

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6233931号
(P6233931)

(45) 発行日 平成29年11月22日(2017.11.22)

(24) 登録日 平成29年11月2日(2017.11.2)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 Z N A A
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 1 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2014-525878 (P2014-525878)	(73) 特許権者	305060567 国立大学法人富山大学 富山県富山市五福3190
(86) (22) 出願日	平成25年7月19日(2013.7.19)	(74) 代理人	100114074 弁理士 大谷 嘉一
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/069598	(72) 発明者	大黒 徹 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷 キャンパス内
(87) 国際公開番号	W02014/014077	(72) 発明者	白木 公康 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷 キャンパス内
(87) 国際公開日	平成26年1月23日(2014.1.23)		
審査請求日	平成28年7月18日(2016.7.18)	審査官	吉田 知美
(31) 優先権主張番号	特願2012-161040 (P2012-161040)		
(32) 優先日	平成24年7月20日(2012.7.20)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイトメガロウイルスの薬剤耐性変異の検出方法および薬剤耐性変異遺伝子の同定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

サイトメガロウイルスの薬剤耐性変異の同定方法であって、以下の工程を含む同定方法。

(1) 工程1: サイトメガロウイルスのUL97遺伝子の後半領域の約1.3kbpを以下のプライマーセット(A)でPCR法によりPCR反応を30回以上行うことで増幅して塩基配列を解析し、アミノ酸変異の有無を調べる工程、

<プライマーセット(A)>

プライマー1: 5' - t g c c c a a a g a g g a c g a t t t t - 3' (配列番号1)

プライマー2: 5' - g t a g t c c a a a c t c g a g a c g c - 3' (配列番号2)

(2) 工程2: サイトメガロウイルスのUL54遺伝子のほぼ全域の約3.4kbpを以下のプライマーセット(B)またはプライマーセット(C)でステップダウンPCR法により増幅して塩基配列を解析し、アミノ酸変異の有無を調べる工程とを有する。

<プライマーセット(B)>

プライマー3: 5' - a c g g t c a g a c g g g g t t g a t c a a g c a - 3' (配列番号3)

プライマー4: 5' - a g c a c g t t g g t t a c a g c c t t g a g a a c c t - 3' (配列番号4)

< プライマーセット (C) >

プライマー 5 : 5 ' - t c a t t g c c a g c g t g g g c g a a c t a g t g - 3 ' (配列番号 5)

プライマー 4 : 5 ' - a g c a c g t t g g t t a c a g c c t t g a g a a c c t - 3 ' (配列番号 4)

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、サイトメガロウイルスの薬剤耐性変異の迅速な検出方法およびサイトメガロウイルスの薬剤耐性変異遺伝子の同定方法に関する。

10

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

サイトメガロウイルスは、ヘルペスウイルス科に属する 2 本鎖 DNA ウイルスであり、幼児期に不顕性感染し、一生涯にわたり潜伏感染する。

サイトメガロウイルス (C M V) による感染は、人類の最大の感染症であり、米国では出生時期の C M V 感染による難聴や精神発育遅延など恒久的な医療補助が必要とされる患者は 5 0 0 0 人程とされる。

また、移植や医療の高度化、H I V 感染等による免疫不全時に、C M V は肺炎、網膜炎、消化管潰瘍等の疾病を引き起こす。

その治療に、ガンシクロビル、フォスカビル、シドフォビル等の抗 C M V 薬が使用されるが、臓器移植患者における長期の予防投与などにより、耐性ウイルスの出現が問題となっている。

20

C M V の薬剤耐性は、上記の治療薬の作用機序に関わる遺伝子の変異により生じる。

例えば、ガンシクロビルは、C M V の DNA ポリメラーゼを阻害するために、C M V の U L 9 7 遺伝子にコードされるリン酸転移酵素でリン酸化されることが活性型になる要件である。

そのため、C M V のガンシクロビル耐性株は、U L 9 7 遺伝子に変異を持つか、または DNA ポリメラーゼをコードする U L 5 4 遺伝子に変異を持つことが知られている (非特許文献 1) 。

【 0 0 0 3 】

30

【非特許文献 1】日本臨床, V o l . 6 5 増刊号 2, 4 7 6 - 4 7 9 (2 0 0 7)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 4 】

