



表1. 第1サイクルの要因と水準

要因	水準1	水準2	水準3
1 MM4 (nM)	0.01	0.1	1
2 K4pol <sub>L329A</sub> (nM)	0	1	100
3 Tk-EshA (nM)	0	1	50
4 dNTP (each) (mM)	0.05	0.25	0.5
5 KCl (mM)	10	50	200
6 Tris-HCl (pH 8.3) (mM)	5	25	100
7 Bicine-KOH (pH 8.2) (mM)	10	50	200
8 MgCl <sub>2</sub> (mM)	1	5	20
9 Mn(OCOCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (mM)	0.2	1	5
10 CH <sub>3</sub> COOK (mM)	30	100	300
11 D4R4 primer (μM)	0.1	0.5	1
12 <i>E. coli</i> RNA (μg/ml)	0	1	10
13 glycerol (% v/v)	0	3	9

表2. 第1サイクルの各水準のSN比 (S/N) ならびに各要因の変動 (V) と寄与率 (P)

要因	S/N <sup>1</sup>			V <sup>2</sup>	P (%) <sup>3</sup>	
	水準1	水準2	水準3			
1	-21.58	-38.17	-65.77	110.7	21.8	
2	-50.21	-31.13	-44.19	21.2	4.2	
3	-56.23	-28.63	-40.67	42.6	8.4	
4	-44.19	-44.19	-37.15	3.7	0.7	
5	-50.21	-37.15	-38.17	11.7	2.3	
6	-56.23	-34.65	-34.65	34.5	6.8	
7	-44.19	-50.21	-31.13	21.2	4.2	
8	-38.17	-27.60	-59.75	59.7	11.7	
9	-50.21	-31.13	-44.19	21.2	4.2	
10	-44.19	-63.28	-18.06	114.5	22.5	
11	-44.19	-46.69	-34.65	9.0	1.8	
12	-44.19	-56.23	-25.11	54.7	10.8	
13	-44.19	-37.15	-44.19	3.7	0.7	
			(Total)	508.2	(Total)	100

<sup>1</sup>S/N<sub>m</sub> = -10 log (s<sub>m</sub><sup>2</sup>) (s<sub>m</sub>は実験条件mのスコア), S/N<sub>x,i</sub> (要因xの水準iのS/N)は、水準iが使われている9個の実験条件のS/N<sub>m</sub>の合計 (例: 要因1において水準1が使われている実験条件が1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9である場合, S/N<sub>1,1</sub> = S/N<sub>1</sub> + S/N<sub>2</sub> + S/N<sub>3</sub> + S/N<sub>4</sub> + S/N<sub>5</sub> + S/N<sub>6</sub> + S/N<sub>7</sub> + S/N<sub>8</sub> + S/N<sub>9</sub>となる). また、要因2において水準1が使われている実験条件が1, 2, 3, 10, 11, 12, 19, 20, 21である場合, S/N<sub>2,1</sub> = S/N<sub>1</sub> + S/N<sub>2</sub> + S/N<sub>3</sub> + S/N<sub>10</sub> + S/N<sub>11</sub> + S/N<sub>12</sub> + S/N<sub>19</sub> + S/N<sub>20</sub> + S/N<sub>21</sub>となる).

<sup>2</sup>V<sub>x</sub> = (S/N<sub>x,1</sub><sup>2</sup> + S/N<sub>x,2</sub><sup>2</sup> + S/N<sub>x,3</sub><sup>2</sup>)/9 - (S/N<sub>1</sub> + S/N<sub>2</sub> + ... + S/N<sub>27</sub>)<sup>2</sup>/27

<sup>3</sup>P<sub>x</sub> = V<sub>x</sub> / (V<sub>1</sub> + V<sub>2</sub> + ... + V<sub>13</sub>) × 100

