

耐熱性ヘリカーゼの機能解析と核酸検出技術への利用

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 川戸 克展

【研究目的】ヘリカーゼは NTP ヌクレオシド三リン酸依存的に DNA/RNA の水素結合を解消する酵素である。核酸の高次構造を解く性質から、cDNA 合成の効率化や PCR 誤増幅を低減する効果が期待できる。ヘリカーゼはアミノ酸配列から 6 つのスーパーファミリー (SF1-6) に分類される。SF1 及び SF2 は最も大きいファミリーを構成する。これまでに超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の耐熱性 SF2 ヘリカーゼ TK0566 (*Tk-EshA*) が PCR 反応時に連鎖反応の段階で非特異的に結合したプライマーを 3' 突出方向から剥がし、PCR 反応における誤増幅を低減する効果 (ノイズ低減効果) を有することが示されている(1)。*T. kodakarensis* には 13 の SF1、SF2 ヘリカーゼが存在するがそのほとんどが機能未知である。また、その他のノイズ低減効果を示すヘリカーゼは知られていない。本研究では *T. kodakarensis* が有する唯一の SF1 ヘリカーゼ TK0178 (*Tk-Upf1*) に着目し、機能解析を行った。また、核酸検出技術における TK0178 の効果を検証した。

【実験方法】 *Tk-Upf1* の機能解析. 1. *T. kodakarensis* 由来 TK0178(*Tk-Upf1*)を大腸菌より組換え体として精製し、一本鎖 DNA 存在下で ATPase 活性を測定した。2. ヘリカーゼの熱安定性を評価するため円二色性 (CD) 解析を行った。60°C から 90°C まで上昇させ、ヘリカーゼの CD スペクトルを測定した。3. 基質特異性を検証するため、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)を用いたアンワインド活性を測定した。4. *Tk-upf1* 遺伝子破壊株 (KUPF1 株)を作製し、60°C、85°C、93°C における生育を測定した。核酸検出技術における *Tk-Upf1* の効果. 1. *Tk-Upf1* による PCR 誤増幅産物の低減効果の作用機序を検証するため、完全に鋳型に結合するプライマー及び部分的 (5'突出または 3'突出)に結合するミスアニールプライマーを用いたプライマー競合実験を行った。2. 耐熱性ヘリカーゼ (*Tk-EshA*) と耐熱性逆転写酵素を用いた高感度 RNA 検出技術の構築を行った。鋳型には嘔吐型セレウス菌のセレウリド合成酵素をコードする *cesD* の RNA を用いた。3. デジタル PCR を用いた SNP 解析への耐熱性ヘリカーゼ添加効果を検証した。鋳型にはヒト由来メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) 遺伝子の SNP 遺伝子を標的とした。

【実験結果と考察】ヘリカーゼ *Tk-Upf1* の ATPase 活性の至適温度は 100°C 以上であった。また CD 解析の結果から、*Tk-Upf1* は 90°C まで安定に二次構造を維持したため、耐熱性であることが分かった。アンワインド活性測定において、5'突出型二本鎖 DNA に最も高いアンワインド活性を示した。KUPF1 株を 60°C、85°C、93°C での生育測定の結果、いずれの温度においても親株と同等に生育した。これは *T. kodakarensis* が有する 12 の SF2 ヘリカーゼが機能を代替している事が考えられた。

PCR でのプライマー競合実験の結果、*Tk-Upf1* は 3'突出型または 5'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を解消した。これは、*Tk-Upf1* が 5'突出型では 5'方向からプライマーをアンワインドし、3'突出型では鋳型の 5'末端側からアンワインドすることでノイズを低減したと考えられる。*Tk-EshA* を用いた *cesD* RNA の検出 (RT-PCR) の結果、3 copies/ μ l の RNA が検出可能となった(2)。次に、デジタル PCR を用いた SNP 解析におけるヘリカーゼ (*Tk-Upf1*, *Tk-EshA*) の効果を検証した

結果、ヘリカーゼ存在下において SNP 解析の検出感度が上昇し、特異的に増幅された最終産物量の増加が確認された(3)。以上より、ヘリカーゼは RT-PCR や PCR の非特異的増幅を低減するため、核酸検出技術に有用であることが示唆された。

- 【参考文献】 (1) Fujiwara, A. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 3022 (2016)
(2) Okano, H. *et al.*, *BBRC.*, 487, 128 (2017)
(3) Hidese, R. *et al.*, *BBRC.*, 495, 2189 (2017)