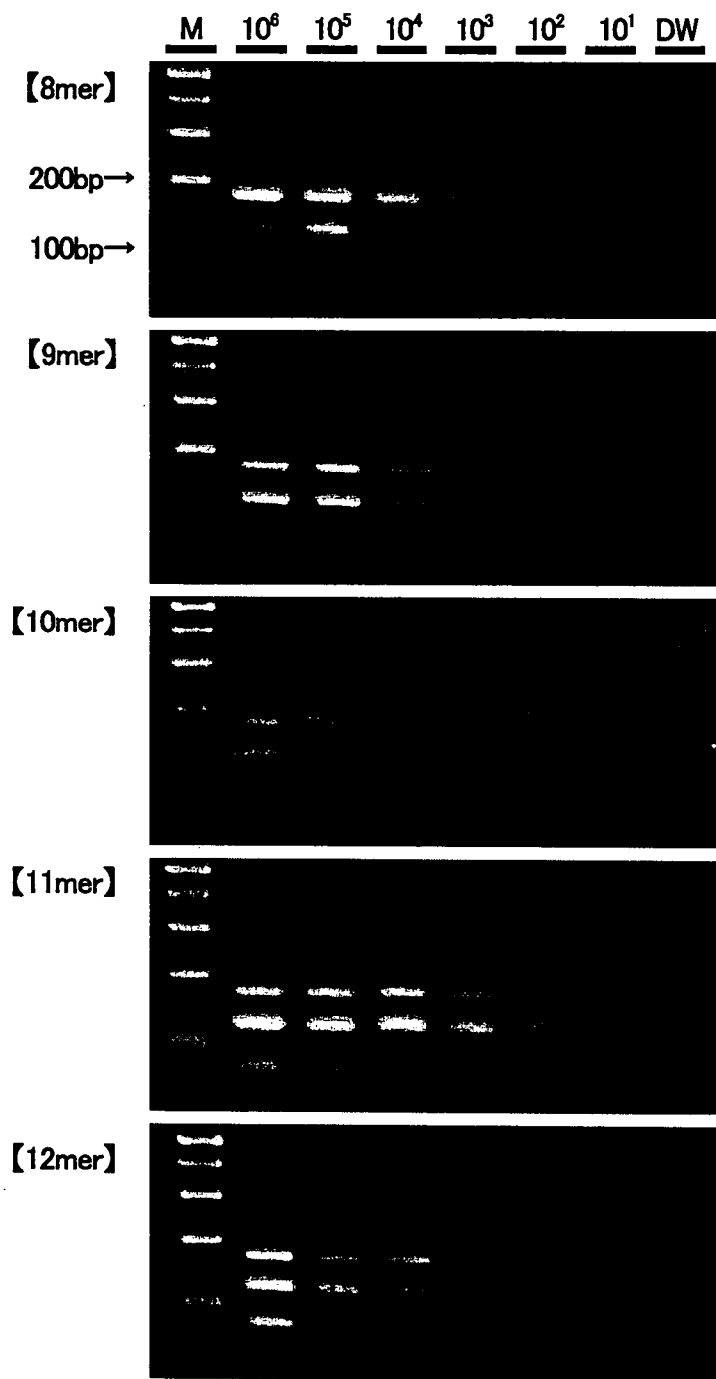


図 15 プライマー全長 25mer での TAP PCR

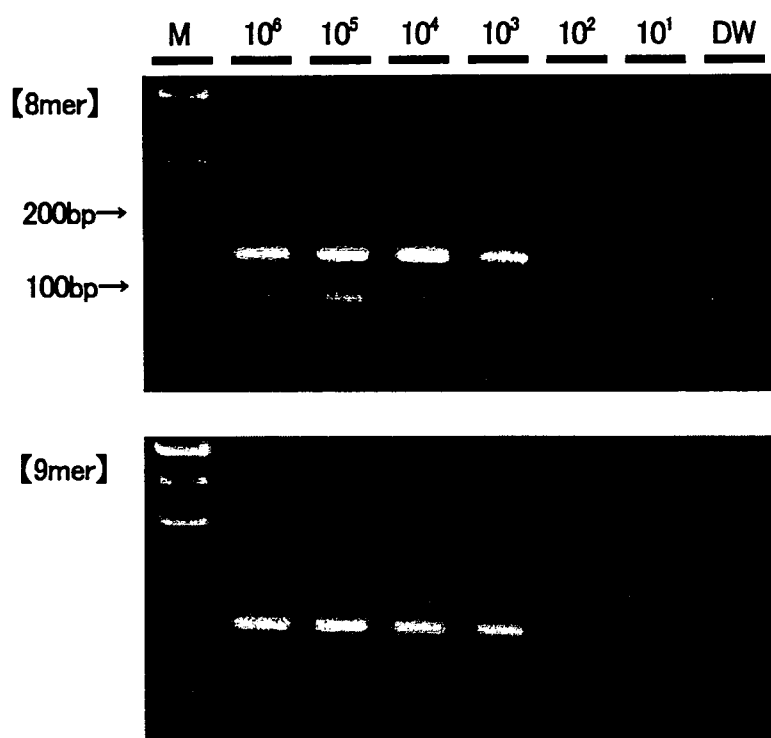


図 16 同一のプライマーによる TAP-PCR

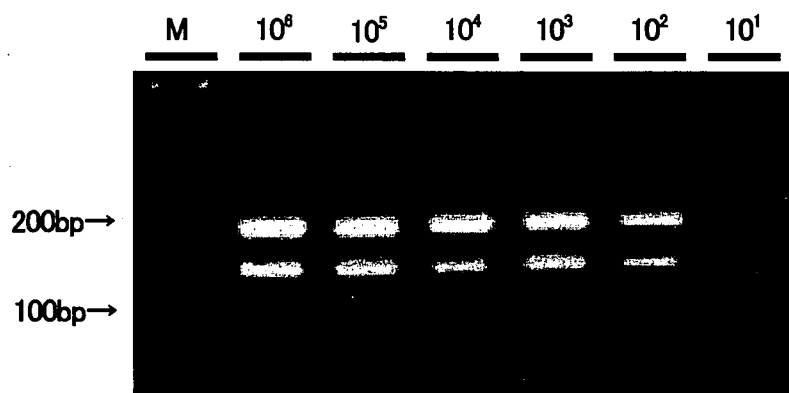


