

表 3.検出用プローブテスト用 Cy3 標識合成オリゴヌクレオシド一覧

○対象プローブ配列

Pathgen	Probe ID	Sequence (5'--3')
1.HIV	・IR1-2 (32bp)	: 5'-TCTGTTGCTATTATGTCTACTATTCTTTCCCC-3'
2.HCV	・CF1-3 (35bp)	: 5'-TGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGG-3'
	・CR2-1 (39bp)	: 5'-TCCGGTGTACTCACCGGTTCCGCAGACCACTATGGCTCT-3'
	・CF2-2 (34bp)	: 5'-CTAGCCGAGTAGTGTGGGTCGCGAAAGCCTTG-3'
3.HBV	・CR2-2 (34bp)	: 5'-CAAGGCCTTTGCGGACCCAACACTACTCGGCTAG-3'
	・BF4-5 (37bp)	: 5'-CCTATGGGAGTGGGCTCAGTCCGTTTCTCTGGCTC-3'

○5'末端Cy3標識合成オリゴ配列

1.HIV	・Cy3-IR1-2- (40bp)
対象変異株	Sequence (5'--3')
テスト用	: 5'-tgcaGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGAcata-3'
A1,G	: 5'-tgcaGGGGAAAGAATAATAGACATAATAGCAACAGAcata-3'
A2,CPZ,D,F2,H,J,N	: 5'-tgcaGGGGAAAGAATAATAGACATAATAGCAACAGAcata-3'
B※	: 5'-tgcaGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGAcata-3'
C	: 5'-tgcaGGGGAAAGAATAATAGATATAATAGCATCAGAcata-3'
F1	: 5'-tgcaGGGGAAAGAACAATAGACATAATAGCAACAGAcata-3'
K	: 5'-tgcaGGAGAGAGAATAATAGATATAATAGCAACAGAcata-3'
O	: 5'-tgcaGGAGAAAGATAATAGACATATTAGCATCACAcata-3'

※はテスト用Cy3-IR1-2と同名

2.HCV ・Cy3-CF1-3- (43bp)

対象変異株	Sequence (5'--3')
テスト用	: 5'-gcgtCCAACACTACTCGGCTAGCAGTCTTGCGGGGGCAtcgc-3'
1a,1c,4a	: 5'-gcgtCCAACACTACTCGGCTAGCAGTCTTGCGGGGGCAtcgc-3'
1b,3k,5a,6d,6g,6h	: 5'-gcgtCCAACGCTACTCGGCTAGCAGTCTTGCGGGGGCAtcgc-3'
2a,2c2k,6a,6b	: 5'-gcgtCCAACGCTACTCGGCTAGCAGTCTTGCGGGGGCAtcgc-3'
2b	: 5'-gcgtCCAACGCTACTCGGCTAGCAGTCTTGCGGGGGCAtcgc-3'
2i	: 5'-gcgtCCAACGCTACTCGGCTAGCGGTCTTGCGGGGGCAtcgc-3'
3a,3b	: 5'-gcgtCCAACACTACTCGGCTAGTATCTTGCGGGGGCAtcgc-3'
6k	: 5'-gcgtCCAACACTACTCGGCTAGCAATCTTGCGGGGGCAtcgc-3'

2.HCV ・Cy3-CR2-1- (47bp)

対象変異株	Sequence (5'--3')
1a,1b,1c	: 5'-cgggAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAattg-3'
2a,2b,2c,2i,2k,	: 5'-cgggAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAattg-3'
3a,3b,3k,5a,	
6a,6d,6g,6h	
4a	: 5'-cgggAGAGCCATAGTGGTCTTGGGAACCGGTGAGTACACCGGAattg-3'
6b,6k	: 5'-cgggAGAGCCATAGTAGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAattg-3'

2.HCV ・Cy3-CF2-2- (42bp)

対象変異株	Sequence (5'--3')
1a,1b,1c,3a,3b,3k,4	: 5'-accaCAAGGCCTTTGCGGACCCAACACTACTCGGCTAGcagt-3'
6d,6g,6h,6k	
2a,2b,2c,2i,2k,	: 5'-accaCAAGGCCTTTGCAACCCAACGCTACTCGGCTAGcagt-3'
6a,6b	

3.HBV ・Cy3-BF4-5- (45bp)

対象変異株	Sequence (5'--3')
テスト用	: 5'-aactGAGCCAAGAGAAACGGACTGAGGCCACTCCCATAGgtatt-3'
A,G,B※	: 5'-aactGAGCCAAGAGAAACGGACTGAGGCCACTCCCATAGgtatt-3'
C	: 5'-aactGAGCCAGGAGAAACGGGCTGAGGCCACTCCCATAGgtatt-3'
D,E,F	: 5'-aactGAGCCAGGAGAAACGGGCTGAGGCCACTCCCATAGgtatt-3'
H	: 5'-aactGAGCCAAGAGAAACGGGCTGAGGCCACTCCCATAGgtatt-3'

※はテスト用Cy3-BF4-5と同名

表 4.人工合成オリゴヌクレオシドの作製

Pathgen	GenBank Accession No. - Amplifying region (nt)	Length (bp)	Genotypes/Subtypes	Methods
HIV	NC_001802 4153 - 4464	312	14	OE-PCR ^a
HCV	D90208 59 - 327	269	9	Custom DNA ^b
HBV	X70185 450 - 715	266	8	OE-PCR ^a
PvB19	NC_000883 2143 - 2278	136	6	OE-PCR ^a
WNV	NC_009942 3445 - 3599	155	10	OE-PCR ^a

a: 変異株の遺伝子配列に対する鋳型として 19-60mer のオリゴヌクレオシド断片から Overlap-extension PCR 法により伸長した。 b: オリゴヌクレオシド合成を Invitrogen 社のカスタム DNA 合成サービスに委託した。配列は表 5 を参照のこと。

