

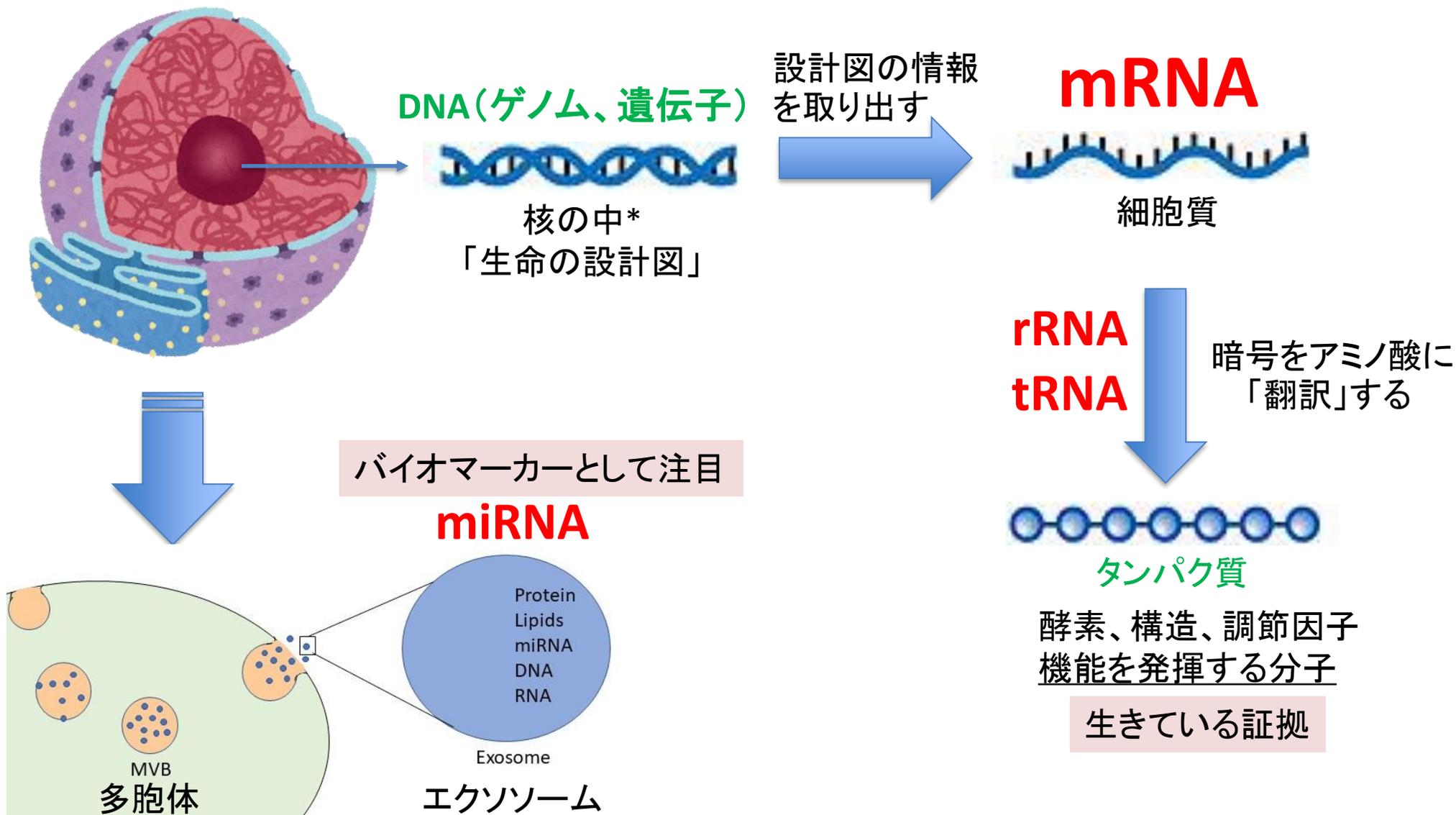
細胞内でのRNA直接検出

広島大学大学院統合生命科学研究科
教授 岡村 好子

令和2年10月1日

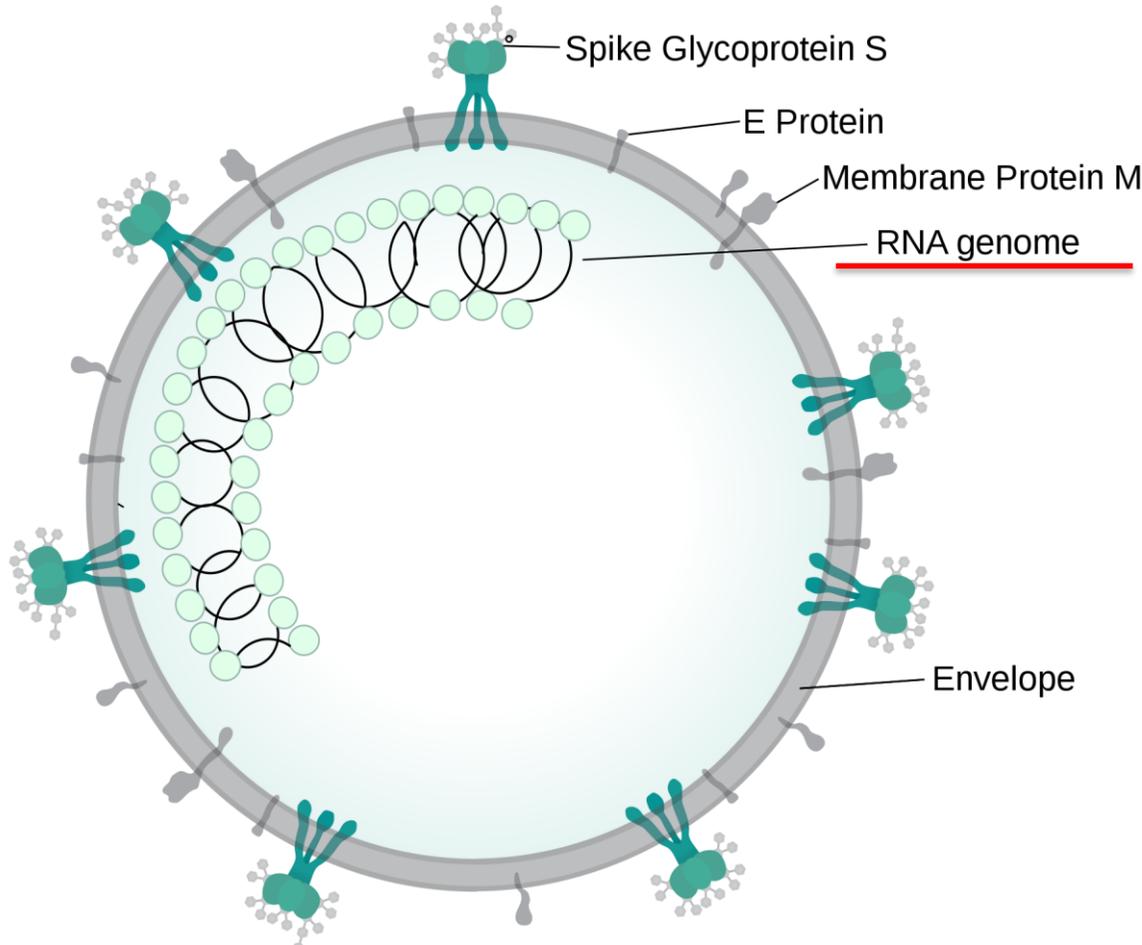
