

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

藤原 伸介*・藤原 綾子・秀瀬 涼太

はじめに

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。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、ワックスや抗体を利用したホットスタート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ぐすため、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。本稿は超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* が有するさまざまなヘリカーゼがcDNA合成反応や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一端について解説する。

核酸検出技術の課題および従来の解決法

RNAを鋳型にcDNAを合成する逆転写酵素はRT-PCRや転写量解析、マイクロアレイ解析などに応用されている。また近年、病原性微生物の検出にRNAを標的とする方法が注目されている¹⁾。現在、病原体検出にバイオアッセイや抗体を用いた方法などが用いられている。しかしながら、バイオアッセイでは病原体を増殖させる必要があることや、抗体検査では感染後血清中に抗体が検出されるまでに1週間以上がかかるなど、検出に時間を要していた。一方、逆転写酵素を使用してRNAを検出する方法では病原体を増殖させる必要なく毒素が大量に生成される前の段階（転写レベル）で検出するため、早期診断につながる利点がある。これらの技術において、逆転写酵素は主要な役割を担っており、一般的には伸長活性が高いという理由からレトロウイルス由来の逆転写酵素であるMoloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT) やavian myeloblastosis virus reverse transcriptase (AMV-RT) が用いられている。しかし、レトロウイルス由来の逆転写酵素は安定性が低く、低温(37–45°C)での反応が必要となる。一本鎖RNAは配列によっては低温でステムループの高次構造をとる

ため、逆転写酵素の進行が停止し、cDNAの合成が阻害されてしまう。このような不完全なcDNAの合成は転写量解析などにおいて問題である。これらの問題を防ぐため、耐熱性逆転写酵素を開発しようという試みが行われており、MMLV由来逆転写酵素については部位特異的変異導入によるRNaseH活性の除去やプライマーアクセプタードメインの変異挿入により安定性が上昇したという報告がある²⁻⁵⁾。

PCRは1983年にMullisらにより開発された核酸を増幅する手法であり、遺伝子クローニング、DNAシーケンス、遺伝子診断におけるSNPs解析、病原性微生物の検出などに利用されている。しかしながら、PCRには目的とは異なった領域が増幅される誤増幅という問題がある。誤増幅は主にPCRのアニリング反応時にプライマーがミスアニールすることによって生じる。通常、誤増幅を防ぐためにアニリング温度やMg²⁺濃度の検討、プライマーの再設計が試みられる。しかしながら、これらの方法では誤増幅を解消できないことがある。そこで、誤増幅を抑制するための方法が開発され、その一つの方法としてホットスタート法がある。ホットスタート法は数種類あり、一つ目はワックス法と呼ばれるオイルを使用する方法である⁶⁾。この方法はPCR反応液を二層に分けDNA鋳型とDNAポリメラーゼをPCRの初反応まで分離する方法である。これによりワックスが溶解するPCRの熱変性段階までの副反応を抑制することができる。二つ目の方法は *Thermus aquaticus* や *T. kodakarensis* 由来のDNAポリメラーゼに対する中和モノクローナル抗体を使用する方法である⁷⁾。この方法では抗体がDNAポリメラーゼの二つの活性中心（ポリメラーゼ活性中心やエキソヌクレアーゼ活性中心など）をマスキングすることでPCR反応が開始するまでの副反応を抑制する。これによりプライマーダイマーやプライマーのミスアニールが低減される。これらの抗体はPCRの最初の変性段階で失活するため、PCR反応中のポリメラーゼの活性には影響を及ぼさない。抗体を用いる方法はワックス法よりも比較的効果的であったが、これらホットスタート法を用いても長いDNA領域を増幅させる際や高GC含量の鋳型を使用した際の副反応は解消されず、完全には誤増幅を抑制させることはできない。また、最近

*著者紹介 関西学院大学大学院理工学研究科生命科学専攻（教授） E-mail: fujiwara-s@kwansai.ac.jp

別のアプローチとして好熱性バクテリアのミスマッチ修復経路のイニシエーターである mismatch-recognizing protein (MutS) をPCR反応液に添加し、誤増幅を抑制する方法が報告されている⁸⁾。MutSはPCRにおいてはミスマッチしたプライマーと鋳型の複合体に結合し、DNAポリメラーゼによって合成されるのを防ぐ。本稿では高精度に核酸を検出する新たな方法として核酸を解く特徴を持つ耐熱性のヘリカーゼを用いた方法を紹介する。