表 5. 人工合成オリゴヌクレオシド配列

HIV核酸合成領域	
Genotype_Accession No.	5'- Sequence -3'
1:A1_U51190	TAAGGCAGCCTGTTGGTGGGCAGGTATCCAACAAGAATTTGGGAT TCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTGAATCTATGAATAAA GAATTAAGAAAAATCATAGGGCAGGTAAGAGATCAAGCTGAACAC CTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATTACAATTTAAAA GAAAAGGGGGGATTGGGGGATACAGTGCAGGGGAAAAGAATAATA GACATAATAGCAACAGATATACAAACTAAAGAACTACAAAAGACAA TTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG
2:A2_AF286237	TAAAGCAGCCTGTTGGTGGGCAAAATGTTAAACAGGAATTTGGTATT CCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAGC AATTAAGAAAAATCATAGGGCAGGTAAGGGAGCAAGCTGAACATC TTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTGTTCATTACAATTTAAAA AAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAAGAATAATAG ACATAATAGCATCAGACTTACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAAT TACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTGTTCAGGGACAG
3:B_U88826	TAGGGCCGCCTGTTGGTGGGCGGGAATCAAGCAGGAATTTGGAAT TCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAATTAAGAAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATC TTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTAAAAAG AAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAAGAATAGTAG ACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAAT TACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG
4:C_U46016	TAAAGCAGCCTGTTGGTGGGCAGGTATTCAACAGGAATTTGGAAT TCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAATTAAGAAAAATCATAGGGCAGGTAAGGAAACAAGCTGAGCAC CTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATTACAATTTAAAA GAAGAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAAGAATAATA GATATAATAGCATCAGACATACAGACTAAAGAACTCCAAAACCAA TTTTAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGAGACAG
5:D_K03454 X04414	TAAGGCCGCCTGTTGGTGGGCAGGTATCAAACAGGAATTTGGAAT TCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAATTAAGAAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAAGCTGAACATC TTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTAAAAAG AAGAAGGGGGGATTGGGGGATACAGTGCAGGGGAAAAGAATAATAG CATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAAT ATAAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGAGACAG
6:F1_AF005494	TAAGGCAGCTTGTGGTGGGCAGGTATCCAGCAGGAATTTGGAAT TCCCTACAACCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAGCTAAAGAAAAATCATAGGACAGATAAGAGATCAAGCTGAACAT CTTAAGACAGCAGTCCAAATGGCAGTATTCATTACAATTTAAAA GAAAAGGGGGGATTGGGGGATACAGTGCAGGGGAAAAGAACAATA GACATAATAGCAACAGACATACAAACTAGAGAATTACAAAAACAA TTATAAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG
7:F2_AJ249236	TAAGGCAGCCTGTTGGTGGGCAGGTATCCAGCAGGAATTTGGAGT TCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAATTAAGAAAAATCATAGGACAGATAAGAGATCAAGCTGAACATC TTAAGACAGCAGTGCAAATGGCAGTATTCATTACAATTTAAAAAG AAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAAGAATAATAG ACATAATAGCAACAGATATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAAT TACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTTCAGGGACAG
8:G_K03455	AAAGGCAGCATGTTGGTGGGCAAAATATCACACAGGAATTTGGAAT TCCCTACAATCCCCAAAGCCAAAGGAGTAGTGGAAATCTATGAATAAC GAATTAAGAAAAATCATCGACAGGTTGGAGATCAAGCTGAACAT CTTAAGACAGCAGTACAGATGGCAGTATTCATTACAATTTAAAA GAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAAGAATAATA GACATAATAGCATCAGATATACAAACTAAAGAACTACAAAAACAA TTATAAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG
9:H_AF005496	TAAGGCAGCCTGTTGGTGGGCAGATATCCAACAGGAATTTGGGAT TCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAATTAAGAAAGATCATAGGGCAGGTAAGAGACCAAGCAGAACAC CTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATTACAATTTAAAA GAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAAGAATAATA GACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAA TTTCAAACATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG

表 5. 人工合成オリゴヌクレオシド配列 (続き)

10:J_AF082394	GAAGGCAGCCTGTTGGTGGGCAGATATCAAGCAGGAATTTGGAAT TCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAATTAAAGAAAATCATAGGACAGGTAAGAGAACAAGCTGAACAC CTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATACACAATTTTAAAA GAAAAGGGGGGATTGGGGGATACAGTGCAGGGGAAAGAATAATA GACATAATAGCAACAGACATACAACTAGAGAATTACAAAAACAA TTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG
11:K_AJ249235	TAAGGCAGCCTGTTGGTGGGCAGATATCAAGCAGGAATTTGGAAT TCCCTACAATCCCCAAAGCCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAATTAAAGAAAATCATAGGACAGGTAAGGGAGCAGGCTGAACAT CTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATTCACAATTTTAAAA GAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGAGAGAGAATAATA GATATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAA TTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG
12:N_AJ006022	AAAAGCAGCCTGTTGGTGGGCAAATATCAAAACAGGAATTTGGGAT ACCCTACAATCCTCAAAGTCAGGGAGCAGTAGAGTCCATGAATAA AGAATTAAGAAAATTTATAGGACAAAATCAGAGATCAAGCAGAACA CTAAGACAGCAGTGCAAATGGCGGTTTTCATTCACAATTTTAAAA GAAAAGGGGGGATTGGGGGTACACTGCAGGGGAAAGAATAATA GACATAATAGCAACAGACATACAGACAACAAAATTTACAAACACAAA TTTTAAAAGTTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGAGACAG
13:O_L20587	GAAGGCTGCATGTTGGTGGGCCAACATACAACATGAGTTTGAAT ACCATATAATCCACAAGTCAAGGAGTAGTAGAAGCCATGAATAAC GAATTAAAATCAATTATACAGCAGGTGAGGGACCAAGCAGAACAC TTAAGAACAGCAGTACAAATGGCAGTATTTGTTTACAATTTTAAAA GAAAAGGGGGGATTGGGGGTACACTGCAGGAGAAAGGATAATA GACATATTAGCATCACAAAATACAAACAACAGAATTACAAAAACAAA TTTTAAAATTCACAATTTTCGGGTTTATTACAGAGACAG
14:U_EF029069	TAAGGCAGCCTGTTGGTGGGCAGTATCAAGCAGGAATTTGGAAT TCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAATTAAAGAAAATCATAGGACAGGTAAGAGATCAAGCTGAACAT CTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTCTTCATTCACAATTTTAAAA GAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAATA GACATAATAGCAACAGACATACAACTACAGAATTACAAAAACAAA TTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG

HCV核酸合成領域

Genotype_Accession No	5'-	Sequence	-3'
1: 1a_AF009606		GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGCTGCAGCCTCC AGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGG TGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCCTTCTTGGATA AACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCGCAAGACTG CTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCT GATAGGGTGTCTGCGAGTGCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCA	
2: 2a_D00944		GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCC AGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGG TGAGTACACCGGAATTGCCGGGAAGACTGGGTCCCTTCTTGGATA AACCCACTCTATGCCCCGTCAATTTGGGCGTGCCCCCGCAAGACTG CTAGCCGAGTAGCGTTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCT GATAGGGTGTCTG CGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCA	
3: 3a_D17763		GAAAGCGCCTAGCCATGGCGTTAGTACGAGTGTGCTGCAGCCTCC AGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGG TGAGTACACCGGAATCGCTGGGTTGACCGGGTCCCTTCTTGGAGC AACCCGCTCAATACCCAGAAATTTGGGCGTGCCCCCGGAGATCA CTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCT GATAGGGTGTCTGCGAGTGCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCA	
4: 4a_Y11604		GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGTACAGCCTCC AGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTTCCGGAACCGGT GAGTACACCGGAATCGCCGGGATGACCGGGTCCCTTCTTGGATTA ACCCGCTCAATGCCCGGAAATTTGGGCGTGCCCCCGCAAGACTGC TAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCT ATAGGGTGTCTGCGAGTGCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCA	

表 5. 人工合成オリゴヌクレオシド配列(続き)

5. 6b_D84262	GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCC AGGCCCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTAGTCTGCGGAACCGGT GAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTCCATTGGAT CAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCAAGAC TGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCC CTGATAGGGTGCTTGCAGTGTCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTG CA
6. 6k_D84264	GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCC AGGACTCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTAGTCTGCGGAACCGGT GAGTACACCGGAATTGCCAGGATGACCGGGTCTTCTTGGATCA ACCCGCTCGATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCAAGATTGC TAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTG ATAGGGTGCTTG CGAGTGTCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCA
7. 6p_EF424626	GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCC AGGATCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGT GAGTTCACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTCTTGGATCA AACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTG CTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCT GATAGGGTGCTTGCAGTGTCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCA
8. 6t_EF632070	GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCC AGGACCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGG TGAGTACACCGGAATTGCCAGGATGACCGGGTCTTCTTGGATC AACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTG CTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCT GATAGGGTGCTTGCAGTGTCCCGGGAGGTCTCGTAGCCCGTGCA
9. 7a_EF108306	GAAAGCGTCTAGCCATGACGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCC AGGACCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGG TGAGTACACCGGAATTGCCCGGAAGACTGGGTCTTCTTGGATC AACCCACTCTATGCCCGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTG CTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCT GATAGGGTGCTTGCAGTGTCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCA

