

サイクリングプローブ法を利用したチフス菌・パラチフスA菌のgyrA変異検出方法の開発

廣瀬 健二¹⁾、伊藤 健一郎²⁾、渡邊 治雄³⁾

1) 国立感染症研究所細菌第一部 第二室 室長

2) 国立感染症研究所感染症情報センター 第五室 室長

3) 国立感染症研究所 副所長

研究の概要

私たちは、腸チフス・パラチフスの原因菌であるチフス菌・パラチフスA菌を専門に研究している。腸チフス・パラチフスでも、他の腸管感染症と同じように治療にはニューキノロン剤が第一選択薬として使用される。ところが、世界中でニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフスA菌が増加し、本剤の治療効果が低下したため、治療上の大きな問題点となっている。

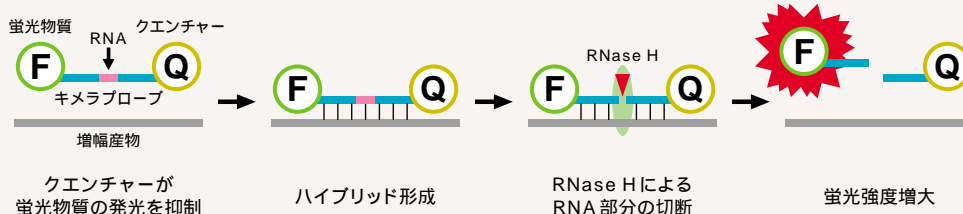
ニューキノロン剤は、原因菌のDNA ジャイレース、トポイソメラーゼIVの働きを阻害し、DNA複製を止めることにより作用する。この二つの酵素はいずれも環状DNAの二本鎖を切断・再結合する酵素で、DNA ジャイレースはDNAの複製その他の機能に要する負のスーパーコイルを作り、トポイソメラーゼIVはDNA複製終了後のDNA二本鎖の分離に働いている。ニューキノロン耐性は、標的酵素であるDNA ジャイレースおよびDNAトポイソメラーゼIVの変異によるニューキノロン剤との親和性の低下により起こる。特に、DNA ジャイレースの変異に関しては、大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌などで詳しい解析がなされており、DNA ジャイレースおよびDNAトポイソメラーゼIVをコードする遺伝子のある特定の部位に変異が入ることにより耐性化することがわかっている。ニューキノロン剤は合成抗菌剤であるため耐性菌が出現しにくいと考えられていたが、予想に反し耐性菌は増加しつつある。

従来、ニューキノロン剤の感受性を調べるには、シプロフロキサシンやレボフロキサシンなどの薬剤が染み込んだ感受性ディスクを使用した薬剤感受性試験が一般的に行われてい

る。しかし、ニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフスA菌は、完全な耐性菌でないためディスクによる感受性試験では感受性もしくは中間と判定されてしまう。また、ニューキノロン剤のMICを測定しても低感受性菌は耐性菌でないため同様に感受性または中間と判定される。ニューキノロン低感受性菌はナリジクス酸に耐性を示すという共通点があるため、ナリジクス酸の感受性試験を行えば検出できるが、ナリジクス酸の薬剤感受性を試験の中に入れている医療機関はそれほど多くない。このように試験方法のさまざまな問題があるため、ニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフスA菌は臨床細菌検査では見逃されがちで治療上の問題となることが多い。このような問題点を解決するためにも、遺伝子検査で変異を検出するほうがより短時間で有効であると考え、私たちは新たな検出方法の開発に取り組んだ。

ニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフスA菌の、低感受性のメカニズムはすでによく研究されており、gyrA遺伝子の特定の場所の点突然変異によることが明らかになっている。私たちの今までの研究で、低感受性菌はgyrA遺伝子のコドン83番とコドン87番のいずれかに1箇所の点変異が入っていることがわかっており、これらの変異を検出することができれば分離されたチフス菌・パラチフスA菌がニューキノロン低感受性を示すかどうかを推定できる。また、耐性菌では、コドン83番とコドン87番の両方に変異が入っていることも判明している。すなわち、gyrA遺伝子のコドン83番とコドン87番に変異が入っているかどうかを調べることによって薬剤の感受性を推定できると考えられる。

