

パイロシーケンサーを用いたウイルス同定技術の開発

東北大学	学生会員	勝又雅博
東北大学大学院	学生会員	沼澤聡
東北大学大学院	正会員	真砂佳史
東北大学大学院	フェロー会員	大村達夫

1. はじめに

先進諸国では上下水道の整備に伴い、水を介したコレラや赤痢などの病原細菌による感染症の拡大はほとんどなくなったといえるが、ノロウイルスなどの病原ウイルスによる感染症は現在でも毎年流行している¹⁾²⁾。これらの病原ウイルスは患者の糞便中に高濃度で存在するため、我が国の都市域のような下水道が整備された地域では、病原ウイルスは生活排水とともに下水処理場に集約されて処理される。したがって、都市域での感染症の発生を迅速に検知し、感染拡大を防ぐためには流入下水中にどのような病原ウイルスが存在するのかを正確に把握することが必要である。しかし、流入下水中の病原ウイルス全てを素早く正確に同定する技術はまだ確立されていないため、都市域で流行している感染症に対して素早かつ確かな対応をとることができないのが現状である。

下水などの環境試料からのウイルス検出方法としては、個々のウイルスを検出することができる PCR 法が広く用いられている。また遺伝子レベルでのウイルスの同定にはクローニング-シーケンシング法を用いるのが一般的である。しかしクローニング-シーケンシング法は PCR 産物をプラスミドの形で細菌に導入して増幅し、それぞれのクローンの塩基配列を読むため、同じ属でも濃度の低い種の検出は難しく、試料中に存在する全てのウイルスの遺伝子型を同定することは事実上不可能である。

近年、この手法に代わり多くの遺伝子の塩基配列を素早く網羅的に読み取ることのできる次世代シーケンシング法が用いられるようになりつつある。本研究では下水中に存在するウイルスの網羅的同定手法の諸条件を検討するため、ノロウイルス感染者の糞便中のノロウイルスを次世代シーケンサーである GS Junior (Roche Applied Science) を用いて同定し、塩基配列を解析する際の条件設定について検討した。

2. 実験方法

2.1 ウイルス RNA の抽出

ノロウイルス陽性患者の糞便 60μl に PBS を 540μl 加えボルトエクストしたものを 3 検体混合し、試料として用いた。試料 140μl から QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit (Qiagen) を用いて RNA 60μl を抽出した。

2.2 定量 PCR 法によるウイルスの検出

2.1 で抽出した RNA に iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) を用いて逆転写反応を行うことにより cDNA を合成した。合成した cDNA に対して定量 PCR³⁾を行い、試料中にノロウイルス G1 型が存在することを確認した。

2.3 GS Junior によるパイロシーケンシング

2.1 で抽出した RNA に SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit (クロンテック) を用いて逆転写反応と cDNA の増幅をすることにより、増幅産物として二本鎖 cDNA を得た。得られた二本鎖 cDNA を 100 倍に希釈し SsoFast Probes Supermix (Bio-Rad) とプライマー SKG1-F、SKG1-R⁴⁾を用いて PCR を行った。増幅した PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し、GS FLX Titanium rapid Library Preparation Kit (Roche Applied Science) によりアダプターを結合させ、塩基配列を読み取るためのライブラリを作成した。このライブラリに対して次世代シーケンサーである GS Junior (Roche Applied Science) を用いてパイロシーケンシングを行い、ノロウイルスの塩基配列のデータを得た。

2.4 塩基配列の解析

Mac Qiime Ver. 1.6.0⁵⁾を用いて、2.3 で得た塩基配列からクオリティスコアが 25 未満の不正確な配列データを除外した⁶⁾。その後 OTU を作成し⁷⁾、それぞれの OTU から代表配列を 1 つずつ抽出した。OTU の作成条件は類似度がそれぞれ 97%以上、95%以上、90%以上とした。

キーワード：次世代シーケンサー、同定、糞便、下水、ウイルス

連絡先：宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06, TEL : 022-795-7483, E-mail : katsumata@water.civil.tohoku.ac.jp

2.5 系統解析及び遺伝子型の同定

2.4で各OTUから抽出した代表配列と国立感染症研究所が公開しているノロウイルスG1型とG2型の標準株配列⁸⁾をインプットデータとし、MEGA5.0⁹⁾を用いて系統樹を作成した。系統解析はネイバージョイニング法を用いてブーストラップ1,000回の条件で行った。

3. 結果及び考察

作成した系統樹を図1-3に示す。OTUの番号の右に書いてあるのはそのOTUに含まれている配列数である。系統樹を見ると、どのOTUもノロウイルスG1/14型に最近縁であったため、試料の糞便中に含まれていたものは3検体ともノロウイルスG1/14型であると同定することができた。今回はサンプルに糞便を用いたため、G1/14のみしか検出されなかったが、下水をサンプルとして同じ研究を行えば多種多様なノロウイルス種が検出されると考えられる。その際に、類似度の条件設定を変えることにより、下水中に存在する種ごとの割合や、同じ種内での株ごとの遺伝子配列の差異を知ることができると考えられる。

