

みが1ビットである数値として表現可能である(図3B)。この記載方法を用いた場合、混合塩基は二つ以上のの桁が1である数値として表現される(図3B)。この記載方法に基づけば、degenerate塩基と通常塩基のホモロジーは、degenerate塩基での1となっているビットの数で、degenerate塩基と通常塩基で一致するビットの数を割った値となる(図3C)。

この方法により相同性を算出する場合、4桁の二進数は1桁の16進数で表現できる。たとえば、ATGCCATという塩基配列は、二進数で表現すると(0001), (1000), (0100), (0010), (0010), (0001), (1000)、16進数で表現すると、1842218という数値で示すことができる。この表現方法では、degenerateを含む全ての塩基配列は16進数の連続として表現可能であり、ホモロジーの算出は16進数の論理演算として表現できる。このような16進数の演算は文字列での演算に比べて、コンピュータの内部演算との親和性が高いため、高速になることが知られている。本研究では、このような計算プログラムの採用により、degenerate塩基のホモロジーを多数の鋳型ウイルス配列に対して検索することが可能となった。

5. 対象ウイルス塩基配列のグループ化

対象ウイルスを分類してグループ化するためには、第1にウイルス塩基配列間の相同性をBLAST2プログラムによって、全ての組み合わせについて求めた。続けて、それらの相同性を図示することにより、図上のデータを目視によってグループ化した。図示にはPajek (<http://pajek.imfm.si/doku.php>, 平成19年~20年)またはGraphViz

(<http://www.graphviz.org/About.php>, 平成20年~21年)を使用した。

平成21年度には、図示に加え、自動的分類をmcl (<http://www.micans.org/mcl/>)に補助的に利用した。

6. プライマー検証のためのウイルスゲノム断片の合成

① DNA合成用連結オリゴマー設計プログラム

設計されたプライマーの増幅効率を検討するためには、プライマーの鋳型となる種々のウイルス断片が必要となるが、実験室では入手および取り扱いが困難なウイルスも存在するため、連結するオリゴマーをアニーリングおよびPCRすることにより100~400塩基程度のDNA断片を合成した(OE-PCR法)。OE-PCR法に用いる19~60塩基のオリゴマーは、基本的にはDNA Works2プログラムに基づいて設計された(<http://mcl1.ncifcrf.gov/dnaworks/dnaworks2.html>)。本研究では、多数のゲノム断片を合成する必要があったため、OE-PCRのためのオリゴマーを設計するプログラムを、HooverとLubkowskiの方法(Hoover and Lubkowski, 2002)に従い作成した。設定されたオリゴマーは、全て依頼合成され、OE-PCR反応に用いられた。

②OE-PCR反応

OE-PCRは、3'→5' exonuclease活性を持つ耐熱性DNA polymerase (PrimeStar HS)により実施された。

すなわち、5×PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μl、1×dNTP Mixture (2.5 mM) 4 μl、2 pmolの各Oligomer、およびPrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/μl) 0.5 μlと滅

菌蒸留水を up to 50 μ l となるように混合し、[98°C 10 sec - 60°C 5 sec - 72°C 10sec] の条件で 30 サイクル反応し、一次鋳型を作成した。続けて、5 \times PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μ l、1 \times dNTP Mixture (2.5 mM) 4 μ l、20 pmol 5' 端の Oligomer、20 pmol 3' 端の Oligomer および PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ l) 0.5 μ l と滅菌蒸留水を up to 50 μ l となるように混合し、[98°C 10 sec - 60°C 5 sec - 72°C 10sec] の条件で 30 サイクル反応し、プライマー検証用鋳型を作成した。

プライマー検証用鋳型は、109~1 copy になるように純水で希釈され、degenerate プライマーの鋳型として使用された。

7. ウイルス感染実験、RNA の抽出および cDNA の合成(平成 19 年度)

1) ウイルス感染細胞の作成

平成 19 年度においては、感染モデルとして SARS コロナウイルスを使用した。SARS コロナウイルス感染細胞の作成には Vero E6 細胞と、Frankfurt 1 株として分離された SARS コロナウイルスを用いた。Vero E6 細胞は通常 75 cm² のフラスコ内で、0.2 mM/ml の L-glutamine、100U/ml のペニシリン、10 μ g/ml のストレプトマイシン、5%(v/v)の牛胎子血清(FBS)を添加した DMEM (Sigma-Aldrich)中で経代培養され、5% CO₂ 大気中に 37°C で維持された。細胞は 25 cm² フラスコにいったん分けられ、100%集密に達するまで培養された。その培養液はウイルス感染の前に、2%の FBS を含んだ DMEM に置き換えられた。その後、SARS コロナウイルス Frankfurt 1 株の感染は、感染効率(m.o.i)が 10 の細胞内で行なわれた。

2) 感染細胞からのウイルスゲノムを含んだ RNA の精製

RNA の抽出には、Isogen (Nippon gene)を用いて定法に従った。すなわち、Isogen に浸漬した細胞 200 μ l に Isogen 600 μ l を加え、ボルテックスをかけた後、12,000 rpm で 15 分遠心し、上精を採取した。上精に 500 μ l のイソプロピルアルコールを加え、13,000rpm で 10 分遠心、沈殿を 500 μ l の 75%エタノールで洗浄し、13,000rpm で 5 分間遠心した。上精を捨てた後、ペレットを完全に乾燥させ、RNase free water (DDW)30 μ l に溶出し、RNA として用いた。

3) cDNA 合成

cDNA の合成には、M-MLV Reverse Transcriptase (SIGMA-Aldrich ジャパン)および Superscript III (INVITROGEN)を用い、それぞれ 1 本鎖、2 本鎖 cDNA 合成を行った。方法は各製品の説明書に従った。すなわち、Random Primer もしくは NR9 6 μ l、10mM dNTP mix 1 μ l、RNA RNA 溶液 1 μ l、DDW 7 μ l を氷上で混合した後、70°C で 10 分間インキュベートした。その後反応物を氷上で急冷し、10 \times M-MLV Reverse Transcriptase Buffer 2 μ l、続いて 2 本鎖目の cDNA を合成するため、M-MLV Reverse Transcriptase 1 μ l、RNase Inhibitor (20 U/ μ l) 1 μ l、DDW 6 μ l を氷上で混合した。37°C で 50 分間インキュベートし、1 本鎖 cDNA を合成した。

M-MLV Reverse Transcriptase で合成した 1 本鎖 cDNA 全量 20 μ l、DDW 83.5 μ l、5 \times Second-Strand Reaction Buffer 30 μ l、10 mM dNTP mix 3 μ l、E.coli DNA Ligase (10U/ μ l) 1 μ l、E.coli DNA Polymerase I (3.5 U/ μ l) 11.5 μ l、E.coli RNase H (2 U/ μ l) 1 μ l を

混合し、16°Cで2時間インキュベートした。その後 T4 DNA Polymerase (5 U/ μ l) 2 μ l を加え、16°Cで5分間反応を続けた。反応物を氷上に置き、0.5 M EDTA 10 μ l を混合し、2本鎖 cDNA を合成した。合成終了後、フェノールおよびクロロホルム抽出により反応を停止し、続けてエタノール沈殿を行った。すなわち、合成終了後の溶液に同量のフェノールを加えた後ボルテックスをかけ、12,000rpm で20分間遠心後、水層を新たなチューブに分取した。クロロホルムについても同様の操作を施した後、溶液の1/10量の3M酢酸ナトリウムと0.1 μ lのグリコーゲン (Roche Applied Science)を加え、さらに2.5倍量の99.5%エタノールを加えて転倒混和した。室温で13,000rpm、15分間遠心後、チューブの底に核酸の沈殿を確認し、上清を完全に廃棄した。さらに70%エタノールを1ml加えた後同様の操作を行い、ペレットを風乾させ、30 μ lのDDWに溶解させた。DDWに溶解させた2本鎖cDNAをSpinClean PCR Purification Kit (M-Biotec)で精製した。

8. degenerate プライマーによる PCR

OE-PCR 反応により作成されたウイルスゲノム断片を鋳型とした degenerate プライマーによる PCR は、GoTaq Green PCR Mix (プロメガ)によって実施された。反応条件としては、タッチダウン PCR 法を用いた。すなわち、2×GoTaqMix (Mg²⁺ plus) 12.5 μ l、50 pmol の各 degenerate プライマー、OE-PCR で作成された鋳型 DNA に滅菌蒸留水を25 μ lとなるように混合し、反応溶液とした。

反応は95°C 1 min の後、[94°C 30 sec—

67°C 30 sec — 72°C 60 sec]の反応を一回おこない、続けて、[94°C 30 sec — 66°C 30 sec — 72°C 60 sec]の反応を一回行った。このように各回アニーリング温度を1°Cずつ下げつつ10サイクルの反応を実施した。続けて、[94°C 30 sec — 55°C 30 sec — 72°C 60 sec]の反応条件で20サイクルの反応をした。

9. マイクロチップゲル電気泳動

メーカーの手順書に従い、PCR 反応後の反応溶液を機器にセットし、分析した。本報告では、100~400塩基のPCR産物が分析対象となったため、分離緩衝液としてDNA-500 Separation buffer (島津)を、マーカーとしてDNA-500 marker for MultiNA(島津)を用いた。

