

アレルギー性ダニ・真菌類を検出・識別するための DNA マイクロアレイ

加瀬谷泰介, 青木 俊介, 平山 幸一*

DNA Microarray to Detect and Discriminate Allergenic Fungi and Mites

Taisuke Kasetani, Shunsuke Aoki and Koichi Hirayama*

A DNA microarray was experimentally produced and verified its function, which aimed to detect and discriminate several allergenic fungi and mites causing allergic diseases like asthma or atopic dermatitis. Its objectives were six fungi: *Alternaria alternata*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Eurotium herbariorum*, *Candida albicans*, *Aspergillus restrictus* and *A. versicolor*, and three mites: *Dermatophagoides farinae* (American house dust mite), *D. pteronyssinus* (European house dust mite), and *Tyrophagus putrescentiae* (cheese mite). Four probes for each species were designed from specific sequences on rDNA ITS1 and ITS2, both sense strand and antisense strand. As probes of the DNA microarray, based on the design above, artificial single-strand oligonucleotides were fixed on GeneSilicon® chip. The DNA microarray could detect and discriminate simultaneously each objectives, six fungi and three mites, because fluorescent PCR product of each fungal or mites' pure culture permitted only correspondent species-specific probes to fluoresce. The DNA microarray could also detect and demonstrate four fungi and a mite included in fine dust of vacuum cleaner pack.

Key words: allergen, fungus, mite, DNA microarray, rDNA ITS, GeneSilicon®, house dust, rapid detection

病院や飲食店、各種の工場などにおいて、屋内の環境の生物的汚染状況を把握するために、細菌や真菌、衛生害虫などの生息数を測定し、評価することは頻繁に行われている。必要に応じて数だけではなく、属や種を同定する。細菌や真菌は、器物や建築物内装表面の付着菌、落下菌や浮遊菌を採取し、単離、拡大培養した後に生理的特徴や顕微鏡観察などによって、衛生害虫も、様々な手法で捕集した後に、形態的特徴により同定される。これらの同定には、各分野の専門家が必須である。

前培養には時間と煩雑な操作と技術が必要で、顕微鏡観察や形態の判定には専門知識が必要であることから、このような検査には多くの時間と費用がかかってしまう。細菌用には、簡易検出キットや ATP を用いた迅速検出キットなどが提案されているが、真菌類や衛生害虫などではほとんどない。また、培養を主な手法とする従来法では生菌のみしか対象にできず、生菌であっても培養できない状態にあるものや同定に必要な特徴的な形態が発現しない場合も対応できない。実際に野生真菌では、培養条件下で胞子を形成しない胞子未形成株はごく普通に多数存在する。害虫なども生体の一部しか得られない場合などには、同定が困難である。

近年、喘息やアトピー性皮膚炎といったアレルギー性疾患の患者が増加しているが、投薬などの対症療法では不十分で、個々の患者によって異なるアレルギーを特定し、それを除去する生活環境の改善が必要である。このため、一

般住居の屋内環境に棲息するアレルギー性生物を検査する必要性が高まっている¹⁾。しかしながら、アレルギー性生物として重要な真菌やダニ類の同定には前述のような困難が伴うことから、費用が高額とならざるを得ない。

一方で、ガラスやシリコン基板上に、ある生物種の全遺伝子のそれぞれから特異な配列をもつ検出用の一本鎖 DNA 断片 (probe) を調製し、高密度に配列した DNA マイクロアレイ (DNA チップ) が実用化されている²⁾。これに目的の生体試料から調製した DNA 断片を反応させることで、生体内で発現している遺伝子を網羅的に解析することから、数万単位の遺伝子断片を集積した研究用マイクロアレイは医学・薬学や食品機能性の研究などに広く用いられている。

DNA マイクロアレイ法は、遺伝子配列という生物普遍の指標を用いて、PCR 法とプローブとの分子交雑 (Hybridization) によって二段階に対象を選択してから、検出する方法である。したがって、この方法を応用すれば、培養や微生物・衛生害虫の同定に関する専門知識が無くとも、わずかの試料から短時間で正確に目標生物を検出、識別できる可能性があると考えられる。

