

簡易な遺伝子検出法 「NASBA-核酸クロマト法」の原理とその応用

宇治家武史

微量な標的遺伝子を高感度に検出するためPCR法をはじめとしてNASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) 法やLAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法などの核酸増幅法が開発されてきた。PCR法やLAMP法の場合、増幅工程で用いられる酵素は1種類であり、それらは耐熱性DNAポリメラーゼや鎖弛緩型DNAポリメラーゼである。これに対しNASBA法は、3種類の酵素の調和で増幅反応が進む核酸増幅法である。

核酸の検出法にもさまざまな技術があるが、標的核酸の配列情報を利用するか否かで二つに大別される。前者はハイブリダイゼーションに基づくTaqManプローブ法や核酸クロマト法などであり、後者にはゲル電気泳動法やピロリン酸マグネシウムを利用した濁度検出法が含まれる。

本稿では、NASBA法と核酸クロマト法を組み合わせた遺伝子検出技術について焦点をあて、その原理や応用例について紹介する。

NASBA法

NASBA法¹⁾は、3種類の酵素 (AMV逆転写酵素, RNase H, T7 RNA polymerase) と2種類のプライマー (Fプライマーと、5'側にT7プロモーター配列 [5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAG] を持つRプライマー) を用いた等温核酸増幅法である。増幅の原理を概説すると以下になるが、RNAを鋳型にそのアンチセンス一本鎖RNAを合成する工程 (①~④) と、アンチセンス一本鎖RNAを増幅する工程 (⑤~⑨) とに分けられる (図1)。

- ① Rプライマーが鋳型のRNAにアニールし、逆転写酵素によりcDNAを合成
- ② RNase HがRNA/DNA鎖のRNA鎖側を分解
- ③ FプライマーがcDNAにアニールし、逆転写酵素によりT7プロモーター配列を含む二本鎖cDNAを合成
- ④ T7 RNA polymeraseの転写反応でアンチセンスの一本鎖RNAを合成
- ⑤ Fプライマーがアンチセンスの一本鎖RNAにアニールし、逆転写酵素によりcDNAを合成

- ⑥ RNase HがRNA/DNA鎖のRNA鎖側を分解
- ⑦ RプライマーがcDNAにアニールし、逆転写酵素によりプロモーター配列を含む二本鎖cDNAを合成
- ⑧ T7 RNA polymeraseの転写反応でアンチセンスの一本鎖RNAを合成
- ⑨ 上記⑤~⑧を繰り返し、最終的にアンチセンスの一本鎖RNAを増幅

NASBA法の原理は一見複雑だが、実際の操作は鋳型となるRNAにNASBA用の基質や酵素を加えるだけで、10コピーのRNAは30-90分間で10¹²倍のアンチセンス一本鎖RNAとして増幅される。

NASBA法には二つの大きな特徴がある。一つ目の特徴は「等温の増幅反応」である。図1に示すNASBA反応の一連工程はすべて等温で進むため、汎用のヒートブロックがあれば、One StepでRNAの核酸増幅反応を行える。特殊な専用機器を準備する必要はなく、低い初期投資費用で高感度検出というメリットを享受できる。

