

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

繰り返し塩基配列内の塩基配列と繰り返し塩基配列外の塩基配列とのそれぞれに、F R E T 効果を持つ蛍光標識プローブをハイブリダイズさせる第 1 の工程と、繰り返し配列を含む領域を P C R により増幅させる第 2 の工程と、P C R 反応中に分解される蛍光標識プローブから発生する蛍光強度を測定する第 3 の工程と、繰り返し塩基配列内にハイブリダイズした蛍光標識プローブと繰り返し塩基配列外にハイブリダイズした蛍光標識プローブのそれぞれから発せられた蛍光強度を比較する第 4 の工程からなる、繰り返し配列の反復数を測定する方法。

【請求項 2】

蛍光標識プローブの少なくとも一つの塩基が R N A であり、前記工程に R N a s e H を加えることを特徴とする、請求項 1 に記載の繰り返し配列の反復数を測定する方法。

【請求項 3】

繰り返し配列がアスペルギルス・フミガーツスの C y p 5 1 A 遺伝子のプロモーター領域に存在する繰り返し配列である、請求項 1 または請求項 2 に記載の繰り返し配列の反復数を測定する方法。

【請求項 4】

繰り返し配列が（配列番号 1）であり、繰り返し配列内にある蛍光標識プローブの配列が（配列番号 2）であり、繰り返し配列外にある蛍光標識プローブの配列が（配列番号 3）であり、P C R 反応に用いるフォワードプライマーとリバースプライマーの配列がそれぞれ（配列番号 6）および（配列番号 7）である、請求項 3 に記載のアスペルギルス・フミガーツスの C y p 5 1 A 遺伝子のプロモーター領域に存在する繰り返し配列の反復数を測定する方法。

【請求項 5】

繰り返し配列が（配列番号 1）であり、繰り返し配列内にある蛍光標識プローブの配列が（配列番号 4）であり、繰り返し配列外にある蛍光標識プローブの配列が（配列番号 5）であり、P C R 反応に用いるフォワードプライマーとリバースプライマーの配列がそれぞれ（配列番号 6）および（配列番号 7）である、請求項 3 に記載のアスペルギルス・フミガーツスの C y p 5 1 A 遺伝子のプロモーター領域に存在する繰り返し配列の反復数を測定する方法。

【請求項 6】

配列番号 1 の反復数が 1 回である場合をアゾール感受性アスペルギルス・フミガーツスであり、反復数が 2 回である場合をアゾール耐性アスペルギルス・フミガーツスとする、アゾール耐性アスペルギルス・フミガーツス株の検出方法。

【請求項 7】

（配列番号 2）、（配列番号 3）、（配列番号 6）および（配列番号 7）、又は（配列番号 4）、（配列番号 5）、（配列番号 6）および（配列番号 7）を含む、請求項 6 に記載のアゾール耐性アスペルギルス・フミガーツス株の検出キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明はアゾール耐性アスペルギルス・フミガーツス（*Aspergillus fumigatus*）の簡易検出法に関する。

【背景技術】**【0002】**

アスペルギルス症はアスペルギルス属真菌を原因とする様々な病態の感染症の総称であり、胞子の吸入とそれに引き続く体内での増殖が原因の日和見感染症である。主要な原因菌はアスペルギルス・フミガーツス（*Aspergillus fumigatus*）であり、臨床上最重要視される真菌である。免疫不全者や免疫力が低下している宿主で発症し、速やかに症状が進行し、重篤な場合には全身に感染が広がる。治療しても致死率が

10

20

30

40

50

高い疾患であり、治療が遅れることは患者にとって極めて危険である。

【0003】

アジアを含めた世界各地で抗真菌薬であるアゾール系薬剤であるボリコナゾールやイトラコナゾールに耐性のアスペルギルス・フミガーツス（以下、アゾール耐性株という。）の出現が報告されている。このアゾール耐性株はcyp51A遺伝子のプロモーター領域に34bpあるいは46bpの2回繰り返し配列を持つこと、及び一つもしくは複数のアミノ酸置換を伴うことを特徴とする。プロモーター領域の繰り返し配列は単独で野生株に比較して8倍の耐性を誘導し、さらにCyp51Aの98番目のアミノ酸変異が加わることにより複数のアゾール系に耐性を示すようになると考えられている。