HBV核酸合成領域

Genotype_Accession No.	5'-	Sequence	-3'
1:A_X02763	AT	TATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCAAC AACAAACAGTACGGGACCATGCAAAACCTGCACGACTCCTGCTCA AGGCAACTCTATGTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGAT GGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCGTCCCTGGGCTTTCGCAA AATACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTT ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCC	
2:B_D00329	ACT	TATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCATC AACCACCAGCACGGGACCATGCAGACCTGCACAACCTCCTGCTCA AGGAACCTCTATGTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTATGGAT GGAAACTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGCAA AATACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTT ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCC	
3:C_X04615	ACT	ACCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTACTTCCAGGAACATC AATACCAGCACGGGACCATGCAGAACCTGCACGATTCTGCTCA AGGAACCTCTATGTTCCCTCTTGTGCTGTACAAAACCTTCGGAC GGAAACTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGCAA GATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTT ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCC	
4:D_X65259	ACT	TATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCTTC AACAAACAGCACGGGACCATGCAGAACCTGCACGACTCCTGCTCA AGGAACCTCTATGATCCCTCCTGTTGCTGTACAAAACCTTCGGAC GGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGCAA AATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCTTGGCTCAGTT TACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCC	

表 5. 人工合成オリゴヌクレオシド配列(続き)

5:E_X75657	ACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCATC AACCACCAGTACGGGACCCTGCCGAACCTGCACGACTCTTGCTCA AGGAACCTCTATGTTCCCTCATGTTGCTGTTCAAACCTTCGGAC GGAAATTGCACTTGTATTCCCATCCCATCATCATGGGCTTTCGGAA AATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTT ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGCCGGGCTTTCC
6:F_X69798	ACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTACTTCCAGGATCCAC GACCACCAGTACGGGACCCTGCAAAACCTGCACAACCTTGCACA AGGAACCTCTATGTTCCCTCATGTTGCTGTTCAAACCTTCGGAC GGAAACTGCACTTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTAGGAA AATACCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTT TACTAGTGCAATTTGTTTCAGTGGTTCGCGTAGGGCTTTCC
7:G_AF160501	ACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTGATTCCAGGATCCTC GACCACCAGTACGGGACCCTGCAAAACCTGCACGACTCCTGCTCA AGGCAACTCTATGTATCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTTCGGAC GGAAATTGCACTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGCAA AATACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTT ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCC
8:H_AY090454	ACTATCAAGGTATGTTGCCCGTGTGCTCTACTTCCAGGATCTAC AACCACCAGTACGGGACCCTGCAAAACCTGCACCACTCTTGCTCA AGGAACCTCTATGTTCCCTCCTGCTGCTGTACAAAACCTTCGGAC GGAAATTGCACTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGGAA AATACCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTT ACTAGTGCAATTTGTTTCAGTGGTTCGCGTAGGGCTTTCC

PvB19核酸合成領域

Genotype_Acesion No.	5'- Sequence -3'
1: FJ591158	GCAGCAGTGGTGGTGAAGCTCTGAAGAACTCAGTGAAAGCAGC TTTTTTAACCTCATCACCCAGGCGCCTGGAACACTGAAACCCCG CGCTCTAGTACGCCCATCCCGGGACCAGTTCAGGAGAATCATCT GT
2. GM703964	GCAGCAGTGGTGGTGAAGCTCTGAAGAACTCAGTGAAAGCAGC TTTTTCAACCTCATCACTCCAGGCGCCTGGAACAGTGAAACCCCG CGCTCTAGTACGCCCGTCCCGGGACCAGTTCAGGAGAATCATTT GT
3. GM703962	GCAGCAGTGGTGGTGAAGCTCTGAAGAACTCAGTGAAAGCAGC TTTTTCAACCTCATCACTCCCGGCGCCTGGAACAGTGAAACCCCG CGCTCTAGTACACCCGTCCCGGGACCAGTTCAGGAGAATCATTT GT
4. GM703832	GCAGCAGTGGTGGTGAAGCTCTGAAGAACTCAGTGAAAGCAGC TTTCTCAACCTCATCACCCAGGCGCCTGGAACACTGAAACCCCG CGCTCTAGTACGCCAGTCCCGGGACCAGTTCAGGAGAATCATTT GT
5. DQ333427	GCAGCAGTGGTGGTGAAGCTCTGAAGAACTCAGTGAAAGCAGC TTTTTCAACCTCATCACTCCAGGCGCCTGGAACAGTGAAACCCCG CGCTCTAGTACACCCGTCCCGGGACCAGTTCAGGAGAATCATTT GT
6. DQ357065	GCAGCAGTGGTGGTGAAGCTCTGAACAACTCAGTGAAAGCAGCT TTTTTAACCTCATCAACCCAGGCGCCTGGAACACTGAGACCCCGC GCTCTAGTACGCCCATCCCGGGACCAGTTCAGGAGAATCATTTG G

WNV核酸合成領域

Genotype_Acesion No.	5'- Sequence -3'
1: FJ483549	GACAGCGGCTGTTGGTATGGCATGGAGATTAGACCACAGAGACAT GATGAAAAGACCCTTGTGAGTCAAGTGAATGCTTACAACCGCT GATATGATTGATCCTTTTCAGCTGGGCCCTTCTGGTCGTGTTCTTGG CCACCCAGGAGGTCTCTCG
2. NC_001563	GAGAATGGCTGTTGGTATGGAATGGAATTGACCTACGCGGCAC GACGAAAAGACCCTCGTGAATCGAGAGTGAATGCATACAACGCC GACATGATTGATCCTTTTCAGTGGGCCTTATGGTCGTGTTCTTGG CCACCCAGGAGGTCTCTCG

表 5. 人工合成オリゴヌクレオシド配列 (続き)

3. FJ425721_D17763	GAGAATGGCTGTTGGTATGGAATGGAAATTCGACCTACGCGGCAC GACGAAAAGACCCTCGTGCAATCGAGAGTGAATGCATACAACGCC GACATGATTGATCCTTTTCAGCTGGGCCTTCTGGTCGTGTTCTTGG CCACCCAGGAGGTCCCTTCG
4. FJ159131	GAATCGGGTGTGGTATGGGATGGAGATACGCCACTTCGCCAC GATGAGAAAACCCTGGTGCAATCAAAGGTTACAGCTTACAATGCT GACATGATTGATCCTTTTCAGCTGGGCCTTCTGGTAGTGTTCCTGG CCACCCAGGAGGTCCCTTCG
5. FJ159130	GAATCGGGTGTGGTATGGGATGGAGATACGCCACTTCGCCAC GATGAGAAAACCCTGGTGCAATCAAAGGTTACAGCTTACAATGCT GACATGATTGATCCTTTTCAGCTGGGCCTTCTGGTAGTGTTCCTGG CCACCCAGGAGGTCCCTTCG
6. DQ256376	AGAAGTGGATGTTGGTATGGCATGGAGATCAGGCCACAGAAGCAT GATGAAAGAACTCTCGTTCAGTCACAGGTGAATGCTTACAATGCT GACATGATTGACCCTTTTCAGTTGGGCCTTCTGGTCGTGTTCTTGG CCACCCAGGAGGTCCCTTCG
7. DQ176636	GAGAGCGGATGTTGGTATGGAATGGAAATTAGACCGCTAAGGCAT GATGAGAAAACCTCTFGTGCAATCGAGAGTGAATGCCGTACAATGCT GACATGATTGATCCTTTTCAGTTGGGCCTTCTGGTTGTGTTCTTGG CCACCCAGGAGGTCCCTTCG
8. AY765264	GATAGTGGATGTTGGTATGGAATGGAAATCAGACCTTGAAGCAT GATGAGAAGACGTTGGTCAATCTAGGGTGAGCGCCTACAAATCT GATATGATTGATCCTTTTCAGCTGGGCCTTCTGGTAGTGTTCCTGG CCACCCAGGAGGTCCCTTCG
9. AY688948	GAGAATGGCTGTTGGTATGGAATGGAAATTCGGCCCCGCGGCAT GACGAAAAGACCCTCGTGACGTCGAGAGTAAATGCATACAACGCC GACATGATTGATCCTTTTCAGTTGGGCCTTCTGATCGTGTTCCTGG CCACCCAGGAGGTCCCTTCG
10. AY603654	GATAGCGGTTGTGGTATGGTATGGAGATTAGACCACAGAGACAT GATGAAAAGACCCTTGTGACGTCACAAGTGAATGCTTACAACGCT GACATGATTGATCCTTTTCAGTTGGGCCTTCTGGTCGTGTTCTTGG TCACCCAGGAGGTCCCTTCG