【サイクリングプローブ法の検出原理】



リアルタイムPCRによる *gyrA* 遺伝子点突然変異検出系の検討

- (1) 変異している領域に特異的な蛍光プローブとして TaqMan® Probe または Molecular Beacon を設定し、その部分をはさむようにユニバーサルプライマーを設計した。結果は、完全マッチでないプローブでの増幅曲線は、蛍光の増え方が遅く最終的に低いいため、変異の有無を増幅曲線の差で推定できたが、一定の増幅産物量になるサイクル数(Threshold Cycle, Ct)にはほとんど変化がなかった。また、プローブが結合する領域の塩基に2箇所の変異があると検出されなくなった。1箇所の変異では、蛍光シグナルは完全にマッチした場合の半分までしかシグナルが上がらず、中には検出されないものもあった。
- (2) アレル特異的PCRプライマーとユニバーサルな蛍光プローブの組み合わせを試した。この方法は、プライマーの3'末端が完全マッチしないとPCRの効率が大幅に低下することを利用している。変異がある場合は蛍光シグナル値がほとんど変わらないが、Ctが変化し、シャトルPCRでのセカンドステップ(アニールと伸長)の温度を高くするとCtの差が拡大する。コドン83番のTCCからTTCへの変異を検出する *gyrA* 83T プライマーを使用した場合、セカンドステップの温度を60℃で行うと、変異株83(TTC)のCtは22~24だが、ワイルド株83w(TCC)では35、83A(TAC)は39と、差は明らかであった。さらに温度を上げるとCtの差は拡大するが、蛍光シグナル値も減っていく。このようなネガティブな検査では、試料中のテンプレート量やPCR阻害物質によるCt変化の影響と紛らわしくなる。
- (3) インビトロジェン社から発売されているLuxプライマーを試した。Luxプライマーは単一フルオロフォアで標識されたオリゴヌクレオチドで、3'末端付近に蛍光標識をし、5'末端との間でヘアピン構造をとるように設計する。この構造は蛍光消光能力を備えていて、オリゴヌクレオチドで存在する時は蛍光シグナルが小さいが、プライマーが二本鎖PCR産物に組み込まれると蛍光シグナルが大きく増加する。当該プライマーを使用した場合はPCR産物の融解曲線を見ることも可能である。反応温度を変更してもよく増幅し、(1)(2)の方法よりも判定が容易であった。プライマー3'末端の1塩基変異がPCR増幅効率に与える影響は、ミスマッチの組み合わせにより大きく異なる。しかし、もっとも重要なワイルド株の特異検出プライマー検出系において、Ct値が5くらい遅れてワイルド株以外の変異株が検出されてしまった。そのため3'末端部分のハイブリダイゼーション強度を低下させるために、3'末端の2番目の位置にもミスマッチを導入するか、プライマーを通常より短くすることを検討していたところ、タカラバイオ(株)からサイクリングプローブ検出を聞き、本法に適しているのではと思い試してみた。

- (4) サイクリングプローブ法は、RNAとDNAのキメラプローブと耐熱性RNase Hを組み合わせた検出法で、遺伝子断片の特定配列を効率よく検出できる。キメラプローブはRNA部分をはさんだDNA部分の片方に蛍光物質、もう一方に非蛍光クエンチャー物質が標識されている。そのままの状態では強い蛍光を発することはないが、PCR増幅産物のDNA配列と相補的なキメラプローブのRNA部分が完全マッチなハイブリッドを形成すると、RNaseHによりRNA部分だけが選択的に切断され、強い蛍光を発するようになる。つまり検出したい点変異部位に相補的なキメラプローブ中の塩基をRNAに置き換えておくだけで、1塩基の変異を検出できる。なお、サイクリングプローブ法では、キメラプローブ配列のRNA部位の前後が完全マッチハイブリッドを形成しない場合は検出されなくなることがある。サイクリングプローブを利用したリアルタイムPCRを検討した結果、特異性が高く短時間で変異を検出できる方法を開発することができた。この方法により、約1時間でニューキノロンに感受性かどうかを判定することが可能になった。

