

平成 30 年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

研究種目：個人研究

研究期間：平成 30 年 10 月～平成 31 年 3 月

研究課題名：等温反応かつ正確な DNA 増幅法の開発

ラボ長

所属：物質創成専攻

氏名：白石 都

研究成果

本研究の目的はリコンビナーゼを用いた等温型 DNA 増幅法の開発である。

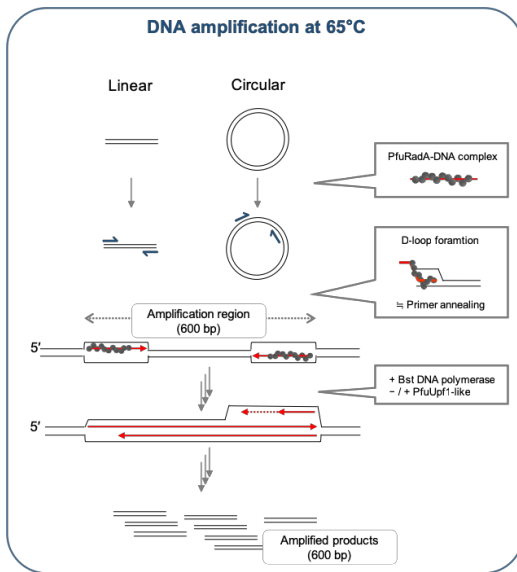


図 1. リコンビナーゼを用いた DNA 合効率の検出系

し、D-loop (図 1) の安定化に寄与することが知られているためである (*J. Biol. Chem.* **277**, 42790–42794 (2002); *DNA Repair* **124**, 403–413 (2013))。

はじめ、RadA と DNA 合成酵素 (Bst DNA polymerase (NEB)) のみを用いて DNA 増幅を試みていたが、非特異的増幅は抑制するというは明らかになったものの、増幅は顕著に促進されなかった。よって、さらに他の 2 つの異なる補助因子を遺伝子クローニングし、組換えタンパク質として添加することにした。

一つは D-loop 形成を促進するとされる一本鎖結合タンパク質である)。 *P. furiosus* 由来の一本鎖結合タンパク質 (PfuRPA32 と PfuRPA41 のサブユニット) は RadA による D-loop を安定化することが知られている (*J. Biol. Chem.* **276**, 25654–25660 (2001) ため、これらを組換えタンパク質として高純度で調製した (図 4A)。もう一つは、アミノ酸配列解析からヘリカーゼと推定されている (*Gene* **576**, 214–228 (2016)) PfuUpf1-like である。PfuUpf1-like は試験的に精製過程のものを用いた (図 4B; 現在高純度の精製方法を確立中)。

リコンビナーゼを用いた DNA 合成効率の評価方法として図 1 に示すような検出系を構築した。リコンビナーゼはすでに活性が報告されている (*J. Biol. Chem.* **275**, 33782–33790 (2000)) 耐熱性菌 (*Pyrococcus furiosus*; Pfu) 由来のもの (PfuRadA) を用いた。まず PfuRadA を組換えタンパク質として高純度に調製した (図 2)。野生型 (WT) に加えて変異体 (K144R) も調製した。このリシン残基 (図 3) のアルギニン残基への変異は他の生物種で ATP 加水分解を抑制

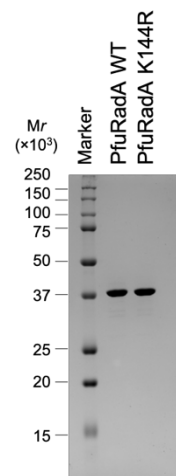


図 2. 精製した PfuRadA WT と K144R 1 μg/lane, 15% SDS-PAGE/CBB

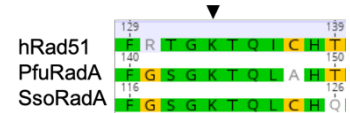


図 3. ATP 加水分解に関与するリシン残基 (▼, K144)

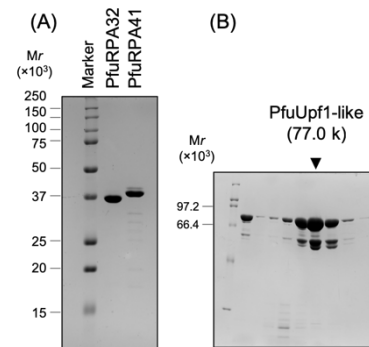


図 4. (A) 精製した PfuRPA32 と PfuRPA41 1 μg/lane, 15% SDS-PAGE/CBB (B) 粗精製段階の PfuUpf1-like

