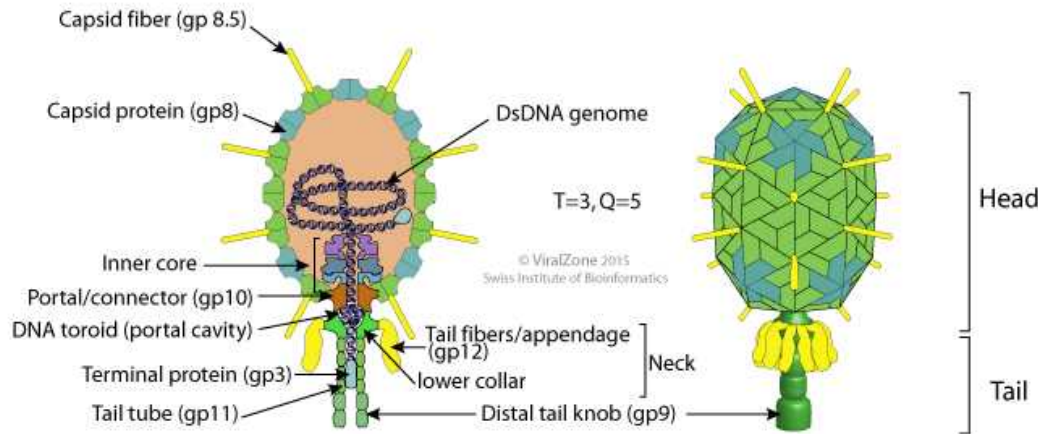


RNase H-assisted RCAによる mRNAの直接検出

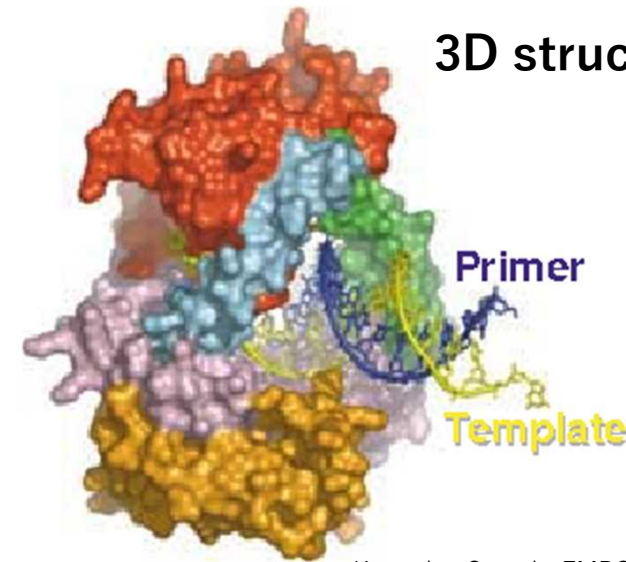
広島大学 大学院先端物質科学研究科
分子生命機能学専攻
研究員 高橋 宏和
平成30年10月11日

phi29 DNA polymerase ?

Bacillus phage ø29



3D structure



Source: [ViralZone:www.expasy.org/viralzone](http://ViralZone.www.expasy.org/viralzone), SIB Swiss Institute of Bioinformatics