【0004】

発明者は日本国内で採取された臨床分離株（非特許文献1）、および土壌細菌（非特許文献2）の中からアゾール耐性アスペルギルス・フミガーツス（OKH50）を初めて見出し、すでにアゾール耐性株が日本国内にも侵入し、蔓延し始めていることを報告した。

【0005】

従来、遺伝子診断、病原菌の特定などの際に、多検体・多項目を検出するために、DNAチップ法が頻繁に用いられるようになってきたが、定量性が低く、繰り返し塩基配列の反復数を測定するなどの定量性の高さが求められる検出には適さないという課題がある。

【0006】

アゾール耐性株の検出法に関しては、特許文献1がA₂RF1転写因子の559～562位における残基QSQSの欠失変異を指標とする方法を開示している。また非特許文献3は34bp繰り返し配列近傍の領域をPCRで増幅し、その鎖長からアゾール耐性であるか否かを判定する方法を開示している。さらに特許文献2は、繰り返し配列の内部と外部にそれぞれ異なる標識を導入し、標識量を測定することによって繰り返し配列の反復数を測定する方法を開示している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特表2010-525837号公報

【特許文献2】特開2008-193984号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Journal of Infection and Chemotherapy (DOI: 10.1016/j.jiac.2016.12.004)

【非特許文献2】Med. Mycol. J. 58, E67～E70, (2017)

【非特許文献3】Antimicrob Agents Chemother. 56, 3905-10, (2012)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

しかしながら、特許文献1は特定のアミノ酸変異のみを指標としていることから他のアゾール耐性株を見落とす可能性があり、非特許文献3の方法は2回のPCRと電気泳動による検出を必要とすることから煩雑である。また、特許文献2は遺伝子中に含まれる繰り返し配列の反復数を測定するための方法を開示しているが、本アゾール耐性株の検出法を示唆するものではない。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上述した課題を解決するために本発明者は鋭意努力した結果、本アゾール耐性株の簡便な検出を可能とする本発明を完成させた。

【0011】

(1) 繰り返し塩基配列内の塩基配列と繰り返し塩基配列外の塩基配列とのそれぞれに、

10

20

30

40

50

FRET効果を持つ蛍光標識プローブをハイブリダイズさせる第1の工程と、繰り返し配列を含む領域をPCRにより増幅させる第2の工程と、PCR反応中に分解される蛍光標識プローブから発生する蛍光強度を測定する第3の工程と、繰り返し塩基配列内にハイブリダイズした蛍光標識プローブと繰り返し塩基配列外にハイブリダイズした蛍光標識プローブのそれぞれから発せられた蛍光強度を比較する第4の工程からなる、繰り返し配列の反復数を測定する方法。

(2) 蛍光標識プローブの少なくとも一つの塩基がRNAであり、前記工程にRNAse Hを加えることを特徴とする、(1)に記載の繰り返し配列の反復数を測定する方法。

(3) 繰り返し配列がアスペルギルス・フミガーツスのCyp51A遺伝子のプロモーター領域に存在する繰り返し配列である、(1)または(2)に記載の繰り返し配列の反復数を測定する方法。

10

(4) 繰り返し配列が(配列番号1)であり、繰り返し配列内にある蛍光標識プローブの配列が(配列番号2)であり、繰り返し配列外にある蛍光標識プローブの配列が(配列番号3)であり、PCR反応に用いるフォワードプライマーとリバースプライマーの配列がそれぞれ(配列番号6)および(配列番号7)である、(3)に記載のアスペルギルス・フミガーツスのCyp51A遺伝子のプロモーター領域に存在する繰り返し配列の反復数を測定する方法

(5) 繰り返し配列が(配列番号1)であり、繰り返し配列内にある蛍光標識プローブの配列が(配列番号4)であり、繰り返し配列外にある蛍光標識プローブの配列が(配列番号5)であり、PCR反応に用いるフォワードプライマーとリバースプライマーの配列がそれぞれ(配列番号6)および(配列番号7)である、(3)に記載のアスペルギルス・フミガーツスのCyp51A遺伝子のプロモーター領域に存在する繰り返し配列の反復数を測定する方法。