C. 研究結果

平成19年度：

平成19年度の適用事例として、SARS コロナウイルスへの適用を検討した。SARS コロナウイルスには、多様性が知られているが、クラスター状に保存領域が存在するために、本アルゴリズムの適用例として適切であることが予想された。実際に、ゲノムを対象として設計を行ったところ、200組以上のプライマーが予測され、それらの中から、33組を適用例として検討した。

鋳型として、SARS コロナウイルス感染細胞抽出RNAから合成したcDNAを用い、RT-PCRで感染細胞のゲノムが混入している状態での増幅産物を検討したところ、33組中32組でPCR産物が予想されたサイズで認められた(図3)。

平成 20 年度：

当該年度の前年に Vieth ら(2007)が報告した旧世界アレナウイルス用プライマーが各種旧世界アレナウイルスを共通して効率良く増幅することが報告されていたため、このプライマーが設計結果に含まれるようにプログラムの変更を行った。具体的には、CoCoMo プログラムに入力するウイルスゲノムは、Vieth ら(2007)がプライマー設計に用いた、Mobara ウイルス、5 種の Mopeia ウイルス分離株、2 種の Ippy ウイルス分離株、Dandenong ウイルス (LCMV の変異株)、7 種の Lassa ウイルス分離株、6 種の LCMV 分離株および Mopeia ウイルスと Lassa ウイルスの組換え体の L-Segment 配列全長とした(表 3)。

当該年度に修正された CoCoMo アルゴリズムでは、対象配列全てに存在する GTNM モチーフは 14,573 か所に存在するが、これらのうち、整列上の位置の差が 20 塩基以内であった局在位置(motif・方向・位置)は 562 か所であった。これらのうち、flanking 配列の degeneracy が 1024 以下で、かつ 100 ~ 500 塩基の PCR 産物を生じる motif は 118 件であった。それらからプライマー候補が作出され、忌避配列の棄却と塩基配列長の調節を行った後、セルフダイマーおよびヘアピンを生じる可能性が低いと判断されたものは 86 件だった。これらのプライマーから 170 組の PCR 用プライマーペアが予想されたが、このうち 16 組についてはプライマーペア間でダイマーが形成されることが想定されたため棄却された。最終的には、80 本のプライマーによる 152 組のプライマーセットが有効な degenerate プライマーとし

て予測された(表 4)。予想されたプライマーを degeneracy の低さとサイズの小ささに応じて順位づけをしたところ、一位となった配列は、Vieth らが提唱したプライマーと一致していた。

プライマーの検証には、OE-PCR 産物を用いたが、その設計対象としては、177 塩基の比較的小さな増幅産物を生成するプライマーペアの鑄型が選ばれた。実際の合成は、23 件の塩基配列のうち、代表的ウイルス種・株を含む 8 件について実施された(表 5)。

希釈された合成フラグメントを鑄型として、旧世界アレナウイルス共通 degenerate プライマーによる PCR 反応を実施した(図 4)。Ippy ウイルスおよび LCMV Mx 株では PCR バンドは 10^5 copies でのみ確認され、Lassa, LCMV Ahmstrong, Mobala, Mopeia および Dandenong ウイルスでは 103 copies を鑄型とした場合にも薄いバンドが認められた。また、Lassa Z148 株については、 10^2 copies を鑄型とした場合でもバンドが確認された。

ペア ID1~18 の 13 種のプライマーセットについては、LCMV M1 株感染細胞から抽出されたウイルス RNA 鑄型とした RT-PCR が実施された(図 5)。ID 1, 2, 3, 13, 14, 15 および 18 番のプライマーセットについては、Expand HiFi で 30°C アニーリングを含む温度サイクル(図 5A)、Expand HiFi で単純な温度サイクル(図 5B)および GoTaq Mix(図 5C)で増幅産物が確認された。

ペア ID 9,10,16 および 17 番のプライマーセットについては、キットおよび温度サイクルによってバンドが認められたが、一部の条件ではバンドが目視されなかった。

いずれの条件でも、Vieth(2007)のプライマーは強いバンドを示した。

平成 21 年度：

平成 21 年度は、プライマー設計の対象として、既知のアレナウイルス科全ウイルスが選ばれた(表 6)。CoCoMo アルゴリズムによるプライマー設計にあたっては、L フラグメント全長に全ての二種の組合せについて blast2 プログラムにより相互の相同性を求めた。一定以上の相同性を持つ場合に二つのウイルスを「相同性あり」として線で結ぶこととし、相互に線で結ばれた「クラスター」を分析した。相同性 10%以上を線で結ぶように設定した場合は、26 種中 19 種について相同性が認められ、4 つのグループに分類された(図 5)。このうち、相互に相同性が高かった 3 種のクラスター(クラスター L4:BCNV, TAMV および WWAV, クラスター L5: MOPV, MOPLAS および MOPVAN, クラスター L6: MACV, JUNV および TCRV)についてプライマーを設計した。

続けて、それぞれの選択クラスターについて CoCoMo アルゴリズムによりプライマーの設計を実施した。続いて、各クラスターで予測されたプライマーについて、Estimate プログラムにより既知の全アレナウイルスへの適用性を検討した。degenerate プライマーの相同性からは、3 種のプライマーペア(表 6)が広い範囲のウイルスをカバーしており、アレナウイルスの全種についてプライマーペアのいずれかが対応するというプライマーペアの最少セットを形成することが示された(表 7)。

続いて、各プライマーペアによるウイルスゲノムの増幅を検討した。対象ウイルス

が広範囲にわたるため、ウイルス RNA の入手と実際の増幅試験は、人工遺伝子断片を鋳型として実施した(人工遺伝子合成のためのオリゴマー一覧は省略)。PCR 試験に用いる人工遺伝子断片を合成したところ、第 2 段階の PCR で単一のバンドが得られた(結果は示さず)。これらの人工遺伝子をコピー数 $10^9 \sim 100$ となるように希釈し、アレナウイルス科カバー用プライマーにより PCR を実施した(図 6)。その結果、 10^9 コピーおよび 10^5 コピーの鋳型について、それぞれ 30 種中 26 種および 30 種中 18 種のウイルスで PCR が確認された。

D. 考察

平成 19 年度には、CoCoMo アルゴリズムによって SARS コロナウイルス、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 social network 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→⑤選定されたオリゴマーの 5' 領域 15 塩基の選択と共通 degenerated 配列の決定、という処理順序で degenerated プライマーを設計することができた。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た。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 primer

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。

SARS コロナウイルス感染細胞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。PCRの結果、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(図 2)。この結果から CoCoMo アルゴリズムは実際のウイルスに対しても有効であるということが示唆された。

平成 20 年度には、前年度に開発した CoCoMo アルゴリズムを発展させ、相同性の比較的低いウイルスグループにも適用可能なプログラムを開発した。プログラムの新興・再興感染症への適用の可能性を検討するために、23 件の旧世界アレナウイルス分離株について共通プライマーを設計した。前年度の方法では、6 塩基 motif について配列および位置が一致ものを探索するが、旧世界アレナウイルス間では配列とおよその位置が一致する motif は見いだされずプライマーは設計されなかったのに対し(結果示さず)、修正 CoCoMo アルゴリズムは、旧世界アレナウイルスで 43 件のプライマーが設計された。

アレナウイルスは、旧世界アレナウイルスと新世界アレナウイルスに分けられるが、いずれのウイルス群も塩基配列の多様性が大きく、プライマーの設計は難しいといわれている。このうち、旧世界アレナウイルスについて前年度の CoCoMo アルゴリズムを用いてプライマー設計を試みたところ、有効なプライマーは設計されなかった。平成 20 年度において、原因を検討した結果、塩基配列がアライメントの同一位置で、4

塩基以上保存されているモチーフは皆無であることが示唆された。一方、ウイルス抗原蛋白質のアミノ酸配列については、保存されたモチーフが存在していた。このことから、アレナウイルス内である程度保存されているアミノ酸配列を、効率よくプライマー設計につなげることが必要であるとの示唆を得た。この検討に基づき、アミノ酸配列を基にプライマーを設計するプログラムを作成したが、計算工程が複雑になり、計算時間が増大したにも関わらず、十分有効なプライマー設計はなされなかった。そのため、塩基配列 motif 探索とアミノ酸配列相同性の長所を両方生かす検索方法を検討し、コドンとの同調が可能な 1 塩基のギャップを含む 4 塩基のモチーフ(GTNM)が、有効であることが示された。

平成 20 年度に改善されたプログラムは、前年度に比べて、多様性の高いウイルス群に対する設計効率が高かった。この効率の高さは、ウイルス間共通の GTNM が多数存在することと関係していると考えられた。本年度用いた 2 塩基一致の後 1 塩基は相異を許容するという探索方法は、コドンの縮重のパターンと一致しており、アミノ酸コードの変化を伴わないサイレントな変異の影響を受容するデザインとなっているため、アミノ酸配列が一致する蛋白質レベルでの保存領域で、多くプライマー設計用のモチーフが検出されたものと考えられる。

平成 20 年度には、モチーフ選定過程にホモロジーに基づくアライメント(整列)過程を導入した。プログラムとしては、精度と計算時間の短さから MAFFT プログラムが選定された。このプログラムの導入により、多数の GTNM 一致点から、ウイルス塩基配

列上の相同領域を選択することが可能となった。プログラム中での仮想 PCR を実施することにより、プライマーとして有効な配列が効率良く選択された。

検出試験では、旧世界アレナウイルス全般について増幅が確認された。また、複数のプライマーについての RT-PCR 試験については効率の良い PCR 反応が示された。アミノ酸配列の一部が保存される現象は、各種ウイルス群で知られているため、本プログラムは、多種のウイルス群に適用可能であることが期待された。