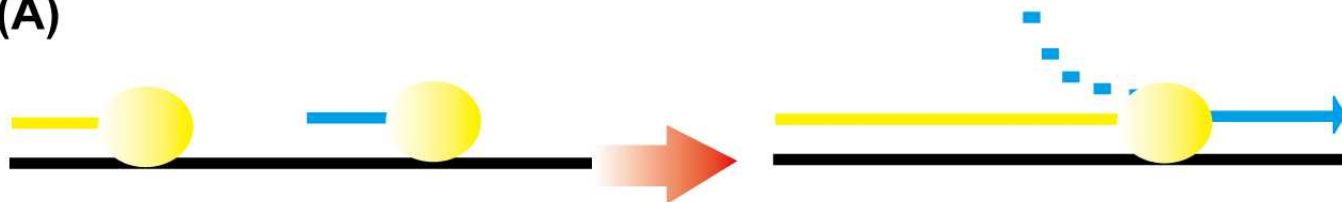
Kamtekar S et al., *EMBO J.* 2006より

1. 1985年にSalasらによって単離された古草菌ファージのDNA合成酵素
2. 中温性酵素 (至適温度**25-42° C**)
3. 高い正確性 (*Taq*の**1,000-10,000倍**)
4. 合成速度は、**~200base/sec** (*Taq*の**10倍以上**)
5. 高いDNA合成能をつ。一度で**70,000base**以上合成
6. 合成しながら、単体で**鎖置換反応**も行う

鎖置換反応？

▶ 合成方向にDNA鎖があった場合

(A)



削る

Taq polymerase

(B)



止まる

(C)