サイクリングプローブ法による *gyrA* 遺伝子点変異検出の手順(図1)

まず、はじめにWild83プローブとWild87プローブによりニューキノロン感受性株を検出し、ここで83番が87番に変異があるものは、第2段階の変異の種類を同定するステップに進む。第1段階では、Wild83プローブ(FAM標識)とWild87プローブ(ROX標識)により、リアルタイムPCRを行う。Wild83プローブ(FAM標識)とWild87プローブ(ROX標識)は、ともに変異がない感受性株の配列を持つとFAM、ROX両方の蛍光が検出される。もし、変異があればいずれか一方あるいは両方の蛍光は検出されなくなる。ここでFAM、ROXともに蛍光が検出されれば、この株はコドン83番と87番ともに変異を持たないと判断し、この株の解析はここで終了する。どちらか一方、もしくは両方の蛍光が検出されなかった場合は、変異があると判断して第2段階へ進む。第2段階では、変異のタイプを同定する。私たちがチフス菌・パラチフスA菌の多くの株を解析した結果、分離株の約3割がニューキノロン感受性菌であった。その残りのほぼすべてがニューキノロン低感受性菌であった。ニューキノロン低感受性菌は前述のように、*gyrA*のコードン83番とコードン87番のいずれかに1箇所の点変異が入っている。また、変異のパターンも決まっていて、83番の変異はTCCがTTCまたはTACに変異し、87番はGACがTAC、GGC、AACのいずれかに変異する。これらのことから、第2段階ではそれぞれの変異に対応したプローブを作成した。83番ではMutant83 TTC probe(FAM標識)、Mutant83 TAC probe(ROX標識)、87番ではMutant87 TAC probe(FAM標識)、Mutant87 AAC probe(ROX標識)、Mutant87 GGC probe(FAM標識)を使用して、それぞれの変異を持つときに蛍光が検出され、どの変異タイプなのか分かる方法になっている。