とも低い標的RNA濃度に基づき、各実験条件に点数をつけた。すべての実験条件の点数がついた後、これを本技法に基づいて解析し、各要因の各水準に点数をつけ、

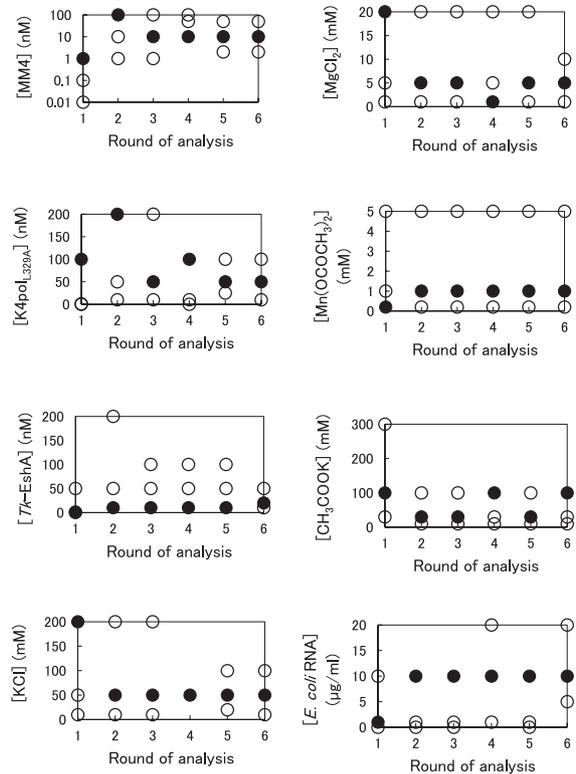


図2. 各要因の各サイクルでの水準値. ●は最適であった水準値, ○はそれ以外の水準値を示す.

表3. 最適反応条件

MM4 (nM)	10	Mn(OCOCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (mM)	1
K4pol <sub>L329A</sub> (nM)	50	CH <sub>3</sub> COOK (mM)	100
Tk-EshA (nM)	20	D4R4 primer (M)	0.5
dNTP (each) (mM)	0.2	trehalose (mM)	100
KCl (mM)	50	ATP (mM)	1
Tris-HCl (pH 8.3) (mM)	20	<i>E. coli</i> RNA (μg/ml)	10
Bicine-KOH (pH 8.2) (mM)	50	glycerol (% v/v)	0
MgCl <sub>2</sub> (mM)	5	温度 (°C)	50

各要因の各水準に対してS/N比、各要因に対して変動および寄与率を算出した(表2)。ここで、S/N比は低いほど、その水準が至適であることを意味する。また、変動および寄与率は大きいほど、その要因の水準の違いによって性能が大きく支配されることを意味する。

第1サイクルの結果(表2)に基づき、新たに13個の要因および各要因について3個の水準を設定し、27個の実験条件の感度を調べた。筆者らはこのサイクルを6回繰り返した。8個の要因について、各サイクルにおける水準値を図2に示す。最終的に得られた最適条件を表3に示す。

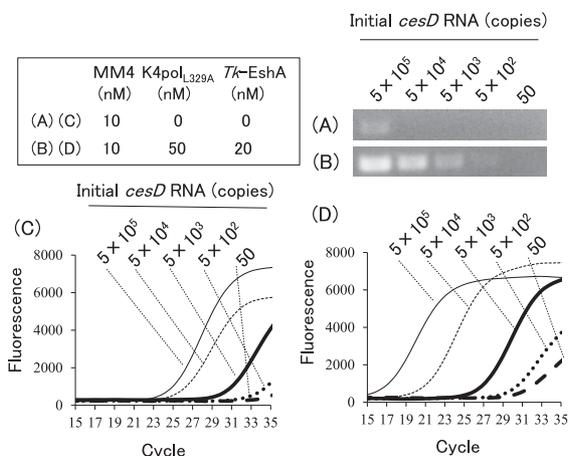


図3. 3酵素によるcDNA合成.  $50 \sim 5 \times 10^5$  個の *cesD* RNA から, MM4 存在下, K4pol<sub>L329A</sub> および Tk-EshA 非存在下 (A, C) あるいは存在下 (B, D) でcDNA合成を行った後, PCRを行い, 反応物をアガロースゲル電気泳動にかけた (A, B). あるいはリアルタイムPCRを行った (C, D).