謝辞

本研究は戦略的創造研究推進事業（CREST，科学技術振興機構）および科学研究費補助金（若手A，日本学術振興会）の補助を受けて行われた。

参考文献

- 1) Inoue *et al.*, *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 270-274, 2000.
- 2) Manula *et al.*, *Epidemiology and Infection*, 132, 737-743, 2004.
- 3) Kageyama *et al.*, *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1548-1557, 2003.
- 4) Kojima *et al.*, *Journal of Virological Methods*, 100, 107-114, 2002.
- 5) Caporaso *et al.*, *Nature Methods*, 7, 335-336, 2010.
- 6) Caporaso *et al.*, *Bioinformatics*, 26, 266-267, 2010.
- 7) Edgar *et al.*, *Bioinformatics*, 26, 2460-2461, 2010.
- 8) 片山和彦, ノロウイルスの標準株配列, <http://idsc.nih.go.jp/pathogen/refer/noro-kaisetu1.html>.
- 9) Tamura *et al.*, *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739, 2011.

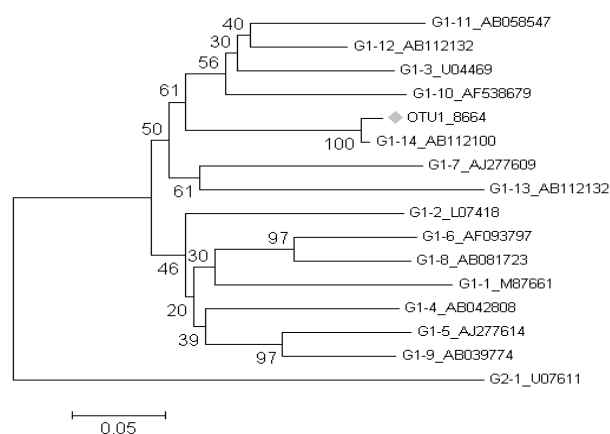


図1 系統樹（類似度 90%以上で OTU を作成した場合）

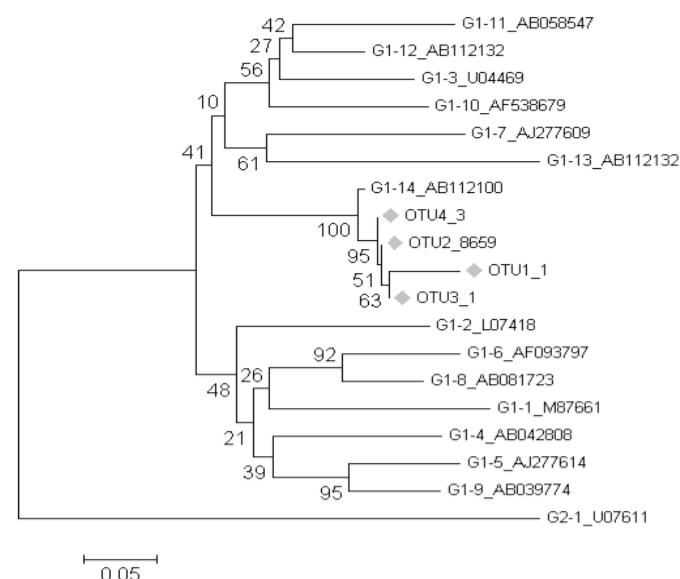


図2 系統樹（類似度 95%以上で OTU を作成した場合）

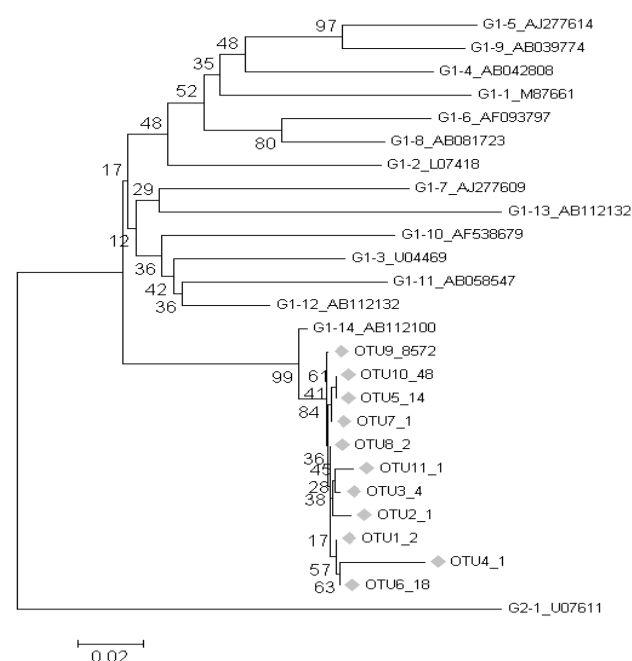


図3 系統樹（類似度 97%以上で OTU を作成した場合）