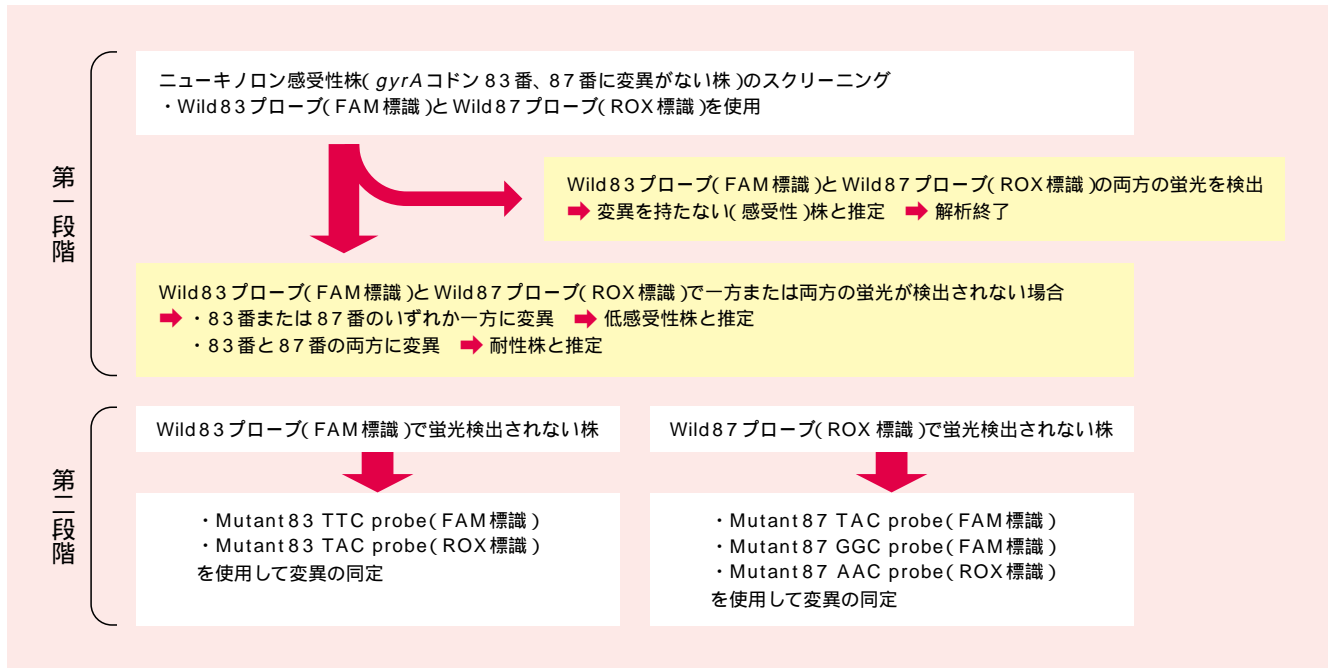


図1 *gyrA* 変異の検出と感受性判定の流れ

プライマーとサイクリングプローブの設計

PCR で増幅するターゲット領域は *gyrA* 遺伝子のニューキノロン耐性決定領域を含んだ約 120 ~ 150 塩基である。実験に使用した 3 組のプライマーを表 1 に示す。3 組のプライマーはキメラプローブの RNA 近傍配列と相補する配列がないように、表 1 の使用可能なプライマー対を使い分ける。プローブは、タカラバイオの Double-Dye プローブ合成サービスに設計・合成を依頼し作製した。Wild83 プローブと Wild87 プローブが同時に使用可能なように、2 つのプローブはオーバーラップしないよう設計した (図 2)。第 1 段階のスクリーニングでは異なる蛍光で標識してある Wild83 プローブと Wild87 プローブを同時に 1 本のチューブで使用する。第 2 段階の 83 番の変異の同定では、Mutant83 TTC probe、Mutant83 TAC probe を同時に使用する。87 番の変異の同

表 1 リアルタイム PCR に使用したプライマーとキメラプローブの配列

プライマー名	長さ	配列
<i>gyrA</i> -F primer	20 mer	GTGACGTAATCGGTAATAC
<i>gyrA</i> -F2 primer	19 mer	GTAATCGGTAAATACCATC
<i>gyrA</i> -F3 primer	18 mer	GTCGTTGGTGACGTAATC
<i>gyrA</i> -R primer	19 mer	CGAAGTTACCCTGACCATC
<i>gyrA</i> -R2 primer	18 mer	CAATAGAACCGAAGTTAC
<i>gyrA</i> -R3 primer	19 mer	CCGTC AATAGAACCGAAG

定では、3 種類あるので 1 本目に Mutant87 GGC probe と Mutant87 AAC probe、2 本目に Mutant87 TAC probe を入れ反応を 2 本に分けて行う。

実験に使用したチフス菌・パラチフス A 菌の菌株を表 2 に示した。チフス菌・パラチフス A 菌の DNA の調製は、寒天平板上の菌体を大体等量になるように、市販のゲノム DNA 抽出キットを用いて抽出し、1 サンプルに 2 μl (DNA 量にして 0.1 ~ 1 pg) を使用した。