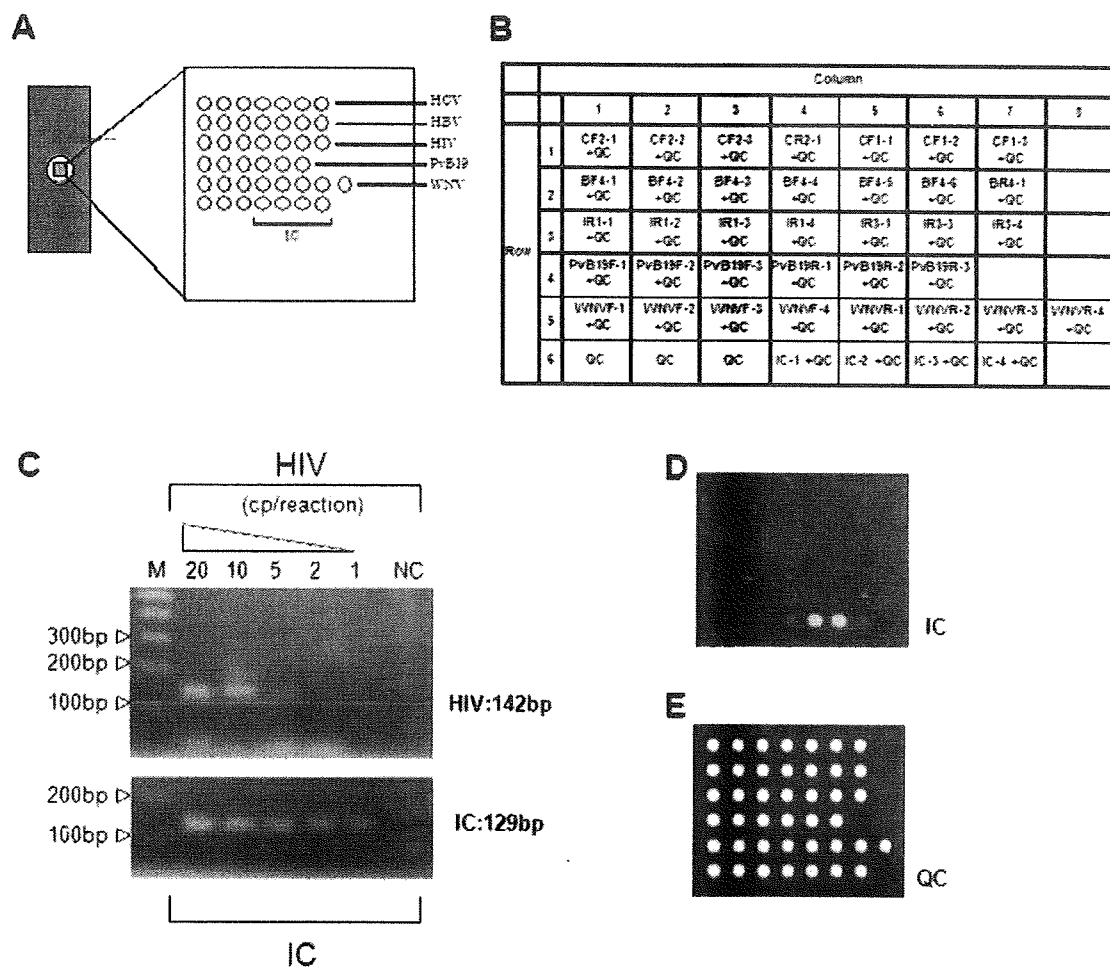


図 1. スポット配置とプローブ ID、及び精度管理用コントロール

A: スライドガラス上に固定されたウイルス核酸検出用プローブの配置と、B: プローブ ID。
 3mm×3mm 角のチップに約 100 個のスポットを置くことができる。C: Internal Control(IC)の使用例として段階希釈された HIV のウイルス核酸を鋳型に検出用 Digenerate プライマーと IC 用プライマーを用いて PCR を行い、3%-アガロースゲル電気泳動により増幅産物を確認した。
 D: Internal Control 用スポットの確認。IC 用プライマーを用いて PCR により Cy5 標識した増幅産物を DNA Chip 上に滴下し、シグナルの検出を行った。E: Quality Control(QC)用プローブの確認。Cy3 で標識された合成オリゴヌクレオチドを用いてスポットの品質管理を行った。

