

論文内容の要旨

氏名	三須政康
Rapid whole genome sequencing methods for RNA viruses (和訳) RNA ウイルスに対する迅速な全ゲノム決定法の構築	

論文内容の要旨

近年、パンデミックを引き起こした SARS-CoV-2 などの感染症において、次世代シーケンサー(NGS)を用いた解析が一般化されつつある。NGS による全ゲノム配列決定は、病原性の変化や疫学的追跡を可能とする。しかしながら、一般的なウイルスゲノム解析では、ウイルス毎にプライマー設計が必要となり、工程も煩雑である。そこで申請者は、ウイルス特異的なプライマーを必要とせず、ゲノム性状に依存しない、且つ、全ての RNA ウイルスに対して解析可能な新規シーケンス法の開発を行った。

異なったゲノム性状をもつ RNA ウイルスサンプルとして、(-)ssRNA 非分節、(-)ssRNA 分節ウイルス、(+ssRNA ウイルス、dsRNA ウイルスを使用した。ウイルスゲノムは、 10^5 TCID₅₀/mL 以上のウイルスストックをヌクレアーゼ処理により抽出し、リンカー配列をライゲーションさせ、逆転写反応後、PCR または Phi29 によりゲノム増幅を行った(PCR-NGS、RCA-NGS と命名)。各反応条件の最適化を行い、Nanopore シーケンサー(MinION)を用いてゲノム配列を決定後、リファレンス配列との比較、正確度を解析した。

PCR-NGS および RCA-NGS 解析により、(-)ssRNA 非分節ウイルス[犬ジステンパーウイルス(CDV)]、(-)ssRNA 分節ウイルス[リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)、A 型インフルエンザウイルス(IAV)]、(+ssRNA ウイルス[重症急性呼吸器症候群ウイルス 2 (SARS-CoV-2)]および、dsRNA ウイルス[プテロパインオルソレオウイルス(PRV)]の全ゲノム配列(末端配列を含む)を高い精度(100%の正確度)で決定可能であった。特に RCA-NGS による解析では、長鎖ゲノムを有する CDV や SARS-CoV-2 由来のゲノム増幅において威力を発揮した。また、PCR-NGS あるいは RCA-NGS の総リード数は、少なくとも 43%以上が標的ウイルスゲノム配列を含むことから、本法により高純度のシーケンスデータを得ることが可能となった。

本法の開発により、RNA ウイルスのゲノム決定は、ゲノムの性状・長さに依存せず、全ての RNA ウイルスに適用可能であることが示唆された。本研究の成果は、新規ウイルス感染症発生時における迅速解析を可能とし、更には、ゲノム配列決定を通じて分子疫学研究や感染制御にも大いに寄与するものとする。