ウイルス自体の入手には困難な場合もあったため、人工的な DNA 合成技術 (OE-PCR) が用いられた。塩基配列情報からのゲノム断片の合成が自由に行えるようになったため、設計されたプライマーは全て PCR により検証された。13 組のプライマーペアについては、ウイルス RNA を用いた RT-PCR でも PCR が確認された。この試験では、設計対象に含まれないウイルス株を効率よく検出できたことから、新興ウイルスの検出技術としての有望性が示された。

平成 21 年度では、前年度に開発した CoCoMo プライマー設計アルゴリズムを活用し、設計された多数のプライマーについて適用範囲を拡大するプログラム群を整備した。平成 20 年度に開発された CoCoMo アルゴリズムには、設計時の適用範囲を 10 種以上のウイルスに拡大すると、計算時間が級数的に延長し、さらに、相同性の低い配列の混入によりプライマーの予測が得られなくなるという問題があった。そこで、当該年度には、PCR 対象範囲を拡大するために、プライマー設計のための高速検索ステップを追加し、CoCoMo アルゴリズムで

プライマーを予測した後、プライマー適用ウイルスを探索するという方法が取られた。この第二の高速探索アルゴリズムの導入により、CoCoMo アルゴリズムで予測したプライマーから、共通性の広いプライマーペアを選択することが可能となった。

プログラム設計上、degenerate プライマーの相同性分析には、元々長い計算時間を要したため、独自の二進数演算化によって相同性探索を高速化された。この高速化によって探索効率が増大したため、CoCoMo アルゴリズムによるプライマー設計の際に、設計対象ウイルスを限定して多数の予測プライマーを算出するという選択肢がとられた。予備的に、①CoCoMo アルゴリズムで多数のウイルスを対象にして少数のプライマーセットを得て Estimate プログラムで適用ウイルスを探索する方法と②CoCoMo アルゴリズムで少数のウイルスを対象にして多数のプライマーセットを得た後 Estimate プログラムで適用ウイルスを探索する方法を予備的に試したところ、アレナウイルスでは、CoCoMo アルゴリズムでウイルス種を限定した場合の方が結果として多数の共通ウイルスが Estimate プログラムで予測された。

CoCoMo アルゴリズムで少数のウイルスを対象にして多数のプライマーセットを得た後 Estimate プログラムで適用ウイルスを探索する方法を活用するために、次に、少数の CoCoMo アルゴリズム対象ウイルスの設定方法を決定する必要がある。比較的低い相同性に基いてウイルスの関係を探索する方法としては、ネットワーク図の構築が有効であることが、平成 19 年度および平成 20 年度の本研究でも示された。今年度

は、ネットワーク図の分析効率を高めるために、図示に Graphviz を、計算上のグループ分けに mcl を使用した。これらのプログラムをウイルス間の相同性に適用させて関係を図示することにより、プライマー設計のためのグループをクラスターとして予測することが可能となった。結果として、mcl は常に図で示されたものと同じグループを予測した。

平成 21 年度の方法では、アレナウイルス科の 26 ウイルス種の配列を元にプライマー設計を試みたところ、一部重複しながらもアレナウイルス全体をカバーするプライマーペアのセットを開発できた。このことは、新興ウイルスに対する対策として、CoCoMo アルゴリズムと degenerate プライマーの高速検索プログラムを連携した方法の有効性を示唆するものと結論された。

E. 結論

平成 19 年度～20 年度において、報告者らは、新興ウイルスが出現した場合の迅速なウイルス同定のための方法として、ウイルス間での共通性の高い degenerate プライマーの設計方法を開発し、ウイルス属レベルでの実用的なプライマー設計が可能であることを示した。最終年度には、CoCoMo アルゴリズムにより設計された多数のプライマー候補について、ウイルス科内の他種ウイルスへの適用可能性を、高速に検討するプログラムを追加して開発した。それらのプログラムを連結して利用することにより、アレナウイルス科の既知の全ウイルスについて、広い種の範囲でウイルスを増幅するプライマーペアが設計された。続いて、全アレナウイルスを増幅する最少のプライマ

ーペアを探索したところ、3 組のプライマーペアによって全アレナウイルスをカバーすることが可能であることが示された。これらのプライマーを用い、人工合成されたウイルスゲノム断片を鋳型とした PCR 反応で増幅試験を実施したところ、109 コピーおよび 105 コピーの鋳型についてそれぞれ 30 種中 26 種および 30 種中 18 種のウイルスで PCR が確認された。検出感度については問題が残されたが、本方法は新興ウイルスを含む多様なウイルス検出対策としての有効性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Daiji Endoh, Tetsuya Mizutani, Shigeru Morikawa, Isao Hamaguchi, Koji Sakai, Kazuya Takizawa, Yuuichi Osa, Mitsuhiko Asakawa, Yasuhiro Kon and Masanobu Hayashi, CoCoMo-primers: a web server to design degenerate primers for virus research, *Nucleic Acid Research* 誌投稿中
- 2) Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi N, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, Mizutani T. Isolation of novel adenovirus from fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). *Emerg Infect Dis.* 2008 ; 14 (2) :347-9.
- 3) Kihara Y, Satho T, Eshita Y, Sakai K, Kotaki A, Takasaki T, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Lapcharoen P, Sumroiphon S, Iwanaga S, Ushijima H, Endoh D, Miyata T, Sakata A, Kashige N,

- Miake F, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T. Rapid determination of viral RNA sequences in mosquitoes collected in the field. *J Virol Methods*. 2007 Dec;146(1-2):372-4.
- 4) Sakai K, Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Endoh D, Kurane I, Takehara K, Morikawa S. An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences of avian RNA viruses. *Arch Virol*. 2007;152(9):1763-5.
- 5) Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Lim CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, Nishimura H. Rapid genome sequencing of RNA viruses. *Emerg Infect Dis*. 2007 Feb;13(2):322-4.
- 6) Mizutani T, Fukushi S, Kenri T, Sasaki Y, Ishii K, Endoh D, Zamoto A, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. *Arch Virol*. 2007; 152(5):1019-25.

学会発表

- 1) 遠藤大二 「共通オリゴマー分析に基づく多種ウイルス共通プライマーの設計」 日本獣医学会学術集会、2009年4月、栃木

H. 知的財産権の出願・登録状況

著作権を設定し、公表予定のプログラムコード：省略
インターネット上で利用可能なプログラム公開サイト：

表1 塩基配列のコードと degeneracy および degeneracy 指数

コード	意味	コードの由来	degeneracy	degeneracy 指数
G	G	Guanine	1	0
A	A	Adenine	1	0
T	T	Thymine	1	0
C	C	Cytosine	1	0
R	G or A	puRine	2	1
Y	T or C	pYrimidine	2	1
M	A or C	aMino	2	1
K	G or T	Keto	2	1
S	G or C	Strong interaction (3 H bonds)	2	1
W	A or T	Weak interaction (2 H bonds)	2	1
H	A or C or T	not-G, H follows G in the alphabet	3	1.58
B	G or T or C	not-A, B follows A	3	1.58
V	G or C or A	not-T (not-U), V follows U	3	1.58
D	G or A or T	not-C, D follows C	3	1.58
N	G or A or T or C	aNy	4	2

表2 SARS コロナウイルスへの適用実験に用いたプライマー

レーン	primer (Forward/Reverse)		増幅産物 サイズ(bp)
	番号	配列	
1	160	5'-TCRAGAAATTCAACTCCTGGCAGCA-3'	150
	156	5'-AGGCTTTTTAGATGCCTCAGCAGCA-3'	
2	161	5'-AYAARGTGACWCTYGTGTGATGCTGG-3'	550
	157	5'-TRGCAGAAGCYCTGATTCAGCAGC-3'	
3	168	5'-GAACTTAGATTCCCTCGAGGCCAGG-3'	390
	169	5'-GAGAATTTCCCCTACTGCTGCCAGG-3'	
4	168	5'-GAACTTAGATTCCCTCGAGGCCAGG-3'	390
	167	5'-GAATTTCCCCTACTGCTGCCAGGAG-3'	
5	164	5'-AGAGCTACCCGACGAGTTCGTGGTG-3'	310
	167	5'-GAATTTCCCCTACTGCTGCCAGGAG-3'	
6	162	5'-AGCTACCCGACGAGTTCGTGGTGGT-3'	310
	167	5'-GAATTTCCCCTACTGCTGCCAGGAG-3'	
7	163	5'-TAGATTCCTCGAGGCCAGGGCGTT-3'	380
	167	5'-GAATTTCCCCTACTGCTGCCAGGAG-3'	
8	166	5'-GACGAGTTCGTGGTGGTGACGGCAA-3'	230
	170	5'-GAGAAGAGGCTTGACTGCCGCCTCT-3'	
9	168	5'-GAACTTAGATTCCCTCGAGGCCAGG-3'	320
	170	5'-GAGAAGAGGCTTGACTGCCGCCTCT-3'	
10	166	5'-GACGAGTTCGTGGTGGTGACGGCAA-3'	300
	167	5'-GAATTTCCCCTACTGCTGCCAGGAG-3'	
11	164	5'-AGAGCTACCCGACGAGTTCGTGGTG-3'	310
	169	5'-GAGAATTTCCCCTACTGCTGCCAGG-3'	
12	162	5'-AGCTACCCGACGAGTTCGTGGTGGT-3'	310
	169	5'-GAGAATTTCCCCTACTGCTGCCAGG-3'	
13	163	5'-TAGATTCCTCGAGGCCAGGGCGTT-3'	380
	169	5'-GAGAATTTCCCCTACTGCTGCCAGG-3'	
14	166	5'-GACGAGTTCGTGGTGGTGACGGCAA-3'	300
	165	5'-AGAATTTCCCCTACTGCTGCCAGGA-3'	
15	168	5'-GAACTTAGATTCCCTCGAGGCCAGG-3'	390
	165	5'-AGAATTTCCCCTACTGCTGCCAGGA-3'	
16	164	5'-AGAGCTACCCGACGAGTTCGTGGTG-3'	310
	165	5'-AGAATTTCCCCTACTGCTGCCAGGA-3'	
17	162	5'-AGCTACCCGACGAGTTCGTGGTGGT-3'	310
	165	5'-AGAATTTCCCCTACTGCTGCCAGGA-3'	
18	163	5'-TAGATTCCTCGAGGCCAGGGCGTT-3'	380
	165	5'-AGAATTTCCCCTACTGCTGCCAGGA-3'	
19	166	5'-GACGAGTTCGTGGTGGTGACGGCAA-3'	300
	169	5'-GAGAATTTCCCCTACTGCTGCCAGG-3'	
20	164	5'-AGAGCTACCCGACGAGTTCGTGGTG-3'	240
	170	5'-GAGAAGAGGCTTGACTGCCGCCTCT-3'	
21	162	5'-AGCTACCCGACGAGTTCGTGGTGGT-3'	240
	170	5'-GAGAAGAGGCTTGACTGCCGCCTCT-3'	