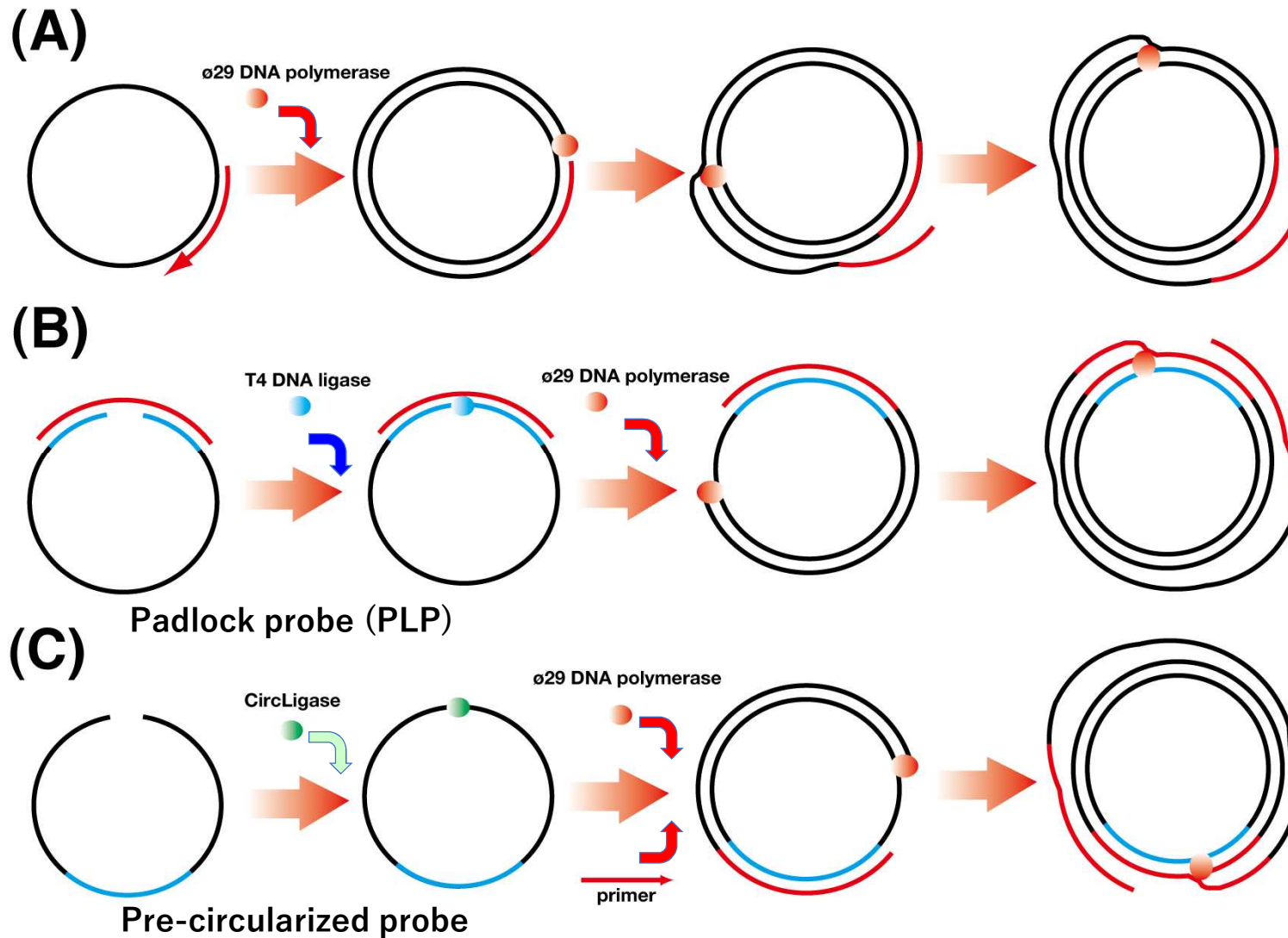


剥がす

φ29 polymerase
Bst polymerase LF

この鎖置換活性(strand displacement activity)を利用したDNA増幅法や配列特異的検出法が開発されている。その一つが、rolling circle amplification(RCA)

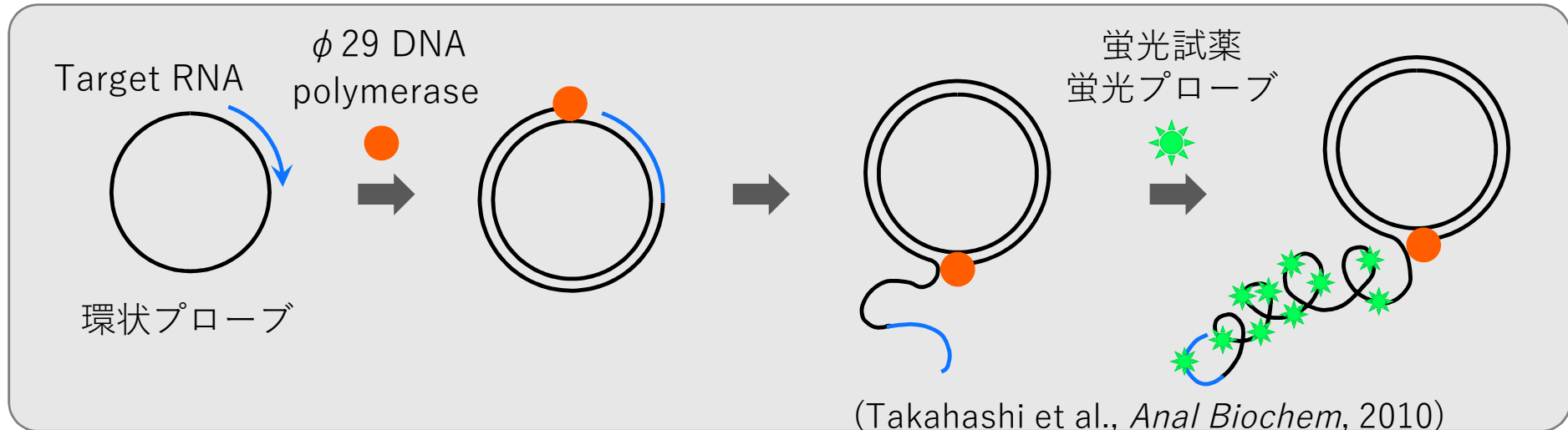
Rolling circle amplification (RCA)



ウイルスやプラスミドのDNA複製メカニズムを模倣

従来技術

▶ RNA-primed Rolling Circle Amplification (RPRCA)



- 標的RNAの3'末端配列を利用する
- 逆転写反応が不要
- 微生物(原核)のmRNA検出に応用する
- 発現している遺伝子(mRNA)を検出できる
- 死んだ微生物ではRNAは速やかに分解される → **生きた微生物だけ検出**

一方で、対象配列が標的RNAの3'末端に限定してしまうことにより、検出対象となるRNA種も限定されてしまう。(e.g. rRNA, tRNA, miRNAなど)