PfuRadA と PfuUpf1-like を用いた増幅結果を図 5 に示す。増幅対象とする DNA は線状と環状のものを用いた。線状 DNA の場合、PfuRadA を加えると非特異的な DNA 増幅が抑制された。これは PfuUpf1 を加えた際も同様であった（スミアの減少; 図 5, lane 1 と lanes 2-8 を比較）。環状 DNA の場合は PfuRadA の添加だけでは DNA 増幅が検出できなかったが、PfuUpf1 を加えることにより、目的の増幅産物（600 bp の DNA 産物）が検出された（図 5, lanes 14-16）。図 6 に示すのは D-loop の安定化に寄与する因子を加えた場合の増幅結果である。PfuRadA K144R も RPA32+41 のいずれの添加も増幅を阻害することがわかった。つまり、D-loop の安定化は DNA 増幅の上昇に寄与しないことが分かった。

以上の研究から、環状 DNA を鋳型として標的とする DNA 領域を等

温で増幅させることに成功した。今後は各酵素の丁寧な生化学的解析を行い、増幅が検出できなかったものについては原因を究明・改善するとともに、増幅が検出されているものについては増幅効率の向上（産物量増大と反応時間短縮）のための最適な条件を決定する。同時に様々な DNA polymerase についてもその活性を検討する（特に等温型 DNA 増幅に適さないとされる正確性に長けた校正機能を有する DNA polymerase を用いる）。

また、興味深いことに等温型 DNA 増幅に応用可能な酵素として、PfuUpf1-like を見出すことができた。私の知る限り Upf1-like (仮名) の性質解析の報告例がこれまでにない。そのため、詳細な生化学的解析は生体内での機能を明らかにするだけでなく、等温 DNA 増幅への応用を提案する新しい知見となりうる。また、2つ目の研究計画として据えている（現在材料準備中の）dCas9 を用いた増幅法の開発にも着手する。

キーワード：遺伝子工学、タンパク質工学、DNA 増幅

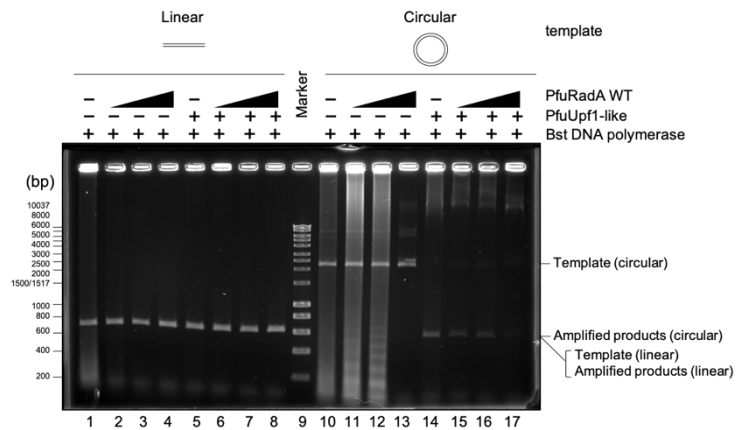


図 5. 等温 DNA 増幅における PfuRadA と PfuUpf1-like による影響
反応は 65°C, 90 min. PfuRadA (0, 20, 100, 500 nM)。

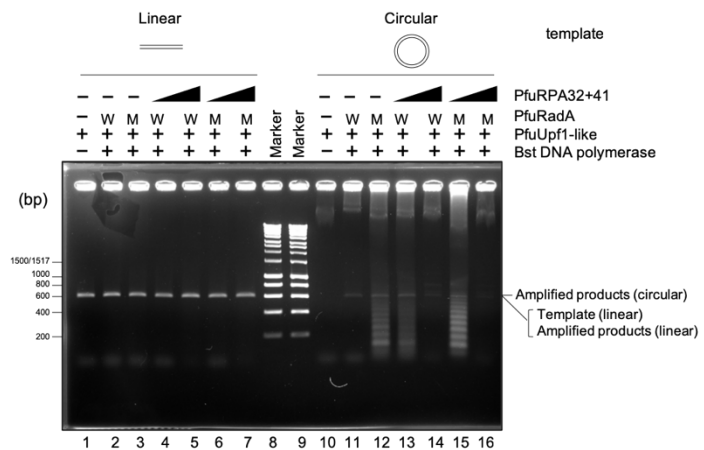


図 6. 等温 DNA 増幅における PfuRadA K144R と PfuRPA32+41 による影響
反応は 65°C, 90 min. PfuRadA WT(W)/K144R(M) (0, 100 nM), PfuRPA32+41 (0, 60, 600 nM)。

研究経費（H30年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
0円	350000円	0円	0円	0円	350000円

共同研究者等

(1) 共同研究者（氏名・所属）

なし

(2) 研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合））

該当なし（来年度から学生による協力を予定）

発表論文等（平成31年3月31日現在）

研究代表者および主な共同研究者の研究業績のうち、本研究課題に関連するもののみを、現在から順に発表年次を過去に遡って記入してください。

該当なし

[雑誌論文]

[著書]

[学会発表]

[その他]

外部資金獲得状況・申請状況（本研究課題に関連して、科研費、JST等の競争的資金、受託研究、奨学寄付金を受給された場合、また、申請された場合はその状況を記入ください）

該当なし

参考となるHP等