

学位研究紹介

RNA切断の定量化による唾液の抗HIV-1作用に関する研究
Study on the anti-HIV-1 activity of oral fluid by quantitation of RNA cleavage

新潟大学大学院医歯学総合研究科顎顔面口腔外科学分野
 村山正晃
 Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Niigata University
 Graduate School of Medical and Dental Sciences
 Masaaki Murayama

【目 的】

HIV (human immunodeficiency virus) は血液だけでなく母乳、精液、膣分泌液、唾液、汗、涙などの体液にも存在することが知られている。これらの体液のうち、血液、母乳、精液、膣分泌液を介して感染が成立することは実証されているが、これまで唾液を介した感染であることを示す明らかな報告はない。そこで今回私たちは、唾液の低感染性の原因が唾液中の HIV-1 ウイルス粒子の中の RNA が損傷を受けることにあるという仮説を立て、それを検証するために、HIV-1 RNA の人為的逆転写産物をいくつかの箇所リアルタイム PCR により定量する系を確立し、唾液中ウイルス RNA の損傷度を評価する方法を開発したので、その詳細について報告する。

【材料と方法】

1. 材料

標準 HIV-1 RNA として、感染性がないことが確認されている HIV-1 株 8E5 (以下 8E5) と、8E5 から精製したウイルス RNA (以下 LAI RNA) を用いた。

2. 方法

A. プライマーの設定と C_T 値の傾きの意義

HIV のゲノムには、gag, pol, env という 3 つの主要遺伝子がある。そのうち HIV 遺伝子検査の標的とされており、比較的変異が少ない gag 遺伝子内の 3 箇所にリアルタイム PCR による定量のためのプライマーおよびプローブを設定した。図 1 に定量法の概要を示す。もし RNA が完全に逆転写が 100% 伸びていれば各プ

ライマーの位置の定量値は同じになるはずである。一方、RNA が途中で切断されていれば、その部分で逆転写反応が止まる。つまり、RNA が損傷していれば各プライマー部位の定量値は下流に行くに従い減少することになる。つまり C_T 値の傾きが大きいほど RNA の切断が起こっていると考えられる。

B. RNA 精製

RNA 抽出キット QIAamp® MinElute™ Virus Spin Kit (QIAGEN, 以下 MinElute) を用いて RNA を精製した。

C. 逆転写反応 (RT)

55℃ で 30 分逆転写を行った後に 72℃ で 10 分間反応させた。反応後、逆転写酵素を失活させるために 72℃ で 10 分間の処理を行った。

D. リアルタイム PCR

Applied Biosystems StepOnePlus™ リアルタイム PCR システムにより TaqMan プローブを用いて A 点、B 点、C 点におけるリアルタイム PCR の C_T 値を基に定量値を算出した。

E. 様々な処理による LAI RNA および 8E5 の損傷度の検討

各実験について 3 回ずつ測定を行い、平均値と標準偏差を求めた。

① HIV-1 RNA の抽出・精製に伴う損傷度の評価

LAI RNA を含む溶液を出発物質として、MinElute を用いて RNA を精製した場合と、精製しなかった場合について、それぞれ RT-リアルタイム PCR を行って、各プライマー部位における C_T 値を求めた。

② 逆転写反応の伸長度の評価

逆転写反応の伸長度を評価するにあたり、LAI RNA を T7 プロモーター配列を含む PCR プライマーを用いて、今回設定した A℃ の 3 箇所のプライマー部位を含む PCR 産物を作製した (以下 T7 DNA)。この T7 DNA を鋳型として、T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (Promega) を用いて

