

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	オンサイトでの迅速・簡便な核酸増幅検査に向けた リコンビナーゼ・ポリメラーゼ増幅法の改良				
研究組織	代 表 者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	兒島 憲二
	研究分担者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	轟木 堅一郎
		所属・職名	薬学部・助教	氏名	古庄 仰
		所属・職名		氏名	
	発 表 者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	兒島 憲二

講演題目
リコンビナーゼ・ポリメラーゼ増幅に用いる T4 フェージ由来ヘリカーゼ および DNA ポリメラーゼの調製および性能評価
研究の目的、成果及び今後の展望
【目的】核酸増幅検査は、新型コロナウイルス感染症の PCR 検査に代表されるように感染症蔓延の抑制などに貢献している。PCR 検査は、核酸増幅検査のゴールドスタンダードとして既に確立された方法ではあるが、反応液の温度を上げ下げする装置が必要なため、その実施は病院などの検査施設に限られ、屋外などでの現場（オンサイト）では実施困難である。研究代表者らは、PCR と同様の核酸増幅がヒトの体温と同程度の温度で起こる「リコンビナーゼ・ポリメラーゼ増幅（RPA）法」に着目している。この RPA 法では 37℃ 付近の一定温度で核酸増幅が進行するため、PCR のような特別な装置を必要とせず、RPA 法により増幅した核酸を妊娠検査薬と同様の原理に基づく試験紙を用いて検出すれば、装置を全く用いることなくオンサイトでの核酸増幅検査を実施することができる。また、PCR 法に比べ RPA 法は核酸増幅速度も速く、迅速に陽性／陰性を判定することができる長所もある。本研究では、RPA 法の核酸増幅速度のさらなる向上を目標とし、RPA 法に用いている従来の鎖置換 DNA ポリメラーゼの代替として、併用により速い鎖置換 DNA 合成が報告されている T4 フェージ由来ヘリカーゼ gp41 および DNA ポリメラーゼ gp43 の調製法の確立および性能評価を行った。 【成果】gp41 遺伝子の N 末と C 末に His₆ タグを付加してから pET28 ベクターに導入することで gp41 の発現ベクターを構築した。gp43 についても同様にして発現ベクターの構築を試みたが成功しなかったため、Addgene より gp43 の発現ベクターを購入し、N 末に His₆ タグを付加したものを発現ベクターとして用いた。両酵素について、それぞれ発現させた大腸菌の菌体内可溶性画分から、Ni アフィニティークラム、イオン交換カラムを用いた精製条件を検討し、高純度に精製する方法を確立した。gp41 については一本鎖 DNA 存在下での ATPase 活性を指標として性能を評価したところ、RPA の反応条件である 40℃、20 分間のインキュベートでもほとんど失活しなかった。また、RPA 反応液に molecular crowding 剤として添加する PEG35000 の濃度の増大に伴い、gp41 の酵素活性が増大することも明らかになった。 【今後の展望】本研究で自家調製法を確立した gp41 と gp43 を併用して RPA を行い、従来の鎖置換 DNA ポリメラーゼを使用した場合と核酸増幅性能を比較する。今後も RPA 法を改良してゆき、感染症の検査のほかにも、核酸を標的とした疾病の早期発見法の開発につなげていきたい。