

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670271

研究課題名(和文)非完全ランダムプライマーによる網羅的ウイルス検出法の開発

研究課題名(英文)Development of diagnostic method for comprehensive viral detection using not so random primer sets

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):我々は次世代シーケンサーによるメタゲノム解析を応用した感染症診断システムを開発している。この方法では、病原体ごとに異なる処理なしに、検体中の核酸をランダムプライマーによる増幅後、網羅的に配列解読し、病原体由来遺伝子を検出する。これまでの取り組みから、検体中に多く含まれるヒトゲノムによる病原体検出感度の低下が問題となっている。そこでヒトゲノムの相対量を減少させる非完全プライマーセットのデザインによる改善を行った。本手法により、インフルエンザウイルス陽性検体において、ヒトゲノム量を減少させ、ウイルス検出量を増やすことが出来たが、環境由来の細菌が多く検出されるなど、解決すべき課題は残された。

研究成果の概要(英文):Unbiased next-generation sequencing approaches enable a diagnostic method for comprehensive pathogen detection. This method employs a single common protocol without specific treatment for each pathogen, which consists of the amplification of DNA/RNA in clinical specimens by a random primer set, metagenomic shotgun sequencing, and identification of pathogenic genes. Our previous studies have revealed that a large amount of human genomic DNA in clinical specimens decreases the sensitivity for pathogen detection. Therefore, we tried to develop the subtraction method for human-derived sequences using not so random primer sets. Using the newly designed primer sets, we were able to subtract the human sequences and amplify the target viral sequences from the specimen of influenza A infection. However, undesirable environmental bacterial sequences were obtained coincidentally. Further study on improving the sensitivity by redesign of the primer sets and protocols needs to be considered.

研究分野：病態検査学

キーワード：感染症 メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

我々は近年急速に発展している次世代シーケンサーによるメタゲノム解析を応用した感染症診断システム“メタゲノミック診断法”を開発している。この方法では、特異的プライマーや病原体毎に異なる複雑な処理なしに、検体中の核酸を完全ランダムプライマーによる増幅後、網羅的に配列解読し病原体由来遺伝子を検出する。これまでにメタゲノミック診断法により咽頭スワブ検体からインフルエンザウイルス、便検体からのノロウイルスの検出、さらに不明肝炎例で血液検体から G 型肝炎ウイルスの同定に成功している。またタイ王国厚生労働省との共同研究で行った原因不明重症肺炎例の網羅的メタゲノム解析の結果、従来の検査の結果陰性になった咽頭スワブ 36 検体中 15 検体からライノウイルスやポカウイルス等、呼吸器感染症の候補ウイルスを検出した。これまでの取り組みから、メタゲノミック診断法の実用化にとって解決すべき課題を見出した。臨床検体中には当然ヒトゲノムが存在し、またトータル RNA には mRNA のみならず rRNA が大量に存在する。これらの遺伝情報が、メタゲノム解析から得られる全体の情報量の多くを占めているため、検出感度が下がること1つの問題である。

この宿主ゲノム除去の解決法として最近、マラリア原虫の発現解析の改善を目的として Not So Random プライマー (“非”完全ランダムプライマーと意識する) が用いられた。非完全ランダムプライマーとは完全なランダムヘキサマーセットから rRNA に当たるヘキサマーを除外し、そのプライマーセットを使って mRNA を解析して感度を改善させるものである。この方法を発展させ、全ウイルス配列をターゲットにした非完全ランダムプライマーを設計し、メタゲノム解析に応用すれば宿主ゲノムや rRNA 由来の増幅産物を減らし、検出感度を向上させることができると考えられる。

2. 研究の目的

メタゲノム解析を応用した網羅的病原体検出法では、ランダムプライマーによる増幅後の核酸を読むため、ヒトゲノムなど病原体以外の遺伝情報の混入が検出感度を下げってしまう問題があった。本研究では、この問題解決のためウイルスの遺伝情報に頻出するヘキサマーを選択し、そのヘキサマーセットを用いたメタゲノム解析によるウイルス検出法の開発を行う。すなわち完全なランダムプライマーではなくウイルスだけをターゲットにした“非”完全ランダムプライマーセットをデザインし、メタゲノムデータ中の宿主ゲノムの相対量を減少させ、病原体の検出感度を上げることを目的とする。また同時に、1 検体あたりの必要データ量を下げることによって、解析コストを低下させることができるため、高コストが最大の障壁である現状の

メタゲノミック診断法の今後の医療現場への応用が期待される。

3. 研究の方法

ウイルスをターゲットとした非完全プライマーの選定を行い、そのプライマーを用いた臨床検体のメタゲノム解析によりデータを取得し、この非完全プライマーによる病原体検出効率を評価する。