そこで、アレルギー性を示す真菌およびダニの rDNA ITS 領域の塩基配列情報³⁾ を基に、アレルギー性生物検出用 DNA マイクロアレイを試作し、純粋培養標品および想定される屋内塵埃試料による動作を検証したので、報告する。

* : 東洋銅鉄(株) 技術研究所

本報は、日本ペストロジー学会誌, 23 (1), 27-30, (2008) に掲載の記事に加筆した。

実験方法

1. 材料および装置

1-1 アレルゲン生物標品

検出対象となるアレルゲン生物のうち真菌類6種は、(独)製品評価技術基盤より購入し、ダニ3種は株式会社大阪製薬より100%エタノール液浸標本を分譲していただいた。Table 1に示す。

1-2 屋内塵埃試料

両親子供の四人家族が住む鉄筋コンクリート造りの集合住宅の一室で使用されていた家庭用電気掃除機の紙パックより屋内塵埃を回収し、開口250 µmメッシュのふるいで微細な埃や砂を多く含む画分を取り出した。培養や検鏡で真菌類やダニが存在することを認めた上で、この屋内塵埃微細画分を実(未知)試料として実験に供した。

1-3 アレルゲン生物検出用DNAマイクロアレイ

検出対象種のribosomal DNAの内部転写スパーサー(ITS)領域2ヶ所から、対象種毎に特異的な配列を特定

し³⁾、センス鎖とアンチセンス鎖の両方の検出用一本鎖DNA断片をプローブとして合成した(Table 2)。したがって対象種1種につき、プローブはITS-1センス鎖、ITS-1アンチセンス鎖、ITS-2センス鎖、ITS-2アンチセンス鎖の計4種類(2ヶ所×両側)であり、この順序でアレイに固定した。

東洋銅鉄(株)技術研究所にて、プローブを3mm角のジーンシリコン®チップに極少量を滴下、焼き付けと洗浄をし、完成したチップをスライドガラス大の合成樹脂板に接着して、アレイとした。プローブの配置をFig. 1に示す。このように、プローブの配置が既知であることから、未知試料を適用した際に、反応プローブの位置からその識別が可能となる。

1-4 使用機器

ゲノムDNA抽出には自動核酸精製装置 QuickGene-810(富士フイルム(株))を、PCR増幅にはPCR Thermal Cycler Dice® Gradient TP600(タカラバイオ(株))を、DNAマイクロアレイの読み取りにはGenePix 4100A(Molecular Devices Inc.)をそれぞれ用いた。

Table 1 Allergenic mites and fungi

Species: scientific name / common name	Origins
<i>Dermatophagoides farinae</i> (Hughes) / American house dust mite	Osaka Pharmaceutical Co., Ltd.
<i>D. pteronyssinus</i> (Trouessart) / European house dust mite	
<i>Tyrophagus putrescentiae</i> (Schrank) / Cheese mite	
<i>Alternaria alternata</i> (Fries) Keissler	NBRC*31805
<i>Aspergillus restrictus</i> G. Smith	NBRC 7683
<i>A. versicolor</i> (Vuillemin) Tiraboschi	NBRC 31806
<i>Candida albicans</i> (Robin) Berkhout	NBRC 1386
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penzig	NBRC 4460
<i>Eurotium herbariorum</i> (Wiggers : Fries) Link	NBRC 33235

* NITE Biological Resource Center

Table 2 Sequences of species-specific probes for allergenic mites and fungi

Species	ITS1 sense strand (5' - 3')	ITS2 sense strand (5' - 3')
<i>D. farinae</i>	CTTGACACTTACCGATGTAC	CGATTCATTTTCGGCGTCGTG
<i>D. pteronyssinus</i>	AGTCAAACCGAATCATGTCA	TGCAAACGTCGTCGGATCAT
<i>T. putrescentiae</i>	GCGCCAGCAGCAGCACCATT	GATCATTCAGTCATCGACTC
<i>Al. alternata</i>	CACTAGGACAAACATAAACC	CACTCTCTATCAGCAAAGGT
<i>A. restrictus</i>	GAGACTCCAACATTGAACAC	CCCACTCGTGTAGGTCCGGC
<i>A. versicolor</i>	CCGGGGACTACTGAACTTCA	CCCGCTCGATTTAGGGCCGG
<i>C. albicans</i>	GAGGTCTAAACTTACAACCA	ACCAAAAACATTGCTTGCGG
<i>Cl. sphaerospermum</i>	CCCGGGTGGACATTTCAAAC	ACTATTCGCTAAAGGGTGCC
<i>E. herbariorum</i>	GAAGACTAACATTTGAACAC	CCCGCTCCCGTAGGTCCAGC

* Probes from antisense strand of both regions were also used.

