

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14651

研究課題名(和文) ウイルス薬剤耐性にかかわる一塩基変異の迅速診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a rapid diagnostic for detecting single base mutation related to viral drug-resistance

研究代表者

開発 邦宏 (Kaihatsu, Kunihiro)

大阪大学・産業科学研究所・特任准教授(常勤)

研究者番号：70419464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでウイルス感染の迅速診断は、感染患者の臨床検体中に含まれるウイルス由来の蛋白質を金ナノコロイド修飾抗体により捕獲し、メンブレン上にバンドとして検出するイムノクロマト法が用いられてきた。一方、申請者らはウイルス粒子に含まれる遺伝子をオリゴヌクレオチドにより配列選択的に捕獲する独自技術を開発することに成功している。

本研究では、インフルエンザウイルスの薬剤耐性に関わる遺伝子の一塩基変異を厳密に識別するための核酸に対する化学修飾技術を開発することに成功した。さらに、この化学修飾核酸分子を用いてメンブレン上にインフルエンザウイルスの薬剤耐性と薬剤感受性を目視で識別することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Current virus detection from clinical sample relies on immunochromatography that captures and detects its target viral protein by gold nanoparticle-conjugate antibody. On the other hand, we have established a method to capture the target viral gene within the viral particle by short oligonucleotide and visualized the gene using gold nanoparticles.

In this study, we succeeded to distinguish a drug-resistance of influenza virus by improving the sequence specificity of short oligonucleotide with a simple chemical modification. We further visually distinguished drug-resistant and drug-sensitive influenza virus on a membrane by our chemically-modified nucleic acid.

研究分野：核酸化学

キーワード：遺伝子 核酸 一塩基多型 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

現在、臨床現場でウイルスの存在を迅速に診断する手法としては、ウイルス蛋白質を抗体にて検出するイムノクロマトグラフィーが用いられている。例えば、インフルエンザウイルスの場合は、同ウイルス蛋白質がイムノクロマトグラフィーにより検出されると、医師はウイルス増幅に関与するノイラミニダーゼ（酵素）の阻害剤を処方するのが一般的である。

ところが昨今、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子に変異が生じ、ノイラミニダーゼ阻害剤が効かない“耐性獲得株”が伝播している為、必ずしもインフルエンザウイルス感染にノイラミニダーゼ阻害剤が有効でないことが問題となっている。

このような背景の中、インフルエンザウイルスの検出に加え、その薬剤耐性についても迅速、且つ簡便に評価できる手法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

これまで我々は、インフルエンザウイルスの遺伝子（ゲノム）配列に対して2本の相補配列を持つペプチド核酸(PNA)を利用して、ウイルスゲノムを強固に捕獲後、同ウイルスゲノムに随伴する蛋白質を金コロイド修飾抗体により標識することで（図1A）、ラテラルフローストリップ上でウイルスゲノムを可視化することに成功した（図1B）。

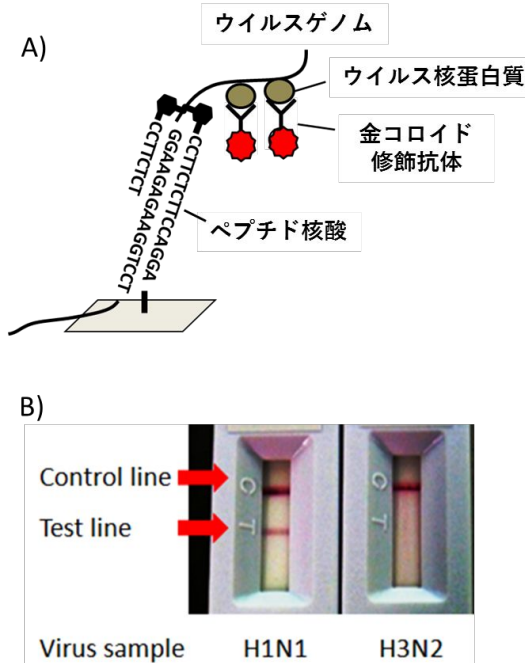


図1 .A)ウイルスゲノムに相補鎖を2本有するペプチド核酸を用いてウイルスゲノムを捕獲、同ゲノムに随伴する核蛋白質を金コロイド修飾抗体により標識するシステム。B)ラテラルフローのテストライン上にてインフルエンザウイルスの“ゲノム-蛋白質-金コロイド修飾抗体”の複合体を目視検出。

また、PNAのアミノ末端領域にトラン誘導体(tolane)を修飾すると、その標的配列に対する会合能が高められるとともに、トラン誘導体の最近傍にある核酸塩基から4塩基以内にあるミスマッチ塩基対をより選択的に識別することを見出している（データ省略）。

本研究では、PNAの標的ゲノム識別能を高める独自の分子設計戦略に基づき、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ酵素の薬剤耐性に関わる遺伝子一塩基変異を高感度に検出診断することを目指した。

3. 研究の方法

インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ阻害剤耐性は、ノイラミニダーゼの触媒活性部位に存在する274番目のヒスチジンがチロシンに変異することでノイラミニダーゼ阻害剤が結合できなくなることによるものである（H274Y）。

このアミノ酸置換は、主にノイラミニダーゼ遺伝子が薬剤感受性の5'-cucauaaugaaa-3'から薬剤耐性の5'-cucauaauaaaa-3'（配列一部省略）へ1塩基変異に由来することがわかった。そこで、この1塩基変異部分を認識するペプチド核酸(PNA)を合成するとともに、PNAのアミノ末端にその標的核酸配列に対する識別能を高めるトラン誘導体(tolane)を導入した。そして、各PNAの遺伝子1塩基変異に対する識別能をPNA/RNA間の二本鎖が50%融解する温度(Tm)により評価した。