表 2 実験に使用した菌株と血清型、由来

菌株番号	血清型	由来
Ty2	TY	基準株
102	TY	臨床分離株
064	PA	臨床分離株
113	PA	臨床分離株
025	TY	臨床分離株
006	TY	臨床分離株
012	TY	臨床分離株
015	TY	臨床分離株
037	TY	臨床分離株
104	PA	臨床分離株
027	TY	臨床分離株

TY : チフス菌、PA : パラチフス A 菌

プローブ名	長さ	配列	標識	使用可能なプライマー対										
				F/R	F/R2	F/R3	F2/R	F2/R2	F2/R3	F3/R2	F3/R3			
Wild83 probe	11 mer	TGCGGAATCGC	FAM 標識, Eclipse クエンチャー											
Mutant83 TTC probe	11 mer	TGCGAAATCGC	FAM 標識, Eclipse クエンチャー											
Mutant83 TAC probe	11 mer	TGCGTAATCGC	ROX 標識, Eclipse クエンチャー											
Wild87 probe	12 mer	TATGACACCATC	ROX 標識, Eclipse クエンチャー											
Mutant87 TAC probe	11 mer	TGTATTACACC	FAM 標識, Eclipse クエンチャー											
Mutant87 AAC probe	11 mer	TGTATAACACC	ROX 標識, Eclipse クエンチャー											
Mutant87 GGC probe	11 mer	TGTATGGCACC	FAM 標識, Eclipse クエンチャー											

赤字は RNA を入れたところ。

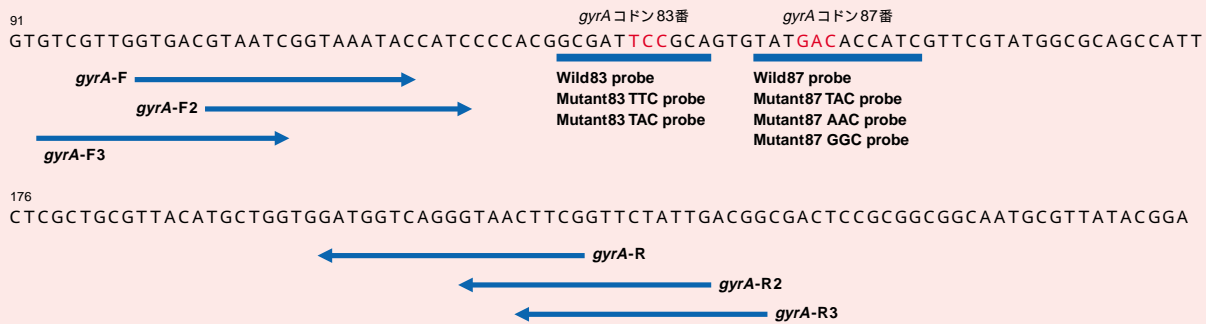


図2 プライマーとプローブの gyrA 遺伝子上での位置(*Salmonella Typhi gyrA* 遺伝子 Acc. No. AB071870 の配列を使用)

PCR 反応組成・反応温度条件

CycleavePCR® Core Kit(製品コードCY501)を用いて以下の反応液を調製した。FAM、ROX 標識のプローブはマルチカラー検出可能なリアルタイムPCR装置(Smart Cycler® II System など)で同時に使用することができる。

[反応液組成]

10 × CycleavePCR® Buffer	2.5 μl
dNTP Mixture(2.5 mM each)	3 μl
Mg ²⁺ solution(25 mM)	5 μl
Primer mix(15 μM)	0.3 μl
Probe(FAM) (10 μM)	0.5 μl
Probe(ROX) (10 μM)	0.5 μl
Tli RNase H II(200 U/μl)	0.5 μl
TaKaRa Ex Taq® HS(5 U/μl)	0.25 μl
dH ₂ O	10.45 μl
template	2 μl
total	25 μl

[反応温度]

リアルタイムPCR装置は、タカラバイオから販売されている Smart Cycler® System を使用した。反応温度条件は以下の通りである。

95	20 sec.	
95	15 sec.	
55	20 sec.	40 Cycles
72	15 sec.	