患者から分離された C M V の薬剤感受性を調べるため、U L 9 7 遺伝子と U L 5 4 遺伝子の塩基配列の決定が必要である。

しかしながら、従来の方法では、患者から分離された試料より得られる DNA 量が少ないため、直接 P C R でそれらの遺伝子の O R F 全領域を増幅することはその困難であった。

すなわち、これまでは患者のリンパ球を分離し、培養細胞に重層し、ウイルスが増殖するのを待ち、ウイルス粒子を超遠心で濃縮し、ゲノム DNA を精製し、P C R を行っていた。

40

この方法では、最終的に塩基配列を決定するまでに 2 ヶ月弱の時間を要していたため、臨床現場へのフィードバックまでに大幅に時間がかかっていた。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 5 】

本発明者らは、ウイルスを増殖させる時間を省き、薬剤感受性に関係する塩基配列を短時間で決定する方法の開発を試みた。

その結果、これまでに報告されていないプライマーのセットを考案し、薬剤耐性遺伝子 U L 9 7 と U L 5 4 の遺伝子を増幅できる条件を決定した。

50

そして、両遺伝子の塩基配列を決定し、薬剤耐性遺伝子とが同定した。

さらに、その遺伝子と、ウイルス分離を行ったウイルスの遺伝子との配列は同一であり、この方法の有用性も確認した。

以下に本発明を詳細に説明する。

【0006】

(1) UL97 遺伝子の変異

CMVのUL97 遺伝子産物(707アミノ酸、2124塩基)は、蛋白質リン酸化活性を有する酵素で、ガンシクロビルなどの抗CMV薬をリン酸化し、活性型へと誘導することが知られている。

すなわち、ガンシクロビルに耐性を獲得したCMVの多くはUL97 遺伝子に変異を持つことが、これまで種々の耐性CMVの遺伝子解析からも報告されている。

また、これらの研究からガンシクロビル耐性に関わるUL97 遺伝子の変異は、全長で707アミノ酸の内、400番目のアミノ酸以降の後半に集中している。

そこで、新たに下記のプライマーセット(A)を設計した。

【0007】

<プライマーセット(A)>

・プライマー1(UL97 forward primer)

5' - t g c c c a a a g a g g a c g a t t t t - 3' (配列番号1)

【0008】

・プライマー2(UL97 reverse primer)

5' - g t a g t c c a a a c t c g a g a c g c - 3' (配列番号2)

【0009】

(2) UL54 遺伝子の変異

UL54 遺伝子産物は、DNA合成酵素の活性を担っており、これまでの研究によりガンシクロビル、シドフォビルに対する耐性、フォスカビルに対する耐性に関わる変異箇所が報告されてきている。

そこで、新たに下記のプライマーセット(B), (C)を設計した。

【0010】

<プライマーセット(B)>

・プライマー3(UL54 forward primer 1)

5' - a c g g t c a g a c g g g g t t g a t c a a g c a - 3' (配列番号3)

【0011】

・プライマー4(UL54 reverse primer 1)

5' - a g c a c g t t g g t t a c a g c c t t g a g a a c c t - 3' (配列番号4)

【0012】

<プライマーセット(C)>

・プライマー5(UL54 forward primer 2)

5' - t c a t t g c c a g c g t g g g c g a a c t a g t g - 3' (配列番号5)

・プライマー4(UL54 reverse primer 1)

