

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012 ～ 2012

課題番号：24659275

研究課題名（和文）ペプチド核酸プローブによるターゲットイドメタゲノミック診断法の開発

研究課題名（英文）Use of peptide nucleic acid probes for pathogen-targeted metagenomics

研究代表者 安永照雄（YASUNAGA TERUO）

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：20260630

研究成果の概要（和文）：

メタゲノム解析は臨床検体からの網羅的な病原体検出法として重要な方法論の一つとなっている。我々はこの方法論を用いて、これまでにヒト検体の抽出核酸からインフルエンザやノロウイルス、また病原性細菌の直接同定に成功してきた。本研究では、ペプチド核酸プローブにより標的ウイルスゲノムを捕捉し、その後のメタゲノム解析によりウイルスのタイピングや変異解析を可能とする方法論の開発を行った。A 型インフルエンザウイルス間で共通に含まれる保存配列を見出し、その配列を標的とした PNA プローブを合成した。このプローブによる標的ゲノム捕捉効率を、インフルエンザウイルスのマウス感染モデルから得られた検体を用いて評価したところ、マウスゲノム比で未処理の 7 倍に比べ、27 倍まで増加させる効果があることが明らかになった。本研究により PNA プローブによる病原体標的メタゲノム解析の基礎プロトコルを確立した。

研究成果の概要（英文）：

Metagenomics is becoming an important tool for comprehensive pathogen detection from clinical specimens. So far, using this methodology, we have detected pathogenic bacteria, influenza viruses and noroviruses from clinical samples. In this study, to increase the sensitivity and efficiency of our method, we developed a basic protocol for influenza-targeted-metagenomics using a peptide nucleic acid (PNA) probe. A PNA probe that recognizes a conserved sequence among influenza A viruses was designed and synthesized. The efficiency of the probe for target capturing was assessed using a mouse model for influenza infection. We show that treatment of the probe results in a 27-fold increase in the ratio of mouse genome to target DNA, compared to a 7-fold increase without the use of the probe. The protocol established here will serve as a basis for pathogen-targeted metagenomics.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：遺伝子検査学

1. 研究開始当初の背景

近年、メタゲノム解析による病原体検出例は年々その報告数が増加しており、原因不明

の感染症診断にとって重要な方法論の一つとなっている。我々も次世代シーケンサーの登場当初からメタゲノム解析の病原体検出への応用を研究しており、これまでに糞便、血液、咽頭スワブ等のさまざまな臨床検体から病原細菌カンピロバクター、ノロウイルス、A型インフルエンザウイルス、肝炎ウイルスといった原因微生物の同定に成功してきた。

このヒト臨床検体中のメタゲノム解析では、ヒトゲノム由来の遺伝情報がメタゲノムデータの多くを占め、病原体由来の遺伝情報を取得する弊害となっている。臨床検体中の病原体ゲノムをあらかじめ分離することができれば、無駄な情報を省き、病原体のタイピングや変異解析に必要な情報を多く得ることができる。

ペプチド核酸とは核酸アナログの1種でありDNAのリボースリン酸バックボーンをペプチド結合に置換したものである。非天然化合物であることから種々の加水分解酵素、プロテアーゼやDNA加水分解酵素などに耐性を示し、非常に安定である。またDNA-DNA相互作用に比べ、負電荷反発が無いことから、DNAに対する親和性が高く、強く結合することができる。これらの性質から人工核酸プローブの一つとして注目されている。

2. 研究の目的

本研究では、ペプチド核酸プローブにより標的ウイルスゲノムを捕捉し、その後のメタゲノミック解析によりウイルスのタイピングと変異解析を可能とする方法論を開発する。

3. 研究の方法

(1) PNA プローブのデザイン及び合成

ヒト感染性のA型インフルエンザウイルスの完全ゲノムセットをデータベースNCBI Influenza Virus Resourceからダウンロードし、マルチプルアライメントを行った。その結果、3,561配列中に高度に保存されているPB2セグメントの3'末端近傍領域に19塩基からなる保存配列(5'-TTT GGT CGC TGT CTG GCT G-3')を見いだした。そして、この保存配列に塩基相補的なPNAプローブanti-PB2 PNAを設計した。PNA配列の両端には、ウイルスゲノムRNAのリン酸ジエステル上のアニオンに静電相互作用をするカチオン性アミノ酸(Lys)を付与し、C末端側にはPNAをアビジン修飾樹脂に固定化するためのビオチン修飾リシン(Lys(Biotin))とPNA-樹脂間のスペーサーとして2-aminoethoxy-2-ethoxy acetic acidを2つ導入した((Lys)₃-CAG CCA GAC AGC GAC CAA A-Lys-(AEEA)₂-Lys(Biotin))

(N→C末端))を設計した。Anti-PB2 PNAはFmoc-法により固相合成し、HPLCによる分取精製、MALDI-TOF-MSによる質量解析により目的物であることを確認した。

(2) PNA プローブによるインフルエンザゲノムの捕捉

A/Guizhou/54/89 (H3N2)株を経鼻投与(1×10⁵ ffu/head)したマウスから3日目に肺組織を採取し、核酸抽出を行った。この抽出核酸を熱変性させ、Anti-PB2 PNA混和することでハイブリダイゼーションさせた。ストレプトアビジン結合磁気ビーズを用いてAnti-PB2 PNAにハイブリダイズしたインフルエンザウイルス由来核酸を回収した。ビーズへの結合に際して、宿主であるマウス由来核酸の混入を可能な限り防ぐため、界面活性剤(0.05% Tween-20)を含む洗浄バッファーで磁気ビーズを洗浄した。