プライマー・プローブの特異性の検討

プライマー・プローブの特異性を検討するためにチフス菌・パラチフスA菌のニューキノロン感受性株、低感受性株、耐性株を使用した。菌株はニューキノロン感受性株、低感受性株では日本国内で分離された株を使用した。耐性株は、実験室内で耐性を誘導した株を使用した¹⁾。試験に用いた株はあらかじめ、ニューキノロン耐性決定領域の塩基配列を決定し変異の場所と置換された塩基を明らかにした。その後、リアルタイムPCRに用いて、各プローブの特異性を検討した。

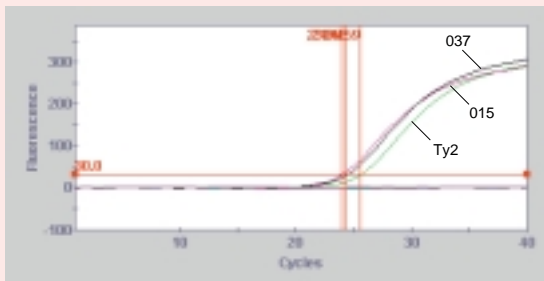
実験結果と考察

サイクリングプローブを使用したリアルタイムPCRによる gyrA 変異のスクリーニングおよび変異同定実験の蛍光検出画面を図3から図6に示す。それをまとめた結果を表3に示す。表3にある結果の一部の増殖曲線が図3から図6に示してある。図3に示すように、スクリーニング用のWild83プローブでは、Ty2、015、037のみ蛍光が検出されている。Wild87プローブでは、Ty2、113、104に蛍光が検出され、83番ではTCC、87番ではGACという変異がない感受性株の配列を特異的に検出した。また、図4において83TTCプローブと83TACプローブについて検討した。83TTCプローブでは、102、113、064のみ検出され、83TACプローブでは025のみ蛍光が検出された。同様に、図5、図6において87AACプローブ、87GGCプローブ、87TACプローブを検討した。87AACプローブは064のみを、87GGCプローブは015のみを、87TACプローブは102のみを検出した。

いずれの結果からも、これらのプローブの特異性は高く、検出目的以外の配列との反応は見られなかった。Wild83とWild87の2種のプローブによるスクリーニングだけで変異の有無は判明できる。しかし、サイクリングプローブではキメラRNAの前後に変異があった場合も検出されなくなり、薬剤耐性をもたらさないサイレントな変異の場合でも検出されなくなる可能性がある。そのために、Mutant83およびMutant87の5種のプローブによる確認試験を行う2段階システムにした。なお、FAM標識したキメラプローブはアプライドバイオシステムズ社のABI PRISM® 7000、ロシュ・ダイアグノスティクス社のLightCycler® DX400でも使用できた。

表4には、培養によるニューキノロン剤の感受性試験の結果とサイクリングプローブ法による感受性の推定の結果を比較した。すべての株において培養による検査の結果と遺伝子検査による結果が一致した。これらのことから、今回使用したプライマー・プローブの検出系でニューキノロン感受性株の検出と、低感受性株・耐性株の変異の同定が可能であると言える。この方法によりおよそ1時間以内に低感受性株と耐性株のスクリーニングが可能になる。培養による感受性試験では一晩(約18時間)必要であるが、それに比較して格段に短時間で検査が可能になる。リアルタイムPCRでは非常に

Wild 83 probe (FAM 標識)



Wild 87 probe (ROX 標識)

