

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis 法を用いたエンテロウイルス属分類手法の開発

東北大学大学院 学生員 小川めぐみ
 東北大学大学院 正会員 真砂 佳史
 東北大学大学院 奥村 千恵
 東北大学大学院 学生員 村田 有紗
 東北大学大学院 フェロー会員 大村 達夫

1. はじめに

近年、腸管系ウイルスによる感染性胃腸炎の流行が問題となっている。腸管系ウイルスは細菌と比較して遺伝子の多様性が非常に高く、その配列の違いによってウイルスの性質も多様である。そのため、感染症発生状況の把握のためには遺伝子解析によるウイルス判別が重要である。現在医療機関では患者から分離されたウイルスの遺伝子解析を行っているが、一人の患者に症状を呈するウイルスは1種類であることが多いため、流行状況の把握のためには非常に多数の検体を解析しなければならないという問題がある。一方、下水道が整備された地域においては、感染者が糞便とともに排出したウイルスは下水に集積するため、下水から腸管系ウイルスを検出することにより、より少ない試料で効率的に感染症発生動向調査を行うことができると考えられる。水試料を対象としたウイルスの種や遺伝子型の判別法として、クローニング-シーケンシング法による遺伝子解析が行われている¹⁾。しかしこの手法では下水中に優占している限られたウイルスしか検出されない可能性がある。

以上の背景より、本研究では下水や河川水といった水試料中に存在する病原ウイルスを対象とした遺伝子解析手法として、Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 法²⁾の適用を試みた。DGGE 法は遺伝子とその塩基配列の違いによって分離する手法であるため、試料に含まれる全遺伝子型を対象とした検出が可能である。DGGE 法を用いて検出するウイルスは、水試料中に多く存在し検出が容易であるエンテロウイルス属とした。エンテロウイルス属は非常に多様な病状を引き起こす³⁾ため、属全体のウイルス検出だけでなく、遺伝子型で分類した調査を行うことが重要となる。さらに、エンテロウイルス属の分類を行うことによって世界ポリオ絶滅計画 (WHO) に伴ったポリオサーベイランスへの貢献が可能である。

本研究ではウイルスによる汚染が激しく、また多様な遺伝子配列が含まれると考えられるマニラ首都圏の河川水を試料として、DGGE 法を用いたエンテロウイルス属の遺伝子配列による分類を試みた。

2. 実験方法

2.1. 使用した水試料およびウイルス株

試料としてポリオウイルス1型 Sabin 株培養液 (PV1)、PV1 を添加した国内の流入下水、およびマニラ首都圏を流れるパシグ川およびその支流の 5 地点において 2008-2009 年に採水した河川水試料 26 検体を用いた。

2.2. PCR

AmpliQ Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems) を用いて PCR を行った。プライマーは配列中に混合塩基を含まないこと、および遺伝子型による分類が可能であること⁴⁾を考慮して、5'UTR 領域を増幅するもの 2 組 (EV1-EV2, EVU1-EVD1)⁵⁾⁶⁾を用いた (図1)。PCR 反応溶液中のプライマー終濃度は 500nM とし、アニーリング温度はプライマーの文献⁶⁾に従い 52°C とした。

2 組のプライマーはフォワードとリバースの組み合わせ方、および GC クランプ⁷⁾を付加する方向によって計 8 通りの条件が得られる (表 1)。この中から DGGE で最も良い結果が得られるプライマー条件を選択した。また、PCR 検出効率の悪いプライマー条件については、検出効率改善のため 2 段階の PCR を行った。2 段階 PCR では 1 回目の PCR に EV1 および EV2 を使い、2 回目の PCR は 1 回目に得られた PCR 産物 1μl を鋳型として、検出効率の悪かった各プライマー条件で行った。

2.3. DGGE

ゲルの作成および泳動は Dcode システム (BIO-RAD) を用いて行った。ゲルは 8% ポリアクリルアミドゲルに変性剤として尿素とホルムアミドを添加したものをを用いた。変性剤濃度は 0-70% とし、120V で 12 時間泳動した。ここで変性剤濃度 100% とはホルムアミド 40%、尿素 7M



図 1. 5'UTR 領域を増幅するプライマー

表 1. プライマーの組み合わせ条件。-GC はプライマーの 5'側に GC クランプを付加したものを示す。

	Primer - F	Primer - R
1	EV1-GC	EV2
2	EV1	EV2-GC
3	EVU1-GC	EVD1
4	EVU1	EVD1-GC
5	EV1-GC	EVD1
6	EV1	EVD1-GC
7	EVU1-GC	EV2
8	EVU1	EV2-GC

Key Words : PCR-DGGE, エンテロウイルス, フィリピン, 水試料

連絡先〒 980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 TEL 022-795-7483 FAX 022-795-7482

に相当する。泳動終了後 SYBR Gold nucleic acid gel stain (Molecular Probes) を用いてゲルを染色した。得られたバンドは切り出してシーケンシングを行い、含まれる DNA 断片の塩基配列を解読した。

3. 結果と考察

3.1. PCR 条件の検討

表 1 に挙げた 8 通りのプライマー条件で PCR-DGGE を行ったところ、リバースプライマーに EVD1 を用いたもの(条件 3, 4, 5, 6) は全ての水試料においてバンドが形成されなかったため、これらの条件は DGGE に適さないと考えられた。一方、アガロースゲル電気泳動によると、リバースプライマーに EV2 を用いたもの(条件 1, 2, 7, 8) では PCR 産物が増幅されにくい傾向がみられた。このため 2 段階 PCR を行い検出効率の改善を試みた。

