

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2018～2022

課題番号：18KK0285

研究課題名（和文）温度勾配ゲル電気泳動によるHIV-1逆転写酵素遺伝子変異の迅速検出

研究課題名（英文）Rapid detection of mutation in HIV-1 reverse transcriptase gene by temperature gradient gel electrophoresis

研究代表者

保川 清（YASUKAWA, Kiyoshi）

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：30397559

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目標は、臨床サンプルから一定温度で標的DNAを増幅させ、マイクロ温度勾配ゲル電気泳動（ μ TGGE）にかけ、パターンに画像処理技術を適応して、遺伝子の変異情報が得られる新しいシステムの構築である。そのために、増幅DNAの長さや変異の位置がパターンに与える影響を調べることで、1回の泳動で2～5個のゲルを扱える μ TGGE装置を開発すること、パターン追跡ソフトを開発し、変曲点を検出すること、一定温度DNA増幅法であるリコンビナーゼポリメラーゼ増幅法の酵素を改良して反応効率を上げること、インドでフィールドワークを行い、臨床サンプルを入手のネットワークを構築することに取り組み、これらを達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最終目標は、医療現場で、RNA増幅法によりHIV-1を検出し、TGGEにより薬剤耐性を判定するシステムを世界に普及させることである。この目標に向かって、装置開発、画像処理、酵素の改変という異なる分野が協力しあうことで、それぞれの分野で学術的価値の高い研究成果をあげ、論文発表した。今回、日本人研究者がインドの現地を訪れて作業を行い、各種情報を得ながら啓蒙活動を行い、多極的ネットワークを築くことができた。

研究成果の概要（英文）：The ultimate goal of this research is to establish a novel method to isothermally amplify a target DNA from clinical specimen. Following DNA amplification, micro temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) and analysis of DNA pattern were performed using image processing technology to identify mutations. For this purpose, we have carried out the following: 1) Examination of the effects of length and mutational position on the TGGE pattern; 2) Development of a micro TGGE apparatus capable of accommodating 2-5 gels in one electrophoresis cycle; 3) Development of a software to detect inflection points in a TGGE pattern; 4) Alteration of enzymes utilized in an isothermal DNA amplification method, including recombinase polymerase amplification; 5) Construction of networks to obtain clinical specimen in India.

研究分野：酵素化学

キーワード：ゲノムプロファイリング HIV-1 エイズ SARS-CoV-19 変異 温度勾配ゲル電気泳動

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19,F-19-1,Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1-1 温度勾配ゲル電気泳動 (Temperature-Gradient Gel Electrophoresis, TGGE)

DNA 増幅産物を TGGE にかけて、DNA 融解温度に基づくパターンが得られ、変曲点の位置をコントロールと比較することにより、配列情報の違いを検出できる。

1-2 一定温度の核酸増幅法

RNA 増幅法では、標的 RNA から逆転写酵素と RNA ポリメラーゼにより、2 本鎖 DNA を介して、RNA を増幅させる。DNA 増幅法であるリコンビナーゼポリメラーゼ増幅法 (RPA 法) では、リコンビナーゼと鎖置換型 DNA ポリメラーゼを用いて 2 本鎖 DNA を増幅させる。これらは、PCR と異なり、サーマルサイクラーが不要であり、現場での増幅に適している。

1-3 エイズ

アジア、特にインド、インドネシア、タイではエイズが重要な社会問題である。2016 年、世界で約 3670 万人の HIV 感染者・エイズ患者があり、年間約 180 万人の新規感染者、約 100 万人の死亡者が推定されている。アジアでは検査センターにサンプルを送って結果を得ることは一部を除いて困難である。エイズの診断と治療：先進国では、エイズ患者に対して、HIV-1 逆転写酵素阻害剤を中心に、プロテアーゼ阻害剤およびインテグラーゼ阻害剤が投与される。このうち、逆転写酵素阻害剤については、HIV-1 逆転写酵素の塩基配列を決定することにより、その薬剤耐性が把握された上で、薬剤が選択される。しかし、新興国ではこのような医療体制を組むことは不可能である。HIV-1 逆転写酵素の配列情報と薬剤耐性については、先進国の研究グループにより多くの情報が集まり、データベース化されている。

2. 研究の目的

本研究の目標は、臨床サンプルから一定温度で標的 DNA を増幅させ、マイクロ温度勾配ゲル電気泳動 (マイクロ TGGE) につけ、パターンに画像処理技術を適応して、遺伝子の変異情報が得られるシステムの構築である。そのために、増幅 DNA の長さや変異の位置がパターンに与える影響を調べることで、1 回の泳動で 2~5 個のゲルを扱えるマイクロ TGGE 装置を開発すること。パターンを追跡するソフトを開発し、変曲点を検出できるようにすること、一定温度 DNA 増幅法であるリコンビナーゼポリメラーゼ増幅法 (RPA 法) の酵素を改良して反応効率を上げること、本システムをアジアで普及させるために、インドでフィールドワークを行い、病院から臨床サンプルを入手するネットワークを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

フィールドワーク：臨床サンプルを入手できるネットワークを構築するために、インド各地の医療機関を訪問した。また、エイズの感染について、オンラインのアンケート調査を行った。

マイクロ TGGE による変異の検出：変異による泳動パターンの差が大きくなるように、増幅させる DNA の長さや変異の位置がマイクロ TGGE の泳動パターンに与える影響を調べた。

マイクロ TGGE 装置の開発：従来の装置は 1 回の泳動で 1 枚のゲルしか扱えなかった。マイクロ TGGE の作業効率を高めるために、1 回の泳動で 2~5 個のゲルを扱える装置の開発を試みた。