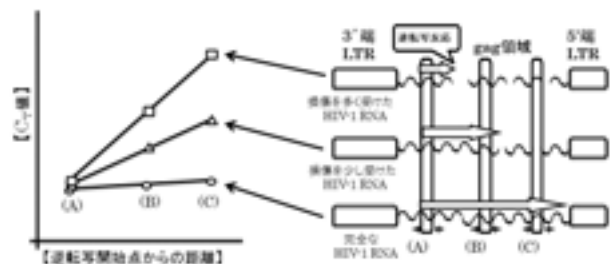


図 1 HIV-1 RNA 鎖の損傷度の測定原理

RNA を合成した (以下 T7 RNA)。そして、T7 DNA と T7 RNA をそれぞれ RT-リアルタイム PCR を行って C_T 値を求めた。

③ 紫外線照射による損傷度の評価

紫外線照射装置 LAI RNA に紫外線を 0, 1, 2, 4, 8 分間照射し、RT-リアルタイム PCR で定量した。

④ 唾液成分による損傷度の評価

唾液検体は健常人の全唾液とし安静時に採取(吐唾法)したものを用いた。得られた唾液検体は 70°C で 20 分間の熱処理を行ったものと、熱処理を行っていないものに分け、それぞれの唾液に 8E5 あるいは LAI RNA を添加し、37°C で 0, 2.5, 5, 10 分間静置した後に MinElute による RNA 精製を行った。得られた抽出液に RT-リアルタイム PCR を行って C_T 値を求めた。

F. 統計解析

リアルタイム PCR 定量値の検討には回帰分析を行った。解析ソフトは Statcel-The Usefull Addin Forms on Excel を用いた。

【結果と考察】

① HIV-1 RNA の抽出・精製に伴う損傷度の評価

精製する前の RNA と精製後の RNA はどちらも C_T 値の傾きが 0 に近く有意差がなかった ($P = 0.48$)。これは RNA 精製時に RNA 鎖の切断は起こっていないことを示している。

② 逆転写反応の伸長度の評価

T-7 DNA と、T-7 RNA の C_T 値の傾きを比較すると、どちらも 0 に近く有意差がなかった ($P = 0.72$)。すなわち逆転写の伸長は測定領域の端までほぼ 100% 起っていると考えられた。

③ 紫外線照射による損傷度の評価

核酸は紫外線を照射することにより無作為に切断されることが知られている。紫外線照射による損傷度の評価において、紫外線照射の時間経過に伴い傾きが増加した。すなわち今回設定した 3 箇所プライマー部位を含む領域において RNA が次第に切断されていくことがわかった。以上より、今回私達の確立した実験系を用いること

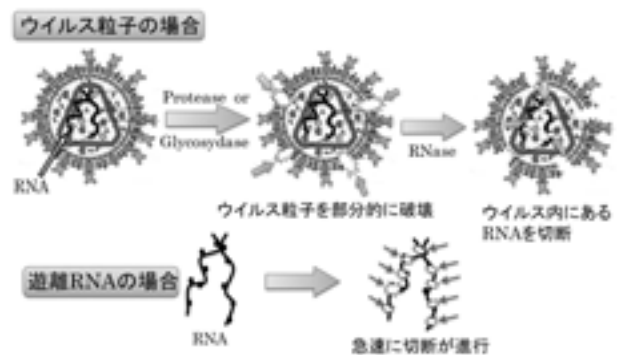


図2 唾液中における HIV-1 ウイルス粒子の分解過程モデル

で、RNA の損傷度を定量的に測定可能であることが示された。

④ 唾液による影響の評価

熱処理をしない場合の 8E5 株は、 C_T 値の傾きは処理時間とともに次第に増大した。LAI RNA は 5 分以降でまったく検出されなくなった。熱処理をした場合、8E5 は C_T 値の傾きは時間経過によらず 0 に近かった。LAI RNA は、熱処理を行っていない唾液と同様に、RNA は 5 分以降でまったく検出されなくなった。

すなわち唾液の中には、遊離ウイルス RNA を急速に切断する熱に安定な活性と、ウイルス粒子の中の RNA の切断に関与する熱不安定な活性が含まれることが示唆された。前者は RNA 分解酵素であり、後者はウイルス粒子の構造を部分的に破壊する糖分解酵素やタンパク質分解酵素と思われる。

以上の結果から、唾液中のウイルス粒子内 RNA が損傷を受ける機構として次のようなモデルが考えられる。唾液中に存在するプロテアーゼあるいはグリコシダーゼなどの酵素の作用によりウイルス粒子が部分的に破壊される。次にそのゆるんだ構造を利用して RNA 分解酵素が侵入し、ウイルス RNA が切断される。その結果、ウイルスの感染性は消失する。一方、遊離した RNA の場合は、RNA 分解酵素による RNA 切断がいったん開始されると、RNA 鎖全長にわたって急速に進行すると考えられる (図 2)。