【0013】

本発明の方法は、以下の手順で行えばよい。

(1) 患者の尿や血液から分離したリンパ球からDNAを抽出する。

(2) 抽出したDNAをPCRする際、以下の操作を行う。

a) PCR反応のサイクル数を増やす。

b) 遺伝子変異領域に絞って増幅を行い、その増幅距離を短くする。

上記の手順で実施することにより、少ないDNA量から効率よく必要な塩基配列を決定することができる。

【0014】

患者の尿や血液からリンパ球の分離および分離したリンパ球からのDNAの抽出は、公

10

20

30

40

50

知の方法を用いればよい。

【0015】

PCR反応のサイクル数を増やすとは、例えば、PCR反応を30回以上、好ましくは、35回～50回行うことである。

【0016】

微量のDNAサンプルから増幅するためには、例えば、プライマーセットを2種類組み合わせ合わせたNested PCR法がよく用いられている。

しかし、PCR反応を2度行う必要があり、PCR反応終了後に希釈や一度目のPCRに使ったプライマーを除去するなど手技が複雑になり所用時間もかかる。

本発明方法では、最初は厳しい条件でPCR反応を行い、少しずつアニーリングの温度条件を緩和していくことで、非特異反応を軽減し、目的の遺伝子の高率な増幅を行う。

具体的には、ステップダウンPCRでアニーリングの温度を68～70 から1サイクルごとに1 ずつ下げながら約10サイクル増幅を行う。

【0017】

遺伝子変異領域に絞って増幅とは、UL97遺伝子の変異として既に報告された遺伝子変異領域のことである。

具体的には、全長で707アミノ酸の内、400番目のアミノ酸以降の後半である。

この領域の変異を検出するためには、上記のプライマーセット(A)(プライマー1およびプライマー2)でUL97遺伝子の後半の遺伝子領域(約1.3kbp)を、PCR法により増幅して塩基配列を解析し、さらにアミノ酸変異の有無を検討すればよい。

塩基配列の解析およびアミノ酸変異の検討は公知の方法で行えばよい。

【0018】

UL54遺伝子の変異を検出するには、上記のプライマーセット(B)または(C)(プライマー3～5)でUL54遺伝子のほぼ全領域に相当する約3.4kbp(53番目から1200番目のアミノ酸をコードする領域)をPCR法で増幅して塩基配列を解析し、アミノ酸変異の有無を検討すればよい。

塩基配列の解析およびアミノ酸変異の検討は公知の方法で行えばよい。

【発明の効果】

【0019】

本発明方法および本発明のプライマーは、UL97遺伝子の薬剤耐性に関わる変異が報告されている後半の領域と、UL54遺伝子領域の92%以上に相当する領域の解析を可能とした。

これにより、サイトメガロウイルス全ての薬剤耐性変異株を検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】UL97のPCRの結果を示す写真である。UL97の既報の薬剤耐性に関与するアミノ酸変異が多いC末より300のアミノ酸をコードする領域に対するPCR。矢印で示した場所に約1.3kbpの増幅が認められる。

【図2】UL54のPCRの結果を示す写真である。UL54のATGから155bp、509bp離れた領域から、3602bp離れた領域までのPCR。なお、CMVのUL54のCDSは3729bpである。

【図3】UL54のアミノ酸比較である。分離株1では、355番目のバリンからアラニンに、688番目のアラニンからバリンへの変異がある。なお、3157および3301は、乳児の尿からの分離株、HAN13は、気管支肺胞洗浄からの分離株である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

以下、本発明を実施例で説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】

【0022】

(1)患者の血液・尿から分離したリンパ球からDNAの抽出

10

20

30

40

50

患者の血液は凝固させないように、EDTAを加えた状態のものを使用した。

患者血液をリン酸緩衝生理食塩液 (phosphate-buffered saline; PBS) で2倍に希釈し、密度勾配遠心用担体 (Ficoll) を3mL加えた15mLチューブに静かに重層し、低速 (1,500rpm 30分) 遠心分離を行う。

リンパ球は赤血球と血清の境界面に集積するので、静かにこれを抜き取る。

サイトメガロウイルスのゲノムDNAの抽出には、キアゲン (Qiagen) 社のQIA Blood DNA extraction mini kit、もしくはロシュ (Roche) 社のHigh Pure Viral Nucleic Acid Kitを使用した。

患者の全血より分離した血漿、末梢血リンパ球200 μ L、もしくは尿200 μ Lに溶解buffer AL (Qiagen)、またはBinding Buffer (Roche) を加え常法により抽出を行った。

10

【0023】

(2a) 抽出したDNAのPCR (その1)

サイトメガロウイルスのリン酸化酵素をコードしているUL97およびDNA合成酵素をコードしているUL54遺伝子領域をPCRで増幅する。

<反応液の作成>

5 μ M Primer Forward : 2 μ L

5 μ M Primer Reverse : 2 μ L

10 \times KOD FX neo buffer : 5 μ L

20

2mM dNTP : 5 μ L

KOD FX neo DNA polymerase : 0.5 μ L

Template DNA : 5 μ L

dw : 30.5 μ L

Total : 50 μ L

【0024】

<反応条件 (UL97)>

96、5min

96、30sec

58、15sec (30 cycle 繰り返す。)