マイクロ TGGE の変曲点を検出するソフトウエアの開発：マイクロ TGGE の泳動パターンでは、様々な濃淡や線特徴が表出する。従来の輪郭線抽出アルゴリズムでは、このようなぼやけた線の輪郭追跡が困難である。これを追跡するソフトを開発し、変曲点を検出できるようにすることを目的とした。

核酸等温増幅法の改良：マイクロ TGGE には臨床サンプルから DNA を増幅させる必要がある。リコンビナーゼポリメラーゼ増幅法 (RPA 法) は約 41℃ の一定温度で DNA を増幅させる方法である。本研究では、遺伝子工学を用いて RPA 法に使用する酵素の改良を行った。

4. 研究成果

4-1 フィールドワーク

1) 2018、2019 年度

ビヤニ、横田、ビヤニ大学の Dr. Sanjay Biyani 理事がラジャスタン州・医療健康福祉局 (Department of Medical, Health, and Family Welfare) の HIV/AIDS 局を訪問し、局長の Dr. Samit Sharma とラジャスタン州・エイズ予防協会 (Rajasthan State AIDS Control Society) の Dr. S. S. Chauhan と、現地での HIV/AIDS 検査検体入手について打ち合わせを行った。ビヤニ、保川、兒島、横田、吉高がデリー (インド) の日本大使館を訪問し、大使館秘書、独立行政法人国際協力機構 (JICA) インド事務所駐在員と、インドでの活動について意見交換を行った。ビヤニ大学 (ジャイプル) に設置した集中研究室に必要な機器を設置し、実験を行う学生の教育を行った。ビヤニと横田が SK Gout Medical College, Department of Community Medicine 助教の Dr. Priyanka Kapoor を訪ね、検体入手に関する打ち合わせを行った。

2) 2020 年度：新型コロナウイルスの影響で海外出張が不可能となったため、現地・ビヤニ大学やその他のステークホルダーとのコンタクトは、電子メールあるいはズーム会議で行った。インドの「HIV/エイズ」、「感染に関する危険行動・因子」、「ハイリスク・グループ」、「HIV 検査」等のキーワードで、PubMed や Google Scholar から先行研究・文献を検索・精査した。また現在のインドにおける HIV・AIDS の疫学的、社会的動向と、HIV 簡易検査、カウンセリング、ラボ検

査・治療が可能な医療施設を特定した。先行研究・文献調査からインド・ラジャスタン州のトラック・ドライバーを研究対象者とした HIV/AIDS 検査の受診行動に関連する要因を明らかにするためのオンライン・アンケート調査の準備を開始した。また、2020 年 9 月にインド・ラジャスタン州・ジャイプル市のピヤニ大学に HIV-1 逆転写酵素をコードする RNA を標的とした RNA 増幅用試薬を送った。アンケート調査実施にあたり、ピヤニ大学倫理審査委員会からの承認を得るため、HIV/AIDS オンライン・アンケート調査の計画書と倫理審査申請書を作成・提出し、2021 年 3 月に承認を得た。オンライン・アンケート調査の質問票をグーグル・フォーム(Google Form) を活用し、作成した。質問項目は全 25 問あり、以下の 5 つの項目カテゴリーに分かれている(i . アンケート参加者の属性・社会的・経済的特徴；ii . 過去の病歴・薬の現在の使用状況、医療施設の使用状況；iii . 危険行動；iv . HIV 検査受診行動；v . 新型コロナウイルスとうつ・ストレス状況)。現在、アンケート調査を実施中であり、目標サンプル数 300 名中、67 名から回答を得た。インド・ラジャスタン州・ジャイプル市のピヤニ大学に、SARS-CoV-2 RNA を標的とした RNA 増幅用試薬を送った。ジャイプル市の SMS Medical College から SARS-CoV-2 RNA 測定に用いられたヒト唾液からの核酸抽出物 41 検体を入手し、ピヤニ大学にて本試薬で測定を行った。その結果、SMS Medical college で陽性であった 23 検体中 20 検体が陽性、陰性であった 18 検体中 15 検体が陰性であり、正診率は 85%であった。

3) 2021 年度：現地・ピヤニ大学やその他のステークホルダーと、ズームを使ったオンライン会議を 10 回実施した。2021 年 3 月～4 月に HIV/エイズに関するグーグルフォームを使ったオンライン・アンケート調査を実施した。目的は、インド・ラジャスタン州のトラック運転手において HIV/AIDS 検査の受診行動や危険性行動を明らかにすることである。アンケートの対象者は HIV ハイリスクグループの長距離トラック運転手で、66 名が参加した。過去に HIV 検査を受けた被験者(トラック運転手)は、66 人のうちわずか 1 人(1.5%)であったが、22.7% (n = 15) は、過去に covid-19 の検査を受けたことがあると回答した。過去 12 か月間に妻またはガールフレンド以外とコンドームなしでの性的関係を持ったことがあると回答した被験者はわずか 3.0% (n = 2)であった。被験者の 3 分の 2 は、病気のときに民間の診療所や病院を利用すると回答した。これらから、以下を結論とした。HIV 検査を過去に受けたことがあるトラック運転手はわずか 1.5%であり、危険な性行動を示したのはわずか 3%であり、HIV 検査行動または危険な性行動に関連する要因を特定するための分析を行うには、より多くのサンプルが必要である。調査対象者を「トラック運転手」から「HIV 陽性患者」に変更し、HIV / AIDS 薬の副作用(または薬剤耐性)に関連する要因の調査を行う必要がある。さらに、HIV-1 逆転写酵素をコードする RNA を標的とした RNA 増幅による HIV 現地検査に必要な機材をインド・ラジャスタン州・ジャイプル市のピヤニ大学へ送付した。