また、各PNAによりインフルエンザウイルスのゲノムRNAを捕獲して、図1A、Bに示すように、ラテラルフローストリップ上で可視化することを試みた。

4. 研究成果

インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ阻害剤耐性ウイルスのゲノムに相補的なPNA1(X-spacer- GTGTATTATTTT, C → N term)を調整した。

またPNA1のアミノ末端にTolane誘導体(図2)を修飾したPNA2(X-spacer-GTGTATTATTTT-tolane C → N-term)を合成した。

各PNAのC-term)にはラテラルフローストリップ上の官能基と反応する置換基Xを導入し、置換基XとPNA配列との間には、ラテラルフローストリップとPNAの間に適度な距離を保つ為のスペーサー分子を導入した。

次に、各PNAの薬剤耐性ウイルスのゲノム配列(Res-RNA)、又は薬剤感受性ウイルスゲ

ノム配列(Sens-RNA)を含むオリゴ RNA に対する会合能を、PNA/RNA の二本鎖が 50% 解離する温度(T_m)を解析することにより求めた。

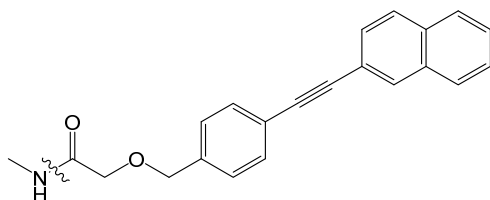


図 1 . PNA のアミノ末端に導入したトラン誘導体(Tolane)

その結果、PNA 1 に対して、PNA 2 は Res-RNA への会合能が 3.6 向上するとともに、Sens-RNA への会合能が 8.7 低下し、1 塩基識別能が 12.3 向上 ($T_m = 23.8$) することが明らかになった(表)。

	T_m [$^{\circ}\text{C}$] w/ Res-RNA	T_m [$^{\circ}\text{C}$] w/ Sens-RNA	ΔT_m
PNA 1	51.7	40.2	11.5
PNA 2	55.3	31.5	23.8

表 . PNA 1, PNA 2 の Res-RNA、及び Sens-RNA に対する会合特性を融解温度(T_m)により評価。

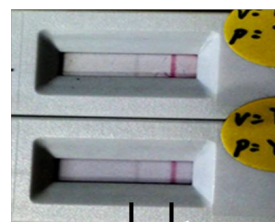
次に、PNA 1, PNA 2 を薬剤耐性ウイルス(Res-virus)と薬剤感受性ウイルス(Sens-virus)の溶解液と反応させ、ラテラルフローストリップ上にてゲノム配列選択的に捕獲できるかを目視にて評価した。

その結果、PNA 1 はテストライン上に Res-virus だけでなく、Sens-virus も捕獲し、その存在を赤色バンドとして示すことが明らかとなった(図 3A)。

一方、PNA 2 は本来標的とする薬剤耐性ウイルスのゲノムのみをゲノム配列選択的に捕獲することが赤色バンドの強度比から示された(図 3B)。

これらの結果は、前表に纏めた PNA 1, 2 とウイルスゲノム相同配列を持つ Res-RNA, Sens-RNA との会合特性の尺度となる融解温度(T_m)の解析結果と相関を示した。

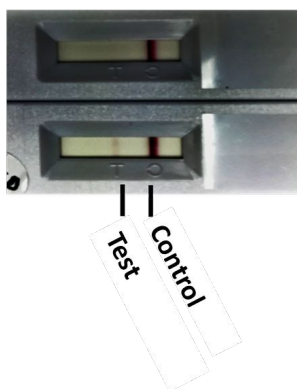
PNA 1



薬剤感受性

薬剤耐性

PNA 2



薬剤感受性

薬剤耐性

図 3 . PNA-tolane (上図) 又は PNA (下図) を用いたウイルスの薬剤耐性識別。PNA-tolane(PNA 2)は薬剤耐性ウイルスを選択的に検出したが、未修飾の PNA (PNA 1)は薬剤耐性だけでなく、薬剤感受性のウイルスを非特異的に検出した。

本研究により、インフルエンザウイルスのゲノムに相補鎖を持つ PNA-tolane を用いれば、ゲノムの一塩基変異による薬剤耐性/感受性を遺伝子増幅操作に頼らず見極められることが明らかとなった。

現在、同ウイルスが 10^4 ffu/ml 以下であっても高感度に検出できる技術、さらにはウイルスが高濃度(10^7 ffu/ml 以上)であっても偽陽性を抑制する技術の開発を進めている。

本技術は、あらゆる感染症の薬剤耐性診断、及び治療薬の選定に有用な指針を与える診断技術になりうると期待される。

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)

開發邦宏、「ペプチド核酸クロマトを用いたウイルスゲノム情報の目視診断技術」、羊土社、34[16]、2016、2688-2688

[学会発表](計 1 件)

開發邦宏、原田絵美、加藤修雄、化学修飾ペプチド核酸を用いたウイルスのゲノム検出、日本化学会 第 97 春季年会、横

浜, 2017.3

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称:

発明者: 開発邦宏、高木賢治、加藤修雄

権利者: 大阪大学

種類: 国際出願

番号: PCT/JP2016/077597

出願年月日: 2016年9月17日

国内外の別: 国外

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

開発 邦宏 (KAIHATSU, Kunihiro)

大阪大学 産業科学研究所・特任准教授

研究者番号: 70419464

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

竹中 綾 (TAKENAKA Aya)