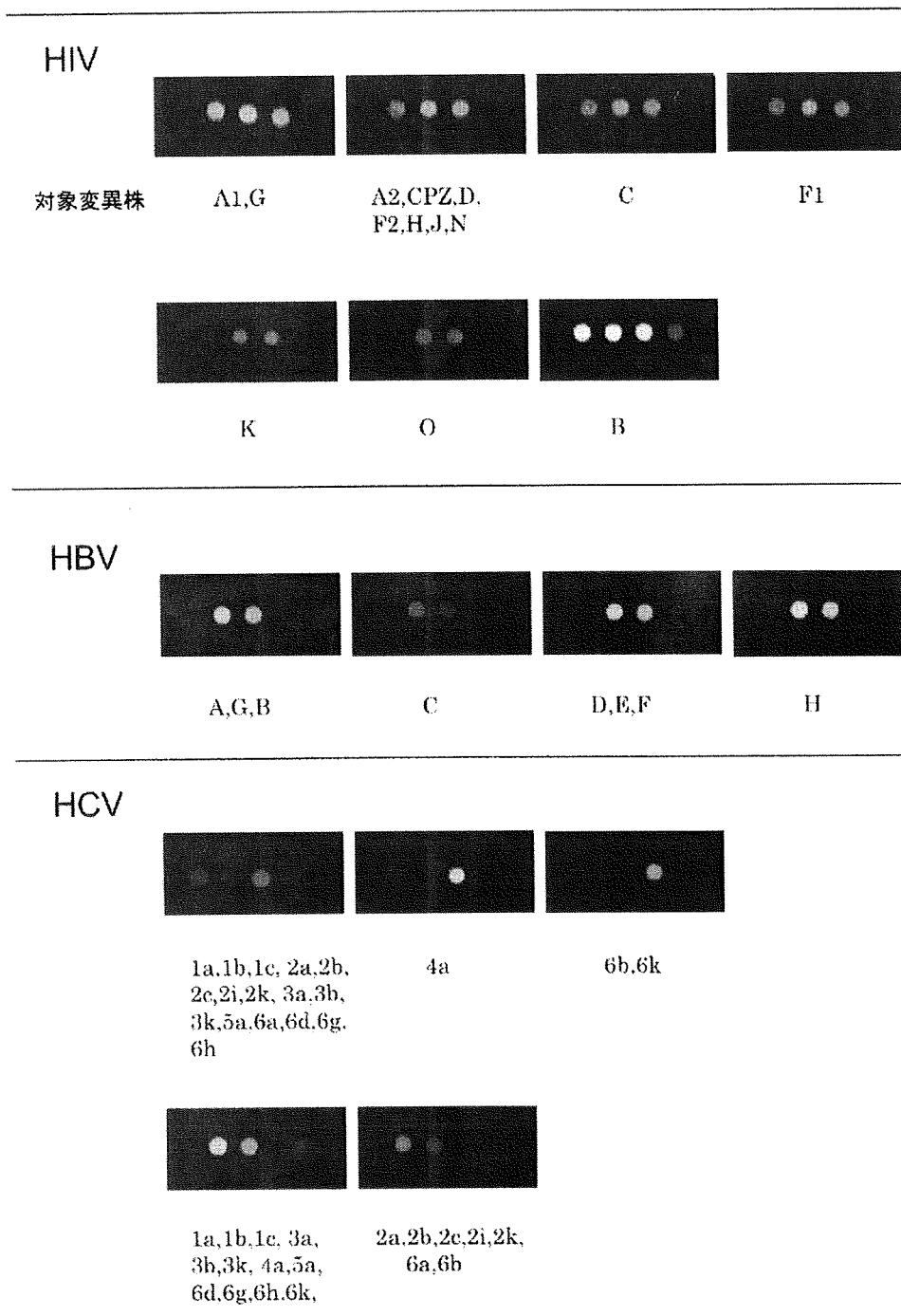


図 2. 蛍光標識合成オリゴを用いた検出用プローブの変異株に対するバリデーション
 Cy3 標識された合成オリゴヌクレオチドを用いて HIV、HCV、HBV の各ウイルス検出用プローブ
 の変異株に対する検出能力をマイクロアレイにより評価した。

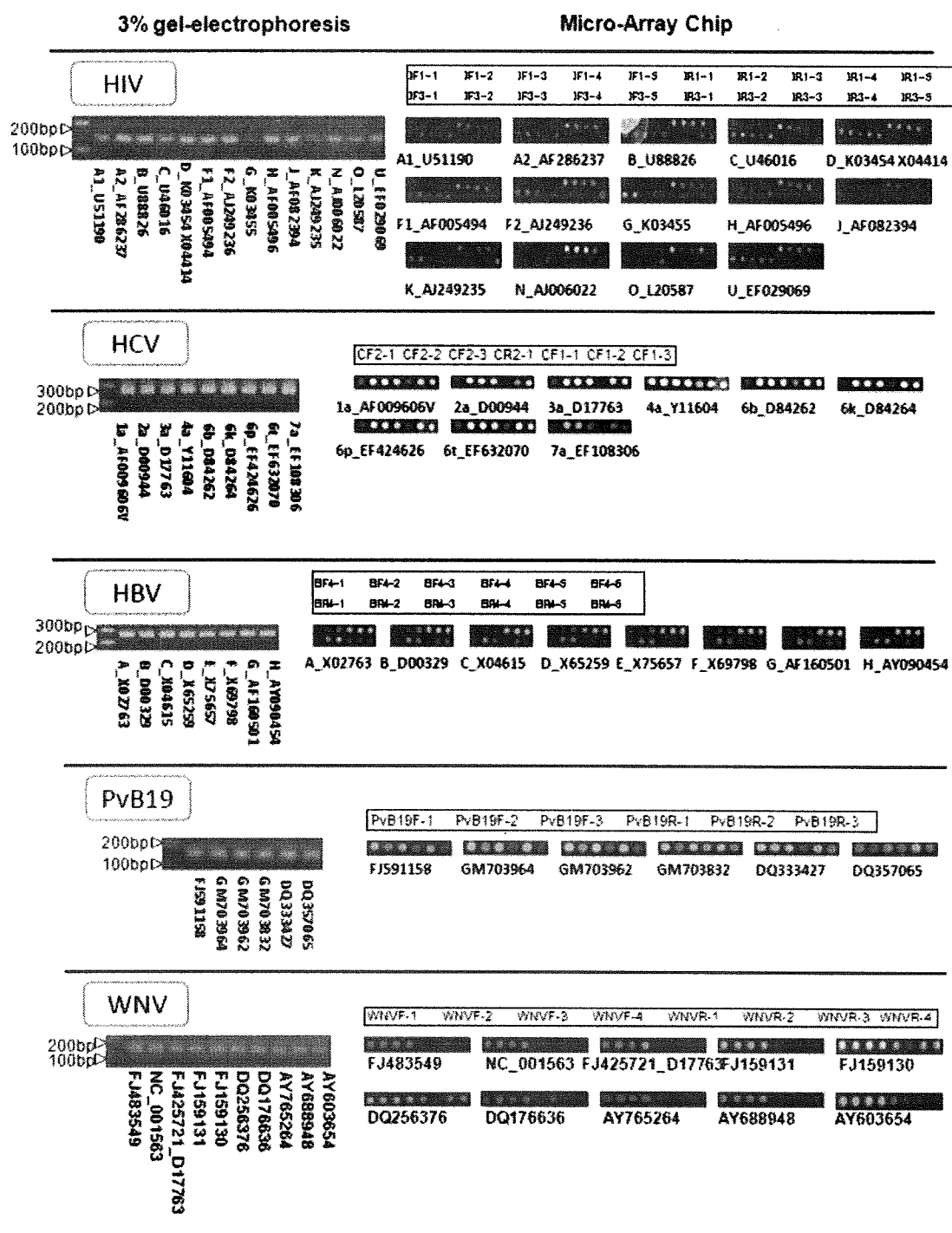


図 3.人工合成オリゴヌクレオチドを用いた変異株に対するバリデーション

HIV、HCV、HBV、PvB19、WNV の各ウイルス変異株の遺伝子配列を基に作製した合成オリゴヌクレオチドを鋳型として用い、Digenerate プライマーと検出用プローブの変異株に対する有効性を評価した。左：Digenerate プライマーを用いて PCR を行い、3%-アガロースゲル電気泳動により増幅産物を確認した。右：PCR により Cy5 標識した増幅産物を DNA Chip 上に滴下し、シグナルの検出を行った。

HIV		HCV		HBV		PvB19		WNV	
cp*		IU*		cp*		IU*		cp*	
20		10		10		10		20	
10		5		5		5		10	
5		2		2		2		5	
2		1		1		1		2	

*Copies or International units /reaction

図 4. マイクロアレイによるウイルス核酸の検出

標準検体から調整したウイルス核酸の希釈系列を用いて各ウイルスの検出用プローブの検出限界をマイクロアレイにより測定した。Digenerate プライマーを用いた PCR によって Cy5 標識されたウイルス核酸を DNA Chip 上に滴下し 50℃、2 時間ハイブリダイズを行った。