4) 2022 年度

2022 年 7 月に横田とピヤニが、インド・ラジャスタン州・ジャイプル市とムンバイの 2 都市における小・中規模の病院・クリニックのラボを視察し、HIV や新型コロナウイルスの検査における課題やサンプル収集について、医師と対面でインタビューした。

日時	面談した医師	施設名	専門分野
7 月 11 日	ニランジャン・シン	Shalby Multispecialty 病院、ジャイプル	内科
7 月 12 日	ソメシュ・グプタ	Somesh Gupta クリニック、ジャイプル	心臓病、糖尿病
7 月 13 日	カピル・ラティ	マイヘルス クリニック、ムンバイ	心臓病、糖尿病
7 月 14 日	アロック・モディ	ケヴァリヤ病院、ムンバイ	糖尿病

2023 年 1 月に横田とピヤニが、インド・ラジャスタン州・ジャイプル市の SMS 病院を訪問した。新型コロナウイルス(デルタ株・アルファ株)のサンプルを収集し、日本へ輸送した。

4 - 2 マイクロ TGGE による変異の検出

1) HIV-1

HIV-1 逆転写酵素で最も多く現れる薬剤耐性変異である M184V を題材とした。282 bp の野生型の遺伝子断片と変異型の遺伝子断片をマイクロ TGGE にかけてところ、WT と M184V の変曲点の位置は明らかに異なっており、両者がマイクロ TGGE で識別されることが示された。

2) SARS-CoV-19

SARS-CoV-19 を標的として、D614 と G614 をマイクロ TGGE で見分けることを試みた。30 種類のすべてのプライマー組み合わせにおいて理論通りの長さのバンドが得られた。DNA の長さがマイクロ TGGE のパターンに与える影響を解析した。120 bp の DNA では、D614 と G614 で、最初の変性点(a)、中間の変性点(b)、c は最後の変性点(c)の位置が異なった。特に、中間の変性パターン(a から b、c への曲線)は、D614 の方が G614 よりも短かった。140 bp の DNA でも同様に、D614 と G614 で a、b、c の位置が異なった。また、中間の変性パターンは、D614 の方が G614 よりも短かった。一方、80 bp の DNA では D614 と G614 の差が小さかった。変異の位置がマイクロ TGGE のパターンに与える影響を解析した。120 bp の DNA を用いて、変異が 3'末端にあるもの(A)、中央にあるもの(B)、5'末端にあるもの(C)をマイクロ TGGE にかけて。A と C では、D614 と G614 でパターンが異なった。しかし、B では似たパターンを示した。これらの結果から、変異の位置は 3'末端あるいは 5'末端が好ましいことが示された。

4 - 3 マイクロ TGGE 装置の開発

マイクロ TGGE については、まず、1 枚のゲルに 2 サンプルがアプライでき、同時に TGGE が行えるゲルカセットを設計し、作製した。従来の TGGE 装置を用いて温度勾配や電流等の条件を最適化した結果、2 サンプルで同じ TGGE のパターンが得られた。次に、1 枚のゲルに 5 サンプルがアプライでき同時に TGGE ができるゲルカセットと専用装置を設計し、作製した。このシステムでは、4 カ所の温度を設定することにより、1 枚のゲルの左から右に 3 つの温度勾配（低 高、高 低、低 高）をかけることができる。条件を最適化した結果、5 サンプルで同じ TGGE のパターンが得られた。

4 - 4 マイクロ TGGE の変曲点を検出するソフトウェアの開発

1) 濃淡の差の正規化処理

まず入力画像に対して軌跡の濃淡さや背景領域の濃淡の差を正規化する処理を適用し、軌跡間並びにサンプル間の濃淡差の差異による検出性能のばらつきを抑制した。さらに軌跡検出処理の精度向上を意図して軌跡と背景間のコントラスト強調処理を施し、軌跡の検出処理を実装した。さらに局所特徴量や局所的フィルタ適用の処理による精度向上を試みたが、TGGE 画像によっては軌跡や変曲点を検出できない事例があることが判明した。

そこで、主として深層学習による軌跡検出処理ならびに変曲点検出を実行する処理の実装を行い、精度向上の可能性を検証した。まず、深層学習のネットワークアーキテクチャとしては、分担者がこれまでに採用し、別種の画像にて良好な結果を得た経験のある RetinaNet を選択した。軌跡強調処理を施した場合、出力画像は軌跡が強調される半面、背景領域に点状のノイズも強調されてしまうという問題については、その画像に対して軌跡を学習させた RetinaNet をベースとして軌跡領域以外の背景（ノイズ）領域を分割、除去し、その後に変曲点を学習させた別の RetinaNet を適用して変曲点を出力させる手法を設計、実装した。これとは別に YOLOv2 を適用して変曲点を適用して変曲点を検出する手法についても実装した。これらと比較した結果、YOLO では過検出が抑制されるものの検出漏れも多く発生し、RetinaNet を基本としたものは検出漏れは少ないものの、過検出が目立つ結果となった。双方の問題を改善する方策を検討したところ、YOLO における検出漏れを改善するよりも RetinaNet ベースの手法の改善により過検出を減少させる方が有望であると判断し、損失関数の再検討を行った。損失関数は変曲点検出時のバウンディングボックス予測確率と位置、領域分割に関するものの和とし、領域分割に関する項に関する重みの設定を複数種類検討し、それぞれの設定における精度を求め比較を行った。その結果、前景と背景の割合をそのまま重みとしていた以前の設定に対して、それに 0.5 以下、あるいは 2 以上を乗じた場合により良好な精度が得られることが判明した。