従来技術の問題点

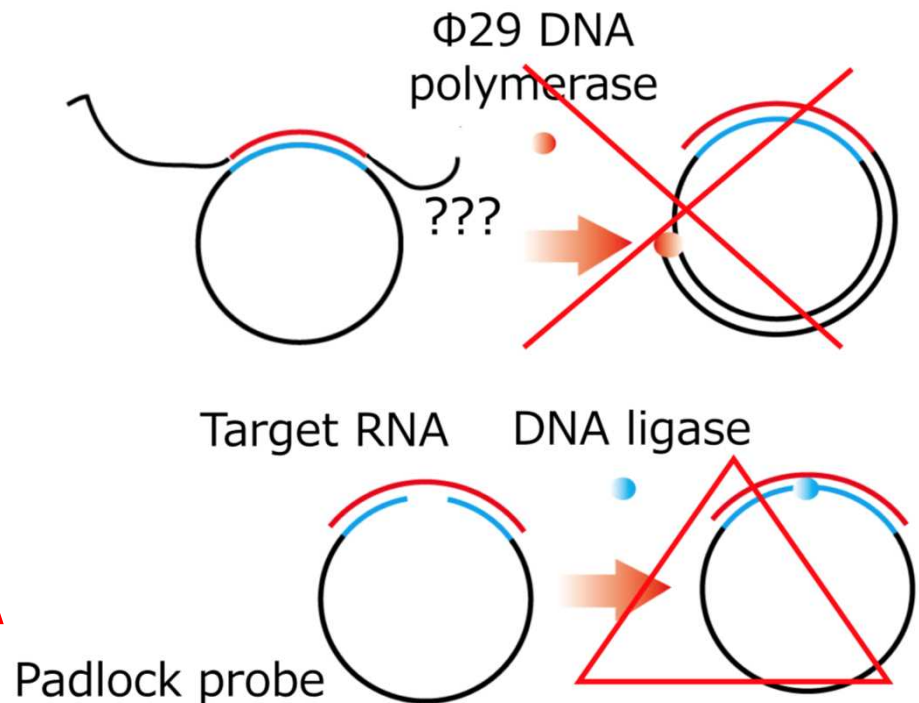
▶ 情報的な問題点

- ・ 微生物のRNAseqのデータは、**3'末端の情報**が欠けている
- ・ ゲノム配列から予想した場合、予想が1残基でもずれるとRCAは動かない
- ・ 真核生物や病原ウイルスは、mRNAには**poly(A)テール**を持つので対象外