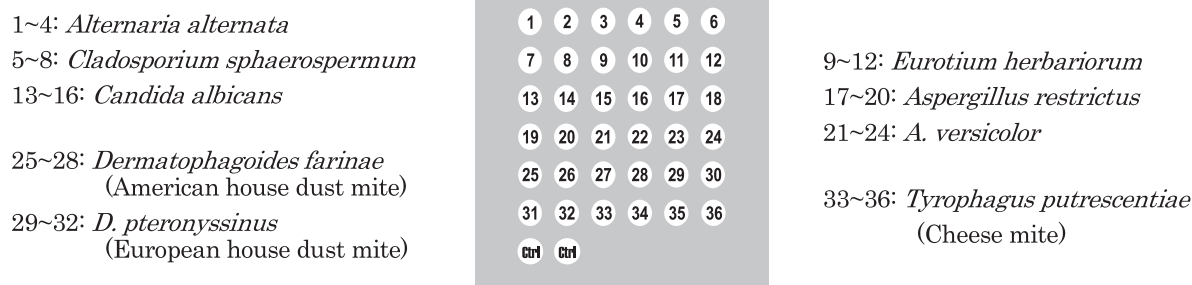


Fig. 1 DNA microarray to detect and discriminate some allergenic mites and fungi

probes : ITS-1 sense strand (ss), ITS-1 antisense strand (as), ITS-2 ss, ITS-2 as

2. 方法

2-1 ゲノム DNA 抽出

試料を凍結破碎した後に、界面活性剤による加温抽出法と沈殿精製、および自動核酸精製装置 QuickGene-810 と専用試薬キット DT-S (富士フイルム(株)), および土壌 DNA 抽出キット「ISOIL」(株)ニッポンジーン), 「Soilmaster™ DNA Extraction Kit」(EPICNETRE® Biotechnologies) を適宜使い分けて、対象種標品および屋内塵埃よりゲノム DNA を抽出、精製した。

2-2 PCR 増幅と蛍光標識

真菌用 PCR プライマーとして、18S rDNA 末端付近と 28S rDNA の先頭付近から選抜した ITS1-F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA), FO514 (TATGCTTAAGTTCAGCGGCTAGTCC) を、ダニ用として Acari-ITS1 (CAAGGTTTCCGTAGGTGAAC), Acari-ITS2 (GCTTGATCTGAGGTCGA) を用いた³⁾。増幅範囲は rDNA ITS1 および ITS2 を主とする領域である。PCR 用酵素キット TaKaRa Ex Taq® Hot Start version (タカラバイオ(株)) を用いたが、蛍光標識スクレオチドの 1 種 Cy™5-dCTP (GE ヘルスケアバイオサイエンス(株)) を併用した。主な反応液組成と条件を Table 3-4 に示す。

Table 3 Formula for fluorescent labeling PCR

Reagents	Amounts
10× PCR buffer (Mg ⁺)*	2.0 µl
2.5 mM dNTP mixture* (dCTP is 1/10)	2.0 µl
1 mM Cy5-dCTP	0.5 µl
Forward primer (10 pmol)	1.0 µl
Reverse primer (10 pmol)	1.0 µl
Taq Polymerase*	0.1 µl
Template DNA	10 ng
Add H ₂ O up to	20 µl

* TaKaRa Ex Taq™ HS

Table 4 Thermal setting of PCR

	94°C	60 sec
Start of cycle		
35 cycles	94°C	30 sec
	50°C	30 sec
	72°C	30 sec
End of cycle		
	72°C	60 sec

