

耐熱性ヘリカーゼを利用した高精度核酸検出技術の開発

関西学院大学大学院理工学研究科
生命科学専攻 藤原研究室 藤原 綾子

【研究目的】逆転写酵素や DNA ポリメラーゼは cDNA の *in vitro* 合成や PCR に利用されている。しかし、逆転写反応では鋳型 RNA の高次構造形成による cDNA 合成阻害、PCR ではプライマーのミスアニールによる誤増幅という問題がある。これまでに鋳型の高次構造やプライマーのミスアニールを防止するために、耐熱性逆転写酵素やホットスタート PCR 法などが開発されてきた。ヘリカーゼは ATP を加水分解して得られるエネルギーを使って、塩基間の水素結合を解消する酵素である。本酵素は核酸のステム構造や、部分二本鎖などの高次構造をほどくため、ヘリカーゼによる cDNA 合成の高効率化や PCR 誤増幅を低減する効果が期待できる。本研究では超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* が有する様々なヘリカーゼが PCR 反応に及ぼす影響に注目し、高感度で精度の高い核酸検出技術の開発を目指した。

【実験方法】*T. kodakarensis* 由来の組換えヘリカーゼ TK0306 (*Tk-DeaD*)、TK0566 (Euryarchaeota specific helicase (*Tk-EshA*))、TK0928 を大腸菌より精製し、一本鎖 RNA 存在下で ATPase 活性を測定した。次に 3 種類のヘリカーゼの PCR 反応特異性への影響を検討した。PCR 反応では高次構造を形成しやすい *T. kodakarensis* の 16S rDNA 及び高 GC 含量 (69%) の 緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* 由来のエキソトキシン A をコードする *Pa-toxA* を標的とした。酵素は KOD plus ポリメラーゼを用いた。*Tk-EshA* による PCR 誤増幅産物の低減機序を検証するために以下の実験を行った。完全に鋳型に結合するプライマー及び部分的 (5'末端側または 3'末端側) に結合するミスアニールプライマーを用いプライマー競合実験を行った。次に、*Taq* ポリメラーゼを用い、ARMS 法における SNP 解析への *Tk-EshA* の添加効果を検証した。*Tk-EshA* の基質特異性を検証するためアンワインド活性を測定した。基質には 5'末端側を蛍光標識した二本鎖 DNA (両端突出型、5'突出型、3'突出型、平滑末端型) 及び両端突出型の RNA/DNA ハイブリッドを用いた。アンワインドされた DNA の検出にはリアニールを防ぐためにトラップ DNA を用いた。

【実験結果と考察】各ヘリカーゼの ATPase 活性を測定した結果、*Tk-EshA*、TK0928 の反応至適温度はそれぞれ 80°C、90°Cであったのに対し、*Tk-DeaD* は 50°Cであった。次に PCR 反応におけるヘリカーゼ添加の影響を検討した。*Tk-EshA* を添加することで PCR 時のノイズバンドが消失し、特異性が顕在化した。一方、*Tk-DeaD* 及び TK0928 の添加では顕著な変化は見られなかった。*Tk-EshA* の基質特異性を検証した結果、*Tk-EshA* は両端突出型、3'突出型の二本鎖 DNA、RNA/DNA ハイブリッド基質をアンワインドした。このことから、*Tk-EshA* は 3'側からアンワインドすることが示された。プライマー競合実験の結果、*Tk-EshA* を添加していない条件では目的のバンド及び 5'突出型ミスアニールプライマーまたは 3'突出型ミスアニールプライマーによって増幅されるノイズバンドが検出された。*Tk-EshA* を添加した条件においてはミスアニールプライマーによって増幅されるノイズバンドは解消され、目的バンドのみが検出された。また、高 GC 含量の鋳型を用いた PCR 反応では、*Tk-EshA* 非添加時にはアニーリング温度を上昇させても誤増幅は低減されなかったが、*Tk-EshA* を添加することで誤増幅が低減された。SNP 解析においても *Tk-EshA* 添加により特

異性が増強された。以上より、*Tk-EshA* は鋳型及びミスアニールしたプライマーの 3'末端側からアンワインドするが、鋳型の目的領域に結合したプライマーは 5'突出型二本鎖 DNA を形成しているためアンワインドすることが困難であると考えられる。よって、*Tk-EshA* が優先的にミスアニールしたプライマーを剥がしたことで DNA 増幅の特異性が増強されたと考えられる。