(1) ウイルスをターゲットとした非完全プライマーの選定

NCBI の GenBank に登録されている BLAST 検索用核酸データベース nt 中に登録されているウイルス由来の配列を抽出する。取りうるヘキサマー 4,096 通りの配列について、ウイルス由来の配列中に存在する各ヘキサマーの頻度を算出する。また得られた配列の優位性を検討するために、各ヘキサマー配列をランダム化したデータセットと比較し、評価する。得られたウイルス配列特異的頻出ヘキサマーについて合成を行う。

(2) 非完全プライマーの評価

ウイルス配列特異的頻出ヘキサマーを用いて臨床検体中核酸を増幅する。このときに用いる臨床検体は、従来法によって病原体が同定されたものをポジティブコントロールとして用いる。増幅済みの核酸についてメタゲノム解析し、得られたデータを通常の完全ランダムヘキサマーによるデータと比較する。ヒトゲノムの低減について評価する。

(3) メタゲノミック診断への応用

非完全プライマーによる検出感度の向上が見られた場合には、これまでに検出ができなかった原因不明感染症例について再検討を行う。多くの未検出例の核酸保存検体を保有しているので、再度これらの保存検体の RNA から、非完全ランダムプライマーセットを用いて cDNA 化や増幅を行い、ウイルスをエンリッチした網羅的解析を行う。

この網羅的解析により新たに候補病原体が見出された例があった場合は、その候補病原体特異的なりアルタイム PCR により、臨床検体中にどれくらいの核酸量が存在したのかを定量し、完全ランダムプライマーとウイルスターゲット非完全プライマーセットの検出限界を評価する。異なる非完全ランダムプライマーセットの評価において検出限界に不足があった場合は、引き続き非完全ランダムプライマーセットの評価スクリーニングを行い、より検出感度を向上したウイルスターゲット非完全ランダムプライマーセットを見出す。

4. 研究成果

(1) ウイルスをターゲットとした非完全プライマーの選定

NCBI の GenBank に登録されている BLAST

検索用核酸データベース nt 中に登録されているウイルス由来の配列は約 1600 万配列が存在しており、その中でウイルスに帰属される核酸配列は 1,158,715 配列存在していた。これら約 100 万のウイルス由来の配列を GenBank から取得し、それらの配列中のヘキサマー頻度について計算を行った。得られた頻度分布から、有意性の検討は同じ配列でランダム化したデータセットと比較し、ウイルス中の頻出ヘキサマーを抽出した。その結果、取り得る 4,096 通りの配列中、1,892 配列がウイルス中で有意に見出されることが明らかになった。これらについてその有意性が高い一部の配列の化学合成を行った。

(2) 非完全プライマーの評価

Influenza A virus 陽性の臨床検体(鼻腔洗浄液)からの抽出 RNA に対して、ランダムヘキサマーおよび非完全ランダムプライマーを用いて、逆転写反応および DNA 増幅を行った。得られた DNA について、Illumina MiSeq を用いたメタゲノム解析を行い、ランダムヘキサマーを用いたサンプルからは、113,916 配列、非完全ランダムプライマーを用いたサンプルからは、159,332 配列を得た。得られた全配列について、NCBI-nt データベースを対象とした BLASTn 検索および各配列のアノテーションを行ったところ、Influenza A virus に由来する配列は、非完全ランダムプライマーを用いることで、ランダムプライマーを用いた場合よりもシークエンスリード当たり 1.8 倍多く得られており、非完全ランダムプライマーを用いることでウイルス検出感度を約 2 倍向上させることが出来た。また、ランダムプライマーを用いたサンプルでは、NA および HA 遺伝子に由来する配列が見つかったが、非完全ランダムプライマーを用いたサンプルからは、上記に加え、PA および PB1 の全 4 遺伝子由来の配列が見つかっており、非完全ランダムプライマーを用いることでよりゲノムワイドな解析が出来たことがわかった。