2-3 分子交雑と検出

蛍光標識 PCR 増幅で得られた試料溶液から 2 µL を分取、クエン酸緩衝液 1 µL を混合し DNA マイクロアレイ中央のチップ部分に滴下し、専用のスライドカバーをかけた上、試料溶液の蒸発を抑えるために湿室とした容器に収めてから 45°C で 1 時間静置して、試料中の PCR 産物とプローブを DNA-DNA 分子交雑 (Hybridization) で結合させた。反応終了後、DNA マイクロアレイを SDS 添加クエン酸緩衝液で洗浄し、二本鎖を形成しなかった PCR 産物を除去し、遠心乾燥した後、読取装置 GenePix 4100A で発光を検出した (635 nm)。

結 果

ダニ標品 3 種 (各 50 匹)、塵埃 0.2 g、塵埃にダニ標品を個々に添加したものを試料として、標品は QuickGene による方法で、塵埃を含む試料は市販土壌 DNA 抽出キットによる方法でそれぞれゲノム DNA を抽出した。屋内塵埃を試料とした場合、QuickGene の標準的な方法では DNA 抽出液は淡褐色で、これを鋳型として PCR を行っても増幅しないことから、土壌 DNA 抽出キットを用いた⁴⁾。その結果、いずれの試料・方法でもアガロースゲル電気泳動で約 23,000 bp の位置に明瞭なバンドがあり、高分子の DNA が得られていることが示された。真菌標品は、PDA 培地もしくは M40Y 培地で培養し、QuickGene 法でゲノム DNA を得た。

標品と塵埃試料から得られたゲノム DNA を鋳型に, Cy5-dCTP を用いた PCR 法で, rDNA ITS1 および ITS2 を含む領域を増幅し, 同時に蛍光標識をした. 真菌・ダニ標品にはそれぞれ真菌用, ダニ用の汎用プライマーを個別に添加し, 雑多な生物の DNA が混在する塵埃試料については, 両プライマーを半量ずつ同時に添加する多重 PCR (Multiplex-PCR) を行ったが, いずれも増幅は可能であった. PCR 増幅産物 2 μ L を, 0.3% SDS 添加クエン酸緩衝液 (3 $\times$ SSC) 1 μ L と混合してチップ上に滴下し, 専用カバーをかけ, 試料の蒸発防止のため密封容器に納めて 45 $^{\circ}$ C の水中に沈め, 90 分間緩やかに往復振盪し, プローブを介して試料をチップに固定する DNA-DNA 分子交雑反応を進めた. 次いで, DNA マイクロアレイを取り出してクエン酸緩衝液 (2 $\times$ SSC) で洗浄して, 二本鎖を形成しなかった PCR 産物を除去し, 遠心してチップ表面を乾燥した. この様に調製した DNA マイクロアレイの蛍光を GenePix で読み取った結果を示す.

Fig. 2 はダニ標品 3 種を個々にチップに適用した結果である. 3 種のダニのいずれも, チップ上の別種用プローブ (ダニ, 真菌両方) と誤って二本鎖を形成し (cross hybridization), 誤った位置が発光する誤動作は起こっておらず, 正しい位置に発光を確認した.

Fig. 3 は真菌標品 6 種を個々にチップに適用した結果である. ダニ標品と同様に別種用プローブとの誤動作は起こらず, 正しい位置に発光を確認できた. したがって, アレイに搭載している全 9 種については種の識別が可能であることが示唆された.

一方で, プローブ毎に発光にはばらつきがあり, 必ずしも全てのプローブが反応, 発光しなかった. 特に真菌において顕著であるが, ITS1 アンチセンス鎖側と ITS2 センス鎖側のプローブのみが強く反応しており, 4 プローブのうち中央二つのみが発光した.

次いで, Fig. 4 に示すとおり, 一般家庭の掃除機から採取した掃除機塵埃試料から得た未知試料について検出した結果, 標品の蛍光強度と比較して, 背景部分に不正規発光が多く S/N 比が低下し, 反応のあった個々のプローブの発光強度も弱くなった.