22	166 156	5'-GACGAGTTCGTGGTGGTGACGGCAA-3' 5'-AGGCTTTTTAGATGCCTCAGCAGCA-3'	450
23	163 170	5'-TAGATTCCTCGAGGCCAGGGCGTT-3' 5'-GAGAAGAGGCTTGACTGCCGCCTCT-3'	320
24	189 191	5'-TGAGTTTGACCGTGATGCTGCCATG-3' 5'-TCTGGTGTTACAGTRATTGCCTGTC-3'	930
25	192 192	5'-AATTATTRAAGTCAATAGCCGCCAC-3' 5'-GGTTTMACATATAGTGAGCCGCCAC-3'	260
26	192 193	5'-AATTATTRAAGTCAATAGCCGCCAC-3' 5'-GGTTTMACATATAGTGAGCCGCCAC-3'	260
27	196 156	5'-GCAGARGGRAGCAGAGGCGGCAGTC-3' 5'-AGGCTTTTTAGATGCCTCAGCAGCA-3'	210
28	194 156	5'-CGCAGARGGRAGCAGAGGCGGCAGT-3' 5'-AGGCTTTTTAGATGCCTCAGCAGCA-3'	210
29	188 195	5'-YAACTGGGAGTWCTCGTGCCACA-3' 5'-YTAGTCCTACCTCCCTTGC GGAGTC-3'	860
30	190 195	5'-AYA AACTGGGAGTWCTCGTGCCAC-3' 5'-YTAGTCCTACCTCCCTTGC GGAGTC-3'	860
31	178 187	5'-AYACWACYAGCTATCGTGAAGCAGC-3' 5'-CCTRTCACCATRATAACAGCAGCA-3'	730
32	198 197	5'-GAAGAGAGGTGTYTACTGCTGCCGT-3' 5'-AAATTGATCTRATAACACCAGCAGC-3'	930
33	198 195	5'-GAAGAGAGGTGTYTACTGCTGCCGT-3' 5'-YTAGTCCTACCTCCCTTGC GGAGTC-3'	490

表 3 旧世界アレナウイルス共通プライマー設計対象塩基配列

Accession	ウイルス種	遺伝子名	塩基長
NC_006574	Mopeia virus AN20410	polymerase RDRP	6714
NC_006572	Mopeia Lassa reassortant 29	polymerase RDRP	6714
NC_004297	Lassa virus	L protein	6657
NC_004291	Lymphocytic choriomeningitis virus	L protein	6633
NC_007904	Mobala virus	L protein	6663
NC_007906	Ippy virus	L protein	6627
DQ328878	Ippy virus	L protein	6627
DQ328876	Mobala virus	L protein	6663
DQ328875	Mopeia virus	L protein	6690
EU195889	Lymphocytic choriomeningitis virus	L protein	6630
EU480453	Lymphocytic choriomeningitis virus	L protein	6630
EU480451	Lymphocytic choriomeningitis virus	L protein	6630
EU136039	Dandenong virus	RNA-dependent RNA polymerase	6630
DQ286932	Lymphocytic choriomeningitis virus	L protein	6630
DQ361066	Lymphocytic choriomeningitis virus	L protein	6633
AY772167	Mopeia Lassa reassortant 29	polymerase RDRP	6714
AY772169	Mopeia virus AN20410	polymerase RDRP	6714
AY628204	Lassa virus	L protein	6660
AY628202	Lassa virus	L protein	6663
AY628200	Lassa virus	L protein	6660
AY179174	Lassa virus	polymerase	6654
AY179172	Lassa virus	polymerase	6663
AY179171	Lassa virus	polymerase	6663