細胞の中のRNA分子

*真核生物の場合



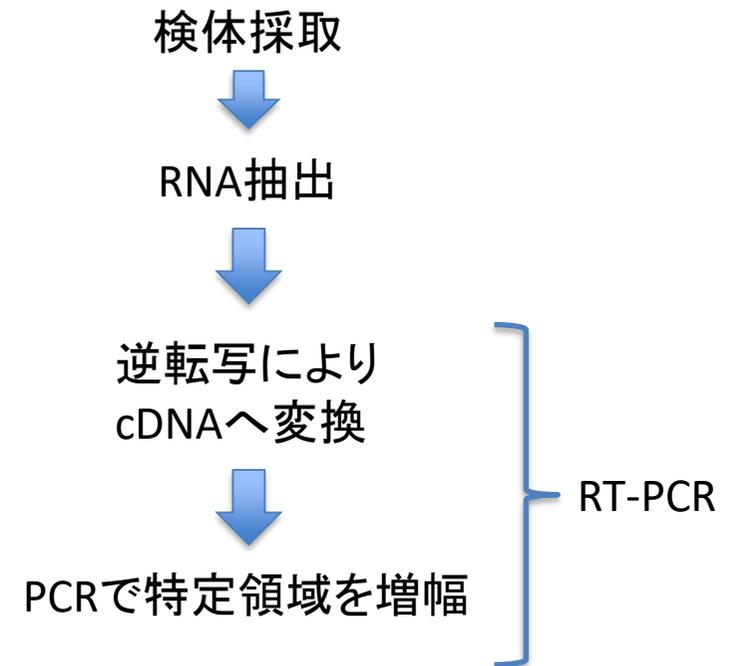
その他のRNA分子

新型コロナウイルス SARS-CoV2 (RNAウイルス)



Wikipediaより

検査方法