プローブの発光が不明瞭とはいえ, 屋内塵埃を材料とした一連の操作で真菌 4 種 (*Al. alternata*, *Cl. sphaerospermum*, *E. herbariorum*, *A. versicolor*) とダニ 1 種 (コナヒョウヒダニ) を検出するプローブに反応が出ており, この計 5 種のアレルゲン性生物を抽出した環境遺伝子によって検出, 識別し, その存在を示唆できたものと考えられる.

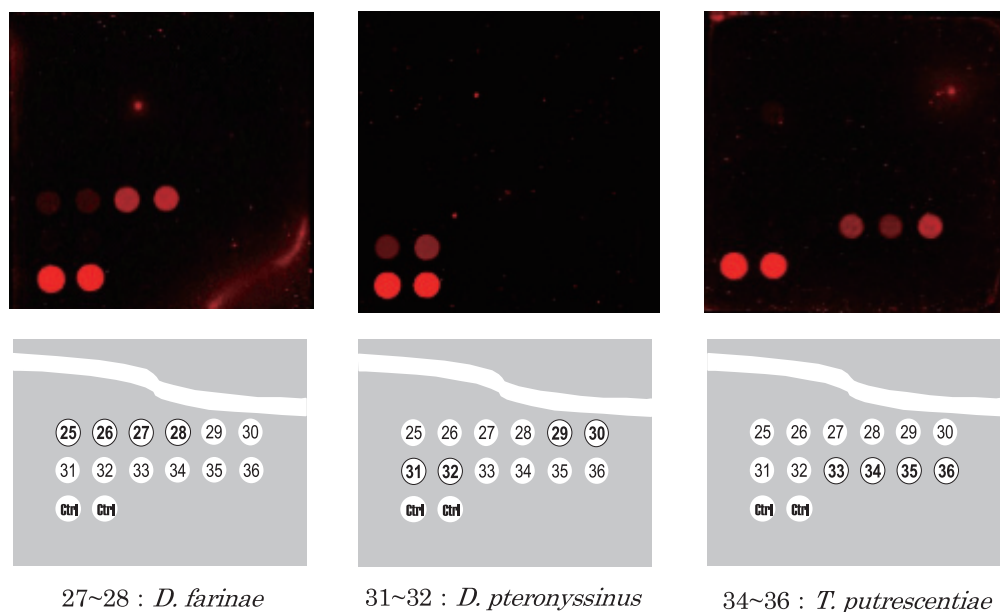


Fig. 2 Discrimination of three allergenic mites by the DNA microarray

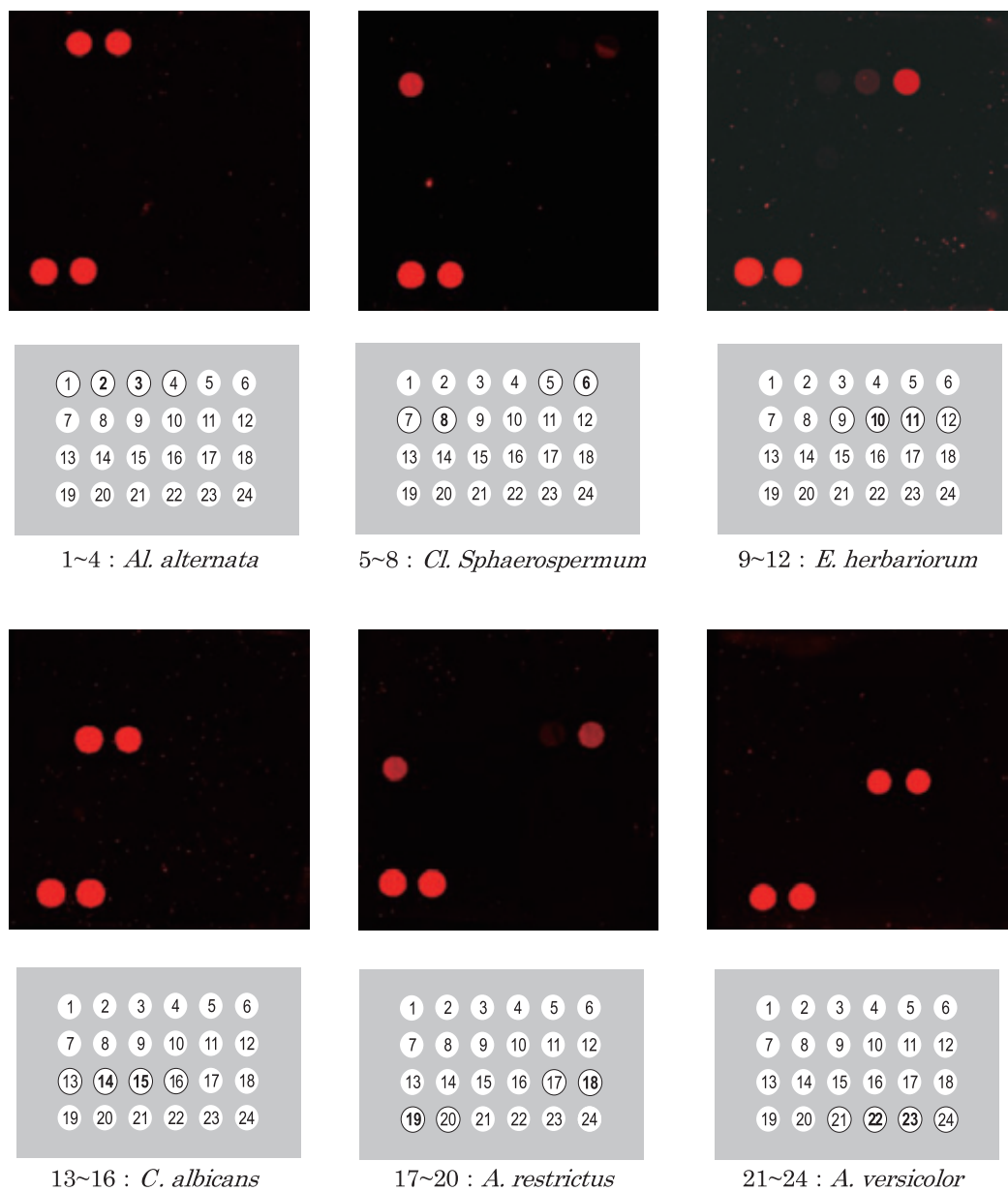


Fig. 3 Discrimination of six allergenic fungi by the DNA microarray

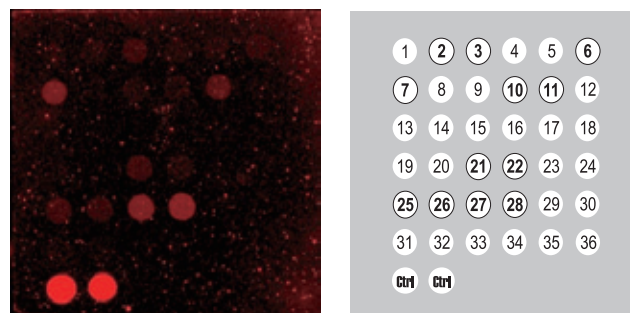


Fig. 4 Detection and Discrimination of allergenic mite and fungi from house dust by the DNA microarray

It was suggested that four molds (*Al. alternata*, *Cl. sphaerospermum*, *E. herbariorum* and *A. versicolor*) and a mite (*D. farinae*) had been in the house dust of vacuum cleaner from a condominium.

考 察

標品（ダニ，真菌）の検出結果から，ダニ3種も真菌6種も個々のゲノムDNAを試料として用いた場合，プローブが相互に反応することは一切なく，正確にPCR産物の配列を判定できた．少なくとも，本報で用いた生物種においては，プローブの種識別能は正確であるといえる．

一方で標品（ダニ，真菌），塵埃試料のいずれでも，種毎に搭載した四つのプローブの発光にはばらつきがあった．4プローブのうち中央に置いた，ITS1 アンチセンス鎖側とITS2 センス鎖側の2プローブのみが強く反応しており，特に真菌において顕著であった．

