

短報

SV40 調節領域の PCR 増幅時における偽陽性産物

出現要因の解析

石井紀郎*、岸本恵子、山崎修子
就実大学薬学部免疫化学研究室

Analysis of false-positive results on PCR-based detection of SV40 DNA regulatory regions

Norio Ishii, Keiko Kishimoto, Shuko Yamasaki
*Department of Immunology, School of Pharmacy, Shujitsu University,
1-6-1 Nishigawara, Naka-ku, Okayama, 703-8516*

(Received 13 December 2013; accepted 9 January 2014)

Abstract

PCR-based detection of Simian virus 40 (SV40) in various human tumors has been reported, but there were unusual reproducibility difficulties. Especially, the risk of false-positive results due to contamination by SV40 containing laboratory plasmids has been proposed. To reveal the cause of this false-positivity, we have constructed 2 sets of nested PCR system on SV40 regulatory region detecting up to 1 molecule of input template. The non-coding regulatory region has structural variation among strains and was known to exert a significant influence on tumor incidence. False positivity using the first primer sets (RA4/RA3, RA2/RA1) was 28%, and those of second sets (RA4/RA3, RA8/RA5) was 13.5%, respectively. The sequence of the latter false-positive product was identical to most common experimental SV40 776 (2E) strain. These results suggest that even the smallest amount of contaminating DNA from experimental circumstance can be amplified and the strategies of the prevention of nucleic acid contamination should be strictly considered.

Keywords: SV40; regulatory region; nested PCR; false-positivity; contamination

緒言

SV40 (Simian virus 40) は5,243塩基対の2本鎖DNAを持つポリオマウイルスであり、各種実験動物に腫瘍を誘発させる。また、ヒトの培養細胞に対しても感染性を有するとともに形質転換させること、さらに各種ヒト癌組織や正常組織から頻

繁に検出されることが知られている¹⁾。

SV40は1950年代末から1960年代半ばまでの間に世界中で接種されたポリオワクチンへの混入物として発見された。これはワクチンの製造段階で用いたサル腎臓培養細胞に元々感染していたウイルスであったのだが、その後、SV40がヒト培養細

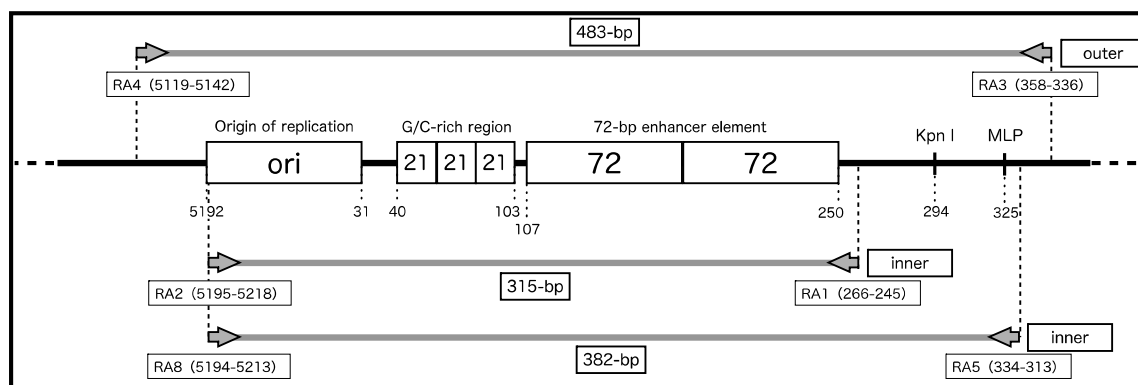


図1 SV40 776 (2E)株の調節領域とプライマー

胞や実験動物に対して発癌作用を有することが示され、疫学的、血清学的、分子生物学的、免疫組織化学的観点から多様な検討が行われた²⁾。その結果、ヒト発癌との関連が指摘されたものの、中皮腫や髄芽種などの特定の腫瘍を除き、SV40が直接ヒト発癌作用を有しているという統一見解はいまだに得られていない³⁾。