20

(6) 配列番号1の反復数が1回である場合をアゾール感受性アスペルギルス・フミガーツスであり、反復数が2回である場合をアゾール耐性アスペルギルス・フミガーツスとする、アゾール耐性アスペルギルス・フミガーツス株の検出方法。

(7) (配列番号2)、(配列番号3)、(配列番号6)および(配列番号7)、又は(配列番号4)、(配列番号5)、(配列番号6)および(配列番号7)を含む、(6)に記載のアゾール耐性アスペルギルス・フミガーツス株の検出キット。

【発明の効果】

30

【0012】

本発明によれば、従来の検出法と比較して、アゾール耐性アスペルギルス・フミガーツスを簡便に検出・判定することがができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】繰り返し配列の反復数を測定する方法を示した模式図である。

【図2】本アゾール耐性株と感受性株でリアルタイムPCRを行った時の増幅曲線を示す。

【図3】PCRのサイクル数の差から、本アゾール耐性株と感受性株が識別できることを示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0014】

発明者が臨床分離株および環境中から検出した、抗真菌剤であるアゾール系薬剤に対して耐性を獲得したアスペルギルス・フミガーツス(OKH50)はCyp51A遺伝子のプロモーター領域に34bpからなる2回繰り返し配列を持つことを特徴としている。OKH50のプロモーター領域近傍の配列を配列番号8に示す。3'末端のATGがCyp51A遺伝子の開始コドンである。本発明はこの繰り返し配列の反復数を簡便に測定する方法を開示するものであり、以下にその方法を説明する。

【0015】

図1に示す青プローブと赤プローブは蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)効果をもつ

50

蛍光色素で標識されており、それぞれ繰り返し配列の上流側と34bpの繰り返し単位内にハイブリダイズする。FおよびRプライマーを用いてTaqManプローブ法（タカラバイオ）によりPCRを行い、繰り返し配列を含む領域を増幅させる。この時、DNA鎖の延長反応を行うDNAポリメラーゼはエキソヌクレアーゼ活性を合わせ持つため、ハイブリダイズしたプローブが分解され、蛍光を発する。本アゾール耐性株は2回繰り返し配列を持つため、青プローブ由来の蛍光量に比べて赤プローブ由来の蛍光量が2倍観測される。一方で、感受性株では繰り返しがないために青プローブと赤プローブは同量の蛍光量となる。

【0016】

サイクリングプローブ法(タカラバイオ)はRNA残基を含むプローブとRNaseHを用いるSNP等の検出法である。RNaseHは二本鎖を形成するDNAとRNAのうちRNA側を分解するため、TaqManプローブ法と同様の効果が得られる。サイクリングプローブ法はTaqManプローブ法に比べてエンドポイントでの計測の可能性があるという点で優位性を持つ。

10

【0017】

図2は、ほぼ同量のDNAを用い、本アゾール耐性株と感受性株のリアルタイムPCRを行った時の赤プローブの結果を示す。予想通り感受性株（始点側）よりも本アゾール耐性株（終点側）の方が立ち上がり早く、同じサイクル数ではより多くの赤プローブが分解されていること、すなわち繰り返し配列の反復数が多いことを示している。

【0018】

20

図3は本法による反復数の定量性を示す図である。あらかじめPCRで増幅した精製DNA断片を実施例に記載の倍率で希釈し、青プローブと赤プローブを加えて再度PCRを行った。コントロールとなる青プローブのCt値から繰り返し配列を示す赤プローブのCt値を引き算することにより、タンデムリピート配列を持つアゾール耐性株を明確に判別することができる。本アゾール耐性株は2回繰り返し配列を持つため理論値は1であり、感受性株では0となる（四角で囲んだスポット）。なお、丸で囲んだスポットはゲノムDNAを用いた結果であり、実験系が正常に作動していることを示す。テンプレート量は 10^7 に渡って異なっても再現良く高い値を示した。さらにPCR増幅精製DNA断片ではなく、ゲノムDNAを用いても同様の結果が得られた。

【0019】

30

理論値に比べて実測値は低めにでているが、本発明により簡便に本アゾール耐性株を検出することが可能になった。

【実施例】

【0020】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0021】

アスペルギルス・フミガーツスのアゾール感受性でタンデムリピート配列がない（繰り返しがない）OKH31株とアゾール耐性でタンデムリピート配列があるOKH50株はポテトデキストロース寒天培地（ディフコラボラトリーズ）上で25℃もしくは35℃で数日から2週間程度培養した。培養後に胞子を0.05% Tween 20（和光純薬）で懸濁した。