図 18 SARS コロナウイルス感染細胞由来 cDNA を鋳型とした TAP-PCR

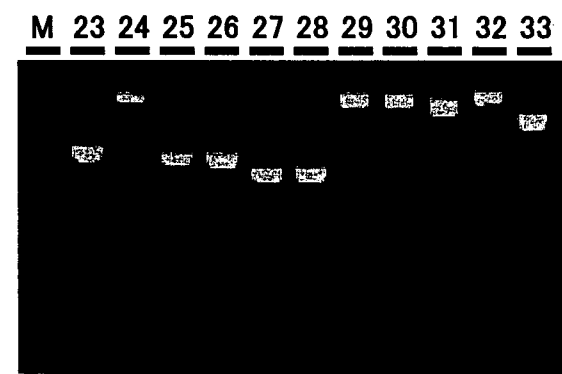
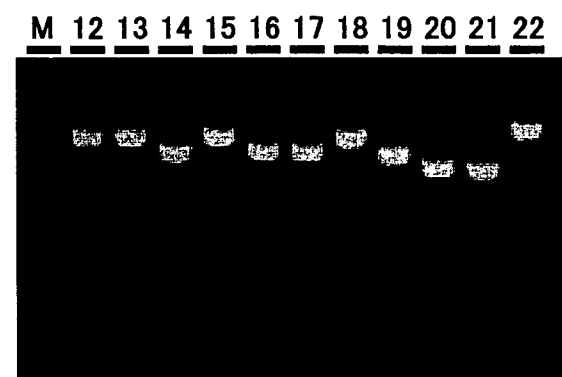
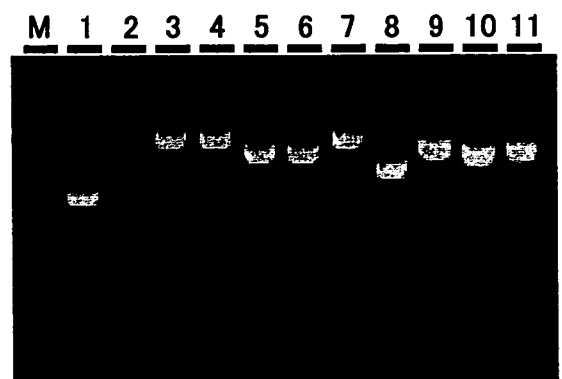