▶ 技術的な問題点

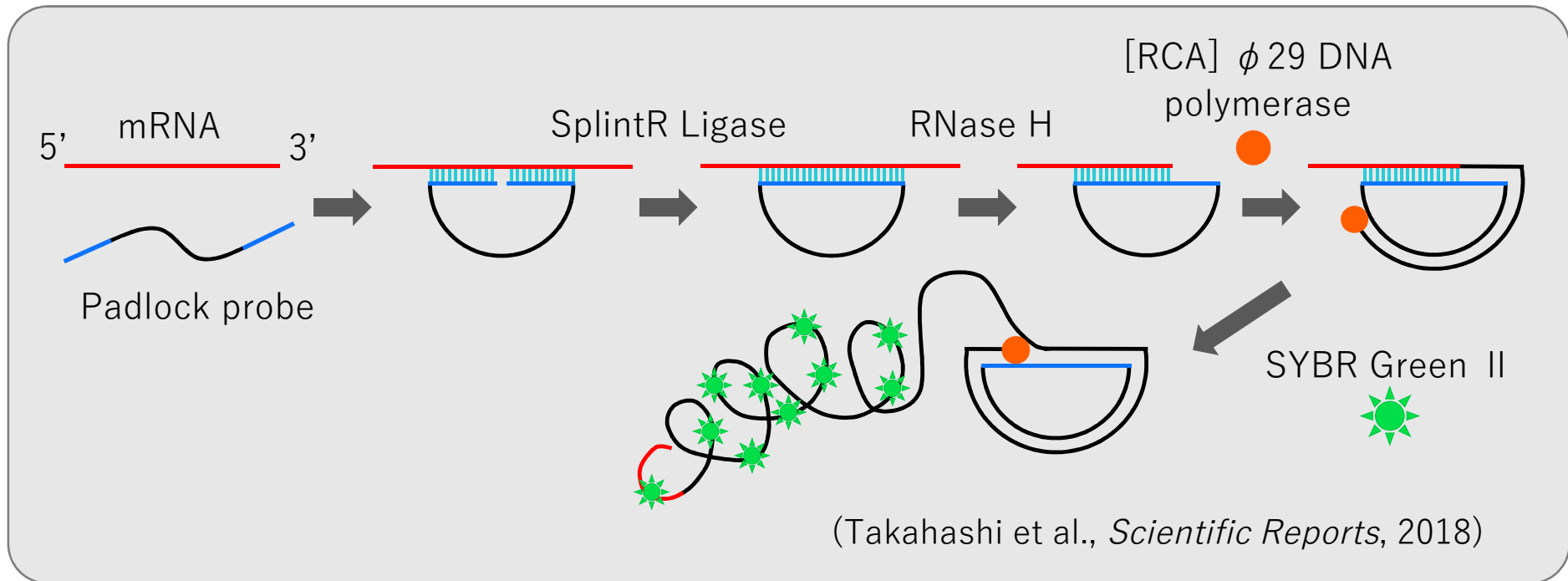
1. 先に報告されていた、phi29 polymeraseの**3'-5'リボヌクレアーゼ活性は確認できない**。
2. RNAを鋳型とした場合、既存のDNAリガーゼでは、**PLPの環状化効率が著しく悪い**→そのため、先に環状化したプローブを用いていた。
3. 他の研究グループはmRNAを**cDNAに変換**して行っている。

➡ 操作手順が煩雑で感度も低下



新技術

▶ RNase H-assisted RCA (RHa-RCA)



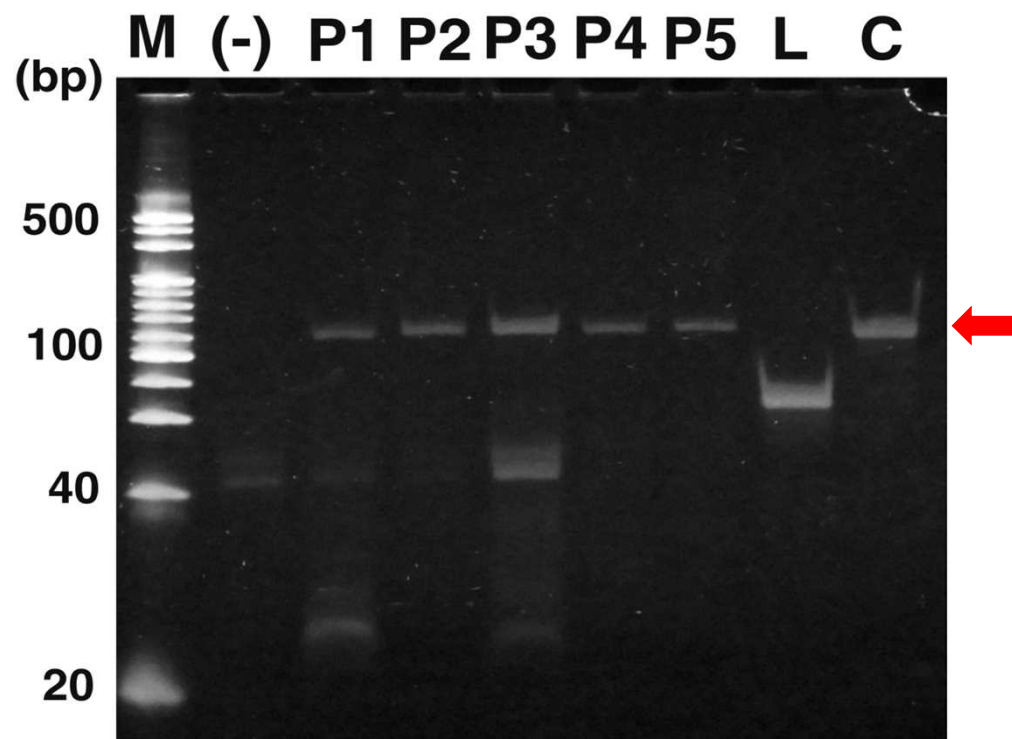
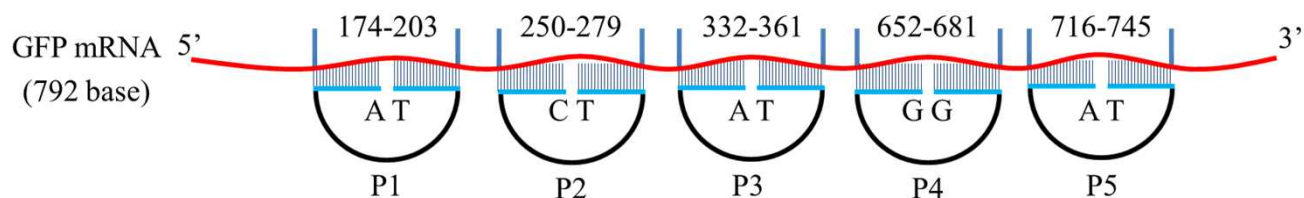
任意の配列が検出可能な汎用性の高いRNA検出方法

