

論文の要旨

氏名 佐野 創太郎

論文題目 Development of elemental technologies for a simple and rapid nucleic acid amplification test
(簡便・迅速な核酸増幅検査のための要素技術開発)

緒言

Polymerase chain reaction (PCR) の開発以来、DNA や RNA を増幅し検出する核酸増幅検査は、感染症検査や個別化医療、食品工業など幅広い分野に応用され、我々の生活になくてはならない技術となっている。この核酸増幅検査は、主に増幅工程と検出工程から構成されるが、各工程において特別な酵素試薬や煩雑な操作、高価な分析機器を必要とする。このため、適切な人員や設備の確保が難しい小規模医療施設や開発途上国において、核酸増幅検査を行うことに対する大きなニーズがあるにも関わらず、その実施が困難であるという課題があった。特に、近年の新興・再興感染症のパンデミックの事例から、早期検出・診断により感染拡大を未然に防ぐことの重要性が指摘されており、“誰でも、どこでも”実施可能な核酸増幅検査が強く求められている。このような背景から本研究では、核酸増幅検査の各工程を簡便・迅速化する要素技術を開発することを目的とした。この目的を達成するため、第一章では増幅工程に焦点を当て、DNA 依存性 DNA ポリメラーゼに逆転写酵素活性を付与するというアプローチから、RT-PCR の簡便化を図った。また第二章においては、検出工程に焦点を当て、修飾プライマーとペーパークロマトグラフィーを利用した multiplex-PCR 産物の迅速検出法の開発を試みた。

第一章 逆転写酵素活性と DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性を併せ持つ耐熱性酵素の開発

核酸増幅検査の増幅工程は、標的由来の DNA や RNA を増幅する工程である。この工程において重要な技術として、RNA を増幅する逆転写 PCR という方法がある。逆転写 PCR は、標的とする RNA を逆転写反応により DNA に変換し PCR により増幅する。逆転写反応においては、ウイルス由来の逆転写酵素が、PCR においては、耐熱性の DNA 依存性 DNA ポリメラーゼがそれぞれ必要となる。しかし、両酵素の至適反応条件が異なることから、一般的に逆転写反応と PCR をそれぞれ分離した 2 ステップの煩雑な操作が必要であった。

この課題に対し、耐熱性 DNA 依存性 DNA ポリメラーゼに逆転写酵素活性を付与し、逆転写反応と PCR を 1 ステップで遂行可能な逆転写 PCR 用酵素を開発することでその解決を試みた。検討材料として、高い安定性と正確性を有する、超好熱性細菌 *Thermotoga petrophila* K4 株由来の DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ I (K4 PolI) を単離し、K4 PolI の逆転写酵素化を試みた。まず、K4 PolI の DNA/RNA 識別機構に着目して構造予測を行ったところ、酵素の鋳型結合ドメインを構成する複数のアミノ酸残基が、RNA が有する 2'

水酸基に対して立体障害となっていることが推察された。これらについて、立体障害を解消するように、アラニンへの置換変異体を作製し評価したところ、329番目のロイシンをアラニンに置換した L329A 変異体から特に強い逆転写酵素活性が確認された。L329A 変異体は、単一の酵素からなる 1 ステップの構成にて標的 RNA の増幅が可能であり、簡便な逆転写 PCR 用試薬としての応用が期待される。

第二章 ペーパークロマトグラフィーを利用した multiplex-PCR 産物の迅速検出技術の開発

核酸増幅検査の検出工程は、PCR 産物などの増幅核酸を検出する工程である。これまでに、簡便な PCR 産物の検出技術として、ペーパークロマトグラフィーを応用した Kaneka DNA Chromatography Chip (KDCC) が報告されている。KDCC による検出においては、増幅工程の PCR にて、プライマーの 5'末端側に修飾部位を介し DNA タグを付加した修飾プライマーを用いる。プライマーの修飾部位は DNA ポリメラーゼの伸長を当該部位で停止させ、PCR を経ると両末端に一本鎖 DNA タグを有する PCR 産物が得られる。この PCR 産物を DNA タグと相補的な DNA プローブが固定化されたペーパークロマトグラフィーチップに供することにより、約 5 分で PCR 産物を目視検出できる。またこの技術は DNA タグとプローブの組み合わせを増やすことで、Multiplex-PCR にも対応可能である。しかし、修飾種によっては適切に伸長反応を停止できず、検出感度の低下や、修飾の付与による PCR 増幅速度の低下が課題となっていた。

本章においてはこの課題に対し、伸長停止効率が高く、PCR における増幅効率を低下させない修飾種を見出し、KDCC へ応用することでその解決を試みた。修飾物質としては、Azobenzene、Trimethylene、Triethylene glycole、Inverted nucleotide を選定し、伸長停止効率と PCR 増幅速度を解析した。その結果、DNA ポリメラーゼの種類に依らず、Azobenzene 修飾プライマーを用いた場合、最も高い伸長停止効率と増幅速度を示した。さらに、Azobenzene 修飾プライマーと KDCC を組み合わせた検出系は、同一の PCR 条件において、他の修飾プライマーに比べ 10~100 倍高感度となることを確認した。またこの知見を応用し、Herpes Simplex Virus 1, 2 を識別検出可能な多項目検出系を構築した。本技術は簡便・迅速な multiplex-PCR 産物の検出技術として有用と考えられる。

総括

本研究においては、核酸増幅検査の各工程を簡便・迅速化するための要素技術を開発することを目的とし検討を行った。第一章においては、逆転写酵素活性と DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性を併せ持つ耐熱性酵素 (K4PolII 変異体) を開発し、1 ステップでの簡便な RT-PCR を実現した。第二章においては、Azobenzene 修飾プライマーとペーパークロマトグラフィーチップを組み合わせ、multiplex-PCR 産物の迅速検出技術を開発した。これらの核酸増幅検査の簡便・迅速化に関わる要素技術を組み合わせることで、小規模医療施設や開発途上国における核酸増幅検査の実現、ならびに感染症の早期検出・診断による感染拡大の防止に貢献するものと期待できる。