40

【0022】

懸濁胞子1白金耳（およそ数マイクロリットル）を0.5mLから1mLのポテトデキストロース液体培地（PhytoTechnology Laboratoriesもしくはディフコラボラトリーズ）に接種し、35℃で一晩培養後に菌糸を回収した。回収した菌糸はバイオマッシャーIV（ニッピ）にて破碎し、塩化リチウム（和光純薬）・エチレンジアミン四酢酸（同仁化学）・トリス（和光純薬）・ドデシル硫酸ナトリウム（ナカライテスク）（LETS）バッファ350μLに懸濁し、フェノールクロロホルムイソアミルアルコール（ナカライテスク）350μLを加えて、激しく攪拌した。攪拌後15℃

50

0 0 0 r p mで1 0 分、4 にて遠心により層分離を行う。上層の水層およそ3 0 0 μ Lを回収し、1 m Lのエタノール（ナカライテスク）と混ぜて、1 5 , 0 0 0 r p mで2 , 3 分遠心分離し、上清を除く。7 0 %エタノールを5 0 0 - 7 0 0 μ L加えて、再度1 5 , 0 0 0 r p mで2 , 3 分遠心分離し、上清を除く。再度遠心分離後にできるだけ上清を除き、室温での乾燥後に2 0 μ Lの0 . 3 m g / m LのR N a s e A を含むp H 8 . 0 に調整した1 0 m M トリス溶液に懸濁した。

【0 0 2 3】

図2および図3に用いた増幅済みDNA断片は次の通り、PCR反応により調整した。PCR反応液はEmerald Amp PCR master mix（タカラバイオ）5 μ L、図1に示すF . プライマーおよび（配列番号7）R . プライマー（配列番号6）（タカラバイオにて委託合成を行った。）の5 p m o l / μ L溶液をそれぞれ0 . 4 μ L、上記調製DNA溶液1 μ L、超純水3 . 2 μ Lを混ぜて、サーマルサイクラーGene Amp PCR System 2 7 2 0（アプライドバイオシステム）で9 8 1 0 秒、5 5 3 0 秒、7 2 1 分を3 0 サイクル繰り返して増幅した。増幅後、TAEバッファ（コスモバイオ）中1 % アガロースS（ニッポンジーン）にて分離後、増幅されたDNA断片をファストジーンGel / PCRエクストラクションキット（日本ジェネティクス）で抽出した。抽出したDNAはそのまま、もしくは超純水で希釈（ 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^6 , 10^8 倍）を行って、リアルタイムPCRに用いた。

10

【0 0 2 4】

リアルタイムPCRは次の通りに行った。なお、青プローブ（配列番号5：サイクリングプローブ、HEXとクエンチャーがラベルされている、タカラバイオにて委託合成を行った。）の5 ' 側から5 つ目の塩基Aと、赤プローブ（配列番号4：サイクリングプローブ、FAMとクエンチャーがラベルされている、タカラバイオにて委託合成を行った。）の5 ' 側から4 つ目の塩基AはともにRNAである。

20

【0 0 2 5】

タカラバイオCycleave PCR Starter Kit（タカラバイオ）を用いた。反応溶液はCycleave PCR Reaction Mix 1 0 μ L、図1に示すF . プライマー（配列番号6）およびR . プライマー（配列番号7）それぞれ0 . 8 μ L、青プローブ（配列番号5）0 . 8 μ L、赤プローブ（配列番号4）0 . 8 μ L、調製ゲノムDNA、もしくは増幅DNA断片もしくはその希釈溶液1 μ L、これら容量に対して2 0 μ Lとなるように超純水を加えた。リアルタイムPCRはライトサイクラー4 8 0 インストルメントII（ロシュ）を用いて行った。PCR反応は最初に9 5 3 0 秒ホールドを行い、9 5 5 秒、5 5 1 0 秒、7 2 1 5 秒を4 5 サイクル行った。蛍光は7 2 のステップで検出した。Ct値は2nd Derivative Maximum法で算出した。結果を図2および図3に示す。

30