ウイルス核酸の捕捉効率を評価するため、PB2セグメント中にプライマーを設計し、リアルタイムPCRを行った。この際、2種類のマウスのハウスキーピング遺伝子(*gapdh*および*actB*)の核酸量を同時に定量することで宿主由来核酸とウイルス核酸の存在比率を見積もった。

(3) メタゲノム解析

サンプルより抽出したトータル核酸を逆転写し、Nexteraキット(イルミナ社)を用いてライブラリ調製を行った。調製したライブラリをMiSeq(イルミナ社)に供し、メタゲノムショットガンシーケンシングを行った。得られたシーケンスデータはGenBankのntデータベースに対してBLASTによる相同性検索を行い、系統分類を行った。

4. 研究成果

Anti-PB2 PNAがウイルスゲノムのPB2保存配列を効率的に識別していることを確認するため、influenza A/Osaka/180/2009 (H1N1pdm), A/Beijing/262/95/(H1N1), A/Panama/2007/99 (H3N2), A/Duck/Hong Kong/342/78/(H5N2)の各ウイルスライセートにanti-PB2 PNAを作用させ、マウス白血病ウイルス(MLuV)由来の逆転写酵素によるcDNA合成阻害活性を評価した。その結果、anti-PB2 PNAはいずれのウイルスに対しても0.2-0.5 μMで完全かつ配列選択的にcDNA合成を阻害することがわかった。

一方、ミスマッチ塩基を含むanti-PB2 PNAおよびanti-PB2 PNAと同じ塩基配列を持つが、主鎖骨格がフォスフォロチオエート結合であるanti-PB2 PSを用いてcDNA合成阻害活性を調べたところ、いずれも5.0 μMにお

いても阻害活性を示さなかった。

また anti-PB2 PNA は、同ウイルスがイヌ腎臓培養 (MDCK) 細胞へ感染する初期を阻害することも確認した。以上のことから、anti-PB2 PNA はインフルエンザウイルスのゲノム保存配列を効果的かつ配列選択的に認識することが示唆された。

そこで、anti-PB2 PNA をストレプトアビジン結合磁性ビーズへ捕捉させ、ウイルスゲノムの捕獲および濃縮効率を調べた。リアルタイム PCR の結果、PB2 セグメント/マウス遺伝子の核酸存在比率は、Anti-PB2 PNA 未処理のものでは、7.5 であったのに対し、Anti-PB2 PNA 処理では 27.1 であった。Anti-PB2 PNA とストレプトアビジン結合磁性ビーズを用いることで、宿主由来核酸に対するウイルス核酸を濃縮することが可能となった。

この Anti-PB2 PNA 処理したインフルエンザ感染マウス肺抽出核酸の配列をイルミナ社の MiSeq により解読することでメタゲノム解析を行った。Anti-PB2 PNA 未処理と処理を比較したとき、得られた A 型インフルエンザのリード数の変化は 2 倍以下であった (表)。Anti-PB2 PNA 処理した核酸は未処理のものに比べて総核酸量がピコグラムオーダーにまで低下しており、本研究で行ったシーケンサーのライブラリー調製法では、このような極微量な核酸に含まれるウイルスを定量的に解析するのは困難であると考えられる。ピコグラムオーダーの核酸でもメタゲノム解析の定量性を保持できる手法の開発が今後の課題である。

表. メタゲノム解析結果

	総リード数	マウス由来リード (%)	A 型インフルエンザ (10 万リードあたり)
Anti-PB2 PNA 未処理	225,970	99.2	171
Anti-PB2 PNA 処理	439,162	99.4	130

以上により、PNA プローブを用いた標的核酸の濃縮プロトコルを確立した。リアルタイム PCR での定量結果では確かに標的核酸が濃縮されていることを確認した。しかし、その結果をメタゲノムデータに反映させることはできなかったため、今後、濃縮後の極微量核酸のメタゲノム解析法を確立することでターゲット化メタゲノム解析が可能となるはずである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Kaihatsu K, Sawada S, Nakamura S, Nakaya T, Yasunaga T, Kato N. Sequence-Specific and Visual Identification of the Influenza Virus NS Gene by Azobenzene-Tethered Bis-Peptide Nucleic Acid. PLoS One. 2013 May 21;8(5): e64017. doi:10.1371/journal.pone.0064017 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 中村 昇太, 後藤 和義, 元岡大祐, 飯田 哲也, 堀井 俊宏, メタゲノミック診断法のハイスループット化 生命情報若手の会, 岡崎コンファレンスセンター, 愛知県, 2013.3.1
2. K. Kaihatsu, S. Sawada, T. Kanno, S. Nakamura, N. Goto, T. Nakaya, T. Yasunaga, N. Kato, Identification and inhibition of influenza virus genome replication by a peptide nucleic acid, The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Nov. 15-17, 2012, Nagoya, Aichi.
3. 開発邦宏, 澤田慎二郎, 菅野堯, 中村昇太, 中屋隆明, 後藤直久, 安永照雄, 加藤修雄, ペプチド核酸のインフルエンザウイルスゲノム識別能, 第 6 回バイオ関連化学会, 北海道大学, 北海道, 2012.9.6-8,
4. 中村 昇太, 次世代シーケンサーを用いたメタゲノミクスによる病原微生物探索 水環境学会シンポジウム, 佐賀大学, 佐賀県, 2012.9.11
5. 中村昇太, 感染症メタゲノミクス, NGS 現場の会 第二回研究会, ホテル阪急エキスポパーク, 大阪府, 2012.5.24

[その他]

ホームページ等

<http://imet.gen-info.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安永 照雄 (YASUNAGA TERUO)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号: 20260630

(2) 研究分担者

開発 邦宏 (KAIHATSU KUNIHIRO)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号: 70419464

中村 昇太 (NAKAMURA SHOTA)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：90432434

(3) 連携研究者

中屋 隆明 (NAKAYA TAKAAKI)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：80271633