1960年代以降、SV40と発癌の関連性をめぐる様々な研究が行われているが、研究方法として主に採用されているPCR (Polymerase chain reaction)において偽陽性が出るなど、結果が安定しない。こうしたPCRにおける偽陽性の出現要因として、調節領域を含むSV40配列の大部分が一般的に使用されているプラスミドベクターに広く導入されているために、実験室ベクターの測定系への混入により、鋳型を加えていなくてもPCRで配列が増幅されるプラスミドコンタミネーションが起こっている可能性が指摘されている⁴⁾。そこで、本研究ではSV40の調節領域のPCRにおける偽陽性産物の出現率、及びその出現要因の解明を目的とした。上述のようにSV40の調節領域はT抗原の結合と遺伝子転写に重要な領域のため多くのプラスミドに導入されており、コンタミネーションを高頻度を起こす可能性が指摘されている領域でもある。また、調節領域はSV40の株によってその構造が異なるため⁴⁾、偽陽性産物が出現した場合には検出された配列を解析することにより、偽陽性配列の由来を同定することもできる (図1)。

方法

SV40の調節領域を増幅する nested PCR 系

SV40の調節領域を増幅するプライマー2組

(RA4/RA3、RA2/RA1)及び (RA4/RA3、RA8/RA5)を使用し、2種類の nested PCR 系を構築した (図1)。実際には様々なプライマーの組み合わせを検討し、各反応で最高感度を達成する組み合わせを選択した。またPCR条件の確立にあたり、種々の条件でPCRを実施し検討を行った結果、最も高感度が達成され、非特異産物も抑制された以下の条件を採用した。なお、使用したプライマーセット (RA4/RA3、RA2/RA1)はSV40調節領域の研究で一般的に使用されているものである⁵⁾。

PCR条件は、1反応当たり、10×PCR Buffer(15 mM MgCl₂ 含む /Perkin Elmer)を1 µL、2 mM dNTPs(TOYOBO)を1 µL、25 mMのMgCl₂(Perkin Elmer)を0.6 µL(最終濃度3 mM)、プライマー(50 pmol/µL、SIGMA GENOSYS)をそれぞれ0.05 µLずつ、滅菌水(Nacalai)を6.25 µL、耐熱性DNAポリメラーゼとしてAmpliTaq(5 units/µL、Lot No.M09946:Perkin Elmer)を0.05 µL、これに鋳型を1 µL加え、全量を10µLとしてPCRを行った。使用プライマー配列は以下の通りである。

RA4: 5'-GTCCATTAGCTGCAAAGATTCTC-3'

RA3: 5'-GCGTGACAGCCGGCGCAGCACCA-3'

RA2: 5'-TCCAAAAAAGCCTCCTCACTACTT-3'

RA1: 5'-AATGTGTGTCAGTTAGGGTGTG-3'

RA8: 5'-CTCCAAAAAAGCCTCCTCAC-3'

RA5: 5'-GGCCTGAAATAACCTCTGAAAG-3'

これらを上記の組み合わせ通りに nested PCR に用いた。鋳型は nested 1段階目では、陽性コントロールとしてpUC-SV40(SV40調節領域の全配列を含むプラスミド)を、陰性コントロール (図中では No DNA) として滅菌水(double distilled water: ddW、Nacalai)をそれぞれ用いた。pUC-SV40は大腸菌で

大量増殖後に HiSpeed Plasmid Maxi Kit(Qiagen)を用いて精製後、NanoDrop lite(Thermo Scientific)で定量したものを使用した。2段階目の増幅では、1段階目で得た産物を ddW で 50~100 倍に希釈したものを鋳型として導入した。1段階目の陽性コントロールでは pUC-SV40 を ddW で系列希釈し、1反応当たり計算上それぞれ、 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 分子となるように加えた。PCR プロフィールは、1種類目のプライマーセットでは $94^{\circ}\text{C}2$ 分、($94^{\circ}\text{C}30$ 秒、 $65^{\circ}\text{C}30$ 秒、 $72^{\circ}\text{C}30$ 秒) $\times 30$ サイクル、 $72^{\circ}\text{C}7$ 分で、2種類目のセットは $94^{\circ}\text{C}2$ 分、($94^{\circ}\text{C}30$ 秒、アウター 65°C 、インナー 52°C 各 30 秒、 $72^{\circ}\text{C}30$ 秒) $\times 30$ サイクル、 $72^{\circ}\text{C}7$ 分で行った。サーマルサイクラーは Mastercycler ep(Eppendorf)を使用した。Nested PCR にて DNA を増幅後、1反応当たり $2\mu\text{L}$ の 6 \times dye を加え、その内の $5\mu\text{L}$ を 4% NuSieve3:1 アガロースゲル(Lonza)で電気泳動した。アガロースゲルは臭化エチジウム(Nacalai)で染色した後、写真撮影した。