- 従来技術と同様に逆転写不要
- RNAのみからDNA合成
- 従ってDNase処理も基本不要

従来技術 vs 新技術

	RT-PCR	RT-LAMP	RPRCA	RHa-RCA
逆転写	必須	必須	不要	不要
反応温度	サイクル	60-65° C	~30° C	~30° C
オリゴ設計	制限有	複雑	3'末端限定	制限無
配列依存性	制限有	制限無	3'末端既知	ほぼ無
所要時間	~2.5 h	~2.5 h	~2.0 h	~2.0 h
リアルタイム	可	蛍光不可	可	可
コンタミ	影響大	影響大	影響小	影響小
簡便性	煩雑	煩雑	混ぜるだけ	簡単
検出感度	10~	10~	10 ⁹ ~	10 ⁹ ~

新技術 プローブの位置を任意に設定可能



-: without ligase, L: linear probe, C: circular probe

(Takahashi et al., *Scientific Reports*, 2018)

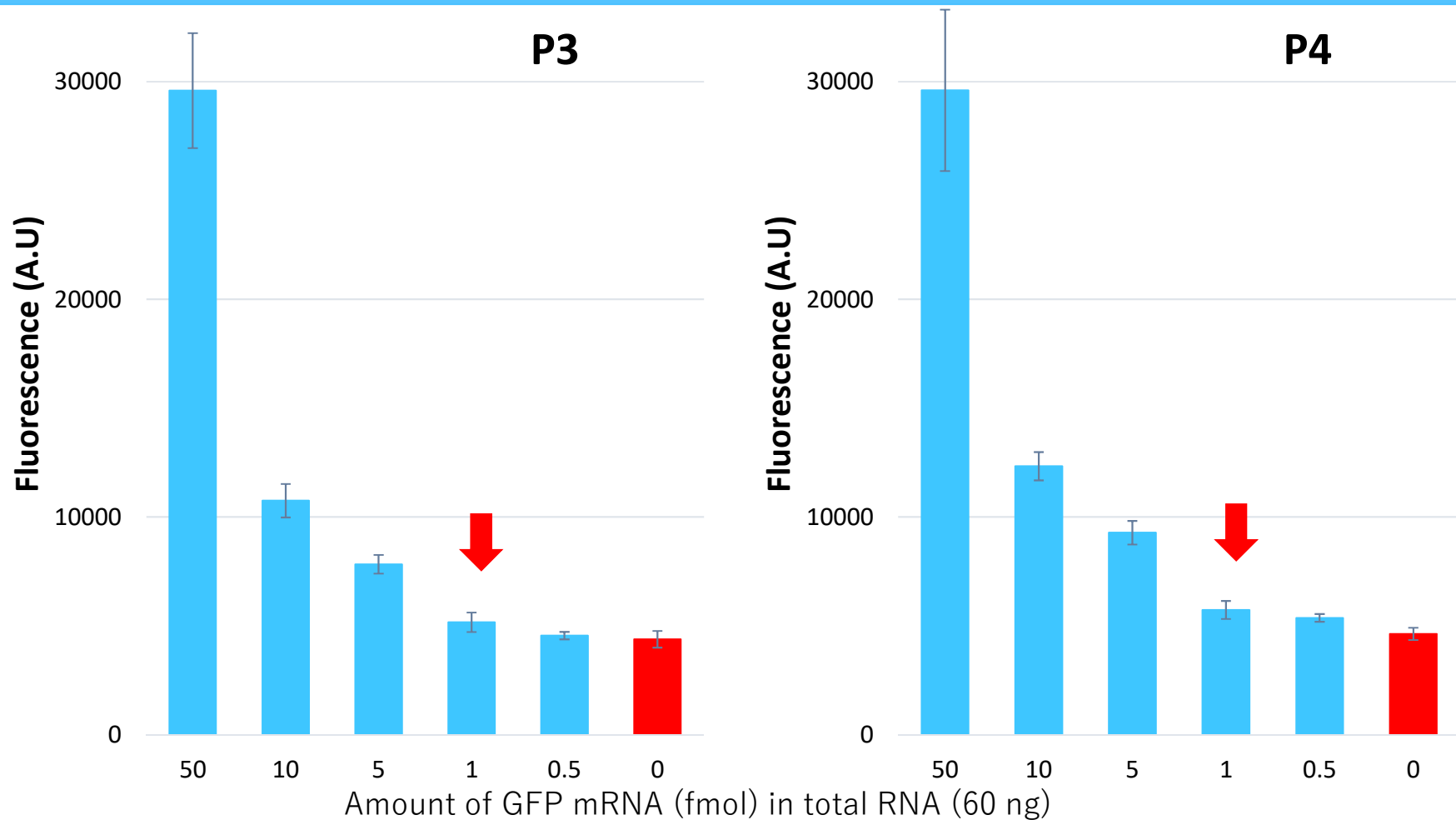
5カ所全ての位置で、PLPは環状化可能

新技術 プローブの位置を任意に設定可能

Probe	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
RNA	(-)	100 fmol	(-)	50 amol	100 amol	500 amol	1 fmol	5 fmol	10 fmol	50 fmol	100 fmol	10 fmol
RNase H	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Probe P1												
Probe P2												
Probe P3												
Probe P4												
Probe P5												