核酸検出に適したヘリカーゼとは

ヘリカーゼはDNAやRNA代謝に関与するほぼすべての生物学的プロセスを駆動させるためにヌクレオシド三リン酸(主にアデノシン三リン酸(ATP))のエネルギーを用いるモータータンパク質である。ヘリカーゼは二本鎖の核酸から一本鎖への解離や核酸関連タンパク質の除去、クロマチンリモデリング介助に関与しており、アミノ酸配列の相同性、酵素極性(5'→3'もしくは3'→5')、オリゴマー状況によって6つのスーパーファミリーに分類される。もっとも大きいスーパーファミリーSF1, SF2は6量体を形成せず単量体または二量体で機能するヘリカーゼとして知られている。これらのスーパーファミリーは二つの遺伝子組換えタンパク質RecA様ドメインからなるヘリカーゼコアダメインを共有している。ヘリカーゼコアダメインはモチーフQ, I, Ia, Ib, II, III, VIから構成されており、モチーフIおよびIIはWalker A (リン酸結合ループ), Walker B (Mg²⁺結合アスパラギン酸モチーフ)として知られており、それぞれNTPs結合領域を有している。多くのSF1, SF2ヘリカーゼは分岐した鎖の先端に位置する楔(βヘアピン)を加水分解により駆動させて二本鎖を分離させる。さらにSF1およびSF2は移行方向によってグループA, Bに細分類され、SF1/2Aは3'→5'方向で、SF1/2Bは5'→3'である。SF1は三つのファミリー、SF2は9つのファミリーからなる。また最近、SF2に新規のファミリーArchaea-specific helicase(ASH)が同定された。ASHはユーリアーキオータに保存されているが生理学的機能は分かっていない⁹⁾。ASHはユーリアーキオータ門に特異的な酵素であり、正確にはEuryarchaeota-specific helicase (ESH)として位置付けられるべきものである。

逆転写反応およびPCRに適したヘリカーゼを探索するうえで重要な点は①耐熱性を有す、②高温で活性を有す、③基質特異性(ミスアニールしたプライマーは剥がすが、正しい位置にアニールしたプライマーは剥がさない)である。核酸検出に使用するヘリカーゼの候補とし

て超好熱性アーキア *T. kodakarensis* 由来のものを使用した。本菌は鹿児島県小宝島の熱水噴出孔から分離された絶対嫌気性の硫黄還元型超好熱始原菌であり、生育温度が60~95°C、至適生育温度は85°Cである。よって、本菌が持つヘリカーゼの多くは耐熱性であると考えられる。数種のヘリカーゼを調べたところ、2種類のヘリカーゼでプライマーの特異性を向上させるというユニークな性質が認められた。これら2種類のヘリカーゼであるDEAD box RNA helicase (*Tk-DeaD*), Euryarchaeota-specific helicase A (*Tk-EshA*) を精製し、ATPase活性およびアンワインド活性を測定した。*Tk-EshA*の至適ATPase活性温度は80°Cと高いのに対し、*Tk-DeaD*は50°Cと比較的低い温度であった^{10,11)}。アンワインド活性測定による基質特異性評価の結果、*Tk-DeaD*は両端突出型および5'突出型の二本鎖DNA、高次構造を有す一本鎖RNA, RNA/DNAハイブリッド基質をアンワインドし、*Tk-EshA*は両端突出型及び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¹¹⁾。このことから、*Tk-DeaD*は5'末端側から、*Tk-EshA*は3'末端側からRNAおよびDNAをアンワインドしていると示された。本説では *T. kodakarensis* 由来ヘリカーゼのうち逆転写反応の感度を向上させた *Tk-DeaD* およびPCRの精度を上昇させた *Tk-EshA* についてその効果の詳細を紹介する。