表 4 CoCoMo アルゴリズムによって予測された旧世界アレナウイルス共通プライマーセット

Primer Pair ID	Primer ID (Forward)	塩基配列(Forward)	平均位置 (Forward)	Primer ID (Reverse)	塩基配列 (Reverse)	平均位置 (Reverse)	予想サイズ	プライマーの degeneracy 指数 ¹
1	46	GRATHAGYGARAGRGARAGYAAATC	3207.43	84	GNCCCCAYTTRCTRTGRTC	3588.43	381	16
2	50	HAGYGARAGRGARAGYAAATCDGA	3210.43	84	GNCCCCAYTTRCTRTGRTC	3588.43	378	17
3	82	GDGAYYTDAGRACVAARATGTTYAC	3411.43	84	GNCCCCAYTTRCTRTGRTC	3588.43	177	18
9	111	CHTWYACHTCHAGTGATGAYCARAT	3979.61	129	YTGRTGNGGTYCYTTRCAYTT	4243.61	264	19
10	111	CHTWYACHTCHAGTGATGAYCARAT	3979.61	130	ARYTGRGTGNGGTYCYTTRCA	4246.61	267	19
11	91	AYCAYAGYAARTGGGGNCC	3567.43	105	SCRTARAARTCHGAHGYRTTDTG	3910.61	343.174	19
12	93	HTSGAYCAYAGYAARTGGGG	3564.43	105	SCRTARAARTCHGAHGYRTTDTG	3910.61	346.174	19
13	47	YNAGRATHAGYGARAGRGARAGYAA	3204.43	84	GNCCCCAYTTRCTRTGRTC	3588.43	384	19
14	46	GRATHAGYGARAGRGARAGYAAATC	3207.43	92	ADGGRSWCATCATDGGNCC	3603.43	396	19
15	46	GRATHAGYGARAGRGARAGYAAATC	3207.43	56	CTRTTNCNCCHACYTYTC	3393.43	186	20
16	46	GRATHAGYGARAGRGARAGYAAATC	3207.43	58	TCYCTRTTNCNCCHACYTYG	3396.43	189	20
17	46	GRATHAGYGARAGRGARAGYAAATC	3207.43	70	ACATYTTBGTYCTHARRTCHCCWAT	3423.43	216	20
18	46	GRATHAGYGARAGRGARAGYAAATC	3207.43	80	TRAACATYTTBGTYCTHARRTCHCC	3426.43	219	20
19	104	GGGDCARGGDATHYTRCAHAA	3874.61	129	YTGRTGNGGTYCYTTRCAYTT	4243.61	369	20
20	104	GGGDCARGGDATHYTRCAHAA	3874.61	130	ARYTGRGTGNGGTYCYTTRCA	4246.61	372	20
21	50	HAGYGARAGRGARAGYAAATCDGA	3210.43	92	ADGGRSWCATCATDGGNCC	3603.43	393	20
22	132	NAARTGYAARGARCCNCAYCA	4222.61	136	TYTGHGCHCCYCKWGTRAA	4792.61	570	20
23	115	AYAARTTYRTNAGYCCHAARAGYGT	4102.61	129	YTGRTGNGGTYCYTTRCAYTT	4243.61	141	21
24	115	AYAARTTYRTNAGYCCHAARAGYGT	4102.61	130	ARYTGRGTGNGGTYCYTTRCA	4246.61	144	21
25	46	GRATHAGYGARAGRGARAGYAAATC	3207.43	55	RTTNCNCCHACYTYCYTT	3390.43	183	21
26	50	HAGYGARAGRGARAGYAAATCDGA	3210.43	56	CTRTTNCNCCHACYTYCYTC	3393.43	183	21
27	50	HAGYGARAGRGARAGYAAATCDGA	3210.43	58	TCYCTRTTNCNCCHACYTYG	3396.43	186	21
28	75	TNTAYATWGGDGAAYTDAGRACVAA	3402.43	84	GNCCCCAYTTRCTRTGRTC	3588.43	186	21
29	76	ARYTNTAYATWGGDGAAYTDAGRAC	3399.43	84	GNCCCCAYTTRCTRTGRTC	3588.43	189	21
30	82	GDGAYYTDAGRACVAARATGTTYAC	3411.43	92	ADGGRSWCATCATDGGNCC	3603.43	192	21
31	72	GNAAYAGRGARTYNTAYATWGGDGA	3390.43	84	GNCCCCAYTTRCTRTGRTC	3588.43	198	21
32	50	HAGYGARAGRGARAGYAAATCDGA	3210.43	70	ACATYTTBGTYCTHARRTCHCCWAT	3423.43	213	21
33	50	HAGYGARAGRGARAGYAAATCDGA	3210.43	80	TRAACATYTTBGTYCTHARRTCHCC	3426.43	216	21
34	59	CARGTDGGNGGNAAYAGRGA	3375.43	92	ADGGRSWCATCATDGGNCC	3603.43	228	21
35	62	AARGARCARGTDGGNGGNA	3369.43	92	ADGGRSWCATCATDGGNCC	3603.43	234	21
36	63	CHTAYAARGARCARGTDGGNGG	3366.43	92	ADGGRSWCATCATDGGNCC	3603.43	237	21
37	6	YTCHTTYTAGCNGAYCCDAA	1711.09	22	GGYTCMADRWAYTTYTCRAARCA	2185.09	474	21
38	134	AAVRTNAARTGYAARGARCCNCA	4219.61	136	TYTGHGCHCCYCKWGTRAA	4792.61	573	21
39	50	HAGYGARAGRGARAGYAAATCDGA	3210.43	55	RTTNCNCCHACYTYCYTT	3390.43	180	22
40	69	GNGGNAAYAGRGARTYNTAYATWGG	3387.43	84	GNCCCCAYTTRCTRTGRTC	3588.43	201	22
41	46	GRATHAGYGARAGRGARAGYAAATC	3207.43	60	RRTCHCCWATRTANARYTCYCTRTT	3408.43	201	22
42	57	RGARCARGTDGGNGGNAAYAG	3372.43	92	ADGGRSWCATCATDGGNCC	3603.43	231	22
43	64	CHYTRTCHTAYAARGARCARGTDGG	3363.43	92	ADGGRSWCATCATDGGNCC	3603.43	240	22
44	91	AYCAYAGYAARTGGGGNCC	3567.43	106	YVAKDSMRTARTTDATRAAYCTYTC	3943.61	376.174	22
45	93	HTSGAYCAYAGYAARTGGGG	3564.43	106	YVAKDSMRTARTTDATRAAYCTYTC	3943.61	379.174	22
46	47	YNAGRATHAGYGARAGRGARAGYAA	3204.43	92	ADGGRSWCATCATDGGNCC	3603.43	399	22
47	46	GRATHAGYGARAGRGARAGYAAATC	3207.43	96	RAAHARRWADGGRSWCATCATDGG	3606.43	399	22
48	6	YTCHTTYTAGCNGAYCCDAA	1711.09	26	GYTCMADRWAYTTYTCRAARCA	2182.09	471	22
49	135	TNCAYAARTNAARTGYAARGARCC	4216.61	136	TYTGHGCHCCYCKWGTRAA	4792.61	576	22
50	116	HVVTTYGYHGCWGARTTYAARTC	4132.61	129	YTGRTGNGGTYCYTTRCAYTT	4243.61	111	23
51	116	HVVTTYGYHGCWGARTTYAARTC	4132.61	130	ARYTGRGTGNGGTYCYTTRCA	4246.61	114	23
52	47	YNAGRATHAGYGARAGRGARAGYAA	3204.43	56	CTRTTNCNCCHACYTYCYTC	3393.43	189	23
53	47	YNAGRATHAGYGARAGRGARAGYAA	3204.43	58	TCYCTRTTNCNCCHACYTYG	3396.43	192	23
54	50	HAGYGARAGRGARAGYAAATCDGA	3210.43	60	RRTCHCCWATRTANARYTCYCTRTT	3408.43	198	23
55	46	GRATHAGYGARAGRGARAGYAAATC	3207.43	66	CHCCWATRTANARYTCYCTRTTNC	3405.43	198	23
56	46	GRATHAGYGARAGRGARAGYAAATC	3207.43	73	THARRTCHCCWATRTANARYTCYCT	3411.43	204	23
57	47	YNAGRATHAGYGARAGRGARAGYAA	3204.43	70	ACATYTTBGTYCTHARRTCHCCWAT	3423.43	219	23
58	47	YNAGRATHAGYGARAGRGARAGYAA	3204.43	80	TRAACATYTTBGTYCTHARRTCHCC	3426.43	222	23
59	46	GRATHAGYGARAGRGARAGYAAATC	3207.43	79	NARBCKDGRAACATYTTBGTYCT	3435.43	228	23
60	111	CHTWYACHTCHAGTGATGAYCARAT	3979.61	131	NGGYTCYTTTRCAYTTNAYRTTRTG	4234.61	255	23
61	113	ANDCHTWYACHTCHAGTGATGAYCA	3976.61	129	YTGRTGNGGTYCYTTRCAYTT	4243.61	267	23
62	113	ANDCHTWYACHTCHAGTGATGAYCA	3976.61	130	ARYTGRGTGNGGTYCYTTRCA	4246.61	270	23
63	50	HAGYGARAGRGARAGYAAATCDGA	3210.43	96	RAAHARRWADGGRSWCATCATDGG	3606.43	396	23
64	6	YTCHTTYTAGCNGAYCCDAA	1711.09	16	WGTBARYCTRTCWGGNGTYTC	2149.09	438	23
65	6	YTCHTTYTAGCNGAYCCDAA	1711.09	14	KCWGTBARYCTRTCWGGNGTYTC	2152.09	441	23
66	6	YTCHTTYTAGCNGAYCCDAA	1711.09	13	GRKOWGTBARYCTRTCWGGNGT	2155.09	444	23
67	6	YTCHTTYTAGCNGAYCCDAA	1711.09	15	DATYTGKOWGTBARYCTRTCWGG	2158.09	447	23
68	6	YTCHTTYTAGCNGAYCCDAA	1711.09	10	AYTTDATYTGKOWGTBARYCTRTC	2161.09	450	23
69	6	YTCHTTYTAGCNGAYCCDAA	1711.09	17	DRWAYTTYTCRAARCAITTDATYTG	2176.09	465	23
70	82	GDGAYYTDAGRACVAARATGTTYAC	3411.43	105	SCRTARAARTCHGAHGYRTTDTG	3910.61	499.174	23
71	59	CARGTDGGNGGNAAYAGRGA	3375.43	105	SCRTARAARTCHGAHGYRTTDTG	3910.61	535.174	23
72	62	AARGARCARGTDGGNGGNA	3369.43	105	SCRTARAARTCHGAHGYRTTDTG	3910.61	541.174	23
73	63	CHTAYAARGARCARGTDGGNGG	3366.43	105	SCRTARAARTCHGAHGYRTTDTG	3910.61	544.174	23
74	138	ARRACHYTRGGNAGYARRTYGT	4864.61	139	RTARTGYTCNTCYCKYTTCCAYTT	5424.96	560.348	23