MM4だけを用いる従来のcDNA合成では, *cesD* RNAの初期コピー数が  $5 \times 10^4$  の場合, PCR後の電気泳動で増幅産物のバンドが見られず, リアルタイムPCRで蛍光が立ち上がらなかった. 一方, 本検討で得られた最適条件で3酵素を用いてcDNA合成を行うと, 初期コピー数が  $5 \times 10^2$  の場合でも検出された(図3). これらの結果は, レトロウイルス由来の逆転写酵素に, 逆転写活性を有する耐熱型DNAポリメラーゼおよびDNA/RNAヘリカーゼを加えることにより, cDNA合成の感度が向上したことを示唆する<sup>5)</sup>. 本cDNA合成系の正確性については現在検討中である.

### 品質工学の技法による反応条件の最適化

上述の結果は, PCRチューブを用いて得られたものである. 筆者らはさらに, 移送式マイクロアレイであるMMVチップ上でcDNA合成反応を行い, まったく同様の技法で6回のサイクルによる反応条件の最適化を行った. MMVチップは縦横2.5 cmの平板のチップで, 1枚のチップは容量が0.5  $\mu$ lである1024個のウェルをもつ. MMVチップの特徴は, チップからチップへ反応液を移送できることである<sup>6)</sup>.

MMVチップを用いた場合もまったく同様の最適条件が得られた(データは示さず)<sup>5)</sup>. このことは, 本技法が複数の酵素による反応の最適化に適していることを示唆する.

### DNA/RNAヘリカーゼの効果

このサイクルを繰り返す中で, Tk-EshAの至適濃度範

囲が狭いことが明らかになった. 第2サイクルでTk-EshAの水準を10, 50, 200 nMとすると, 10 nMが至適であったが, 寄与率は41%という高い値であった. 他のサイクルでも5~45%と高値であった. PCRにおいても, Tk-EshAは至適濃度ではノイズを低減させるが, 高濃度では反応効率を低下させることが報告されている<sup>3)</sup>. これらのことは, DNA/RNAヘリカーゼを核酸増幅反応に用いる場合, 使用濃度の最適化が特に重要であることを示唆する.

### *E. coli* RNAの効果

酵素反応は一般に, 酵素濃度が高いほど反応速度が大きくなる. しかし, cDNA合成の場合, RTが過剰に存在すると標的RNAに非特異的に結合し, 反応を阻害する. 今回の検討ではMM4と*E. coli* RNAの最適濃度はそれぞれ10 nMと10  $\mu$ g/mlであった. *E. coli* RNAは, MM4やK4pol<sub>L329A</sub>が標的RNAに非特異的に結合することを防いでいると考えられる.

### おわりに

超好熱性アーキア*Thermococcus kodakarensis*由来KODポリメラーゼ(KODpol)は高い耐熱性と校正活性を有する. 2016年, emulsion PCRを用いた進化工学的手法により, 逆転写活性を有する変異型KODポリメラーゼ(reverse transcription xenopolymerase: RTX)が創製された<sup>7)</sup>. 今後, 筆者らが開発したcDNA合成技術の感度と正確性を, RTXを含めた他の酵素によるcDNA合成技術と比較していきたい.

### 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, 京都大学片野裕太氏, 馬場美聡氏, 兒島憲二先生, 滝田禎亮先生, 関西学院大学藤原綾子氏, 秀瀬涼太先生, 藤原伸介先生, 大阪府立母子保健総合医療センター柳原格先生, 株式会社カイノス林司氏, 宇治家武史氏にお礼申し上げます.

### 文 献

- 1) Yasukawa, K. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **150**, 299 (2010).
- 2) Sano, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 315 (2012).
- 3) Fujiwara, A. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 3022 (2016).
- 4) Yasukawa, K. *et al.*: *Enzyme Microb. Technol.*, **46**, 391 (2009).
- 5) Okano, H. *et al.*: *Enzyme Microb. Technol.*, **96**, 111 (2017).
- 6) Katano, Y. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **38**, 1203 (2016).
- 7) Ellefson, J. W. *et al.*: *Science*, **352**, 1590 (2016).