PCRはDNAしか増幅できないから

RNA直接検出の利点

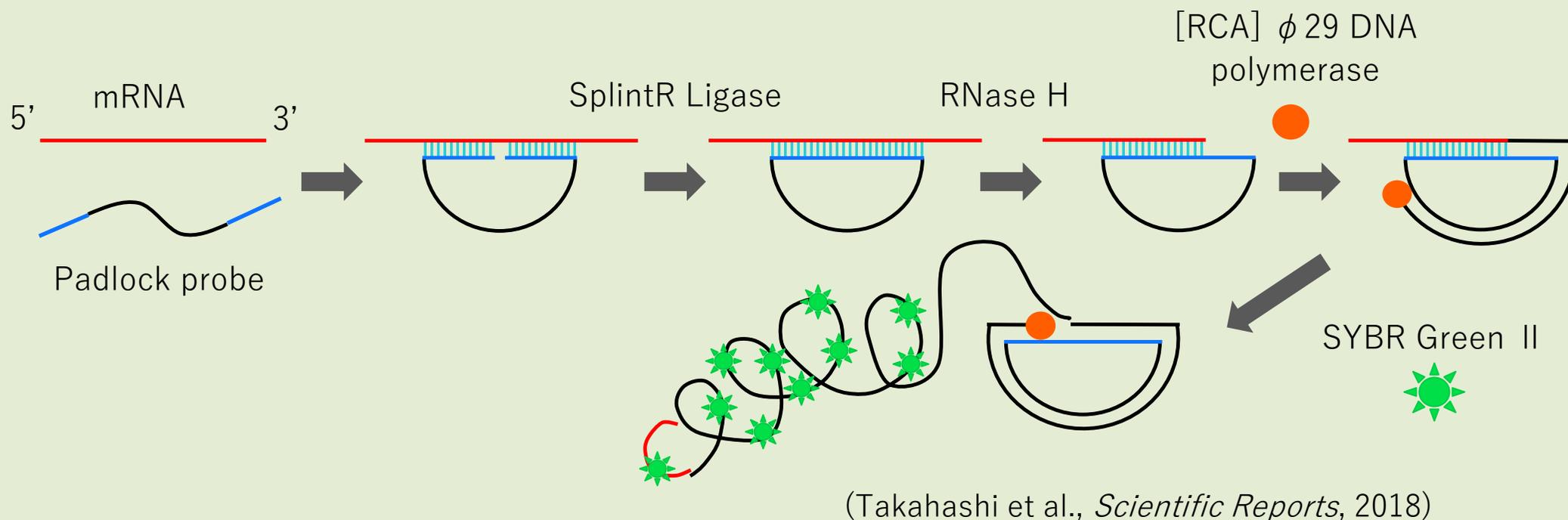
- 逆転写反応不要
- 「生きている細胞」がターゲット
- 死菌RNAは分解が早いため、検出されない
- 「損傷菌=生菌」も検出可能