5カ所全ての位置で検出可能

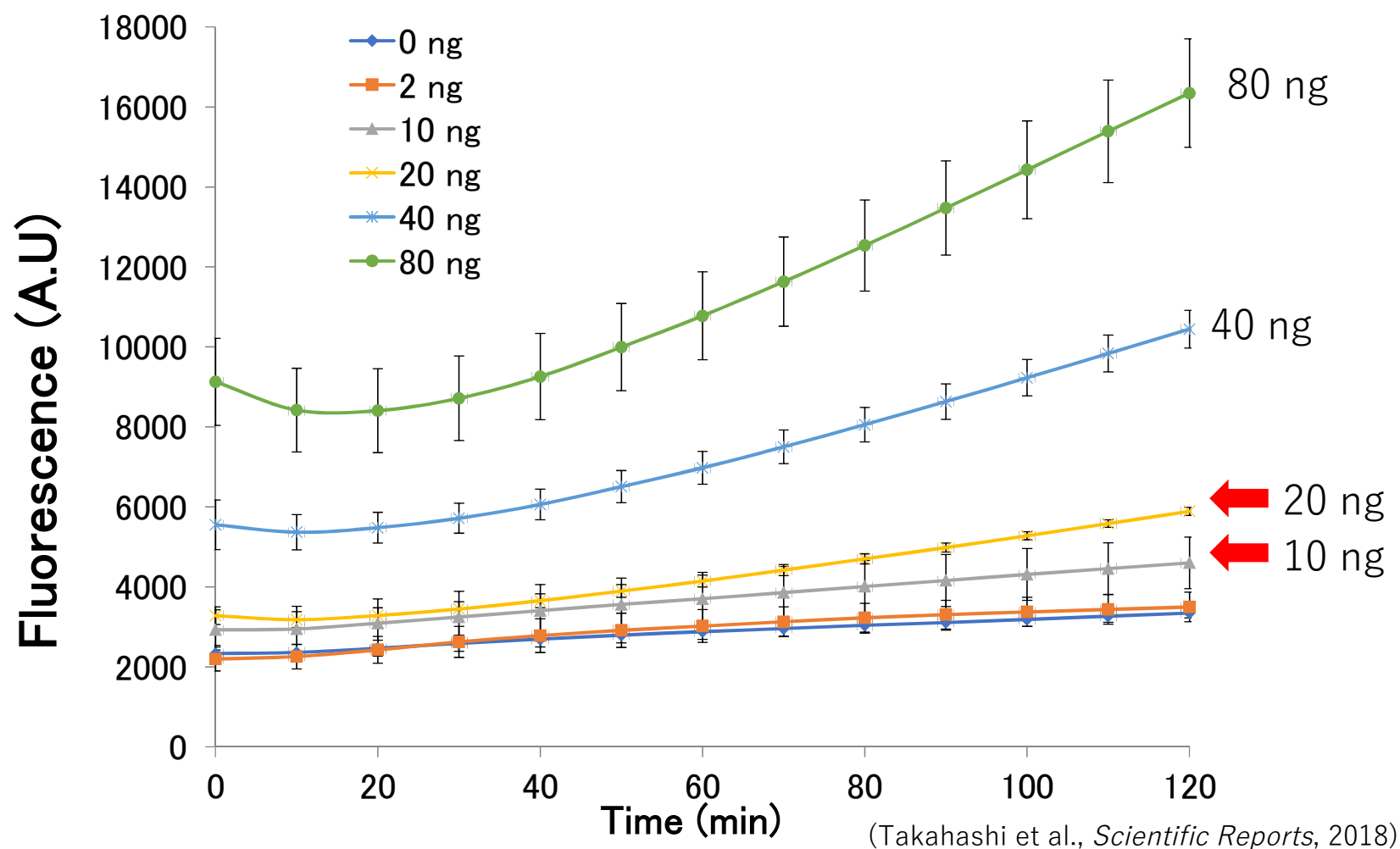
新技術 検出限界



(Takahashi et al., *Scientific Reports*, 2018)

- GFP mRNAのみを特異的検出
- 検出限界は5~1 fmol (in vitro)

新技術 リアルタイム検出も可能



- 検出はSYBR Green IIを利用
- 10~20 ngの微量のRNAで検出可能

想定される用途

- ・ **ウイルスを含む病原微生物の検出**

病院や食品を扱う場所や産業動物育成施設における、安価で使用可能な簡易検査システムの構築
(例、ノロウイルス、薬剤耐性菌MRSA等)

- ・ **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)

- ・ **微生物の遺伝子発現の簡易モニタリングシステム**

発酵等で、好ましい・好ましくない遺伝子の発現をモニタリングするシステムの構築

- ・ **真核生物の遺伝子発現の簡易モニタリングシステム**

polyA配列を持つmRNAにも対応可能

実用化に向けた課題

- ・ **検出感度の向上**

現状のin vitroでの検出限界が、 10^9 コピー以上

➡ ssDNAの検出方法を変えることで感度向上可能

- ・ **より簡便な操作方法への変更**

現時点で最初のmRNAとPLPのハイブリで温度変化は必須

➡ 可能なら混ぜるだけでRCA反応まで行えるように

- ・ **真核生物用のプロトコル作成**

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・地域連携センター 産学連携部門
産学官連携コーディネーター

石堂 隆太 (いしどう りゅうた)

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

TEL : 082-424-4305

FAX : 082-424-6189