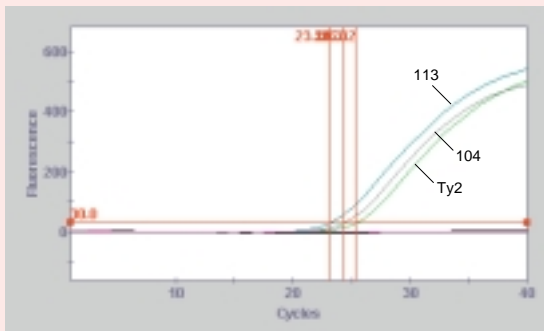
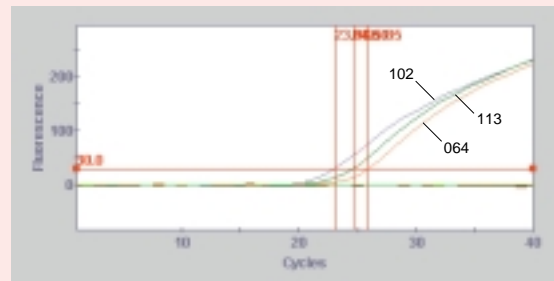


図3 Wild 83 probe と Wild 87 probe による変異の検出

Mutant 83 TTC probe (FAM 標識)



Mutant 83 TAC probe (ROX 標識)

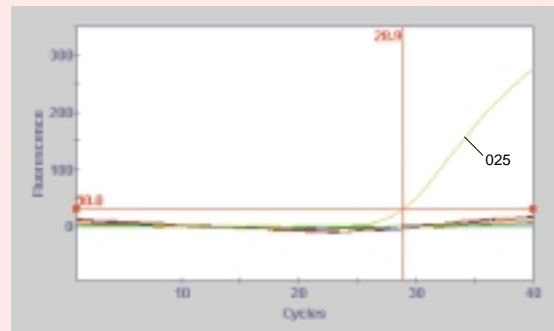
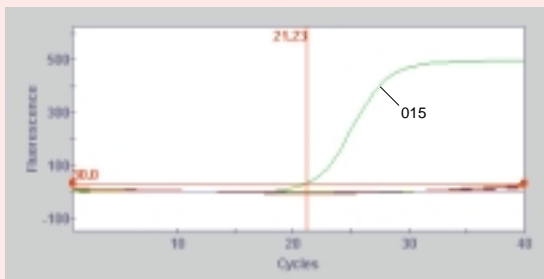


図4 Mutant 83 TTC probe と Mutant 83 TAC probe による変異の検出

Mutant 87 GGC probe (FAM 標識)



Mutant 87 AAC probe (ROX 標識)

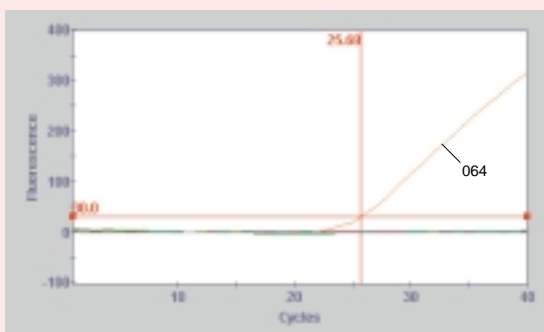


図5 Mutant 87 GGC probe、Mutant 87 AAC probe による変異の検出

Mutant 87 TAC probe (FAM 標識)

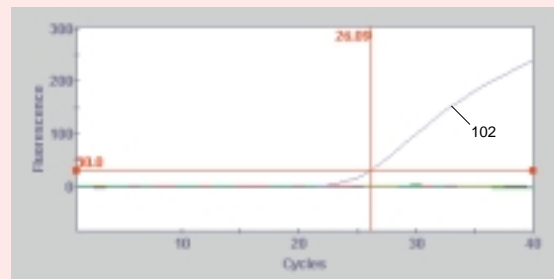


図6 Mutant 87 TAC probe による変異の検出

少量のDNAでも検出ができるため、普通寒天培地で純培養したチフス菌・パラチフスA菌数コロニーからDNAを抽出し使用すれば量は十分である。この方法を臨床検体からの直接検出に使用するためには、テンプレートの調製法と感度を検討する必要がある。現在のところ、寒天培地上に発育した純培養のコロニーからの検査のみに利用できる。