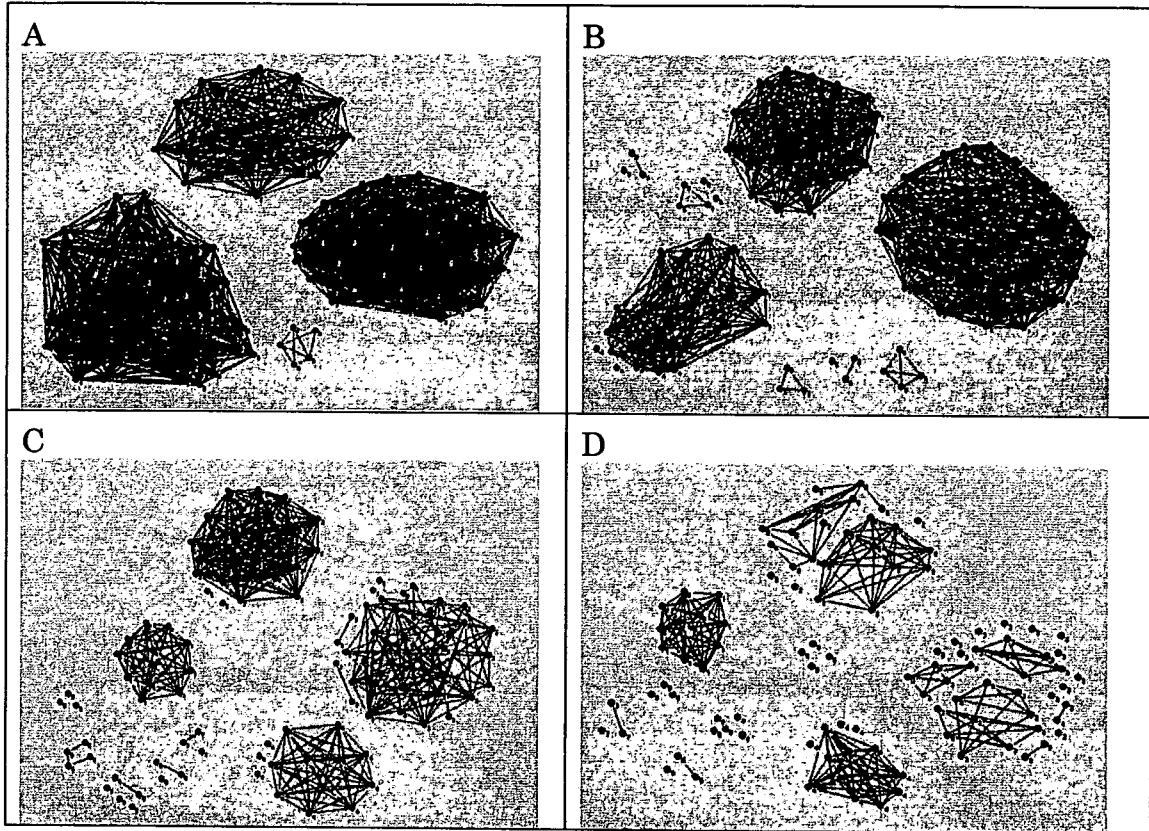


図 19 HEV ゲノム間の社会ネットワーク分析図



HEV ゲノム塩基配列データ間の社会ネットワーク分析による相互関係の図示。各赤点は個々の塩基配列データを青い線は、80% (A), 85% (B), 90% (C) および 95%(D)以上の相同性を示す。