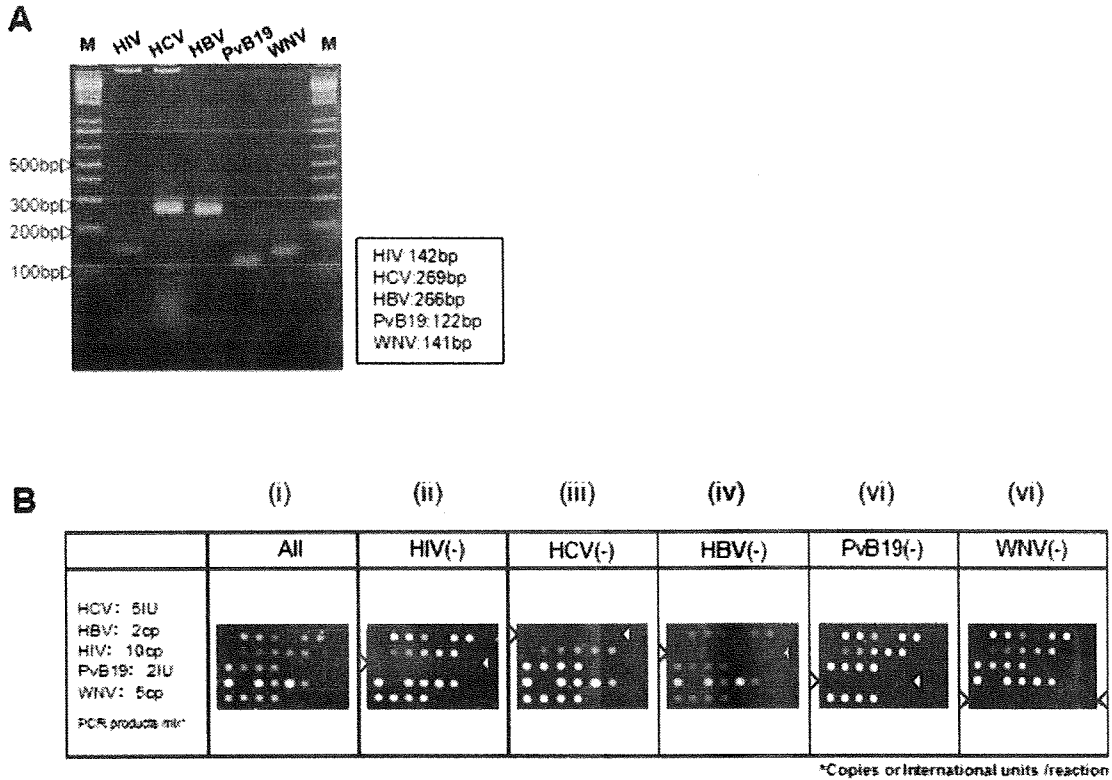


図 5.複数ウイルス核酸の同時検出

各ウイルス検出用プローブがクロスハイブリすることなく複数のウイルス検出することができるかを試験した。A: 500IU/cp の各ウイルス核酸を鋳型として特異的 Digenerate プライマーによる PCR を行った後、3%-アガロースゲル電気泳動により増幅産物を確認した。B: PCR により増幅された各ウイルス核酸を混ぜ合わせ、DNA Chip 上に滴下し 50°C、2 時間ハイブリダイズを行った。(i) 5 種全てのウイルスを混合、(ii) HIV を除く 4 種 (iii) HCV を除く 4 種 (iv) HBV を除く 4 種 (v) PvB19 を除く 4 種 (vi) WNV を除く 4 種。

表 6 .NAT(TMA Assay)による血漿中のウイルス核酸の検出

	HBV	HCV	HIV
IU	Reactive	Reactive	Reactive
100 IU	100%	100%	100%
10 IU	50%	50%	100%
1 IU	50%	25%	50%
0 IU	0%	0%	0%

ヒト陰性血漿中に標準検体を加えた希釈系列を調整し、Chiron 社の NAT システムを用いて Reactive(陽性)/Non-Reactive(陰性)の判定を行なった。IU=IU/ml。

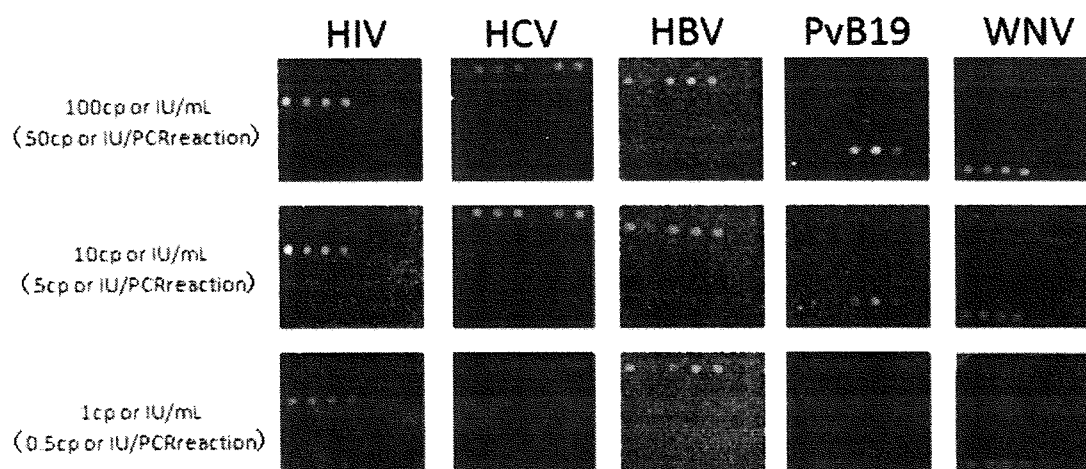


図 6. 血漿中のウイルス核酸のマイクロアレイによる検出

NAT 検査と同様の条件において、検体中のウイルス核酸をマイクロアレイにより検出できるかを試験した。ウイルス核酸の抽出にはラージスケールの検体容量に対応できる High Pure Viral Nucleic Large Volume kit を使用した。

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急研究事業）
ウイルス肝炎感染防止体制の確立に関する総合研究
分担研究報告書（平成 19 年度～平成 21 年度）

ウイルス種・株間共通プライマーを用いた信頼性の高いウイルス
検出方法の開発

研究協力者 遠藤 大二 酪農学園大学獣医学部放射線学教室

研究要旨

本研究は、輸血血液の安全維持のための、多数のウイルス種および株を同時に高感度・高信頼性で検出する方法の必要性を背景として起案された。平成 19 年度には、共通性の高いプライマーを設計するため、多数のウイルス間の関係を総括する技術を確立し、共通プライマーを設計するために枠組みを策定した。平成 20 年度には、その枠組みの中のウイルスを共通して検出するためのプライマー設計技術を開発した。プライマーとしては、複数の塩基が混合した配列を持つ degenerate プライマーを用い、複数ウイルス種に共通のプライマーを設計するための独自プログラムを開発した。その結果、変異株の多い C 型肝炎ウイルスや HIV1 を共通して増幅するプライマーが設計可能であることが示された。平成 21 年度においては、プログラムをさらに発展させ、少数のグループについて設計された多数のプライマーから、対象ウイルスを共通して増幅するプライマーを選択する高速検索技術を開発した。実施例として、ヒトヘルペスウイルスおよびヒトアデノウイルスを選び、複数種を共通して増幅するプライマーを設計し、人工的に合成されたウイルス遺伝子断片の増幅を指標として、適用範囲と感度が予測された。これらの実験から、degenerate プライマー設計と適用性の高速探索を組み合わせることによって、多ウイルス種・多ウイルス株の同時増幅プライマー設計手法が有効であることが示唆された。

A. 研究目的

1. 研究背景

「安全な血液製剤の安定供給の確保等に関する法律」（平成 14 年 7 月施行、以下、血液法）では、血液製剤の安全性の向上に常に配慮した製造、国内自給と安定供給を基本理念（第三条）として、それらの確保、適正使用推進に関する施策及び実施（第四条）は、国の責務として明文化されている。これらの法的社会的背景に基

づき、国内唯一の輸血用血液の採血、製造が認可されている日本赤十字血液センター（以下、日赤）では、血液の安全対策が進められている。

かつては、血液の安全を図る場合には、供給者の健康状態や採血後の管理等が大きな問題となったが、献血のみによる健全な市民による血液供給体制と血液保存システムの向上により、それらの要素は血液安全上の重要課題としては研究対象とは重要視されなくなった。一