次いで、ヒトゲノムの低減率についての評価を行った。得られた全配列中の各生物種の割合は図 1 に示すとおりである。

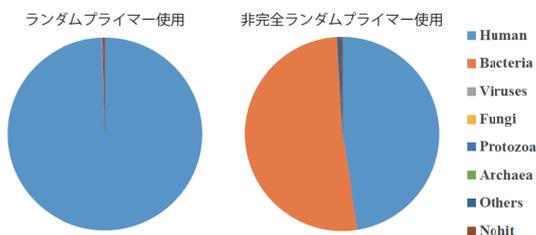


図 1. メタゲノムデータ中の各生物の相対割合

ランダムプライマーを用いたサンプルのメタゲノムデータは、99%がヒトゲノム由来

の配列であったのに対し、非完全ランダムプライマーを用いた場合は 47%にまで減少した。このことから、ヒトゲノム由来配列の相対割合を減らすことができた。一方で、バクテリア由来配列の相対割合は、0.1%から 52%へと増大した。非完全プライマーを用いた場合に検出されたバクテリアの大部分は、*Achromobacter xylosoxidans* であった。本細菌は、環境中に広く見られる細菌であり、プライマーの一致か何かしらの原因で本細菌が、特異的に増幅されてしまったものと思われる。プライマーセットと *A. xylosoxidans* の関連性については調べたもののわからなかった。その後、プライマーセットを変更し、非完全ランダムプライマーの有用性について評価したが、同様の結果であった。以上より、ウイルス配列数を相対的に増やし、ヒトゲノムの配列数を相対的に減らすことには成功しているため、さらなる検討によって非完全ランダムプライマーの実用性が見込まれる。しかし現時点では、生物種によっては偏った結果が得られるため、非完全ランダムプライマーを用いて網羅的な解析を行う上での十分な効率化は達成できていない。

(3) メタゲノミック診断への応用

今回の検討においては、非完全ランダムプライマーを用いても十分な効率化が見られなかったため、原因不明感染症例に対して応用するには至らなかった。そこで代替法として、DNA 分解酵素を用いた病原体検出の効率化を検討した。多くのウイルスが RNA ウィルスであるというだけでなく、臨床検体中に存在する宿主ゲノム由来の DNA は、その大部分がフリーの核酸として存在しているのに対し、大部分のウイルスはパーティクルの状態、また細菌は細胞壁に守られた状態で存在していると考えられる。そのため、DNA 分解酵素によって宿主ゲノムのみを選択的に分解することができると考えた。DNA 分解酵素としては、DNaseI を用いた。この改良したメタゲノム解析法を用いて、大阪大学医学系研究科との共同研究を行い、アレルギー性気管支炎例から *Aspergillus fumigatus* と *Schizophyllum commune* の共感染や重症肺炎例から *metapneumovirus* の共感染、また感染症心内膜炎例の 3 例から *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* を同定し、それぞれ学術雑誌に報告した。

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 7件)

Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya

T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Akari H, Matsuzawa T, Hirai H, Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) by SRV-4 after transmission to a novel host, *Sci Rep*, 査読有, 5, 2015, 8850, doi: 10.1038/srep08850

Motooka D, Nakamura S, Hagiwara K, Nakaya T. Viral detection by high-throughput sequencing, *Methods Mol Biol*, 査読無, 1236, 2015, 125-34, doi: 10.1007/978-1-4939-1743-3_11

Miyamoto M, Motooka D, Gotoh K, Imai T, Yoshitake K, Goto N, Iida T, Yasunaga T, Horii T, Arakawa K, Kasahara M, Nakamura S. Performance comparison of second- and third-generation sequencers using a bacterial genome with two chromosomes, *BMC Genomics*, 査読有, 15, 2014, 699, doi: 10.1186/1471-2164-15-699

Imai A, Gotoh K, Asano Y, Yamada N, Motooka D, Fukushima M, Kanzaki M, Ohtani T, Sakata Y, Nishi H, Toda K, Sawa Y, Komuro I, Horii T, Iida T, Nakamura S, Takashima S, Comprehensive metagenomic approach for detecting causative microorganisms in culture-negative infective endocarditis. *Int J Cardiol*, 査読有, 172, 2014, e288-9, doi: 10.1016/j.ijcard.2013.12.197

Niimi M, Masuda, T, Kaihatsu K, Kato N, Nakamura S, Arai F, Virus purification and enrichment by hydroxyapatite chromatography on a chip, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 査読有, 201, 2014, 185-190, doi:10.1016/j.snb.2014.04.011

Seki M, Ohno H, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Miyazaki Y, Tomono K. Allergic bronchopulmonary mycosis due to co-infection with *Aspergillus fumigatus* and *Schizophyllum commune*, *ID Cases*, 査読有, 1, 2014, 5-8, doi:10.1016/j.idcr.2014.01.001

Seki M, Yoshida H, Gotoh K, Hamada N, Motooka D, Nakamura S, Yamamoto N, Hamaguchi S, Akeda Y, Watanabe H, Iida T, Tomono K, Severe respiratory failure due to co-infection with human metapneumovirus and *Streptococcus pneumoniae*, *Respiratory Medicine Case Reports*, 査読有, 12, 2014, 13-15, doi:10.1016/j.rmcr.2013.12.007

〔学会発表〕(計 2件)

中村昇太、次世代シーケンスの過去・現在・未来～ウイルス研究に与えるインパクト、第62回 日本ウイルス学会学術集会、2014年11月11日、パシフィコ横浜

Shota Nakamura, Genomics and Metagenomics using 2nd and 3rd Generation Sequencers, DMSc-NIH Seminar, 2014年7月3日、ノンタブリ(タイ)

〔図書〕(計 1件)

二階堂愛、中村昇太、他、羊土社、次世代シーケンス解析スタンダード NGSのポテンシャルを活かすWET&DRY、2014年、31-38

〔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

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