75	138	ARRACHYTRGGNAGYARRTGYGT	4864.61	143	YRTARTGYTONTCYCKYTTCCA	5427.96	563.348	23
76	47	YNAGRATHAGYGARAGRAGARAGYAA	3204.43	55	RTTNCCNCHACACTYCYCTYTT	3390.43	186	24
77	50	HAGYGARAGRAGARAGYAAAYTCDGA	3210.43	66	CHCCWATRTANARYTCYCTRTTNCC	3405.43	195	24
78	82	GDGAYYTDAGRACVAARATGTTYAC	3411.43	96	RAAHARRWADGGRSWCATCATDGG	3606.43	195	24
79	50	HAGYGARAGRAGARAGYAAAYTCDGA	3210.43	73	THARRTCHCCWATRTANARYTCYCT	3411.43	201	24
80	75	TNTAYATWGGDGAYYTDAGRACVAA	3402.43	92	ADGGRSWCATCATDGGNCC	3603.43	201	24
81	76	ARYTNTAYATWGGDGAYYTDAGRAC	3399.43	92	ADGGRSWCATCATDGGNCC	3603.43	204	24
82	72	GNAAYAGRGARYTNTAYATWGGDGA	3390.43	92	ADGGRSWCATCATDGGNCC	3603.43	213	24
83	50	HAGYGARAGRAGARAGYAAAYTCDGA	3210.43	79	NARBCKDGTAAACATYTTBGTYCT	3435.43	225	24
84	59	CARGTDGGNGGNAAYAGRGA	3375.43	96	RAAHARRWADGGRSWCATCATDGG	3606.43	231	24
85	62	AARGARCARGTDGGNGGNAAY	3369.43	96	RAAHARRWADGGRSWCATCATDGG	3606.43	237	24
86	63	CHTAYAARGARCARGTDGGNGG	3366.43	96	RAAHARRWADGGRSWCATCATDGG	3606.43	240	24
87	104	GGDCARGGDATHYTRCAHAA	3874.61	131	NGGYTCYTTTRCAYTTNAYRTTRTG	4234.61	360	24
88	46	GRATHAGYGARAGRAGARAGYAAAYTC	3207.43	97	YBARRAAHARRWADGGRSWCATCA	3610.43	403	24
89	57	RGARCARGTDGGNGGNAAYAG	3372.43	105	SCRTARAARTCHGAHGYRTTDTG	3910.61	538.174	24
90	64	CHYTRTCHTAYAARGARCARGTDGG	3363.43	105	SCRTARAARTCHGAHGYRTTDTG	3910.61	547.174	24
91	115	AYAARTTYRTNAGYCCHAARAGYGT	4102.61	131	NGGYTCYTTTRCAYTTNAYRTTRTG	4234.61	132	25
92	47	YNAGRATHAGYGARAGRAGARAGYAA	3204.43	60	RRTCHCCWATRTANARYTCYCTRTT	3408.43	204	25
93	69	GNGGNAAYAGRGARYTNTAYATWGG	3387.43	92	ADGGRSWCATCATDGGNCC	3603.43	216	25
94	57	RGARCARGTDGGNGGNAAYAG	3372.43	96	RAAHARRWADGGRSWCATCATDGG	3606.43	234	25
95	64	CHYTRTCHTAYAARGARCARGTDGG	3363.43	96	RAAHARRWADGGRSWCATCATDGG	3606.43	243	25
96	27	WGMYCARATHAARTGYTTYGARAA	2155.09	39	TNAYVACHACACTYTYVTTTRCTDGC	2476.48	321.391	25
97	18	CCWGAYAGRYTVACWGMYCARAT	2140.09	39	TNAYVACHACACTYTYVTTTRCTDGC	2476.48	336.391	25
98	50	HAGYGARAGRAGARAGYAAAYTCDGA	3210.43	97	YBARRAAHARRWADGGRSWCATCA	3610.43	400	25
99	47	YNAGRATHAGYGARAGRAGARAGYAA	3204.43	96	RAAHARRWADGGRSWCATCATDGG	3606.43	402	25
100	6	YTCHTTTTAYGCGNGAYCCDAA	1711.09	7	RYCTRTRCWGGNGTYTYCTTNGTDAT	2143.09	432	25
101	6	YTCHTTTTAYGCGNGAYCCDAA	1711.09	9	BARYCTRTRCWGGNGTYTYCTTNGT	2146.09	435	25
102	82	GDGAYYTDAGRACVAARATGTTYAC	3411.43	97	YBARRAAHARRWADGGRSWCATCA	3610.43	199	26
103	47	YNAGRATHAGYGARAGRAGARAGYAA	3204.43	66	CHCCWATRTANARYTCYCTRTTNCC	3405.43	201	26
104	47	YNAGRATHAGYGARAGRAGARAGYAA	3204.43	73	THARRTCHCCWATRTANARYTCYCT	3411.43	207	26
105	47	YNAGRATHAGYGARAGRAGARAGYAA	3204.43	79	NARBCKDGTAAACATYTTBGTYCT	3435.43	231	26
106	59	CARGTDGGNGGNAAYAGRGA	3375.43	97	YBARRAAHARRWADGGRSWCATCA	3610.43	235	26
107	62	AARGARCARGTDGGNGGNAAY	3369.43	97	YBARRAAHARRWADGGRSWCATCA	3610.43	241	26
108	63	CHTAYAARGARCARGTDGGNGG	3366.43	97	YBARRAAHARRWADGGRSWCATCA	3610.43	244	26
109	34	RTGYTTYGARAARTWYHTKGARCC	2167.09	39	TNAYVACHACACTYTYVTTTRCTDGC	2476.48	309.391	26
110	30	VACWGMYCARATHAARTGYTTYGA	2152.09	39	TNAYVACHACACTYTYVTTTRCTDGC	2476.48	324.391	26
111	6	YTCHTTTTAYGCGNGAYCCDAA	1711.09	8	NGTYTCYTTNGTDATNAAARTGRCA	2134.09	423	26
112	75	TNTAYATWGGDGAYYTDAGRACVAA	3402.43	105	SCRTARAARTCHGAHGYRTTDTG	3910.61	508.174	26
113	76	ARYTNTAYATWGGDGAYYTDAGRAC	3399.43	105	SCRTARAARTCHGAHGYRTTDTG	3910.61	511.174	26
114	72	GNAAYAGRGARYTNTAYATWGGDGA	3390.43	105	SCRTARAARTCHGAHGYRTTDTG	3910.61	520.174	26
115	82	GDGAYYTDAGRACVAARATGTTYAC	3411.43	106	YVAKDSMRTARTTDATRAAYCTYTC	3943.61	532.174	26
116	138	ARRACHYTRGGNAGYARRTGYGT	4864.61	140	CKYTTCCAYTTNAYHAYRTGDGA	5412.96	548.348	26
117	59	CARGTDGGNGGNAAYAGRGA	3375.43	106	YVAKDSMRTARTTDATRAAYCTYTC	3943.61	568.174	26
118	62	AARGARCARGTDGGNGGNAAY	3369.43	106	YVAKDSMRTARTTDATRAAYCTYTC	3943.61	574.174	26
119	63	CHTAYAARGARCARGTDGGNGG	3366.43	106	YVAKDSMRTARTTDATRAAYCTYTC	3943.61	577.174	26
120	116	HVVTTYGYHGCWGARTTYAARTC	4132.61	131	NGGYTCYTTTRCAYTTNAYRTTRTG	4234.61	102	27
121	75	TNTAYATWGGDGAYYTDAGRACVAA	3402.43	96	RAAHARRWADGGRSWCATCATDGG	3606.43	204	27
122	76	ARYTNTAYATWGGDGAYYTDAGRAC	3399.43	96	RAAHARRWADGGRSWCATCATDGG	3606.43	207	27
123	72	GNAAYAGRGARYTNTAYATWGGDGA	3390.43	96	RAAHARRWADGGRSWCATCATDGG	3606.43	216	27
124	57	RGARCARGTDGGNGGNAAYAG	3372.43	97	YBARRAAHARRWADGGRSWCATCA	3610.43	238	27
125	64	CHYTRTCHTAYAARGARCARGTDGG	3363.43	97	YBARRAAHARRWADGGRSWCATCA	3610.43	247	27
126	113	ANDCHTWYACHTCHAGTGATGAYCA	3976.61	131	NGGYTCYTTTRCAYTTNAYRTTRTG	4234.61	258	27
127	32	YTTYGARAARTWYHTKGARCCDAA	2170.09	39	TNAYVACHACACTYTYVTTTRCTDGC	2476.48	306.391	27
128	29	GRYTVACWGMYCARATHAARTGYTT	2149.09	39	TNAYVACHACACTYTYVTTTRCTDGC	2476.48	327.391	27
129	23	AYAGRYTVACWGMYCARATHAARTG	2146.09	39	TNAYVACHACACTYTYVTTTRCTDGC	2476.48	330.391	27
130	47	YNAGRATHAGYGARAGRAGARAGYAA	3204.43	97	YBARRAAHARRWADGGRSWCATCA	3610.43	406	27
131	69	GNGGNAAYAGRGARYTNTAYATWGG	3387.43	105	SCRTARAARTCHGAHGYRTTDTG	3910.61	523.174	27
132	57	RGARCARGTDGGNGGNAAYAG	3372.43	106	YVAKDSMRTARTTDATRAAYCTYTC	3943.61	571.174	27
133	64	CHYTRTCHTAYAARGARCARGTDGG	3363.43	106	YVAKDSMRTARTTDATRAAYCTYTC	3943.61	580.174	27
134	69	GNGGNAAYAGRGARYTNTAYATWGG	3387.43	96	RAAHARRWADGGRSWCATCATDGG	3606.43	219	28
135	27	WGMYCARATHAARTGYTTYGARAA	2155.09	40	YHRDRTRYTTRTTNAYVACHACACT	2488.48	333.391	28
136	18	CCWGAYAGRYTVACWGMYCARAT	2140.09	40	YHRDRTRYTTRTTNAYVACHACACT	2488.48	348.391	28
137	75	TNTAYATWGGDGAYYTDAGRACVAA	3402.43	97	YBARRAAHARRWADGGRSWCATCA	3610.43	208	29
138	76	ARYTNTAYATWGGDGAYYTDAGRAC	3399.43	97	YBARRAAHARRWADGGRSWCATCA	3610.43	211	29
139	72	GNAAYAGRGARYTNTAYATWGGDGA	3390.43	97	YBARRAAHARRWADGGRSWCATCA	3610.43	220	29
140	34	RTGYTTYGARAARTWYHTKGARCC	2167.09	40	YHRDRTRYTTRTTNAYVACHACACT	2488.48	321.391	29
141	30	VACWGMYCARATHAARTGYTTYGA	2152.09	40	YHRDRTRYTTRTTNAYVACHACACT	2488.48	336.391	29
142	75	TNTAYATWGGDGAYYTDAGRACVAA	3402.43	106	YVAKDSMRTARTTDATRAAYCTYTC	3943.61	541.174	29
143	76	ARYTNTAYATWGGDGAYYTDAGRAC	3399.43	106	YVAKDSMRTARTTDATRAAYCTYTC	3943.61	544.174	29
144	72	GNAAYAGRGARYTNTAYATWGGDGA	3390.43	106	YVAKDSMRTARTTDATRAAYCTYTC	3943.61	553.174	29
145	69	GNGGNAAYAGRGARYTNTAYATWGG	3387.43	97	YBARRAAHARRWADGGRSWCATCA	3610.43	223	30
146	32	YTTYGARAARTWYHTKGARCCDAA	2170.09	40	YHRDRTRYTTRTTNAYVACHACACT	2488.48	318.391	30
147	29	GRYTVACWGMYCARATHAARTGYTT	2149.09	40	YHRDRTRYTTRTTNAYVACHACACT	2488.48	339.391	30
148	23	AYAGRYTVACWGMYCARATHAARTG	2146.09	40	YHRDRTRYTTRTTNAYVACHACACT	2488.48	342.391	30
149	12	TNATHACNAARGARACNCCWGAYAG	2125.09	39	TNAYVACHACACTYTYVTTTRCTDGC	2476.48	351.391	30
150	11	TNTGYCAYTTNATHACNAARGARAC	2116.09	39	TNAYVACHACACTYTYVTTTRCTDGC	2476.48	360.391	30