方、血液を介して感染する恐れのあるウイルスの混入については、高感度の検査を通じたコントロールが必要な状況である。日赤では、平成11年から安全対策としてHBV、HCV、HIVに対するウイルス核酸増幅検査(NAT)を導入し、ウイルス検査の感度を向上させる対策を実施している。しかし、ウイルス検査には感度限界があり、検査での感度限界を下回りながらも輸血患者に感染する事例の存在が推計されている。たとえば、ウインドウ期間の長いHBVは年間13件検査すり抜けにより感染すると推計、NAT導入後平成18年までに69例の感染が報告されている。計算できない低い発生とされたHCVやHIVでは現時点までにそれぞれ4例、1例のすり抜けによる感染例が既に報告されている。

これらの調査推計に加え、ウイルス学的研究からも検査感度を向上させる必要性が示唆されている。すなわち、HBV、HCVおよびHIVはいずれも高頻度で突然変異を繰り返しており、現在使用されている遺伝子検査用のプライマーが結合する塩基配列に変異が生じないという保証はできないことが示唆される。

また、これらの主要な対象とされるウイルスに加え、HEV、ヒトパルボウイルスB19などの感染があり、感染検査の対象を拡大させる必要性が示唆されている。さらに、地球温暖化やグローバル化により国内にも忍び寄る新興・再興感染症についても、ウイルス研究および疫学研究から、対策の必要性が示されている。近年の新興感染症を羅列した場合には、1997年のニパウイルス脳炎、1999年 ウェストナイル熱／脳炎、2001年 E型肝炎、2003年 重症急性呼吸器症候群(SARS)、2003年 高感染性鳥インフルエンザ、そして2008年から2009年には豚由来の新型インフルエンザなど、多様なウイルスに対する対策が求められるようになってきている。

このような状況が発生した要因としては、1) 森林地帯やジャングルへの開発、人の侵入、動物との接触、2) 環境、生態系の変化、3) 海

外旅行の増加、4) ペットや食料などの輸送、輸入、5) 環境の適応、6) 習慣の変化、性意識の変化、7) 食生活、食品・食肉供給の変化等が関与しており、今後も新興・再興ウイルスの危険性は持続することが予想される。

これらの状況を勘案すると、極めて高感度の検査感度が向上したNATのみに依存することなく、多様な状況や病原体に対応しつつ、高い検出感度を持つ検査方法の開発が必要であると言える。

しかしながら、一方では、輸血血液検査は検体数が膨大であるため、検査コストを制限しつつ開発を進める必要がある。また、安全体制にイニシアティブを持つという点では、国内の研究組織が独自に開発した検査方法・システムを持つことが望ましい。このような社会的要請に基づき、本研究では、多様なウイルスに対応しつつ高感度であるウイルス検出方法の開発に取り組んで来た。本報告書では、平成19年度から21年度における方法の改善について述べる。

1. プライマー設計上各年度に設定した目標

1). プライマー設計のための基本的戦略

上記の背景に基づき、広い検出多種のウイルスの低コストでのPCRでの検出を実現するためのアプローチとして、検出範囲の広いプライマーを設計することを優先して検討することとした。研究開始当時において設計されていたプライマーは、検出範囲を広げることを前提としては設計されていなかった。すべての塩基と水素結合をするイノシン酸に加えて、二重鎖を形成する際に強い水素結合を形成する人工塩基がすでに開発されていたが、それらは非特異的結合を促進するため、イノシン酸等の使用は塩基の使用は、一方ではプライマーの特異性を低下させる。従って、ウイルス検出のための特異性を維持しつつ複数株または複数種のウイルスを検出するプライマーの設計のためには、基本的に適用範囲が広いプライマーを設計

すること優先するとの結論に達した。

適用範囲を広げるための考え方としては、複数の塩基配列を整列させて共通の塩基配列をそのままプライマーとして採用し、ウイルス株間で変化している塩基については、対象配列間での複数の塩基を混合塩基一文字で示した塩基をプライマーとして設定する方法を取ることとした。

たとえば、二種の鋳型の塩基配列が

ATGGGCAGGGA

ATGGCCAGGGA

であった場合、5番目の位置の塩基を G と C の混合塩基として

ATGG{CG}AGGGA

という配列のプライマーが使用される。このようなプライマーは塩基が縮重していることから、degenerate(縮重)プライマーと呼ばれる。HIV、HCV および HBV 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ことが知られていた。

検出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 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、複雑な因子が多数関係するため、単純なプログラムでの解決が難しい。しかも、既知の配列の増加に伴い、さらに高度な設計技術が必要とされるようになってきている。本研究開始時には、このような理由からプライマー設計を自動化する試みが報告され始めていた。

自動化されたプライマーの設計においては、鋳型塩基間で共通する配列を最大にし、degenerate 塩基の使用範囲を最低にするためにどのような高速コンピュータを用いても 100 年を越すような膨大な計算時間を要することが判明していた。数学的には、このような単純な計算方法では膨大な時間を要する計算について、ある程度の時間範囲で実行するために、アルゴリズムと呼ばれる近似解を得るための計算手法が知られている。最適な degenerate プライマーの設計についてもアルゴリズムが取り入れられたため、プライマーの自動設計は設計アルゴリズムと呼ばれている。

既知の設計アルゴリズムでは、プライマーのうち 3' の短い配列を設定した後に、残りの 5' 領域を設計する方法が効率的な共通 degenerate プライマーに用いられていた。本研究でも 3' 末端の短い共通配列を選択することによるプライマー設計を行うこととした。続いて、平成 20 年度においては、プライマー設計アルゴリズム全体を自動化するため、プライマー設計プログラムを作成した。この自動化により、多数のプライマー評価プログラムをプログラム内に含むことが可能となり、多数の設計対象配列に対応したプライマー設計が可能となった。平成 21 年度においては、自動化された設計プログラムで予測されたプライマーを元に、前年度よりも広い範囲のウイルスを増幅するプライマーを設計した。

2). 平成 19 年度における目標設定

第 1 年度においては、文献的に報告された共通プライマーの設計アルゴリズムを比較検討した。その結果として既知の設計アルゴリズムは下記の 3 つの計算工程を取っていることが整理された。

- 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。

一方、ウイルスの実際の塩基置換は、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、ゲノムの塩基配列そのもの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、単純な4種の塩基の構成では見られないが、6~12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モチーフの出現頻度の相違があることを見出した。このような、6~12塩基程度の短い配列の出現頻度の傾向は、HIV, HCV および HBV においても認められた。従来提唱されているプライマー設計アルゴリズムでは、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、ウイルスのように十分なゲノムサイズがない場合には、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、HIV, HCV および HBV 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 を集めて利用することから CoCoMo 法(Co-ordination of common motifs)と称することとした。

当該年度においては、CoCoMo 法のうち、プライマーの degenerate 塩基配列の degeneracy を最低に設定するためのプログラムを開発し、degenerate プライマーの適用範囲を検討することを目標とした。

3). 平成 20 年度における目標

平成 19 年度に作出・検討された CoCoMo アルゴリズムでは、対象塩基配列間での共通配列として6~8塩基の motif が degenerate プライマー設計上求められた。しかしながら、ウイルスの塩基配列間の相同性が低くなることにより、急速にプライマーの設計効率が減少し、HIV1 などでは、共通プライマーの設計範囲が限定されてしまうことが問題点として挙げられた。