耐熱性ヘリカーゼを用いた

逆転写反応効率の上昇およびPCRノイズの低減

***Tk-DeaD*が逆転写反応効率へ及ぼす影響** *Tk-DeaD*の至適活性温度は50°Cであり、一本鎖RNAの高次構造を解く¹⁰⁾。そのため、*Tk-DeaD*は逆転写反応時(40°C)において鋳型RNAの高次構造を解き、逆転写酵素を進行させ、cDNA合成効率を向上させる可能性が考えられたため、*Tk-DeaD*を添加しRT-PCRを行った。逆転写反応の鋳型には40°Cで安定なステム構造を形成するセレウス菌由来の毒素遺伝子である *cesA* のmRNAを使用し、プライマーはアニール領域がステム構造内に存在するように設計した(図1A)。つまり、安定な二次構造を形成している *cesA* mRNAがアンワインドされない限り、RNAを検出することができない。レトロウイルス由来の逆転写酵素MMLV-RTおよび *Tk-DeaD* を使用して逆転写反応を行い、cDNAを合成させ、PCRにより増幅させたところ、*Tk-DeaD*非存在下においては、cDNAは合成されなかったが *Tk-DeaD*添加条件では濃度依存的にcDNA合成量が増加した(図1B)。しかし、過剰量(25 nM)の *Tk-DeaD* を添加するとcDNAの合成が阻害された。

以上より、*Tk-DeaD*が二次構造形成したRNAを解くことでcDNA合成効率が上昇するが、過剰量の*Tk-DeaD*が存在するとプライマーと*cesA* mRNA 鋳型の二本鎖をも剥がしてしまった可能性が考えられる。したがって鋳型に適した濃度の*Tk-DeaD*の添加は少量のRNAを検出するための有用な方法であることが示された。

***Tk-EshA*がPCR特異性へ及ぼす影響** *Tk-EshA*のPCRへの影響を検討するためにPCR反応液にヘリカーゼを添加しPCRを行った。鋳型には*T. kodakarensis*由来16S rDNA (1498 bp)を用い、その全長を増幅させた。PCRに使用したDNAポリメラーゼはホットスタート法に用いられているKOD plus polymeraseである。その結果、ヘリカーゼ非添加の条件では複数の誤増幅産物(ノイズDNA)が見られた(図2A)。一方、50 nM *Tk-EshA*を添加した条件では、非特異的に増幅されたDNAが消失した(図2A)。過剰量(100 nM)の*Tk-EshA*を添加す

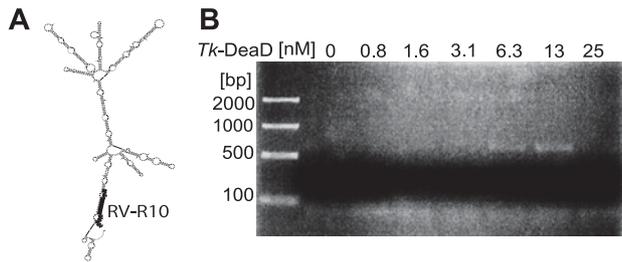


図1. *Tk-DeaD*の逆転写効率へ及ぼす影響。(A) 40°Cにおける*cesA* mRNAの二次構造予測。逆転写反応時にプライマー(RV-R10)が結合する領域を黒矢印で示している。mRNA二次構造の自由エネルギー変化量(ΔG°)は-110.09 kcal/molである。(B) *cesA* mRNAを鋳型に*Tk-DeaD*存在、非存在下において逆転写反応を行い、cDNAを合成させたのち、TaqポリメラーゼでRT-PCR反応を行った。RT時に図Bに示す濃度で*Tk-DeaD*を添加した。

