

「迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした感染症対策ネットワーク構築に関する研究」

分担研究報告書

研究分担者

調 恒明 ( 山口県環境保健センター )

研究協力者

戸田昌一 ( 山口県環境保健センター )

岡本玲子 ( 山口県環境保健センター )

村田祥子 ( 山口県環境保健センター )

高橋徹 ( 山口県立総合医療センター )

内田正志 ( 徳山中央病院 )

門屋亮 ( 山口赤十字病院 )

鈴木英太郎 ( 鈴木小児科 )

河野祥二 ( 下関市民病院 )

研究要旨

ヒトの呼吸器感染症の原因ウイルスの一つである Human Parainfluenza virus(HPIV)には4つの型があり、その中のHPIV4には2つのサブグループ(4a,4b)があるが1、2、3型に比べ患者情報の蓄積が少なく、遺伝子データベースへの全長配列の登録も少ない。当所で分離したウイルス株について全長配列を決定するため、次世代シーケンサー(NGS)を用いて4a:1株、4b:3株の分離株についてゲノム遺伝子配列の決定を行った。しかし、4aで数カ所、4bについては数10カ所 coverageが低い(100以下)の部分があったため、その部分を補完するためにプライマーを設計し、サンガー法(従来法)でも配列を決定した。NGSで決定した塩基配列とサンガー法で決定した配列を比較した結果、より正確な全長配列を決定するためにはNGSのデータが必要だった。

A.研究目的

近年、感染症等原因不明疾患の検査法に、次世代シーケンサー(NGS)を用いて検体中に存在するすべての病原体を検出する方法が用いられるようになってきた。よって、通常の検査で何も病原体が検出されなければ、NGSを利用する使い方がメインであると考えられる。しかし、それだけではなく、NGSでは、短い配列を一度のRunで100~1500万リード読むことが出来るため、ウイルスゲノム遺伝子等の全長配列を一度のRunで決定することも出来る。

当所では不明疾患の原因検索だけでなく、検出数が少なく、また、データベース上に全長配

列の登録も少ないHPIV4の全長配列の解析を行うことを試みた。

B.研究方法

当所に搬入された病原体サーベイランスや調査研究用の検体から分離されたHPIV4の全長配列を決定するために、分離株4a:3株、4b:6株のうち、4a:1株、4b:3株について解析を行った。これはNGSの技術習得を含め、国立感染症研究所での研修時に行った。解析の結果、coverageが低い(100以下)部分があり、それを補完するために、NGSにより決定された配

列を基に PCR 用プライマーを作製した (表 1、2)。また、3'末端のリーダー配列と 5'末端のトレーラー配列部分 (図 1) については、4a は HPIV4\_DK(459)(KF483663)を基に (表 3)、4b は SKPIV4(EU627591)を基に作製した (表 4)。これらのプライマーを使用し、すべての株について、RT-PCR を行い、得られた amplicon について、ダイレクトシーケンスを行った。これにより得られた配列と NGS のデータを用い、CLC\_genomic\_workbench や Geneious で、NGS のデータのあるものは mapping を行い、また、無いものについては de novo assembly を行った。ウイルス RNA の抽出は、細胞培養上清から QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を Carrier RNA を添加せず使用し行った。RT-PCR には Primescript II High fidelity One step RT-PCR kit (TAKARA) を使用した。

### C. 研究結果

HPIV4a、HPIV4b 共に NGS で coverage の低い部分をサンガー法で補うことが出来た。また、NGS データが無い部分についても、サンガー法のデータからほぼ全長の配列を得られた。しかし、3'末端と 5'末端については他の部位に比べ重複して配列が得られた部分が少なく、プライマーの部分もあるため、完全な配列の決定には至らなかった。

### D. 考察及び結論

NGS データにサンガー法のデータを mapping し、coverage の低い部分を補うことが出来た。これにより、より正確性の高いデータを得ることが出来たと考えられる。しかし、NGS データに比べ、サンガー法で得られるデータは少ない。サンガー法では図 2 のような場合コンセンサス配列を得ることは難しい。しかし、同じ場所の NGS データ (図 3 枠内) を見ることににより、たとえ、NGS データ全体でみ

ると coverage が低くリード数が十分でない部分であってもサンガー法に比べると、遙かに多くの情報をもっているため、正しい配列の決定が可能であり、変異の確認もできる。よって、サンガー法の配列データのための 4a : 2 株、4b : 3 株についても、より正確な配列を得るためには、NGS を行う必要があると考えられる。

### E. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

### F. 研究発表

1. Makoto Kuroda, Shoichi Niwa, Tsuyoshi Sekizuka, Hiroyuki Tsukagoshi, Masaru Yokoyama, Akihide Ryo, Hironori Sato, Naoko Kiyota, Masahiro Noda, Kunihisa Kozawa, Komei Shirabe, Takashi Kusaka, Naoki Shimojo, Shunji Hasegawa, Kazuko Sugai, Masatsugu Obuchi, Masato Tashiro, Kazunori Oishi, Haruyuki Ishii, and Hirokazu Kimura. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C, Scientific Reports, in press.

2. Hasegawa S, Wakiguchi H, Okada S, Gui Kang Y, Fujii N, Hasegawa M, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Shirabe K, Toda S, Wakabayashi-Takahara M, Morishima T, Ichiyama T. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. Cytokine. 2014, Oct;69(2):206-10.

3. Kawase J, Kurosaki M, Kawakami Y, Kashimoto T, Tsunomori Y, Sato K, Ikeda T, Yamaguchi K, Watahiki M, Shima T, Kameyama M, Etoh Y, Horikawa K, Fukushima H, Goto R, Shirabe K. Comparison of Two

Methods of Bacterial DNA Extraction from Human Fecal Samples Contaminated with *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, and *Campylobacter jejuni*. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(6):441-6.