チフス菌・パラチフスA菌において、ニューキノロン低感受性株は毎年増加を続けており2004年の分離株では、チフス菌で約70%、パラチフスA菌では約80%がニューキノロン低感受性を示す。この迅速検査法が利用されれば、腸チフス・パラチフスの治療に使用する抗生物質の選択に大いに貢献できるものと思われる。また、*gyrA*領域の配列は腸内細菌間

表3 リアルタイムPCRプライマー・プローブの特異性検討の結果

(1) 83番、87番の *gyrA* 変異のスクリーニング

サンプル名	配列		Wild83 probe	Wild87 probe
	83番	87番	FAM	ROX
Ty2(感受性株)	TCC	GAC	+	+
102	TTC	TAC	-	-
113	TTC	-	-	+
015	-	GGC	+	-
037	-	GGC	+	-
104	TAC	-	-	+
064	TTC	AAC	-	-
025	TAC	-	-	+
006	TAC	-	-	+
012	TAC	-	-	+
027	-	GGC	+	-

(2) 83番変異の同定

サンプル名	配列		Mutant83 TTC probe	Mutant83 TAC probe
	83番	87番	FAM	ROX
Ty2(感受性株)	TCC	GAC	-	-
102	TTC	TAC	+	-
064	TTC	AAC	+	-
113	TTC	-	+	-
025	TAC	-	-	+
015	-	GGC	-	-
027	-	GGC	-	-
006	TAC	-	-	+
012	TAC	-	-	+
037	-	GGC	-	-
104	TAC	-	-	+

(3) 87番変異の同定

サンプル名	配列		Mutant87 GGC probe	Mutant87 AAC probe	Mutant87 TAC probe
	83番	87番	FAM	ROX	FAM
Ty2(感受性株)	TCC	GAC	-	-	-
102	TTC	TAC	-	-	+
064	TTC	AAC	-	+	-
113	TTC	-	-	-	-
025	TAC	-	-	-	-
006	TAC	-	-	-	-
012	TAC	-	-	-	-
015	-	GGC	+	-	-
037	-	GGC	+	-	-
104	TAC	-	-	-	-
027	-	GGC	+	-	-

- : 感受性株の配列に同じ + : 蛍光が検出された - : 蛍光は検出されず

表4 培養検査(MIC測定)によるニューキノロン剤に対する感受性試験の結果とサイクリングプローブ法による感受性の推定

菌株番号	血清型	培養による 感受性試験の結果	遺伝子検査による 感受性の推定
Ty2	TY	感受性	感受性
102	TY	耐性	耐性
064	PA	耐性	耐性
113	PA	低感受性	低感受性
025	TY	低感受性	低感受性
006	TY	低感受性	低感受性
012	TY	低感受性	低感受性
015	TY	低感受性	低感受性
037	TY	低感受性	低感受性
104	PA	低感受性	低感受性
027	TY	低感受性	低感受性

においても比較的良く保存されているため、チフス菌・パラチフスA菌以外のサルモネラ、赤痢菌などの他の腸内細菌で、ニューキノロン耐性や低感受性を示す株のスクリーニングにも応用が可能である。SNPなどの一塩基置換を正確に+/-検出できるサイクリングプローブ法を利用して、細菌の薬剤感受性が迅速に分かるようになることは適切な抗菌剤の投与を行う点において、十分貢献しうるものとする。

【参考文献】

- 1) Hirose, K., Hashimoto, A., Tamura, K., Kawamura, Y., Ezaki, T., Sagara, H., Watanabe, H.: DNA sequence analysis of gyrase and topoisomerase IV quinolone-resistance determining regions of *Salmonella enterica* serovar Typhi, and Paratyphi A. (2002) *Anitmicro. Agent. Chemo.*, 46, 3249-3252.

リアルタイムPCR