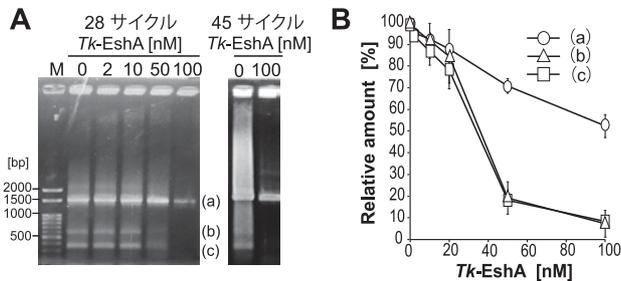


図2. *Tk-EshA*のPCR特異性への影響。(A) *T. kodakarensis*由来16SrDNAの1498 bpを標的とし、*Tk-EshA*, TK0928を用いたPCRを行った。ヘリカーゼの濃度は0, 2, 10, 50, 100 nMである。(B) *Tk-EshA*を添加によるPCR増幅産物量の割合。○: 目的のDNA増幅産物(a), □: 誤増幅DNA産物(b), △: 誤増幅DNA産物(c)。DNA増幅産物量の割合はImageJ softwareを用いて測定し、それぞれヘリカーゼを添加していない条件でのバンド強度を100%として示した。

ると、目的領域の産物も減少した。そのためPCRサイクル数を28から45に増やして100 nM *Tk-EshA*を加えて反応させたところ、目的の産物バンドのシグナル強度は高くなったが、誤増幅バンドは見られなかった。次にアガロースゲル上の目的のバンド(a)、および非特異的なバンド(b, c)のバンド強度を測定することで増幅されたDNA量を比較した(図2B)。その結果*Tk-EshA*添加による目的のDNA量の減少率はノイズDNAの減少率よりも低いことから、*Tk-EshA*はPCR時に優先的にミスアニールしたプライマーと鋳型の二本鎖を剥がすことで非特異的増幅を抑制していることが明らかとなった。

競合プライマー存在下における*Tk-EshA*がPCR特異性へ及ぼす影響 *Tk-EshA*がどのように結合したプライマーと鋳型の二本鎖をアンワインドしているのかを検証するため、目的領域の内側に部分的に結合するプライマーを設計した。完全に一致するプライマーの組合せでは1498 bpのDNAが増幅される。また、部分的に結合する5'突出型プライマーまたは3'突出型プライマーの組合せでは約800 bpのDNA産物が生じる。*Tk-EshA*を添加していない条件では目的のバンド(1498 bp)およびノイズバンド(800 bp)が検出された。*Tk-EshA*を添加した条件においては、ノイズバンド(800 bp)は消失し、目的バンド(1498 bp)のみが検出された(図3A)。以上より、*Tk-EshA*は完全に一致して結合しているプライマーと鋳型の二本鎖DNAよりも部分的に結合している二本鎖DNAを優先的に剥がすことが示された。また、*Tk-EshA*が3'側からアンワインドする特徴を有することから、5'突出型プライマーを鋳型の3'末端側から、

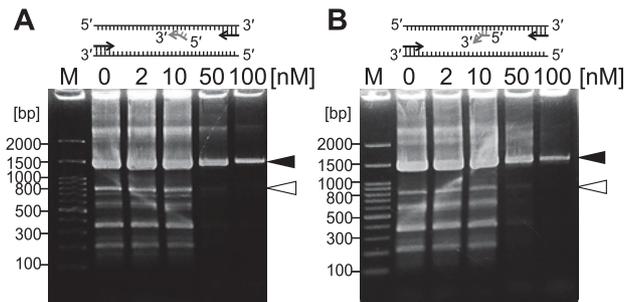


図3. ミスアニールするプライマー存在下での*Tk-EshA*がPCRへ及ぼす影響。*Tk-EshA*添加時における競合してミスアニールするプライマーを用いたPCR。標的は*T. kodakarensis*由来の16S rDNA (1498 bp)である。(A) *Tk-EshA*存在下における5'突出型プライマーを用いたPCRの増幅パターン。*Tk-EshA*は示した濃度で添加した。目的のDNA産物(1498 bp): ◀, 誤増幅DNA産物(805 bp): ◁。(B) 3'突出型プライマーを用いた*Tk-EshA*存在下におけるPCRの増幅パターン。*Tk-EshA*は図に示した濃度で添加した。◀: 目的のDNA産物(1498 bp), ◁: 誤増幅DNA産物(800 bp)。ミスアニールしたプライマーを灰色の矢印で示した。