二つ目の特徴は「増幅産物が一本鎖RNA」である。NASBA法の増幅産物は、PCR法の増幅産物 (二本鎖DNA) とは異なり、変性工程を経ることなく検出プロ-

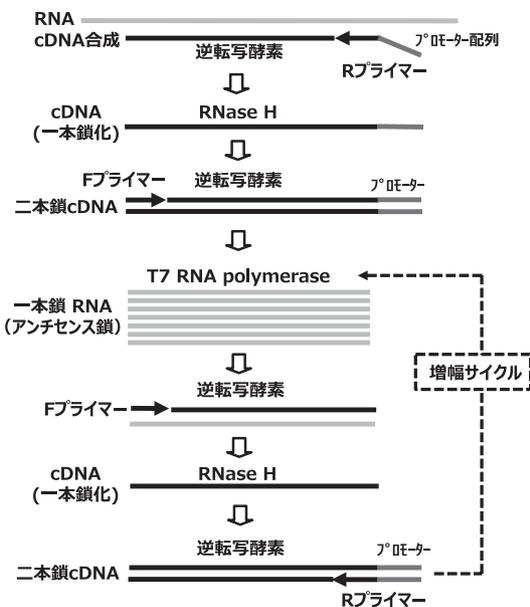


図1. NASBA法の原理

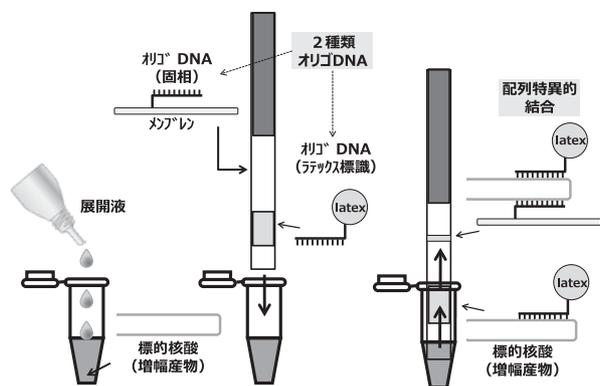


図2. 核酸クロマト法の原理と操作

ブを用いた配列特異的な検出に使用可能である。

核酸クロマト法

核酸クロマト法²⁾(図2)は、毛細管現象を利用して標的核酸をクロマトストリップに導き、そのクロマトストリップ上で配列特異的に捕捉して検出する技術であり、「簡便な操作」および「目視検出」の特徴を有している。

核酸クロマト法の検出操作は、増幅産物に展開液を加え、そこにクロマトストリップを挿すだけであり、非常に簡単である。標的核酸の有無は、検出ラインを目視で確認し判定するため、検出時に機器は必要ない。

増幅産物を検出する場合、増幅反応に使用したプライマーを検出プローブとして転用することは、非特異増幅産物の検出リスクを高める。本稿の核酸クロマト法は、プライマーとは異なる2種類の検出プローブを用いて標的核酸をサンドイッチハイブリする特異性の高い検出系が採用されている。

NASBA-核酸クロマト法の応用

セレウリド産生セレウスの検出試薬 NASBA-核酸クロマト法の増幅・検出性能をセレウリド産生セレウスの検出系を用いて紹介する。

セレウス (*Bacillus cereus*) は、グラム陽性の通性嫌気性桿菌であり、嘔吐毒 (セレウリド) 産生株は食中毒の原因菌である。この食中毒菌を検出するため、セレウリド合成に関与する *cesPTABCD* オペロンの mRNA を標的にして、NASBA-核酸クロマト検出系が構築された³⁾。この検出系は、増幅反応阻害の指標となる Internal Control (以下、IC) との共増幅系を含んでおり、偽陰性の防止も考慮されている。また反応液の展開の成否はリファレンスライン (以下、r) で確認する。判定

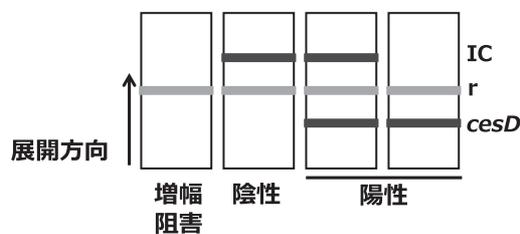


図3. 核酸クロマト法の判定例

例を図3に示す。

NASBA法の増幅性能を確かめるため、*cesD*の合成RNAおよびセレウリド産生セレウスの抽出核酸を用いて検出感度を調べた。10コピーの*cesD*合成RNAを鋳型として、NASBA法の反応時間を5、10、15、20、30、60分と変え試験した。その結果、10分間のNASBA反応で得られた増幅産物で核酸クロマトの検出ラインが表れた(図4)。Brain Heart Infusion培地で培養したセレウリド産生セレウスからEXTRAGEN II試薬(東ソー)を用いて核酸を抽出し、菌数を1、10、100、1000 cfu/testに調製した。増幅時間を30分に固定し試験した結果、このNASBA-核酸クロマト検出系は、10 cfuの菌を検出する能力があると判明した。特異性に関しては、食中毒食品から分離された嘔吐型セレウス100株および下痢型セレウス50株、*Bacillus thuringiensis* 38株などが調べられ、嘔吐型セレウスのみを検出することが示されている⁴⁾。

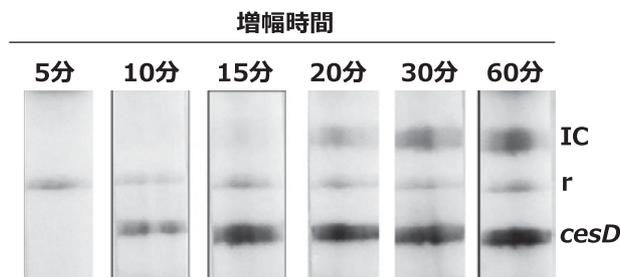


図4. セレウリド産生セレウス. 核酸クロマト検出

CPE産生ウエルシュ菌の検出試薬 遺伝子検査は、一般的に核酸の抽出・増幅・検出の3工程からなる。ここでは、食品(カレー)中の細菌からRNAを抽出し、NASBA-核酸クロマト検出した例をCPE産生ウエルシュ菌の検出系を用いて紹介する。