陰性コントロールにおける偽陽性産物の配列解析

上記のプライマーセット (RA4/RA3) のアウター PCR 産物を ddW で 10 倍希釈して 2 段階反応の鋳型とし、得られた偽陽性産物を QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)を用いてゲルから抽出後に両方向からの塩基配列解析に使用した。反応はインナープライマー(RA8 及び RA5)を用いて DYEnamic ET Terminator Cycle Sequence Kit(GE ヘルスケア)で行い、シーケンサー 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems)にて解析を行った。

結果

両 nested PCR とも、適切な PCR 条件を探るため、アニーリング温度、マグネシウム濃度、プライマー濃度、サイクル数など、様々なパラメーターの検討を行った。本研究の標的配列である調節領域は塩基の偏りや重複が激しいため増幅されにくく、高感度の検出が困難であったが、種々検討の後、研究方法に示した条件で両 PCR を行うことにより、図 2~5 の様な良好な結果を得ることができた。図 2

(RA4/RA3、RA2/RA1) は陽性コントロールにおいて、1 反応当たり 10^0 分子の pUC-SV40 を加えたものでも産物が得られた。一方、DNA を加えてい

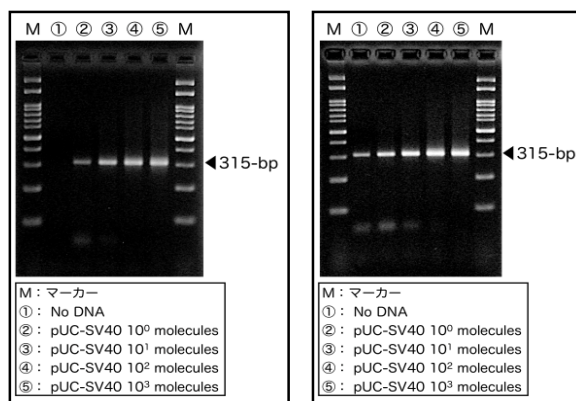


図 2 (左) 及び図 3 (右) プライマーセット (RA4/RA3、RA2/RA1)を用いた nested PCR の結果

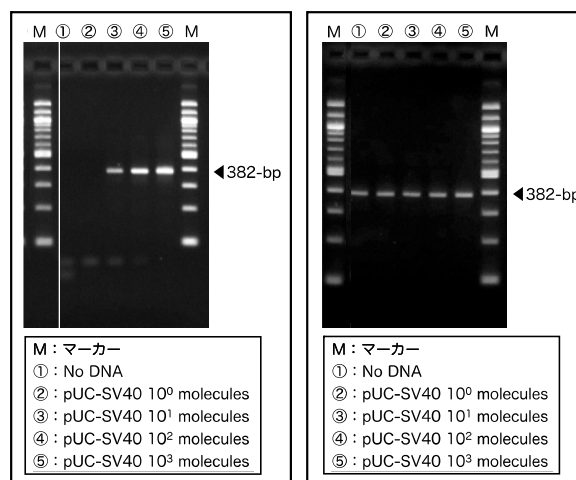


図 4 (左) 及び図 5 (右) プライマーセット (RA4/RA3、RA8/RA5)を用いた nested PCR の結果

ない陰性コントロールでは産物は得られなかった (図 2 レーン①)。しかし、図 3 に図 2 と同様の条件で行った PCR の典型的なデータを示すように、鋳型非存在下でも偽陽性産物が現れるケースがあった (図 3 レーン①)。

これらに類似した実験は計 57 回実施し、その内の 16 実験(28%)で図 3 の偽陽性産物が出現した。

図 4 (RA4/RA3、RA8/RA5) の 1 段階目の PCR 反応において、陽性コントロールはアウターで 10^2 分子/反応、インナーで 10^0 分子(1 分子)/反応の鋳型を加えたものまで産物が得られ、感度は良好であった。それにもかかわらず、これらを組み合わせた nested PCR では、 10^1 分子/反応までしか産物が得られない例が 65%を占めたことからわかるように感度が上がらず、鋳型を加えない陰性コントロールでは産物が得られなかった(図 4 レーン①)。しかし、類似実験を 37 回実施した内の 5 実験 (13.5%) で図 5 レーン①のような偽陽性産物が出現し、そのう