30

72、1min 30min

72、7min

4、

【0025】

<反応条件 (UL54) ステップダウンPCR>

94、2min

98、10sec

70、30sec [10 cycle 繰り返す。(1 cycleごとに1 / ずつアニーリングの温度を下げる。)]

40

68、5min

98、10sec

60、30sec (45 cycle 繰り返す。)

68、5min

【0026】

(2b) 抽出したDNAのPCR (その2)

サイトメガロウイルスのリン酸化酵素をコードしているUL97およびDNA合成酵素をコードしているUL54遺伝子領域をPCRで増幅する。

<反応液の作成>

5 μ M Primer Forward : 2 μ L

5 μ M Primer Reverse : 2 μ L

50

2 x KOD FX neo buffer : 25 μ L
 2mM dNTP : 5 μ L
 KOD FX neo DNA polymerase : 1 μ L
 Template DNA : 5 μ L
 dw : 10 μ L
 Total : 50 μ L

【0027】

<反応条件 (UL97)>

96、5 min
 96、30 sec
 58、15 sec (30 cycle 繰り返す。)
 72、1 min 30 min
 72、7 min
 4、

10

【0028】

<反応条件 (UL54) ステップダウン PCR >

94、2 min
 98、10 sec
 68、30 sec [10 cycle 繰り返す。(1 cycle ごとに1 /
 ずつアニーリングの温度を下げる。)]
 68、5 min
 98、10 sec
 58、30 sec (45 cycle 繰り返す。)
 68、5 min

20

【0029】

アガロースゲル電気泳動で目的のサイズのバンドが増幅されているかを確認する。

複数のバンドが見られる場合は、アガロースゲル電気泳動後、切り出し精製をおこなう。

1本バンドの場合はPCR反応後の反応液から clean up kit を用いてプライマーを除去する。

30

図1にUL97のPCRの結果の写真例を示し、図2にUL54のPCRの結果の写真例を示す。

【0030】

(3) 塩基配列の解析

<シーケンス反応液の調製 >

ABI 5x buffer : 3.5 μ L
 ABI Big Dye Terminator V3.1 : 1 μ L
 Dw : 12.5 μ L
 Template DNA : 2 μ L
 Primer : 1 μ L

40

【0031】

<シーケンス反応のプログラム >

96、1 min
 96、10 sec
 50、5 sec (28 cycle 繰り返す。)
 60、4 min
 4、

【0032】

エタノール沈殿により過剰な蛍光物質を除去する。

上記反応液 : 20 μ L

50

99.5%エタノール：70 μ L
62.5mM EDTA：10 μ L
Total：100 μ L

【0033】

ボルテックスミキサーでよく攪拌し、室温15分放置

12,000rpm \times 15min 遠心

上清を完全に抜き取る。

70%エタノール100 μ Lを加える。

12,000rpm \times 10min 遠心

上清を完全に抜き取る。

乾燥(10~15分放置)

95 ヒートブロックかサーマルサイクラーを準備

Hi-Di Formamide 15 μ Lを各チューブに入れる。

【0034】

95、2min

氷中で5min以上冷やす。

シーケンス用プレートに気泡ができないようにサンプルを移す。

セプタをかぶせる。

シーケンス解析 ABI (Applied Biosystems) 3130 DNA sequencerにて塩基配列の決定。

【0035】

(4) アミノ酸変異の検討

上記実験結果から塩基配列をGENETYX 遺伝子解析ソフトによりこれまで報告されているサイトメガロウイルスのUL97, UL54 遺伝子と相同性の比較検討を行った。

また、得られた塩基配列からアミノ酸配列に変換し、アミノ酸置換の有無を検討した。

アミノ酸配列に変異が認められた場合は、これまで報告されているガンシクロビルまたはフォスカビル耐性に関わる変異箇所と比較し、変異箇所が既報告と同一の場合には薬剤耐性に関わる変異とみなした。