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は自然界に広く分布している偏性嫌気性桿菌である。ウエルシュ菌

検出ラインとして表れるため、識別検出することが可能である(図5)。

肺炎原因菌のプライマー設計などは、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構の大学発事業創出実用化研究開発事業で山口大学の白井睦訓教授および岐阜大学の江崎孝行教授監修のもと行われた。

DNA NASBA NASBA法は図1に示すようにRNAを鋳型とした核酸増幅であるが、Visset達はplasmid DNAを鋳型にしてNASBA増幅を行い、RNAを鋳型にした時に比べ検出感度は1000倍低くなるものの、増幅可能であることを示した¹²⁾(以降、DNAを鋳型としたNASBAをDNA NASBAと呼ぶ)。

NASBA法の原理上DNA NASBAの律速は、Rプライマーから伸長したcDNAの乖離にあると予想された。これは、鋳型がDNAの場合、NASBA反応はRプライマーアニール後のcDNA合成で止まると考えられたためである。

実際にplasmid DNAを用いて、PCR法を対照としてDNA NASBAの律速がcDNAの一本鎖化にあるかを調べた。はじめに次の手順でDNA NASBAを実施した：①plasmid DNAの熱変性、②プライマーのアニール、③NASBA増幅(NASBA試薬・酵素添加)、④核酸クロマト検出。その結果、検出感度はPCR法よりも低いものの、Visset¹²⁾と同様にDNAを鋳型にしてNASBA増幅を確認できた。

次に以下の手順でDNA NASBAを実施した：①plasmid DNAの熱変性、②プライマーのアニール、③NASBA増幅(NASBA試薬・酵素を添加しcDNA合成)、④熱変性(cDNAの乖離)、⑤NASBA増幅(NASBA試薬・酵素を添加)、⑥核酸クロマト検出。その結果、DNA NASBAの検出感度はPCRと同等になり、DNA NASBAの律速がcDNAの乖離にあることが示唆された。また、この検討は、NASBA法を改良しcDNAを効率良く乖離させる手段を見いだせば、PCR法と同等の感度でDNAを鋳型に増幅できることを意味していた。

最後に

NASBA法は三つの酵素のバランスで反応が進む核酸増幅法であり、単一酵素で行われるPCR法に比べ、これまでほとんど酵素などの改良は行われてこなかった。したがって、酵素の耐熱化や合成速度の速い酵素への改良は、NASBA法の性能改善だけでなく適応拡大につながる可能性がある。

現在、遺伝子検査は簡便性や操作性を高め、クリニックやベットサイドのように患者の近くで検査を行うPOCT(point of care test)分野への参入も始まっている。遺伝子検査が、いつでも、どこでも、誰にでも、簡便に行える検査へと発展していく中で、等温増幅と簡便検出といった特徴を有するNASBA-核酸クロマト法の果たすべき役割は、今後さらに増えるものと期待される。

文 献

- 1) Compton, J.: *Nature*, **350**, 91 (1991).
- 2) 宇治家武史：臨床化学, **36**, 19 (2007).
- 3) カイノス研究用試薬：http://www.kainos.co.jp/products/res.html (2017/3/29)
- 4) Ueda, S. et al.: *Biocontrol Sci.*, **21**, 45 (2016).
- 5) 大分県水産振興課「ヒラメによる食中毒の防止対策ガイドライン」：http://www.pref.oita.jp/uploaded/life/273195_313608_misc.pdf (2017/3/29)
- 6) Sugita-Konishi, Y. et al.: *Jpn. J. Infect. Dis.*, **68**, 145 (2015).
- 7) 農林水産省消費・安全局「ヒラメに寄生した*Kudoa septempunctata*の検出方法について」：http://www.jfa.maff.go.jp/test/saibai/pdf/kudoa_notice_03.pdf (2017/3/29)
- 8) 厚生労働省医薬・生活衛生局「*Kudoa septempunctata*の検出方法について」：http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzentbu/0000124372.pdf (2017/3/29)
- 9) 農林水産省消費・安全局「ヒラメに寄生した*Kudoa septempunctata*の検出方法について」：http://www.jfa.maff.go.jp/test/saibai/pdf/kudoa_notice_04.pdf (2017/3/29)
- 10) Loens, K. et al.: *J. Microbiol. Methods*, **73**, 257 (2008).
- 11) Lau, L. T. et al.: *J. Virol. Methods*, **168**, 251 (2010).
- 12) Voisset, C. et al.: *Biotechniques*, **29**, 236 (2000).