当該年度においては、前年度に作出された CoCoMo アルゴリズムを原型として、相同性が比較的低い対象ウイルス群でのプライマー設計効率を向上する改善を実施した。そのため、検索する motif に、共通性を無視する塩基をギャップとして挿入し、共通 motif 選択に当たっては、塩基配列間での共通塩基配列を整列させる既知のプログラムを導入し、さらにプライマーの評価モジュールを作成してプログラムに組み込んだ。結果として、前年度よりも広い範囲のウイルスに共通するプライマーを算出することが可能となった。

設計されたプライマーの実用性を検討するためには、増幅対象となる塩基配列を持つ DNA を用いた PCR 反応が実施された。本研究で対象とするウイルスは多岐にわたっており、既知のウイルス全てを鋳型として検証することは難しかったため、連結オリゴマー PCR(OE-PCR)法を用いてプライマーの鋳型となるウイルスゲノム領域を合成方法を導入した。

これらの試行により、多種の血液中ウイルスに対応可能な PCR 法の設計方法が構築された。

4). 平成 21 年度における目標

前年度に制作されたプログラムは、HBV, HCV および HIV1 では効率的なプライマーの設計能力を示した。しかしながら、ヒトアデノウイルスやヒトヘルペスウイルス5~7のように、単一種内に多様性が存在する上、検出対象

が複数のウイルス種にまたがる場合には、プライマーの設計範囲を越えるという現象が見られた。また、CoCoMo アルゴリズムに導入する鋳型塩基配列数が 20 本を越える場合には、必要となる計算時間が 10 日間を越え、コンピュータが計算上の暴走に入らないようにコントロールすることに多大な計算資源を割かれる問題が見られるようになった。

そのため、当該年度においては、CoCoMo アルゴリズムでのプライマー設計を最大に生かすために、プライマー設計過程を 2 つのステップに分けた。第 1 のステップでは CoCoMo アルゴリズムを適用するための、最適なウイルス塩基配列のグループを多数のウイルス塩基配列から選択した。この選択過程においては、前年度以上に多くのウイルス配列を対象として最適なグループを設定する必要があったため、多様な対象について高速でグループ化を実施する既知のプログラムを導入した。

第 2 のステップでは、最適化によって得られた多数のプライマー候補について、設計対象以外の広いウイルス塩基配列への適用可能性を高速に検索した。ここでは、degenerate 塩基配列と一般の配列間での相同性を極めて高速に算出することが必要となったが、既存の方法では計算時間がかかりすぎるため、独自の方法を開発した。

プライマー設計を 2 つのステップに分割することにより、前年度に比較して広い範囲の対象ウイルス株・種について共通プライマーが設計可能であることが示された。

以下の報告では、研究方法に共通の部分が多かったため、研究方法は基本的に一括して記載し、年度ごとに異なる点についてはその中で提示することとした。研究結果および考察については年度ごとに記載し、各年度に小括を加えた。報告の末尾には、それに加えて 3 年間の目標に対する達成度を評価した総括を述べる。

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/na_seq.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 の積算縮重値(degeneracy)を積算した。例えば、ATRYBNCC の場合、degeneracy は $2 \times 2 \times 3 \times 4 = 48$ とした。計算中、degeneracy が莫大な数となる場合があったため、指標として degeneracy の 2 を底とする対数を算出し、degeneracy 指数として用いた。

2. プライマー設計プログラム

1) 開発環境

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 2~4G 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 (SuSe9, Ubuntu8.04, 8.10 および 9.04)を用いた。

開発言語としては、Ruby 1.86 または 1.87 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には、独自に開発した gas ソフトをコンパイルおよび稼働するために、gcc C コンパイラを使用した。

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 (<http://dev.mysql.com/>)を使用

した。

2) 連携プログラム

塩基配列間の相同性を算出するためには、NCBI の開発した Blast2 プログラムを使用した。

複数のウイルスの塩基配列を整列させるためには、MAFFT プログラム(MAFFT version 6, <http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/>)を用いた(平成 20・21 年度)。

多数の配列を相同性を指標としてグループ化するためのプログラムとしては mcl (<http://www.micans.org/mcl/>)を利用した。

3. 対象ウイルスデータ

各ウイルスの既知のゲノム塩基配列データは、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) または EMBL(<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) よりダウンロードし、BioRuby を用いたプログラムにより MySQL のテーブルに格納した。

4. CoCoMo アルゴリズム(CoCoMo)の構成

1) 平成 19 年度

当該年度の 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、各ステップ用のプログラム群を個別に準備した。基本的な処理方法は下記のとおりであった。

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

ウイルス種別の遺伝子データを収集する際には、ウイルスゲノムプロジェクト上の整備されたゲノムデータのみでは、HCV でも 90 個程度のみがリス手アップされているのみで、既知の遺伝子データを網羅しているとは言えない。そのため、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。特に GenBank は、2005 年ごろから 50 MB を

超える大量の検索データのダウンロードも許可しているため(分担者の実施から推測、未確認)、各種ウイルスデータをダウンロードする際には、主として用いた。

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 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。

GenBank の規約上では、このような分類は塩基配列に付随する Annotation 情報から読み取ることができることになっているが、塩基配列の登録者は必ずしも同一の遺伝子名称やゲノム全長との記述をしているわけではないため、Annotation による分類は十分な実用性を示さなかった。そのため、塩基配列の分類のため、塩基配列を長さが大きい順に並べ、順次それよりも短い配列と相同性とサイズの類似性を基準として塩基配列を分類した。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、ゲノムや主要抗原に関する塩基配列を分類し、同一グループに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の程度と相互の相同性についての social network analysis による二次グループに分類

Social network analysis は、相互に結合され

るノードの親密性やグループ分けを行う手法で、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となった。Social network analysis の図示化には、Pajek(<http://pajek.imfm.si/doku.php>)を使用した。

⑤ 二次グループ数が20程度の場合には、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ソフトウェアは、その第一段階で大量の計算容量を必要とする。HCVの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程度以内に抑える必要がある。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を選んだ。

⑥ 一旦、可能な6塩基モチーフ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を選択する(図1)。まず、レパートリー数が4,096種であるため、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、モチーフの基本を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、その外側の塩基配列を連結することにより、degenerateプライマーを設計した。degenerateプライマー設計時の3'端のモチーフは長いほど3'端の配列が安定して長くなるため、6塩基の予測終了後、motifを伸長することにより、PCRの位置にあるmotifを選択した。

motifの選択においては、PCRを想定する二種のmotifが対象塩基配列上のどの場所でも相補的に重複した位置に存在した場合、最終的に作成したdegenerateプライマーでも相補的

にプライマーが自己結合してしまう可能性が高くなる。そのため、6塩基motifの選択はそのような重複motifのうちの片方を削除する形で進めた。以下に5'-ATGGATGTGGCAT-3'(相補鎖:5'-ATGCCACATCCAT-3')という単純な配列を鋳型とした3merプライマーの選択を事例として以下に説明する。

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、その総数を数えた(表2)。次に存在位置と方向を3merごとに記録した。表1の事例について3merの位置を算出した(表3)。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リストアップされた(表4)。

続けて、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、仮想的にPCRを実施した。具体的には、表2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、各オリゴマーについて、プライマーとして寄与するPCR産物の数を積算した。3merの事例で、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、下表のようなPCR産物の生成が予想される。下表中ではATGが6件のPCR産物に利用されている(表5)。

3merでの事例では、一件の塩基配列データを想定しているため、その一件の中での仮想PCRにおける利用回数を基準に3merの選択をした(表6)。続けて、相補的3merのうち、PCRに利用される頻度の少ない側を消去した(表7)。

上記の事例のうち、右側の表の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る。ただし左側の表でGTG-CAC間での比較で削除されることにな