図3にUL54のアミノ酸比較例を示す。

【産業上の利用可能性】**【0036】**

本発明は、UL97 遺伝子の薬剤耐性に関わる変異が報告されている後半の領域と、UL54 遺伝子領域の92%以上に相当する領域の解析を可能とした。

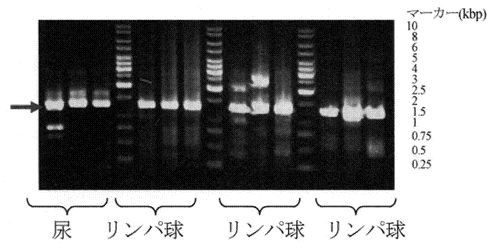
本発明は、薬剤の耐性を獲得したサイトメガロウイルスの迅速な検出に有用である。

10

20

30

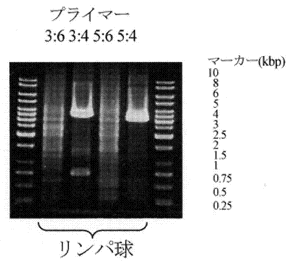
【 図 1 】



【 図 3 】

分離株 1	301: DIECMSGEGGFPCAESDDIVIQISVCVYETGGNTAVDQGI PNGNDGRGCTSEGAIFGHS	360
Towne	301: DIECMSGEGGFPCAESDDIVIQISVCVYETGGNTAVDQGI PNGNDGRGCTSEGAIFGHS	360
AD169	301: DIECMSGEGGFPCAESDDIVIQISVCVYETGGNTAVDQGI PNGNDGRGCTSEGAIFGHS	360
Toledo	301: DIECMSGEGGFPCAESDDIVIQISVCVYETGGNTAVDQGI PNGNDGRGCTSEGAIFGHS	360
3157	301: DIECMSGEGGFPCAESDDIVIQISVCVYETGGNTAVDQGI PNGNDGRGCTSEGAIFGHS	360
3301	301: DIECMSGEGGFPCAESDDIVIQISVCVYETGGNTAVDQGI PNGNDGRGCTSEGAIFGHS	360
HAN13	301: DIECMSGEGGFPCAESDDIVIQISVCVYETGGNTAVDQGI PNGNDGRGCTSEGAIFGHS	360
分離株 1	661: NSSSSVGVFSVSGSSGGVGSNDSHGVGGTAAVSYQGATVFEPEVGYNDPVAVDFAS	720
Towne	661: NSSSSVGVFSVSGSSGGVGSNDSHGVGGTAAVSYQGATVFEPEVGYNDPVAVDFAS	720
AD169	661: NSSSSVGVFSVSGSSGGVGSNDSHGVGGTAAVSYQGATVFEPEVGYNDPVAVDFAS	720
Toledo	661: NSSSSVGVFSVSGSSGGVGSNDSHGVGGTAAVSYQGATVFEPEVGYNDPVAVDFAS	720
3157	661: NSSSSVGVFSVSGSSGGVGSNDSHGVGGTAAVSYQGATVFEPEVGYNDPVAVDFAS	720
3301	661: NSSSSVGVFSVSGSSGGVGSNDSHGVGGTAAVSYQGATVFEPEVGYNDPVAVDFAS	720
HAN13	661: NSSSSVGVFSVSGSSGGVGSNDSHGVGGTAAVSYQGATVFEPEVGYNDPVAVDFAS	720

【 図 2 】



【 配列表 】

0006233931000001.app

フロントページの続き

- (56)参考文献 DREW, W. L. , Cytomegalovirus Resistance Testing: Pitfalls and Problems for the Clinician, *Clinical Infectious Diseases* , 2010年, Vol.50, p.733-736
榮鶴義人, サイトメガロウイルスの薬剤耐性化機構, *日本臨床* , 2007年, Vol.65, 増刊号2, p.476-479
HECKER, K. H. and ROUX, K. H. , High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PC, *Biotechniques* , 1996年, Vol.20, No.3, p.478-480, 482-485
DAIKOKU, T. et. al , Rapid detection of human cytomegalovirus UL97 and UL54 mutations for antiviral resistance in clinical, *Microbiology and Immunology* , 2013年 5月14日, Vol.57, p.396-399
相原隆充, 外2名, CMVの薬剤感受性にかかわるUL97とUL54の塩基配列の早期決定, 第60回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集, 2012年10月31日, p.447, P2-117

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

REGISTRY(STN)

CAplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)