ち3回は、鋳型を1分子/反応加えたものでは産物が得られなかった。図5の偽陽性産物①について塩基配列の解析を行ったところ、SV40 776 (2E)株の配列と一致した(結果は示していない)。

考察

PCRのセッティング、PCR増幅や電気泳動はそれぞれ異なる実験区画において実施し、使用する試薬や器具類、ピペットのフィルターチップなども汚染を回避するよう細心の注意を払った。それにも関わらず無視できない頻度で偽陽性産物が得られたが、再現性はなく、その原因として以下が考えられた。

①研究室中のプラスミドに含まれるSV40の配列が混入した可能性³⁾

②使用している試薬にSV40の配列が混入していた可能性

実験を行った研究室は、様々なプラスミドを使用しており、またSV40についても数年に渡り研究しているため、研究室中に存在するSV40の配列が混入することは十分に考えられる。一般的にPCRは非常に高感度であり、混入した鋳型がごく微量であってもその配列が増幅されることが予測できるため、①が原因である可能性が高い。しかし、PCR試薬のセッティング時に、全反応分の混合試薬に鋳型DNAが数分子オーダーで混入していれば、再現性が得られないことが想定できるので、②である可能性も否定できない。

SV40 776 (2E)株は研究用として一般的に使用されているSV40であり、その配列の大部分は多くのプラスミドに組み込まれ利用されている。我々の研究室でも使用していること、さらに偽陽性産物の配列が776 (2E)株と一致したことから、その由来は研究室中に存在するSV40である可能性が考えられる。しかし遺伝子クローニングや発現の際に用いられるベクターに広く使用されている株でもあることから、AmpliTaqの製造段階から試薬に混入・残存していた可能性も否定できない。

ラミナーフロータイプのクリーンベンチ内でPCRのセッティングを行っていた際に、誤ってクリーンベンチ外で使用した滅菌水を使用したことがあったが、その2回の実験ではどちらも偽陽性産物が出現し、水への汚染が疑われた(結果には示し

ていない)。興味深いことに、2回のうち1回は、鋳型を1分子/反応加えたものでは産物が得られなかった。このことから、研究室での試薬汚染があったとしても、混入した鋳型は僅かであり、すべての反応系に均一に分配されるわけではないため、再現性が得られなかった可能性がある。つまり、実験の様々な段階で検出感度以上の鋳型が混入したときに、陰性コントロールや鋳型量が検出限界未満でも産物が得られたものと考えられる。この中には製造段階から鋳型が混入していた試薬を実験に使用した場合も含まれる。

本研究では、特にRA4/RA3、RA8/RA5の組み合わせのnested PCRの検出感度が不十分であったこと、偽陽性産物の配列解析が結果に示した1度しか実施できなかったことから、さらなるnested PCR条件の検討及び他の領域を含む配列解析の積み重ねが望まれる。上述のように、我々の研究室で使用しているSV40はすべて776 (2E)株由来であるので、他の部位の配列増幅時を含む偽陽性産物から同株とは異なる配列が検出されれば、プラスミドや試薬に由来する鋳型の可能性が高いと結論づけられる。

引用文献

- 1) Vilchez R.A., Butel J.S.: SV40 in human brain cancers and non-Hodgkin's lymphoma, *Oncogene*, 22, 5164-5172 (2003).
- 2) 横山逸男: ミクロの侵入者、ワクチンに潜む癌ウイルス、郁明社、2003.
- 3) Martini F., Corallini A., Balatti V., Sabbioni S., Pancaldi C., Tognon M.: Simian virus 40 in humans, *Infectious agents and cancer*, 2 (13), doi:10.1186/1750-9378-2-13 (2007).
- 4) López-Ríos F., Illei P.B., Rusch V., Ladanyi M.: Evidence against a role for SV40 infection in human mesotheliomas and high risk of false-positive PCR results owing to presence of SV40 sequences in common laboratory plasmids, *Lancet*, 364, 1157-66 (2004).
- 5) Lednicky J.A., Arrington A.S., Stewart A.R., Dai X.M., Wong C., Jafar S., Murphey-Corb M., Butel J.S.: Natural isolates of Simian Virus 40 from immunocompromised monkeys display extensive genetic heterogeneity: New implications for polyomavirus disease, *Journal of Virology*, 72 (5), 3980-3990 (1998).