このようにマイクロ TGGE の変曲点を検出するソフトウェアの開発については、入力画像に対して軌跡の濃淡さや背景領域の濃淡差を正規化する処理を適用し、軌跡間並びにサンプル間の濃淡差の差異による検出性能のばらつきを抑制した。さらに軌跡検出処理の精度向上を意図して軌跡と背景間のコントラスト強調処理を施し、軌跡の検出処理を実装した。

2) 変曲点検出手法の改良

RetinaNet をベースとした深層学習手法による変曲点検出手法の改良として、変曲点検出処理に Attention 機構を導入し、その効果を評価した。Attention 機構は近年深層学習の性能向上のための 1 手法として注目されているもので、いくつかの方式が提案されている。本研究では self-attention のみ、guided-attention のみ、これら両方を併用したネットワークを構成し、これらの検出性能の比較評価を行った。Attention 機構は、軌跡検出結果や入力画像を参照して軌跡に対応する部分の重みを大きくするように作用させた。この処理を導入前後での変曲点検出結果を比較したところ、アテンション導入前ではしばしば発生していた、変曲点の過検出や検出漏れを抑制する効果が、両 attention を併用した場合に認められる事例を確認した。

本研究で採用している DNN は RetinaNet であるが、RetinaNet は ResNet をベースとしている。ResNet では層の数を 18、34、50、101、152 としたものが提案されているが、これまでは ResNet50 を実装してきた。そこで、ResNet50 を ResNet101、ResNet152 に置き換えた場合の検出精度についてもその効果を評価した。その結果、層の数を増やすことによる大幅な改善は見られず、また、データセットの違いによって多少の傾向の違いが見られたが、全般的には ResNet101 を使用した場合により検出精度が高くなる傾向があることを確認した。

また、これまでは濃度が大きく異なり、複数の軌跡が含まれる電気泳動画像を対象として、深層学習ベースの手法を検討してきたが、より単純な、1 本の軌跡のみを含む電気泳動画像に対する変曲点検出処理についても検討、実装を進めた。この場合は軌跡の濃度の多値性や軌跡の交差等の要因を考慮する必要が無いため、入力画像に対して 2 値化とガウスフィルタ処理を適用し軌跡を強調する処理を施し、その後、水平方向に軌跡を追跡し、始点、終点並びにその間に生じる変曲点の座標を取得する処理を実装した。結果として、単純な電気泳動画像の場合は上記のような処理で変曲点を良好に検出できることを確認した。

3) 取得画像の処理の易化

「複数軌跡を含む TGGE 画像を入力とした深層学習手法による変曲点検出」の精度を高めるため、関数に基づいたフィッティング処理を行った。まず、シグモイド関数の逆関数を要素としたフィッティング関数を設計した。そして、画像処理により検出された軌跡への重なりを最大化す

るパラメタを探索し、その関数を検出軌跡に重畳させた。この処理により、部分的な軌跡消失を伴うような画像への軌跡追従性を高める処理を導入した。これまでは画像処理部分のみの設計、実装を進めてきた。しかし、検査装置操作者は、画像処理や計算機操作に関する十分な知識を持たないことも多い。

この問題を解決するため、「軌跡を1本のみ含む TGGE 画像に対するガウスフィルタ処理と軌跡強調処理」に対して、ユーザインタフェース部分を実装した。それにより、計算機操作や画像処理に関する専門的知識を持たない、検査機器操作者による取得画像の処理を容易にした。その結果、ウィンドウ左部分のアイコンへのクリック操作やマウスによる入力操作により、以下の操作が可能となった。

- (a) 画像選択
- (b) 変曲点検出処理の実行
- (c) 変曲点類似度算出時の原点座標設定
- (d) 検出変曲点座標の修正（過検出、未検出が生じた場合）
- (e) 変曲点類似度計算の実行

処理の結果、検出された変曲点は画面右端に表示される。また、変曲点の類似度（遺伝子情報の遠近に対応する）は画面右上に表示される。検出された変曲点の位置は、強調処理等を実行後の画像上に、緑色の4つ組のドットとして表示される。この4つ組ドットの対角位置の2点間を結んだ交点に変曲点座標に対応する。

ユーザインタフェースを統合したシステムに対して、1本軌跡を含む TGGE 画像に対する変曲点検出および PaSS (Pattern Similarity Score) の算出に関する動作を確認した。現時点では安定して TGGE 画像をスキャンする装置による画像取得ではないため、原点座標の校正や軌跡の出現が安定しない場合がある。その影響を除けば、一通りの処理が行えることを確認した。

TGGE 画像において、原点座標を固定して取得できる撮影装置が運用可能となった後に、以下に関する検証・評価が今後の課題となる。

- (a) 同一遺伝子をもつ、異なる試料間での PaSS 値の類似性を安定して算出できること
- (b) 異なる遺伝子情報をもつ試料間での PaSS 値の非類似性を安定して算出できること

4 - 5 核酸等温増幅法の改良

1) RPA 法の技術構築

一定温度の DNA 増幅法であるリコンビナーゼポリメラーゼ増幅 (RPA) 法を実施するのに必要な酵素である、リコンビナーゼである *UvsX* と *UvsY*、1本鎖 DNA 結合タンパク質 (SSB) である gp32 の組換え体を、大腸菌を宿主として生産した。自家調製の Rec と SSB および市販の Pol と ATP 再生系酵素を用いて RPA 反応を実現した。

2) RPA 試薬の最適化

RPA 試薬の組成を統計学的手法により最適化した。最適化された組成は、400 ng/μL *UvsX*、40 ng/μL *UvsY*、400 ng/μL gp32、0.4 units/μL *Bst* DNA polymerase、120 ng/μL creatine kinase、2 mM ジチオスレイトール、6% PEG35000、3.5 mM ATP、650 μM dNTPs、3.5 mM ATP、50 mM Tris-HCl buffer、40 mM CH₃COOK、20 mM phosphocreatine、8 mM Mg(OCOCH₃)₂、1 μM プライマーであった。最適化された試薬により、600 分子の標的 DNA あるいは RNA が検出された。