同一領域の2プローブは相補配列であり，PCR産物もその両方に相当する分子鎖を有することから，原理的には一方のプローブが機能するなら他方も同様に機能するはずであるが，実際には相補配列の一方でのみ二本鎖が形成され，発光が検出された．この原因としては，塩基配列ではなく，特に一本鎖に乖離した際に約600merに達する長鎖分子のPCR産物がとる可能性のある立体構造や，わずか20merの短鎖分子であるプローブが密集状態で一端を基板に固定されているために両者が結合するには必然的にPCR産物が大きく変形する必要があることなどが考えられる．プローブがPCR産物の前方に結合する場合と後方の場合では，結合位置より前方の鎖長に大きな差異が生じるが，結合位置より前方の分子が長いほど物理的にプローブと結合しにくくなると考えられる．

塵埃試料からの検出では，S/N比の低下，プローブの反応性の低下が観察された．塵埃試料では，Fig. 2-3で示した標品の場合と比べて，精製したとはいえゲノムDNA抽出液に塵埃由来のPCRに阻害的な成分が残留する可能性があり，また二組のプライマーを同時に用いる多重PCRであることから，ダニと真菌それぞれのプライマーは標品でのPCR反応系の半量となり，増幅効率が低下しがちであると考えられる．それにより，チップ上で蛍光を発するべきPCR増幅産物が減少したことが，その原因と考えられる．

とはいえ，屋内塵埃を材料とした数時間の操作で，真菌4種（*Al. alternata*, *Cl. spherospermum*, *E. herbariorum*, *A. versicolor*）とダニ1種（コナヒョウヒダニ）の計5種のアレルゲン性生物について，遺伝子を基準として存在を示唆できており，PCRプライマーでダニと真菌のみに限定している上，さらにプローブで種を限定する方法であることから，その識別は一定程度の確実性を有している．塵埃試料中に何らかの糸状菌とダニが存在することは事前に確認しており，偽陽性反応による誤判定の可能性は非常に低いと考えられる．さらに，通常の培養法と検鏡による検出，識別には数日～数週間を要することと比較して，非常に迅速である．

以上の結果から，本試作DNAマイクロアレイによって，標品9種（真菌6種，ダニ3種）間での誤動作なく，検出と識別が同時に正しくできること，夾雑物やPCR阻害物

質を含む屋内塵埃試料からでも真菌とダニを検出できることが示唆された．一方，今後の実用化のためには，非常に多いと考えられる屋内塵性ダニ，真菌種や，対象種内の系統間で検出や識別に差があるのか，即ち，対象9種の近縁種などが誤検出される偽陽性が発生しないか，同種であっても系統によっては検出されない偽陰性が発生しないか，また様々な屋内塵埃から安定的に高純度の対象種DNAを抽出できるかなど，更に検討を加えるべきである．

まとめ

喘息やアトピー性皮膚炎などアレルギー性疾患を引き起こすアレルゲンとなりうる真菌6種，とダニ3種のrDNA ITS領域の塩基配列を基礎として，それらを同時に検出し，識別するためのDNAマイクロアレイを試作し，その動作を検討した．その結果，検出対象生物の標品および一般家庭の屋内塵埃のいずれを試料としても，対象生物の存在を検出でき，種を識別できた．

一方で，ITS1およびITS2のセンス鎖とアンチセンス鎖からそれぞれ一ヶ所ずつ計4種のプローブを搭載したが，その反応性，すなわち試料（PCR産物）の結合量には大きな差があった．主に試料に反応し，検出に寄与したのはITS1アンチセンス鎖とITS2センス鎖であり，分子の立体構造や相互作用などの塩基配列以外の要因があるものと推察された．

参考文献

- 1) Peat, JK., Tovey, E., Toelle, BG., Haby, MM., Gray, EJ., Mahmic, A. and Woolcock, AJ: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **153**, 1, 141-146 (1996) .
- 2) 君塚 房夫, 加藤 郁之進: 蛋白質 核酸 酵素, **43**, 13, 2004-2011 (1998)
- 3) 平山 幸一, 加瀬谷 泰介, 近藤 隆一郎, 堤 祐司, 須原 弘登: 公開特許 特開 2008-35773.
- 4) 青木 俊介, 加瀬谷 泰介: 東洋食品工業短期大学・東洋食品研究所 研究報告書, **27**, 1-8 (2009)