図 20 DNA チップでの degenerate プライマーによる LCMV GPC 遺伝子増幅の確認

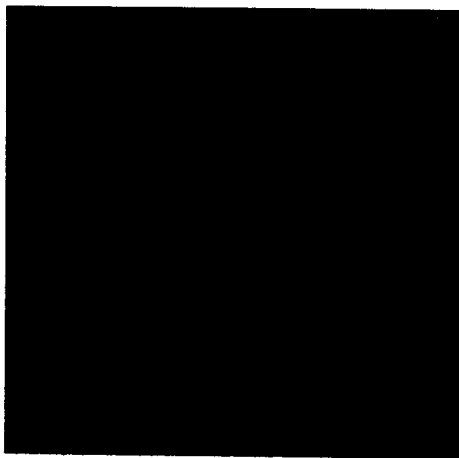
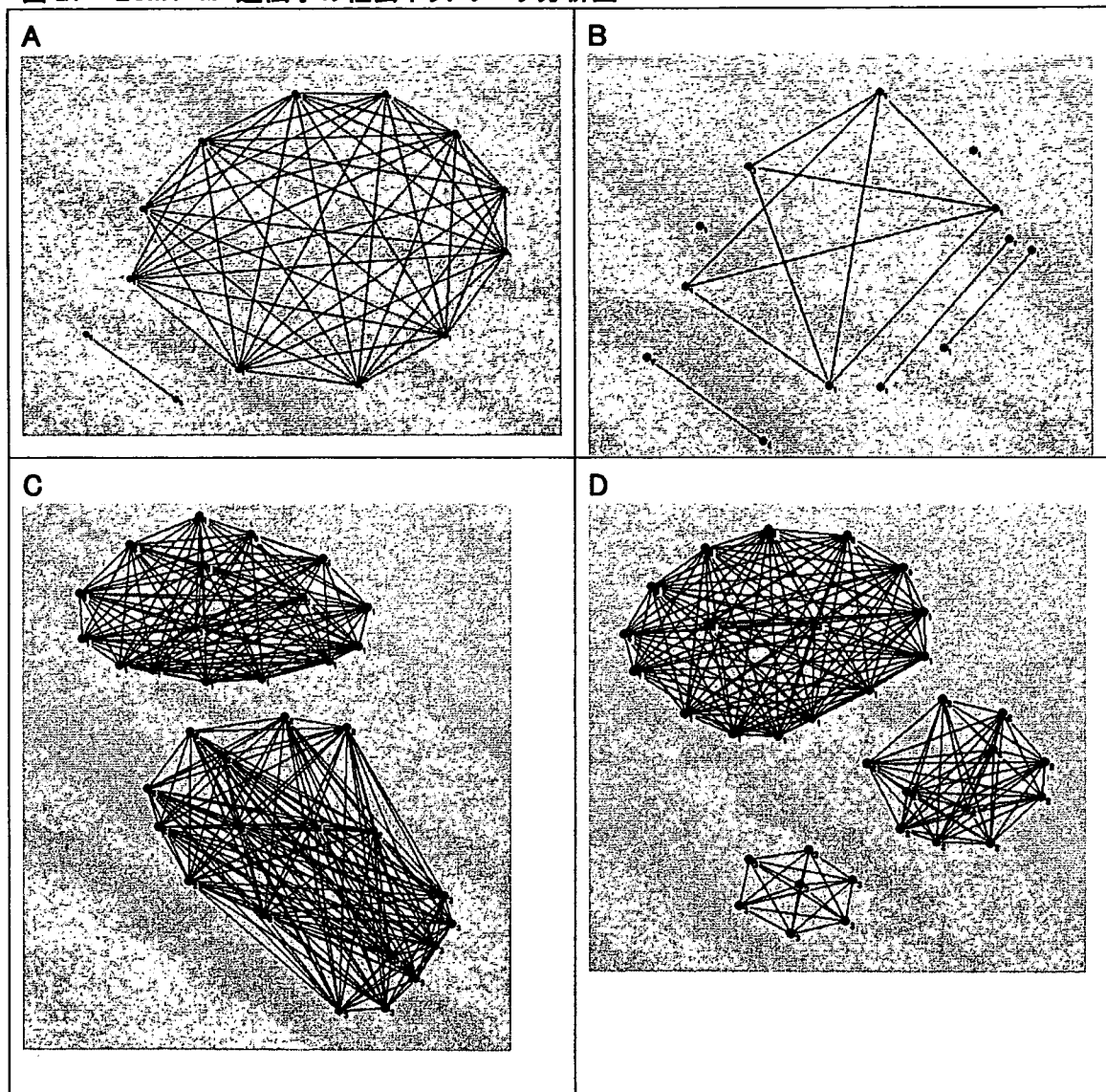