3) His タグの位置が *UvsY* の性能に与える影響

His タグの位置が *UvsY* の性能に与える影響を検討するために、His タグをもたないもの (*UvsY*-his)、N 末端に His タグをもつもの (*UvsY*-Nhis)、C 末端に His タグをもつもの (*UvsY*-Chis)、N 末端と C 末端の両方に His タグをもつもの (*UvsY*-NChis) を調製した。

UvsY-his、*UvsY*-Nhis、*UvsY*-Chis あるいは *UvsY*-NChis を用いた RPA の反応効率に対する *UvsY* 濃度の影響を検討した。その結果、*UvsY*-his、*UvsY*-Nhis、*UvsY*-Chis あるいは *UvsY*-NChis 最適濃度はそれぞれ 20、20、80、60 ng/μL であった。この濃度の *UvsY* を含 RPA 試薬での標的 DNA の検出感度はそれぞれ、6 × 10⁵、60、600、600 分子であった。また、増幅産物の検出に要する反応時間はそれぞれ、20、20、30、20 分であった。*UvsY*-Nhis を用いた RPA では、増幅 DNA のアガロースゲル電気泳動で、他の *UvsY* を用いた RPA より明瞭なバンドが得られた。以上のことから、His タグの位置は N 末端が最適であることが示された。

4) ピルビン酸キナーゼの ATP 再生系酵素としての RPA への使用

ATP 再生系酵素とその基質には従来、クレアチンキナーゼ (CK) とクレアチンリン酸 (PCr) が用いられてきた。ここでは代わりに、ピルビン酸キナーゼ (PKM) とホスホエノールピルビン酸 (PEP) を用いた RPA を構築し、性能を比較した。

まず、ヒトピルビン酸キナーゼを大腸菌で発現させ、菌体から精製した。得られた精製標品は PKM 活性を有した。PKM、PEP、CK、PCr の濃度が RPA 反応に与える影響を検討した結果、最適濃度は 20 ng/μL PKM、10 mM PEP、120 ng/μL CK、20 mM PCr であった。この濃度で PKM と PEP を使う RPA と CK と PCr を使う RPA の感度と迅速性を比較したところ、ともに検出感度は 6000 分子の標的 DNA、増幅に要する時間は 20 分であった。