従来法の問題

- (RT-PCR) DNAも検出してしまう(コンタミネーションに弱い)
- (Viability PCR) 損傷菌を検出できない

RNA直接検出はFISH (Fluorescence *in situ* hybridization) で可視化する方法があるが、十分量存在するrRNAが標的だった。

新技術1・RNase H-assisted RCA (RH-a-RCA)



任意の配列が検出可能な汎用性の高いRNA検出方法

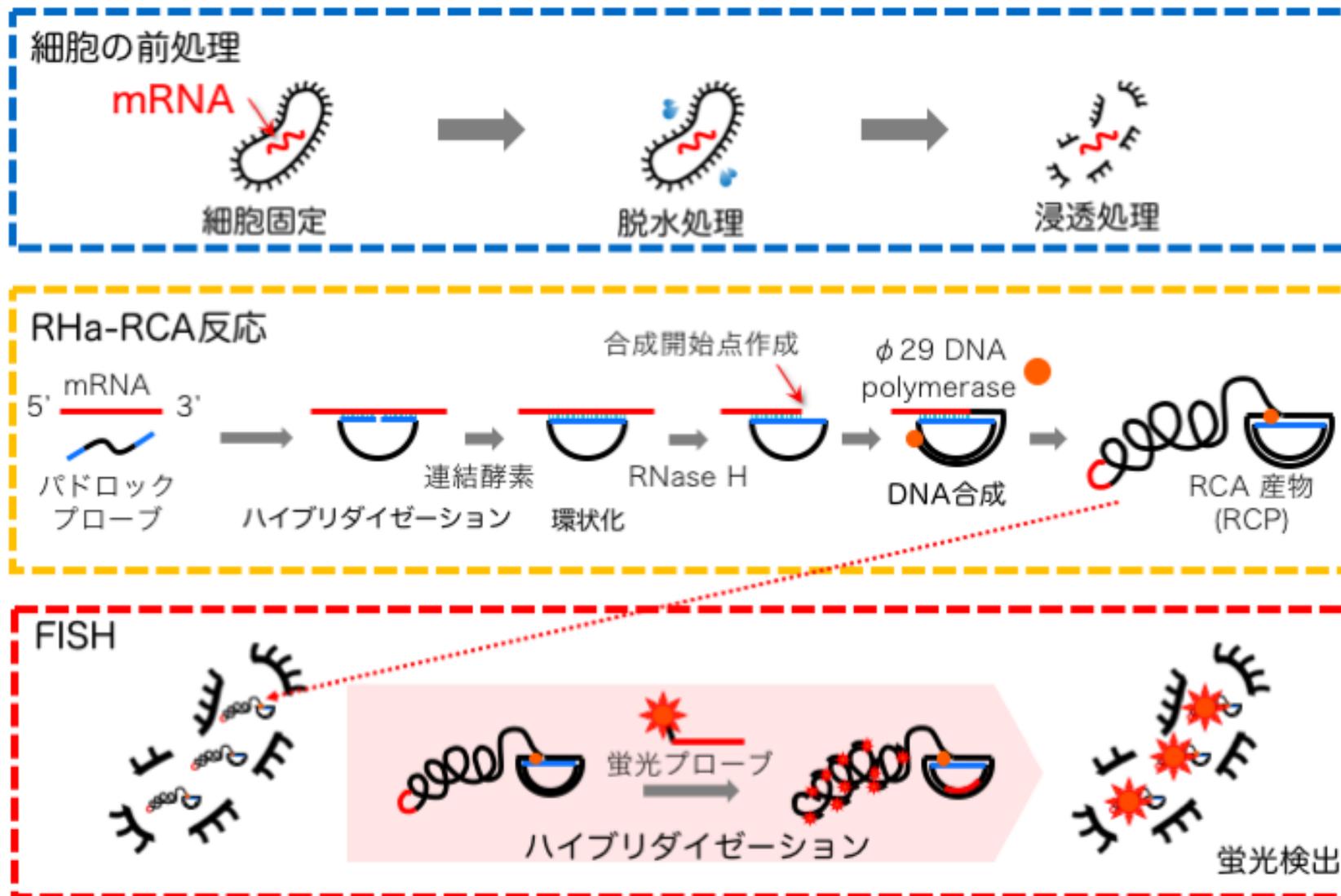
- RNAをプライマーとして使用
- 逆転写不要
- RNAのみ検出
- 従ってDNase処理も基本不要