151	69	GNGGNAAYAGRGARYTNTAYATWGG	3387.43	106	YVAKDSMRARTTDTAARAAYCTYC	3943.61	556.174	30
152	12	TNATHACNAARGARACNCCWGAYAG	2125.09	40	YHRDRTRYTRTTNAYVACHACACT	2488.48	363.391	33
153	11	TNTGYCAYTTNATHACNAARGARAC	2116.09	40	YHRDRTRYTRTTNAYVACHACACT	2488.48	372.391	33

I: degeneracy を2の指数で示した値, 黄色のカラムは OE-PCR ゲノムフラグメントを用いた検証対象のプライマーセットを示す

表5 旧世界アレナウイルス共通プライマー検証用ゲノムフラグメント

ゲノムフラグメント名 (Accession)	ウイルス種	Primer Pair ID	開始 位置	終了 位置	配列
g6Lassa NC_004297	Lassa virus	3	3410	3587	GGTGATCTTAGAACAAAGATGTTTACTAGACTTATAGAAGATTACTTT GAAGCTATAAGCCTACAGTTATCAGGGAGTTGCCGTAACAACGAGAA GGAATTTGAAAATGCTATCCTTTCCATGAAATTGAATGTTTCATTGGC ACATGTGCTTATAGCATGGATCATAGTAAGTGGGGCCCAATGATG
g7LCMV NC_004291	Lymphocytic choriomeningitis virus	3	3386	3563	GGAGATTTGAGGACAAAAATGTTCCACAAGTTAATAGAAGATTATTT TGAGTCTTTTTCAAGTTTCTTTTCAGGCTCCTGTTTAAACAATGATAA GGAATTTGAAAATGCAATCTTGTCAATGACTATCAATGTGCGGGAAG GGTCTTAAACTATAGTATGGATCACAGCAAATGGGGACCAATGATG
g10Mobala NC_007904	Mobala virus	3	3410	3587	GGAGACCTGAGAACCAAATGTTCCACAAGTTAATGAAGACTACTT TGAGGCTTTAACCAGCCAATTCAAAAGGAAGTTGTCTAAATGATGAAC ATGAGTTTGAGAAGCCGTTTTCTCTATGAAGTTCAATGTGTCACTG GGCCTCTATCTTATAGCCTGGACCACAGCAAATGGGGCCCTATGAT G
g12lppy NC_007906	lppy virus	3	3368	3545	GGTGATTTGAGAACGAAAATGTTTACTAGATTTGTTGAAGATTACTTT GAATCTTATACAAAACAATTAGAGGGTAGCTGCCTTAAACAATGAGAA GGAATTTGAAAAAGCTATTCTTGGCATGAAATGGGTGTTTCATTGG CTCATGCCTCTTACTCATTGGATCATAGTAAATGGGGACCCATGATG
g18Mopeia DQ328875	Mopeia virus	3	3440	3617	GGTGACTTAAGAACAAAAATGTTCCACCGGTTGGTAGAAGATTACTT TGAAGCATTGACCAGGCAATATAGAGGAAGTTGTCTGAATGATGAGA AAGAAATCCACAATGCCATCCTAGCAATGAAATGAATGTGCTTTA GGCCAAGTTTCTTATAGCTTGGACCACAGCAAATGGGGACCAATGAT G
g25Dandenong	Lymphocytic choriomeningitis virus	3	3386	3563	GGAGATCTGAGGACAAAAATGTTCCACAAGACTAATAGAGGATTATTT TGAGTCTTTTTCTAGTTTCTTTTCAGGCTCATGCTTAAACAATGACAAA GAATTTGAAAATGCTGTTCTGTCAATGACTATCAATGTGCGAGAAAG GTTTTTAAACTACAGTATGGATCACAGCAAATGGGGGCCAATGATG
g19LCMV EU136039	Dandenong virus	3	3386	3563	GGTGATTTAAGAACAAAGATGTTCCACAAGGCTTGTCGAAGATTACTT TGAATCTTTCTCAAGCTTCTTCAAGTTCTGTCTAAATAATGAGAA AGAGTTTGAAAATGCAATTTTATCCATGACAATAAATGTGAGAGAAG GGCTTCTAAACTATAGTATGGACCATAGTAAGTGGGGTCCAATGATG
g35Lassa AY628204	Lassa virus	3	3419	3596	GGTGACCTTAGGACAAAGATGTTTACTAGACTGATAGAGGATTACTT TGAGGCACTGAGTTTGCAATTTGTCAGGGAGTTGTTGAACAACGAGA AGGAATTTGAGAATGCTATCCTTTCTATGAAACTGAATGTTTCTTTAG CTCATGTTTCTACAGCATGGATCACAGTAAATGGGGCCCAATGATG

表6 プライマー設計および検証対象としたウイルス種およびセグメントL

Accession	種名	略称	分類
NC_010249	Allpahuayo virus	ALLV	New world arenaviruses
NC_010251	Amapari virus	AMAV	New world arenaviruses
NC_010255	Bear Canyon virus	BCNV	New world arenaviruses
NC_010252	Cupixi virus	CPXV	New world arenaviruses
NC_010759	Flexal virus	FLEV	New world arenaviruses
NC_005082	Guanarito virus	GTOV	New world arenaviruses
DQ489718	Junin virus	JUNV	New world arenaviruses
NC_010760	Latino virus	LATV	New world arenaviruses
NC_005079	Machupo virus	MACV	New world arenaviruses
NC_010250	Oliveros virus	OLVV	New world arenaviruses
NC_010761	Parana virus	PARV	New world arenaviruses
NC_006439	Pichinde virus	PICV	New world arenaviruses
NC_005897	Piritital virus	PIRV	New world arenaviruses

NC_006313	Sabia virus	SABV	New world arenaviruses
NC_010702	Tamiami virus	TAMV	New world arenaviruses
NC_004292	Tacaribe virus	TCRV	New world arenaviruses
NC_010703	Whitewater Arroyo virus	WWAV	New world arenaviruses
NC_010563	Chapare virus	CHAPV	unclassified New world arenaviruses
NC_007906	Ippy virus	IPPYV	Old world arenaviruses
NC_004297	Lassa virus	LASV	Old world arenaviruses
DQ868488	Lymphocytic choriomeningitis virus	LCMV	Old world arenaviruses
NC_007904	Mobala virus	MOBV	Old world arenaviruses
NC_006572	Mopeia Lassa reassortant 29	MOPLAS	Old world arenaviruses
DQ328875	Mopeia virus	MOPV	Old world arenaviruses
NC_006574	Mopeia virus AN20410	MOPVAN	Old world arenaviruses
FJ952385	Lujo virus	LUJV	unclassified Arenaviridae

表7 アレナウイルス科用多種共通プライマーペアセット

Primer Pair Name	Forward primer	Position in L-segment	Reverse primer	Position in L-segment	Degeneracy index	Av. size of PCR prod.
L4	GSCCCCAAYTTKGAATG	175	AAGAACARGTWGGWAGYAATAGRGA	175-391	8	216
L5	TCATCWCCCARACAWARAAYCT	149	CATWYACYTCTAGTGATGAYCAAAT	149-344	9	195
L6	GGWCCCATTTDGAGTGRTC	175	AAGGARCARGTKGGYTCMAA	175-394	9	219

表8 アレナウイルスについて設計されたプライマーペアの適用可能なウイルス

Primer pair	L4	L5	L6
ALLV	○		
AMAV	○	○	○
BCNV	◎		
CHAPV	○	○	○
CPXV		○	○
FLEV	○		○
GTOV		○	○
IPPYV		○	○
JUNV		○	◎
LASV	○	○	
LATV	○	○	○
LCMV	○	○	
MACV		○	◎
MOBV	○	◎	
MOPLAS		◎	
MOPV		◎	
MOPVAN		◎	
OLVV	○	○	
PARV	○		
PICV			○
PIRV			○

SABV	○	○	○
TCRV	○		◎
TAMV	◎		
WWAV	◎		
LUJV		○	

図1 CoCoMo プログラムの模式図

A: 対象配列の整列

A 株	ATGGCGGCCGTATGTGCC
B 株	ATGGGGCGTATGAGCC
C 株	ACCGCGGCTGTGCG
A 株	ATGGCGGCCGTATGAGCC
B 株	ATGGC-GCCGTATGACCC
C 株	ATCGCGG-C---TGAGCG

