

水中のエンテロウイルス属の分類への PCR-DGGE 法の適用

東北大学		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⁾³⁾の適用を試みた。DGGE法は遺伝子を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⁴⁾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

フィリピンのマニラ首都圏を流れるパシッグ川およびその支流の5地点で、2008～2009年に河川水試料を計28試料採取した。また実験条件の検討のため、ポリオウイルス1型 Sabin 株 (PV1) と宮城県松島浄化センターで採水した流入下水に PV1 を添加したものをを用いた。

2.2. PCR

AmpliTaQ 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⁵⁾を考慮して、5'UTR 領域を増幅するもの2組 (EV1-EV2, EVU1-EVD1)⁶⁾⁷⁾を用いた (図1)。この2組のプライマーの組み合わせを変更し、さらに GC クランプ³⁾をつける方向を考慮すると計8通りに組み合わせることができる (表1)。これらの組み合わせで PCR-DGGE を行い、最も良い結果が得られるプライマーの選択を行った。プライマーの終濃度は 500nM とし、アニーリング温度はプライマーの文献⁷⁾に従い 52℃とした。



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

	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

2.3. 2 段階 PCR への変更

PCR の検出感度を上げるため 2 段階の PCR を試みた。まず EV1 および EV2 を用いて 1 回目の PCR を行い、得られた PCR 産物 1 μ l を鋳型として表 1 の 1, 2, 7, 8 の 4 通りの条件で 2 回目の PCR を行った。2 回目の PCR では GC クランプ付きのプライマーを使用し、同様にプライマーの組み合わせによる結果の違いを比較した。

2.4. 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 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。

3. 結果と考察

3.1. 1 段階 PCR

表 1 に挙げた 8 種類のプライマーの組み合わせで PCR-DGGE を行ったところ、リバープライマーに EVD1 を用いたものは全ての水試料においてバンドが形成されなかった。このためリバープライマーに EVD1 を用いるのは好ましくないことが示された。一方、アガロースゲル電気泳動の結果をみると、リバープライマーに EV2 を用いると PCR 産物が増幅されにくい傾向がみられた。

3.2. 2 段階 PCR

リバープライマーに EV2 を使用した際の PCR 検出効率を上げるため、EV2 を用いた 4 種類の組み合わせ (表 1 の 1, 2, 7, 8) で 2 段階の PCR を行った。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。しかしフィリピンの河川水試料に対してリバープライマーに GC クランプをつけたときにバンドが形成されなかったため、リバープライマーに GC クランプをつけるのは好ましくないと考えられた。一方、フォワードプライマーについては EV1 および EVU1 のどちらを用いてもバンドが確認できたが、2 段階 PCR では目的 DNA 以外の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。以上より、2 回目の PCR には EVU1-GC および EV2 を使用することが好ましいことが示された。

3.3. 実試料への適用

3.2. で得られたプライマーの組み合わせを用いて、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 PCR-DGGE を行ったところ、全て

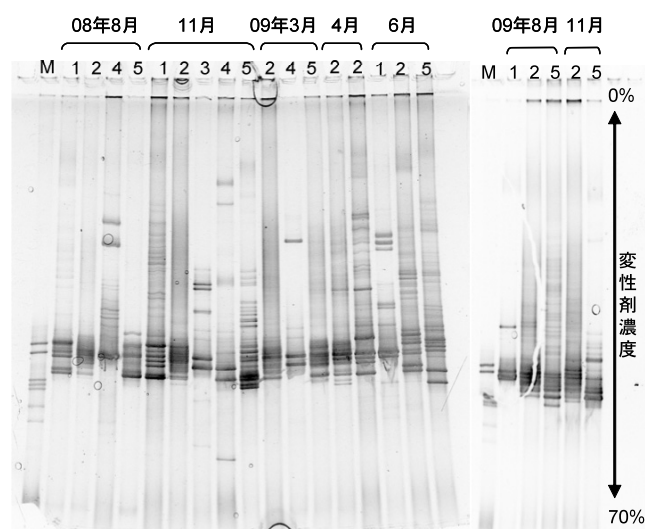


図 2. フィリピンの 22 検体についての DGGE 後の電気泳動写真。番号は試料の採水地点を表す。

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)。以上より、本研究で得られた条件で PCR-DGGE を行うことにより、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。

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。さらにこの条件でフィリピンの河川水について実験を行ったところ、DNA 断片を配列の違いによって分類することができた。

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) Muyzer, G. *et al.*, 1993. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695-700
- 3) Muyzer, G. *et al.*, 1995. *Arch. Microbiol.*, 164, 165-172
- 4) Bosch, A., *et al.*, 2008. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 19, 295-301
- 5) Thoelen, I. *et al.*, 2004. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 963-971
- 6) Muir, P. *et al.*, 1993. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 31-38
- 7) Shen, S. *et al.*, 1997. *J. Virol. Meth.*, 65, 139-144