**G.知的財産権の出願・登録状況**

該当なし

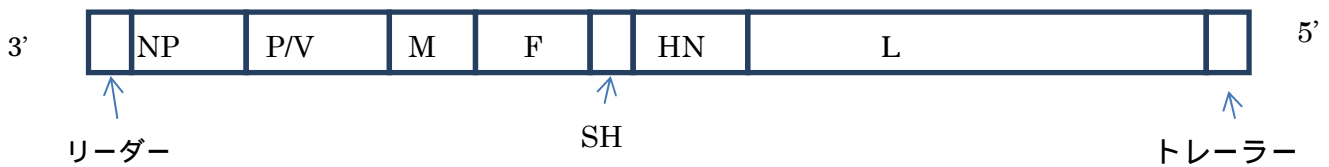


図1 HPIV4のゲノム構造

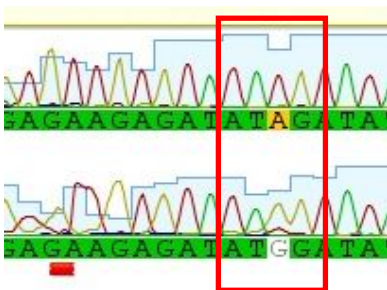


図2 サンガー法のデータ

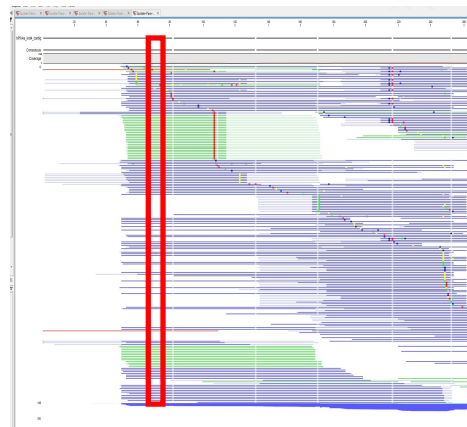


図3 NGSデータ

表 1 HPIV4a PCR 用 Primer

Name	Sequence	Size
PCR-F-primer(102-F)	TCCTRAGTTAACAATCAATCCGGACC	4,443
PCR-R-primer(4544-R)	AGTTGTTTTGCCATTGTAGGAGATGC	
PCR-F-primer(4451-F)	GGAAAATCCCAAAGTCTGCCAGCC	4,832
PCR-R-primer(9282-R)	AAACGGGTTGATCTGAAAGTCCCC	
PCR-F-primer(9030-F)	TGCATTTCCACACTTGAAACGAGCG	4,871
PCR-R-primer(13900-R)	ACGCGTGTCTTAGAAAGTTCGTACG	
PCR-F-primer(13533-F)	TGGGCTCCTTTTGTGCATGGTAGGGG	3,233
PCR-R-primer(16765-R)	TGTATTCCGACAAARAGAGTGCAACC	

表 2 HPIV4b PCR 用 Primer

Name	Sequence	size
PCR-F-primer(153-F)	TCACCATGTCTTCGGTTTTAGCTGC	4331
PCR-R-primer(4483-R)	TGAAATAGAGGCTGGCAGATTTGGGG	
PCR-F-primer(4404-F)	AGGTATCAGTGATCTATGGGGGCC	4838
PCR-R-primer(9241-R)	TCACCCACCTCAAGTATGTAAAGGC	
PCR-F-primer(8939-F)	AGATTGCCCRGGAAATAAAGCTTGCCC	4853
PCR-R-primer(13791-R)	TGAGAAGCACCTGGTATTTGGGCC	
PCR-F-primer(13527-F)	GGGCTCCTTTGTTACATGGTAGGGG	3639
PCR-R-primer(17165-R)	TGGTGTGGCCTTAGTCCTCTATCC	

表 3 HPIV4a PCR 用 Primer (3',5')

Name	Sequence	Size
4a-DA_HPIV4c_21F_C	ACCAAGGGGAGAAGAGATA	376
4a-DA_HPIV4c_25R	TAATGCCCTTGCTTAATCG	
4a-DA_HPIV4c_24F_C	CCAAGGGGAGAAGAGATATRGA	567
4a-DA_HPIV4c_27R	CAAATCCCTGGCTAATGCTC	
4a-DA_HPIV4c_37F	TGGGAACAATTAATCCGTCAG	682
4a-DA_HPIV4c_38R_C	CGTTTGMATCATTRAAYTGG	
4a-DA_HPIV4c_38F	GGTTGCACTCTCTTTGTCGGA	362
4a-DA_HPIV4c_39R_C	ACCAAGGGGAGAAGAGATAWGAAA	

表 4 HPIV4b PCR 用 Primer (3',5')

Name	Sequence	size
4b-DA_HPIV4c_21F-C	ACCAAGGGGAGAAGAGATA	376
4b-DA_HPIV4c_25Re	TAAYGCTCCCTGTTTGATTG	
4b-DA_HPIV4c_24F-C	CCAAGGGGAGAAGAGATATRGA	567
4b-DA_HPIV4c_27Re	CAAATCTCTRGATAATGCC	
4b-DA_HPIV4c_37Fe	TGGGAACAATTAATACAYCAA	682
4b-DA_HPIV4c_38Re_C	CGTTTGAATCRTTAACTGG	
4b-DA_HPIV4c_38Fe	GGATGTACYCTYTTCGTTGGA	632
4b-DA_HPIV4c_39Re	ACCAAGGGGAGAATAGATAAGAAA	