図 21 LCMV GP 遺伝子の社会ネットワーク分析図



LCMV Sセグメント (A および B) 、および Glycoprotein 1(C および D)の社会ネットワーク分析による再グループ化を図示する。各赤点は個々の塩基配列データを青い線は、82%(A および C)または 88%(B および D)以上の相同性を示す。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Yokoyama, M., Harashima, A., Sato, Y., Saijo, M., Morikawa, S., and Sata, T. : Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats infected with SARS coronavirus, *J. Virol.*, 81(4):1848-57, 2007
2. Yu, F., Le, M.Q., Inoue, S., Hasebe, F., Parquet, M.D., Morikawa, S., and Morita K. : Development of immunoglobulin m capture enzyme-linked immunosorbent assay stsem for severe acute respiratory syndrom coronavirus by using recombinant truncated nucleocapsid proteion as antigen. *Clin. Vaccine Immunol.* 14(2):146-149, 2007.
3. Mizutani, T., Endoh, D., Okamoto, M., Shirato, K., Shimizu, H., Arita, M., Fukushi, S., Saijo, M., Sakai, K., Limn, C.K., Ito, M., Nerome, R., Takasaki, T., Ishii, K., Suzuki, T., Kurane, I., Morikawa, S., and Nishimura, H. : Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 13(2): 322-4, 2007.
4. Okada, M., Okuno, Y., Hashimoto, S., Kita, Y., Kanamaru, N., Nishida, Y., Tsunai, Y., Inoue, R., Nakatani, H., Fukamizu, R., Namie, Y., Yamada, J., Takao, K., Asai, R., Asaki, R., Kase, T., Takemoto, Y., Yoshida, S., Peiris, J.S., Chen, P.J., Yamamoto, N., Nomura, T., Ishida, I., Morikawa, S., Tashiro, M., and Sakatani, M. : Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. *Vaccine*, 25(16): 3038-3040, 2007
5. Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Morikawa, S., Yokosawa, H., and Yasuda, J. : Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *J. Virol.* 81(9):4895-9, 2007.
6. Mizutani, T., Fukushi, S., Kenri, T., Sasaki, Y., Ishii, K., Endoh, D., Zamoto, A., Saijo, M., Kurane, I., and Morikawa, S. : Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. *Arch. Virol.* 152:1019-1025, 2007
7. Sakai, K., Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Endoh, D., Kurane, I., Takehara, K., and Morikawa, S. : An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences of avian RNA viruses. *Arch. Virol.* 152(9):1763-5, 2007
8. Saijo, M., George-Corbot, M., Philippe, M., Victor, R., Fukushi, S., Mizutani, T., George, A., Kurata, T., Kurane, I. and Morikawa, S. : Development of recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever. *Clin Vaccine Immunol.* 14(9):1182-9, 2007
9. Ike, F., Bourgade, F., Ohsawa, K., Sato, H., Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I., Takimoto, K., Yamada, Y.K., Jaubert, J., Berard, M., Nakata, H., Hiraiwa, N., Mekada, K., Takakura, A., Itoh, T., Obata, Y., Yoshiki, A., and Montagutelli, X. : LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. *Comp. Med.*, 57(3): 272-281, 2007.
10. Ikejiri, M., Saijo, M., Morikawa, S., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., and Maruyama,