条件 1, 2, 7, 8 について 2 段階の PCR を行ったところ、全ての系でアガロースゲル電気泳動により増幅産物が確認できた。しかし GC クランプをリバースプライマーに付加したもの(条件 2, 8) はフィリピンの河川水試料において DGGE のバンドが形成されなかったため、これらの条件は好ましくないと考えられた。一方、GC クランプをフォワードプライマーに付加したもの(条件 1, 7) はいずれも DGGE のバンドが確認できたが、2 段階 PCR では非特異的産物の生成を避けるため 1 回目と 2 回目で異なったプライマーを使用するのが望ましい。そのため EVU1-GC を用いた条件 7 が最も良い条件と考えられた。

以上より、1 回目に EV1 および EV2 を用い、2 回目に EVU1-GC および EV2 を用いた 2 段階の PCR が DGGE を行うために好ましいと示された。

3.2. 実試料への適用

3.2. で得られた PCR 条件を用いて、フィリピンの河川水 26 検体のうち PCR 産物が得られた 22 検体について DGGE を行ったところ、全てのサンプルで複数のバンドを確認することができた(図 2)。バンドは変性剤濃度約 35-50% の位置に多く集中し、1 試料につき 3-6 本程度見られた。以上より、本研究で得られた条件で PCR-DGGE を行うことで、試料に含まれる複数のエンテロウイルスを分類できることが示された。

3.3. シーケンシング

分離した DNA 断片の配列を解読したところ、それぞれエンテロウイルス属に属するウイルスとの相同性がみられた(表 2)。以上より、PCR-DGGE によってエンテロウイルスを遺伝子型によって分類し、またその配列を求めることが可能であると示された。クローニング-シーケンシング法では通常 1 試料につき数個のクローンに対してのみシーケンシングを行い、また同じ配列のクローンを選択することも多い。一方、DGGE 法は PCR で増幅された配列を全て分類することが可能である。

4. おわりに

PCR-DGGE に最適なプライマーおよび PCR 条件の検討を行ったところ、最初に EV1 および EV2 を、次に EVU1-GC および EV2 を用いた 2 段階の PCR を行うのがよいと分かった。さらにこの条件をフィリピンの河川水試料に適用したところ、DNA 断片を配列の違いによって分類し、さらにその配列を求めることができた。DGGE 法は他の手法と比較して、より多くの異なった遺伝子配列をもつ DNA 断片の分類が可能であるため、複数の遺伝子配列が含まれる試料の遺伝子解析手法として最適であるといえる。

謝辞

本研究の一部は、地球規模課題対応国際科学技術協力事業(科学技術振興機構、国際協力機構)「熱帯地域に適した水再利用技術の研究開発(研究代表者:山本和夫)」および新興・再興感染症研究拠点形成プログラム(文部科学省)「フィリピン・東北大学拠点(研究代表者:押谷仁)」の補助を受けて行われた。

参考文献

- 1) Ueki, Y. *et al.*, 2005. *Wat. Res.*, 39, 4271-4280
- 2) Sheffield, V. C. *et al.*, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 232-236
- 3) Bosch, A., *et al.*, 2008. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 19, 295-301
- 4) Thoelen, I. *et al.*, 2004. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 963-971
- 5) Muir, P. *et al.*, 1993. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 31-38
- 6) Shen, S. *et al.*, 1997. *J. Virol. Meth.*, 65, 139-144
- 7) Muzer, G. *et al.*, 1995. *Arch. Microbiol.*, 164, 165-172

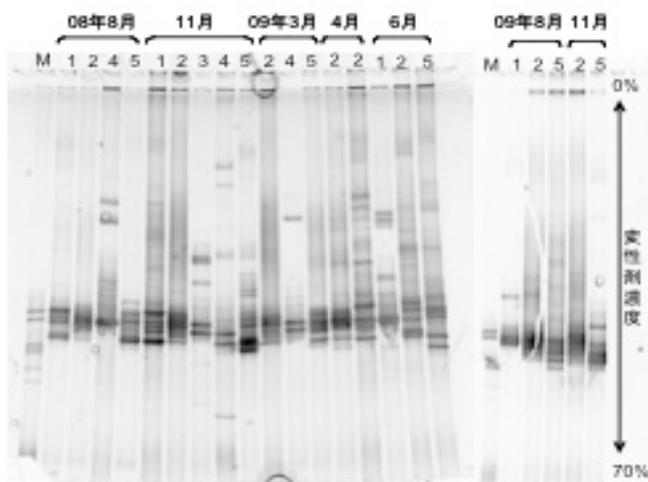


図 2. フィリピンの河川水試料 22 検体についての DGGE 後の電気泳動写真。番号は試料の採水地点を表す。

表 2. 同定されたウイルス型の一例。

ウイルス型	Accession No.
ヒトコクサッキーウイルス A22	AF499643
ヒトコクサッキーウイルス B4	AJ304423
ヒトエコーウイルス 6	AY342892
ヒトエンテロウイルス 90	AB192877
ブタエンテロウイルス 9	AF363453