3' 突出型プライマーをプライマーおよび鋳型の3' 側末端側から剥がしていると考えられる。

Tk-EshAが高GC含量鋳型を使用したPCRへ及ぼす影響 通常、GC含量の高い鋳型を使用した際は鋳型DNAが二次構造を形成し、さらにプライマーが目的とは異なった領域にアニールするためDNA増幅が困難であり誤増幅が生じやすい。そこで、*Tk-EshA*が高GC含量鋳型DNAの増幅に及ぼす影響を検討した。緑膿菌由来の毒素遺伝子*toxA* (1917 bp; GC含量, 69%)を標的とし、KOD-Plus polymeraseを使用してPCRを行った。*Tk-EshA*非存在条件では複数のノイズDNAが見られた(図4)。また、これらのノイズDNAはアニリング温度を62°Cから68°Cへと上昇させても解消されなかった。50 nM *Tk-EshA*を反応液に添加したところ、アニリング温度が62~68°Cすべての条件においてノイズDNAが解消された(図4)。しかしながら、100 nM *Tk-EshA*を添加したところ目的領域のDNAも増幅されなかった。つまり、鋳型に適した濃度の*Tk-EshA*を添加することで、アニリング温度を上昇させても消失しなかったノイズDNAもアニリング温度が低い条件(62°C)において解消される。この*Tk-EshA*添加効果は、アニリング温度を上昇させることよりも効果的であることが明らかとなった。

Tk-EshAがARMS法を用いたSNP解析へ及ぼす影響 校正活性を有さないファミリーA DNAポリメラーゼを用いてDNAを増幅させる手法amplification refractory mutation system (ARMS法) に対する*Tk-EshA*の添加効果を検証した。ARMS法はプライマーにミスマッチがあると、アニリングが困難になりPCRでDNAを増幅できないことを利用した方法である。この方法はハイブリダイゼーションや制限酵素処理を必

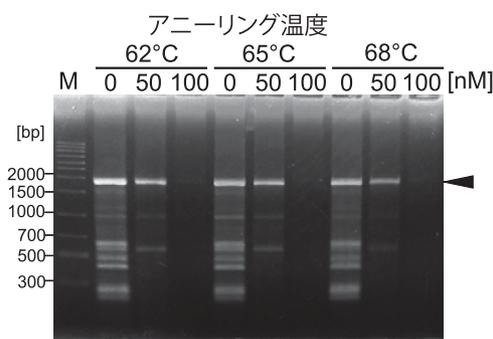


図4. *Tk-EshA*が高GC含量鋳型を用いたPCRへ及ぼす影響. *P. aeruginosa*由来の*toxA*遺伝子(1917 bp)を標的とし、*Tk-EshA*添加した条件でPCRを行った。*Tk-EshA*は0, 50, 100 nM添加し、PCRのアニリング温度は62, 65, 68°Cとした。

要としないため、疾患遺伝子変異の検出に利用されている。標的にはヒトのaldehyde dehydrogenase 2(*ALDH2*)遺伝子を用いた。*ALDH2*はエタノールが代謝されてできるアルデヒドを酸化する酵素であり、その活性の欠損は*ALDH2*遺伝子の点突然変異E487Kによるものである。対立遺伝子の組合せから正常型ホモ接合体(NN型)、ヘテロ接合体(NM型)、変異型ホモ接合体(MM型)の3種類の遺伝子が存在する。このうちのどの遺伝子型かを調べることでアルコールに対する感受性を判断することができる。アレル特異的なプライマーを用いてPCRを行うと、サンプルによっては非特異的なバンドが複数見られ、遺伝子型を特定することが困難な場合がある。それに対し、*Tk-EshA*添加するとノイズが消え、目的のバンドのみが検出された。図5にはヘテロ遺伝子型の検出に際し、*Tk-EshA*が効果的だった例を示す。*Tk-EshA*の添加は*ALDH2*の遺伝子型以外のARMS法を用いたSNP解析に対しても有効であると思われる。