PKM と CK の耐熱性を検討した。PKM と CK を 48~72 °C で 10 分間熱処理した後に、RPA 反応を行った。RPA 反応で DNA が増幅された最も高い熱処理温度は、PKM では 64 °C、CK では 56 °C であった。このことから、PKM は CK よりも耐熱性が高いことが示され、PKM を用いた RPA 試薬は CK を用いた RPA 試薬よりも安定性が高い可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計24件（うち査読付論文 21件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 So Nishimoto, Yuki Ikeda, Ying Qiao, Hideaki Minami, Masaaki Ito, Toshiyuki Kimura, Teisuke Takita, and Kiyoshi Yasukawa	4. 巻 23
2. 論文標題 Inhibition of α -glucosidase activity by <i>Morus australis</i> fruit food	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 19-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14533/jbm.23.19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hara, H., Yano, H., Akazawa, K., Kamoda, K., Kandabashi, Baba, M., Takita, T., and Yasukawa, K.	4. 巻 未定
2. 論文標題 Construction and characterization of ribonuclease H2 C subunit-knockout NIH3T3 cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tokonami, M., Horiguchi, A., Ueshima, N., Takita, T., Takahashi, T., Nishimura, K., and Yasukawa, K.	4. 巻 87
2. 論文標題 Purification and characterization of a serine protease from the fruit of <i>Ficus carica</i> cultivar Masui Dauphine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 532-540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbad028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Juma, K.M., Inoue, E., Asada, K., Fukuda, W., Morimoto, K., Yamagata, M., Takita, T., Kojima, K., Suzuki, K., Nakura, Y., Yanagihara, I., Fujiwara, S., and Yasukawa, K.	4. 巻 135
2. 論文標題 Recombinase polymerase amplification using novel thermostable strand-displacing DNA polymerases from <i>Aeribacillus pallidus</i> and <i>Geobacillus zalihae</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 282-290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2023.01.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kandabashi, M., Yano, H., Hara, H., Ogawa, A., Kamoda, K., Ishibashi, S., Himeda, K., Baba, M., Takita, T., and Yasukawa, K.	4. 巻 172
2. 論文標題 Analysis of ribonucleotide content in the genomic DNA of ribonuclease H2 A subunit (RH2A)-knockout NIH3T3 cells after transient expression of wild-type RH2A or RH2A variants with an Aicardi-Goutieres syndrome-causing mutation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 225-231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeuchi, T., Yasumoto, M., Takita, T., Tanaka, K., Kusubata, M., Hayashida, O., Hattori, S., Mizutani, K., Mikami, B., and Yasukawa, K.	4. 巻 298
2. 論文標題 Crystal structure of Grimontia hollisae collagenase provides insights into its novel substrate specificity toward collagen	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Qiao, Y., Ikeda, Y., Ito, M., Kimura, T., Ikeuchi, T., Takita, T., and Yasukawa, K.	4. 巻 87
2. 論文標題 Inhibition of α -amylase and α -glucosidase by Morus australis fruit extract and its components iminosugar, anthocyanin, and glucose	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Food Science	6. 最初と最後の頁 1672-1683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1750-3841.16098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takita, T., Sakuma, H., Nilouyal, S., Ohashi, R., Nemoto, S., Yogo, Y., Yasuda, K., Ikushiro, S., Sakaki, T., and Yasukawa, K.	4. 巻 86
2. 論文標題 Comparison of the stability of CYP105A1 and its mutants engineered for production of active forms of vitamin D	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 444-454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Narukawa, Y., Kandabashi, M., Li, T., Baba, M., Hara, H., Kojima, K., Iida, K., Hiyama, T., Yokoe, S., Yamasaki, T., Takita, T., and Yasukawa, K.	4. 巻 34
2. 論文標題 Improvement of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase thermostability by introducing a disulfide bridge in the ribonuclease H region	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protein Engineering Design & Selection	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/protein/gzab006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Qiao, Y., Ito, M., Kimura, T., Ikeuchi, T., Takita, T., and Yasukawa, K.	4. 巻 132
2. 論文標題 Inhibitory effect of Morus australis leaf extract and its component iminosugars on intestinal carbohydrate-digesting enzymes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 226-266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.05.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuwata, K., Suzuki, M., Takita, T., Yatsunami, R., Nakamura, S., and Yasukawa, K.	4. 巻 85
2. 論文標題 The mutation of Thr315 to Asn of GH10 xylanase XynR increases the alkaliphily but decreases the alkaline resistance.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1853-1860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakura, Y., Wu, H.N., Okamoto, Y., Takeuchi, M., Suzuki, K., Tamura, Y., Oba, Y., Nishiumi, F., Hatori, N., Fujiwara, S., Yasukawa, K., Ida, S., and Yanagihara, I.	4. 巻 16
2. 論文標題 Development of an efficient one-step real-time reverse transcription polymerase chain reaction method for severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 detection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0252789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0252789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Biyani, R., Sharmab, K., Kojima, K., Biyani, M., Sharnad, V., Kumawatd, T., Juma, K.M., Yanagihara, I., Fujiwara, S., Kodama, E., Takamura, Y., Takagi, M., Yasukawa, K., and Biyani, M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of robust isothermal RNA amplification assay for lab-free and lab-quality testing of RNA viruses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-954111-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Juma, K.M., Takita, T., Yamagata, M., Ito, K., Arikawa, E., Akagi, S., Kojima, K., Biyani, M., Fujiwara, S., Nakura, Y., Yanagihar, I., and Yasukawa, K.	4. 巻 567