従来法の欠点を克服



しかし
RNAを抽出すると稀少分子の場合
希釈されて検出限界以下になる

新技術2・ RHa-FISH 細胞内でRNAを直接検出

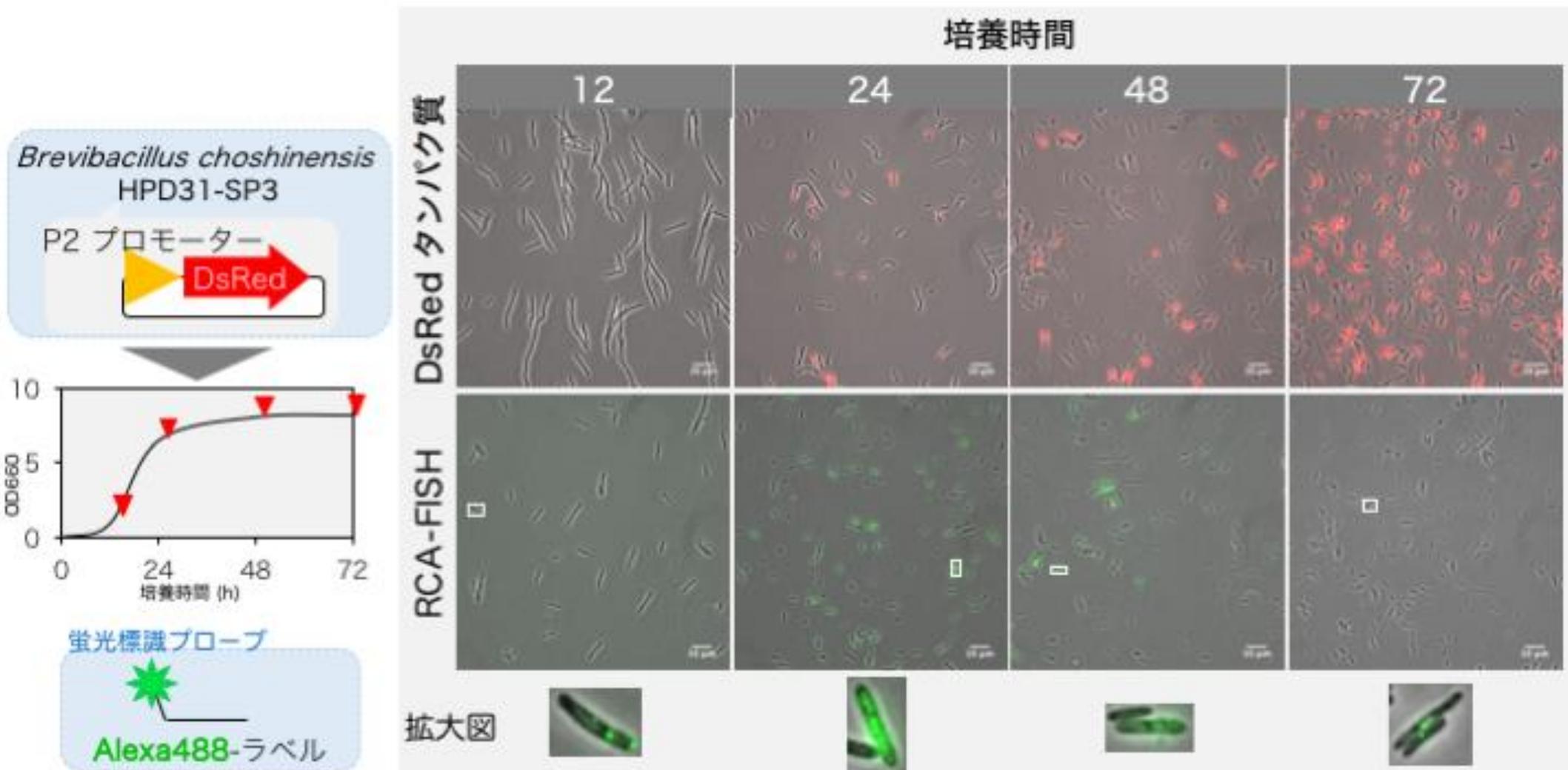


特徴

- RNA抽出不要
- 希釈されない
- RNA1分子由来の蛍光1顆粒として可視化
- 稀少分子も検出可能
- 等温反応 (30~37°C)
- 高感度・高特異性
- PCR偽陽性なし

図1. RCA-FISHによる微生物細胞の蛍光標識手順
(Takahashi et al., *Scientific Reports*, 2020)

実施例・細菌内の蛍光タンパク質転写と翻訳



タンパク質発現に先立ち、mRNAが転写されている様子を可視化できた

従来技術との比較

RT-PCR

RT-LAMP

RHa-RCA

特異性	高い	高い	高い
導入コスト	高い	高い	安い
温度	サイクル	60-65° C	室温-37° C
逆転写	必須	必須	不要
必要なオリゴ	2本	4本	1本
DNase処理	必須	必須	不要
検出時間	2.5 h	2.5 h	2 h
混入DNA	検出	検出	不検出

想定される用途

- 新規創薬シーズの発掘
- メタゲノムからの標的酵素の探索
- 微生物集団・共生微生物ゲノム解析

- 食品中の微生物の高感度検出
(種判別、コンタミネーションの検出)
- 増殖速度の遅い微生物の生死を含めた迅速検出(例、数週間かかる結核菌やマイコプラズマなど)