逆転写反応及びPCRにおけるヘリカーゼの働き

*Tk-DeaD*は高次構造をとる鋳型RNAを5'末端側からほどき、逆転写反応効率を上昇させることでRNA検出感度が上昇する(図6)。*Tk-EshA*は非特異的に結合したプライマーと鋳型の二本鎖をプライマーの5'末端側が結合していない場合は鋳型の3'末端側から、プライマーの3'末端側が結合していない場合は鋳型及びプライマーの3'末端側からアンワインドし、鋳型から遊離させる。一方、目的領域に結合したプライマーと鋳型は5'突出型二本鎖DNAであり*Tk-EshA*がアンワインドするこ

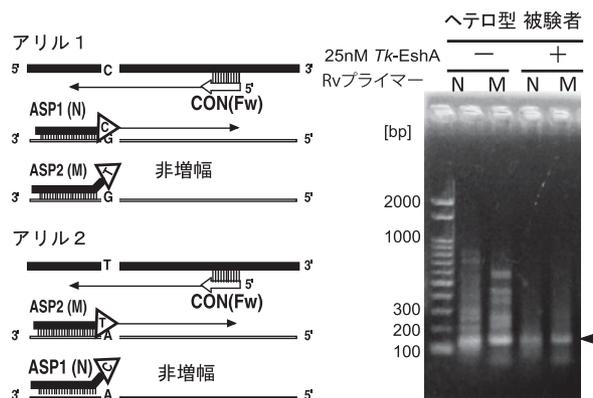


図5. ARMS法に対する*Tk-EshA*の添加効果. ヒトのaldehyde dehydrogenase 2遺伝子(*ALDH2*)を標的とし*Tk-EshA*を25 nM添加してPCRを行った。Con (Fw)はフォワードプライマーを、ASP1 (N)、ASP2 (M)はそれぞれ正常型、変異型DNAに結合するリバースプライマーを示す。Lane N: ASP1 (N)プライマーとCON (Fw)プライマーによる増幅、Lane M: ASP2 (M)プライマーとCON (Fw)プライマーによる増幅。

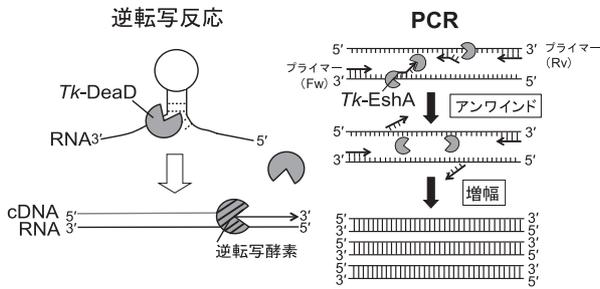


図6. 逆転写反応およびPCRにおけるヘリカーゼの働き

とは困難であるため、優先的にミスアニールしたプライマーを剥がすことによりDNA増幅の特異性が増強される。Tk-DeaDは逆転写効率の上昇、Tk-EshAはPCRにおけるノイズ低減効果を有すが、これらのヘリカーゼはDNAとRNAの両方をアンワインドすることから、逆転写反応やPCRのみならず他の核酸を検出する方法 (transcription-mediated amplification, ligase chain reaction, nucleic acid sequence-based amplificationなど) に対する効果も期待される。

謝 辞

本研究は独立行政法人科学技術振興機構の研究成果展開事業 (先端計測分析技術・機器開発プログラム) による成果です。また、研究を通じ終始ご指導いただいた京都大学大学院教授保川清先生にお礼申し上げます。

文 献

- 1) Yasukawa, K. *et al.*: *Enzyme Microb. Technol.*, **46**, 391 (2010).
- 2) Arezi, B. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **37**, 473 (2009).
- 3) Kotewicz, M. L. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **16**, 265 (1988).
- 4) Gerard, G. F. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3118 (2002).
- 5) Konishi, A. *et al.*: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **169**, 77 (2013).
- 6) Chou, Q. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1717 (1992).
- 7) Mizuguchi, H. *et al.*: *J. Biochem.*, **126**, 762 (1999).
- 8) Fukui, K. *et al.*: *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 6436 (2013).
- 9) Chamieh, H. *et al.*: *Gene*, **576**, 214 (2016).
- 10) Shimada, Y. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **389**, 622 (2009).
- 11) Fujiwara, A. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 3022(2016).