2. 論文標題 Optimization of reaction condition of recombinase polymerase amplification to detect SARS-CoV-2 DNA and RNA using a statistical method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 195-200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.06.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Juma, K.M., Takita, T., Yamagata, M., Ishitani, M., Hayashi, K., Kojima, K., Suzuki, K., Ando, Y., Fujiwara, S., Nakura, Y., Yanagihara, I., and Yasukawa, K.	4. 巻 49
2. 論文標題 Modified uvsY by N-terminal hexahistidine tag addition enhances efficiency of recombinase polymerase amplification to detect SARS-CoV-2 DNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 2847-2856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-021-07098-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 ピヤニマニシュ、保川清	4. 巻 42
2. 論文標題 RICCAとPalmpAGEシステムを用いたSARS-CoV-2亜種の迅速RNA検査のための非ゲノム配列解析アプローチ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 電気設備学会	6. 最初と最後の頁 25-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishizuka, K., Tsutsumi, Y., Baba, M., Biyani, R., Meng, C.W., Biyani, M., Takagi, M., Jaiswal, J., Sharma, B., Kojima, K., Takita, T., and Yasukawa, K.	4. 巻 20
2. 論文標題 Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase activity by the extracts of Indian plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 17-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14533/jbm.20.17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Baba, M., Kojima, K., Nishimura, T., Sugiura, T., Takita, T., Uehara, R., Crouch, R. J., and Yasukawa, K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Val143 of human ribonuclease H2 is not critical for, but plays a role in determining catalytic activity and substrate specificity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0228774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0228774	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 保川清	4. 巻 49
2. 論文標題 リコンビナーゼポリメラーゼ増幅法	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床化学	6. 最初と最後の頁 220-221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Juma, K. M., Kojima, K., Takita, T., Natsuaki, K., and Yasukawa, K.	4. 巻 21
2. 論文標題 Comparison of sensitivity and rapidness of PCR, recombinase polymerase amplification, and RNAspecific amplification for detection of Rice yellow mottle virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 27-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14533/jbm.21.27	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kojima, K., Juma, K. M., Akagi, S., Hayashi, K., Takita, T., O' Sullivan, C. K., Fujiwara, S., Nakura, Y., Yanagihara, I., and Yasukawa, K.	4. 巻 131
2. 論文標題 Solvent engineering studies on recombinase polymerase amplification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 219-224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.10.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishimura, T., Baba, M., Ogawa, S., Kojima, K., Takita, T., Crouch, R. J., and Yasukawa, K.	4. 巻 166
2. 論文標題 Characterization of six recombinant human RNase H2 bearing Aicardi-Goutieres syndrome causing mutations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 537-545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Suzuki, M., Takita, T., Kuwata, K., Nakatani, K., Li, T., Katano, Y., Mizutani, K., Mikami, B., Yatsunami, R., Nakamura, S., and Yasukawa, K.	4. 巻 85
2. 論文標題 Insight into the mechanism of thermostabilization of GH10 xylanase from Bacillus sp. strain TAR-1 by the mutation of S92 to E	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 386-390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbaa003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi, K., Ikeuchi, T., Morishita, R., Qian, J., Kojima, K., Takita, T., Tanaka, K., Hattori, S., and Yasukawa, K.	4. 巻 168
2. 論文標題 The roles of histidine and tyrosine residues in the active site of collagenase in Grimontia hollisae.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 385-392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計37件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 矢野晴菜、神田橋真子、松本響子、原晴佳、馬場美聡、滝田禎亮、保川清
2. 発表標題 リボヌクレアーゼH2 AサブユニットをノックアウトしたヒトHEK293細胞への、野生型あるいはエカルディーングティエール症候群を引き起こす変異をもつRH2Aの一過性発現
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀口星、床並実津希、上島直生、西村耕作、滝田禎亮、保川清
2. 発表標題 イチジク果実からのセリンプロテアーゼの精製と性状解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村友香、畝田航平、鈴木愛美、安本瑞貴、滝田禎亮、中村聡、保川清
2. 発表標題 GH10 キシラナーゼXynRの315位の アミノ酸残基が好アルカリ性に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池田祐輝、西本創、喬穎、矢野晴菜、南秀明、伊東昌章、滝田禎亮、保川清
2. 発表標題 Caco-2細胞および陰イオン交換クロマトグラフィーとパルスドアンペロメトリ検出の組み合わせを用いた1-デオキシノリジマイシンのグルコシダーゼ阻害活性の測定
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西本創、池田祐輝、喬穎、南秀明、伊東昌章、木村俊之、滝田禎亮、保川清
2. 発表標題 シマグワ製品による α -グルコシダーゼの阻害
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 保川清、池内健晃、安本瑞貴、上島聡音理、滝田禎亮、田中啓友、楠畑雅、服部俊治、水谷公彦、三上文三
2. 発表標題 Grimontia hollisae コラゲナーゼ(Ghcol)のX線結晶構造
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会シンポジウム(招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原晴佳、矢野晴菜、神田橋眞子、赤澤佳穂、鴨田佳奈、松本響子、馬場美聡、滝田禎亮、保川清
2. 発表標題 リボスクレアーゼH2のCサブユニットの、欠損およびエカルディーングティエール症候群関連変異が細胞に与える影響の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部 第524回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kevin Maafu Juma, Teisuke Takita, Masaya Yamagata, Mika Ishitani, Kaichi Hayashi, Kenji Kojima, Koichiro Suzuki, Yuri Ando, Wakao Fukuda, Shinsuke Fujiwara, Yukiko Nakura, Itaru Yanagihara, Kiyoshi Yasukawa
2. 発表標題 Modified uvsY by N-terminal hexahistidine tag addition enhances efficiency of recombinase polymerase amplification to detect SARS-CoV-2 DNA
3. 学会等名 日本生化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	Kiyoshi Yasukawa, Misato Baba, Motoki Tsukiashi, Kohei Himeda, Takuto Nishimura, Saori Ogawa, Mako Kandabashi, Shu Ishibashi, Haruna Yano, Teisuke Takita, and Kenji Kojima
2. 発表標題	Enzyme chemical and cell biological analysis of human RNase H2 bearing Aicardi-Goutieres syndrome causing mutations
3. 学会等名	RNaseH2022 (国際学会) (国際学会)
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	濱中雄大、京逸如、雷雨坤、山田章文、三上文三、水谷公彦、保川清、滝田禎亮
2. 発表標題	Geobacillus stearothermophilus由来トランスグルタミナーゼのC末端伸長配列の役割の解明とX線結晶構造解析
3. 学会等名	日本生物高分子学会2022年度大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	池田祐輝、喬穎、伊東昌章、木村俊之、池内健晃、滝田禎亮、保川清