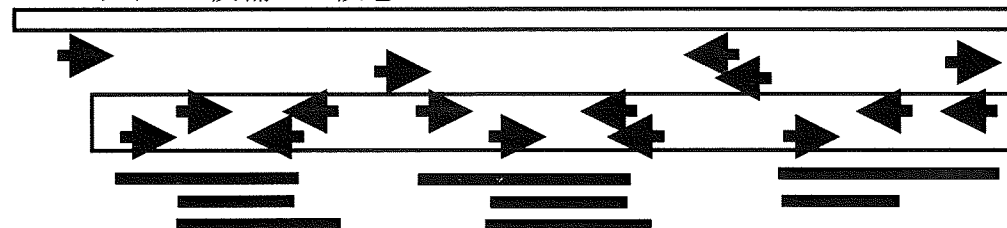
B: ギャップ motif 検索の概念図

A株	GCCAGATGGCGGCCGTATGAGCGAATGCG
B株	CCGGGATGGC-GCCGTATGACCGATACCC
C株	GGCAGATCGCGG-C---TGAGCGAATGCG
ギャップmotif ATYGC GASCG	

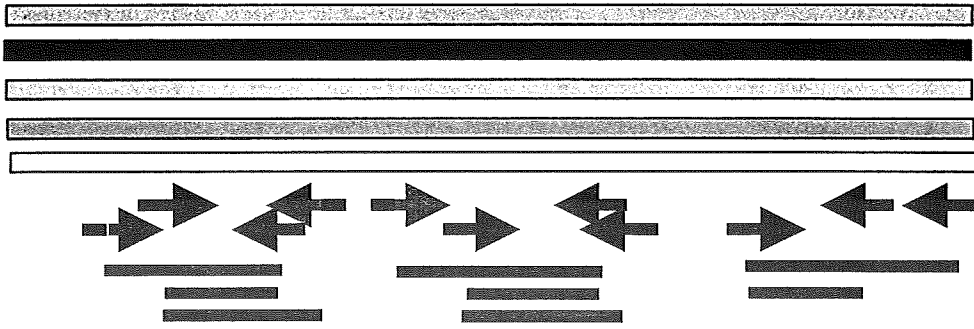
C: motif flanking 配列の抽出と degenerate 配列の決定

A株	GCCAGATGGCGGCCGTATGAGCGAATGCG
B株	CCGGGATGGC-GCCGTATGACCGATACCC
C株	GGCAGATCGCGG-C---TGAGCGAATGCG
GCCAG	AATGCG
CGGGG	ATACCC
SSSRGATYGC	
GASCGAWWSCS	

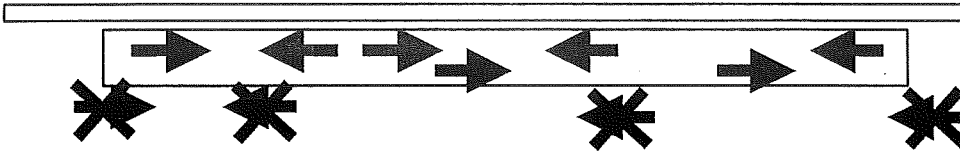
D: プライマー候補1の仮想PCR



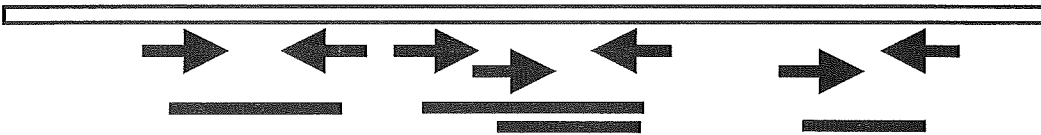
E: プライマー候補1の伸長



F: 忌避配列を含む候補の棄却



G: プライマー候補 2 による仮想 PCR



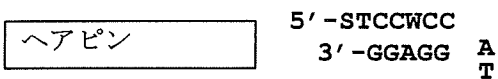
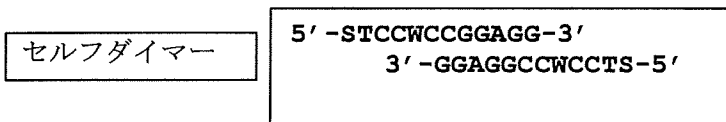
H: プライマー候補 2 の塩基長の調整

GSSSSTCCWGCCAGG

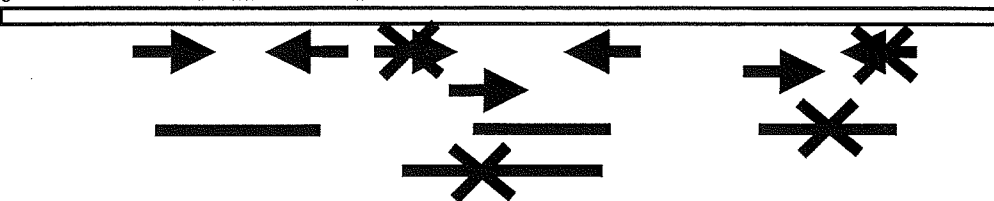
ATACWWTWSCWWWAT



I: プライマー候補 3 の評価



J: プライマー候補 3 の評価



K: プライマーペア候補 2 の評価

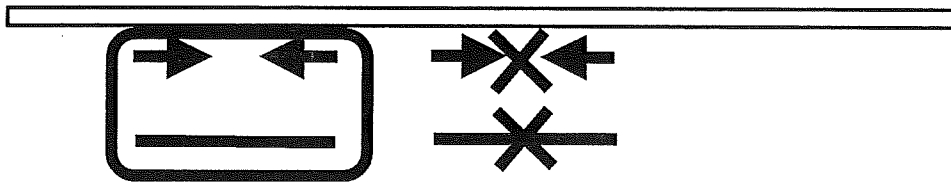


図2 degenerate プライマーの高速 Homology 検索モジュール(Estimate)

A: 相同性検索の問題点

$$ARY = A \begin{Bmatrix} A \\ G \end{Bmatrix} \begin{Bmatrix} C \\ T \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} AAC & AAT \\ AGC & AGT \end{Bmatrix} \rightarrow \text{相同性探索には degeneracy 比例した時間がかかる}$$

二進数の論理演算を相同性探索に用いることにより探索を高速化

高度に degenerate した多数のプライマーのためには通常長大な計算時間を要する

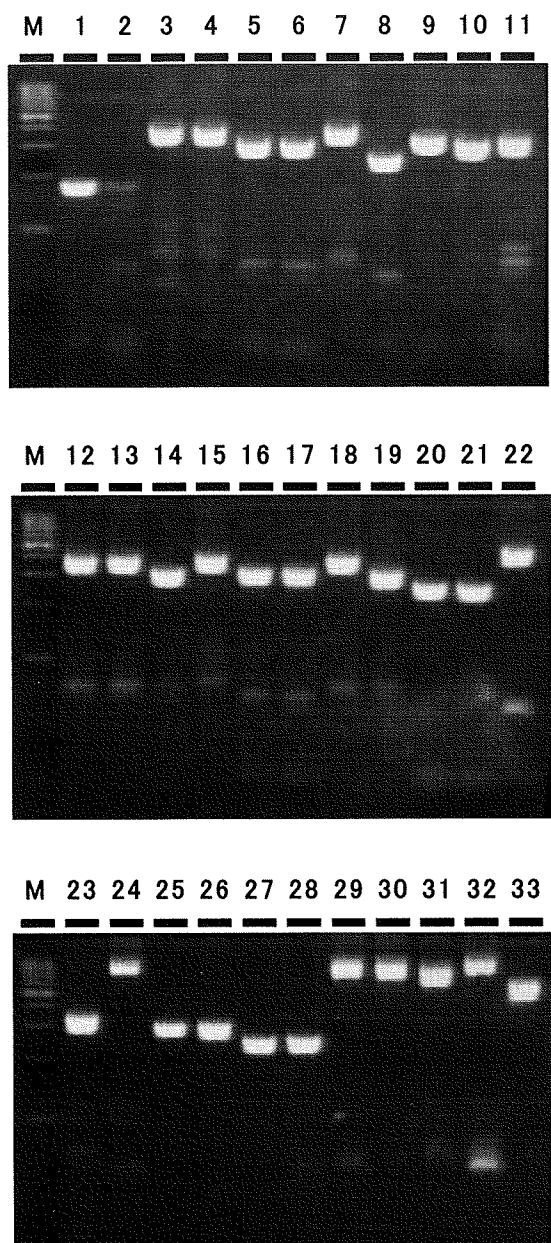
B: 混合塩基の二進数表現

塩基	二進数表現	混合塩基	二進数表現	混合塩基	二進数表現
A	0001	W (A+T)	1001	H (A+C+T)	1011
C	0010	S (G+C)	0110	B (G+T+C)	1110
G	0100	R (A+G)	0101	V (G+C+A)	0111
T	1000	Y (C+T)	1010	D (G+A+T)	1101

C: 二進数表現化された塩基の相同性演算

	塩基	二進数	塩基	二進数	塩基	二進数	塩基	二進数
混合塩基	W	1001	W	1001	H	1011	D	1101
塩基	A	0001	C	0010	C	0010	C	0010
論理積		0001		0000		0010		0000
相同性	50%	1/2	0%	0/2	33%	1/3	0%	0/3

図3 SARS コロナウイルス感染細胞由来 cDNA を鋳型とした TAP-PCR



SARS コロナウイルス RNA の degenerate プライマーによる RT-PCR。SARS コロナウイルス感染細胞抽出 RNA を p(dN)6 により逆転写 (SuperScriptIII) した cDNA を鋳型として、各種プライマーにより PCR を実施した増幅産物のアガロースゲル電気泳動像。PCR 反応は、GoTaqMix によって実施された。アガロースゲル上に表 2 に示すプライマーセット番号を示す。左端のレーンに分子量マーカを示す(100bp Marker)。温度条件の詳細は材料と方法に示す。