- 病原ウイルスの検出

他にもあります。ご相談下さい。

実用化に向けた課題

- 実用化に向けた高感度化・高カバー率を達成した
- 実サンプルで有用性を評価することが必要
- 使い勝手向上に向けて、キット化を検討

企業への期待

- PCRの偽陽性やDNAコンタミネーションに悩む企業様、RHa-RCAをお試し下さい。
- 依頼試験も承ります。
- 希薄なコンタミネーションも濃縮・検出可能です。ご相談下さい。

本技術に関する産学連携の経歴

- ・ 2007～ 関東化学 様
DNA-free phi29 DNA ポリメラーゼの開発、他



現在販売中

- ・ 20012-2016年 興研株式会社 様
DNA増幅用卓上高性能クリーンルームの開発



現在販売中

JAMSTEC, OIST, JAXA,
理研等の難培養微生物や
1細胞解析研究室で導入実績

本技術に関する知的財産権

発明の名称 : RNA検出方法

出願番号 : 特願2017-85299

出願人 : 広島大学

発明者 : 高橋 宏和、岡村 好子、中島田 豊、
秋 庸裕、松村 幸彦、大川内 雅彦

お問い合わせ先

広島大学

産学連携推進部 産学連携部門

産学官連携コーディネーター

柳 和裕(やなぎ かずひろ)

〒739-8511 東広島市鏡山1丁目3-2

TEL: 082-424-4306 FAX: 082-424-6189

E-mail: yanagi@hiroshima-u.ac.jp