2. 発表標題	シマグワ実抽出物とその成分による α -アミラーゼと β -グルコシダーゼの阻害
3. 学会等名	日本生物高分子学会2022年度大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	石橋周侑、神田橋真子、上野凜、滝田禎亮、保川清
2. 発表標題	ヒトDNAポリメラーゼ β のLeu606への変異導入がヌクレオチド選択に与える影響
3. 学会等名	日本農芸化学会関西支部2022年度支部大会 (第522回講演会)
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 上島聡音理、滝田禎亮、安本瑞貴、池内健晃、田中啓友、楠畑雅、服部俊治、水谷公彦、三上文三、保川清
2. 発表標題 Grimontia hollisaeコラゲナーゼの X線結晶構造と触媒反応から明らかになった コラーゲンに対する新規な基質特異性
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部2022年度支部大会（第522回講演会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安本瑞貴、池内健晃、上島聡音理、滝田禎亮、田中啓友、楠畑雅、林田治、服部俊治、水谷公彦、三上文三、保川清
2. 発表標題 Grimontia hollisaeコラゲナーゼのX線結晶構造と酵素活性の解析
3. 学会等名 第68回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 喬穎、伊東昌章、木村俊之、池内健晃、滝田禎亮、保川清
2. 発表標題 シマグワ葉抽出物とイミノ糖の糖質分解酵素阻害効果の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部第516回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤友理、保川清、柳原格、福田青郎、藤原伸介
2. 発表標題 RNA検出を目指したThermus thermophilus由来DNAポリメラーゼの改変
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上瑛介、福田青郎、保川清、柳原格、藤原伸介
2. 発表標題 新規鎖置換型DNAポリメラーゼ生産菌の探索と酵素活性の比較
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 保川清
2. 発表標題 リボヌクレアーゼH2の構造と機能
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kevin Maafu Juma, Teisuke Takita, Kenji Ito, Masaya Yamagata, Shihomi Akagi, Emi Arikawa, Kenji Kojima, Manish Biyani, Shinsuke Fujiwara, Yukiko Nakura, Itaru Yanagihara, Kiyoshi Yasukawa
2. 発表標題 Development and optimization of reaction condition of recombinase polymerase amplification to detect SARS-CoV-2 DNA and RNA using a statistical method
3. 学会等名 日本生物高分子学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤木志保美、浅井莉奈、今井翔太、山形昌也、多田孝清、滝田禎亮、保川清
2. 発表標題 RNA増幅法を用いたビール酵母の生理状態評価手法の構築
3. 学会等名 日本生物高分子学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神田橋眞子、原晴佳、小川紗央里、矢野晴菜、鴨田佳奈、石橋周侑、馬場美聡、姫田康平、滝田禎亮、保川清
2. 発表標題 リボヌクレアーゼH2をノックアウトした動物細胞に同酵素を一過性発現させた時のゲノムDNA中リボヌクレオチド量の経時変化
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部第519回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原 晴佳、神田橋 眞子、鴨田佳奈、矢野 晴菜、小川紗央里、姫田康平、馬場美聡、滝田禎亮、保川 清
2. 発表標題 エカルディーグティエール症候群の患者で 同定された変異をもつリボヌクレアーゼH2を発現する動物細胞の性状解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馬場美聡、兒島憲二、西村拓人、杉浦拓也、滝田禎亮、上原了、Robert J. Crouch、保川清
2. 発表標題 ヒトリボヌクレアーゼH2のVal143は触媒活性と基質特異性に重要な役割を果たす
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Himankshi Rathorea, Radhika Biyania, Hiroto Katob, Yuzuru Takamura, Kenji Kojima, Kiyoshi Yasukawa, Manish Biyani
2. 発表標題 シンプルな電気泳動と電気化学的センサーを用いた信頼でき現場使用が可能なRPA法 による解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保川清
2. 発表標題 One-step RT-PCR using the genetically variant of DNA polymerase with reverse transcriptase activity
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kevin Maafu Juma, Kenji Kojima, Teisuke Takita, Keiko T. Natsuaki, Kiyoshi Yasukawa
2. 発表標題 Comparison of sensitivity and rapidness of PCR, recombinase polymerase amplification, and RNA-specific amplification for detection of Rice yellow mottle virus
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kiyoshi Yasukawa
2. 発表標題 Alteration of enzymes and their application in rapid nucleic acid amplification to combat the virus pandemic
3. 学会等名 BICON2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kevin Maafu Juma、兒島憲二、赤木志保実、林魁一、滝田禎亮、 Ciara K. O' Sullivan、藤原伸介、名倉由起子、柳原格、保川清
2. 発表標題 リコンビナーゼポリメラーゼ増幅法の溶媒工学的研究
3. 学会等名 2021年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保川清
2. 発表標題 酵素の改良と核酸増幅への応用
3. 学会等名 2021年度日本農芸化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 姫田康平、月足元希、馬場美聡、兒島憲二、滝田禎亮、保川清
2. 発表標題 リボヌクレアーゼH2を欠損させたマウス線維芽細胞株NIH3T3の性状解析
3. 学会等名 2019年度日本生化学会近畿日本支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村拓人、馬場美聡、小川紗央里、兒島憲二、滝田禎亮、Robert J. Crouch、保川清
2. 発表標題 リボヌクレアーゼH2を欠損したNIH3T3細胞株の樹立とその性状解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部第503回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川紗央里、西村拓人、馬場美聡、兒島憲二、滝田禎亮、Robert J. Crouch、保川清
2. 発表標題 エカルディーグティエール症候群（AGS）の患者で同定された変異を有する6種類の組換えヒトRNase H2の性状解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・中部支部合同大会（関西支部第510回講演会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyoshi Yasukawa, Kenji Kojima
2. 発表標題 RNA amplification
3. 学会等名 BICON-2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Kojima, Itaru Yanagihara, Shinsuke Fujiwara, Manish Biyani, Kiyoshi Yasukawa
2. 発表標題 Recombinase polymerase amplification
3. 学会等名 BICON-2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuto Tsutsumi, Keiko Ishizuka, Misato Baba, Kosaku Nishimura, Keishi Hata, Saori Takahashi, Shozo Sakuda, Teisuke Takita, Kenji Kojima, Kiyoshi Yasukawa
2. 発表標題 Inhibition of the DNA polymerase activities of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication by <i>Brasenia schreberi</i> (Junsai)
3. 学会等名 BICON-2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuto Nishimura, Misato Baba, Saori Ogawa, Kenji Kojima, Teisuke Takita, Robert J. Crouch, Kiyoshi Yasukawa
2. 発表標題 Characterization of recombinant human ribonuclease H2 bearing Aicardi-Goutieres syndrome causing mutations
3. 学会等名 MECC 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohei Himeda, Motoki Tsukiashi, Misato Baba, Saori Ogawa, Kenji Kojima, Teisuke Takita, Kiyoshi Yasukawa
2. 発表標題 Construction and characterization of ribonuclease H2 knockout mouse NIH3T3 cells
3. 学会等名 MECC 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 核酸増幅方法	発明者 101. 滝田禎亮、保川清、兒島憲二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021- 96136	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>酵素化学研究室ホームページ http://www.enzchem.kais.kyoto-u.ac.jp/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	野原 康伸 (Nohara Yasunobu) (30624829)	熊本大学・大学院先端科学研究部(工)・特任准教授 (17401)	
研究分担者	兒島 憲二 (Kojima Kenji) (40542759)	姫路獨協大学・薬学部・准教授 (34521)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	横田 文彦 (Yokota Fumihiko) (50760451)	九州大学・アジア・オセアニア研究教育機構・准教授 (17102)	
研究分担者	吉高 淳夫 (Yoshitaka Atsuo) (60263729)	北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授 (13302)	
研究分担者	滝田 禎亮 (Takita Teisuke) (70263126)	京都大学・農学研究科・助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スペイン	Universitat Rovira i Virgil	Centro de Biologia Molecular	
米国	NIH		