

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850050

研究課題名(和文) 逆転写反応における非特異的増幅の抑制

研究課題名(英文) Suppression of errors in reverse transcription

研究代表者

福井 健二 (Fukui, Kenji)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：00466038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：RNAを鋳型にしてDNAを複製する逆転写反応は、遺伝子発現解析や病原体の検出技術の基本となる。逆転写反応における非特異的な増幅を低減するために、DNA/RNAミスマッチ認識タンパク質を応用する手法を考案した。新たに同定したタンパク質 LLBP は、DNA と RNA から形成されるミスマッチを強く認識することで、誤対合したプライマー由来の逆転写反応を阻害した。このタンパク質を利用することで逆転写反応の精度を大幅に改善する事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Reverse transcription is essential for gene expression analysis, detection of pathogenic microorganisms, and other diagnostic technologies. In this study, we developed a novel method for suppressing non-specific amplifications during reverse transcription-related reactions. The previously-uncharacterized protein LLBP was isolated from *Thermus thermophilus* HB8 and its binding specificity towards DNA/RNA mismatch was confirmed. LLBP inhibited reverse transcription reaction when the primer-template complex contained a DNA/RNA mismatch. This protein would be utilized for improving the accuracy of reverse transcription-related technologies.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：逆転写 ミスマッチ塩基対 DNA RNA

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 1983 年の発明以来、Polymerase chain reaction (PCR) 法による核酸増幅技術は飛躍的な広がりを見せ、基礎科学研究から臨床診断のあらゆる分野で活用されている。例えば、基礎研究のための遺伝子の単離には PCR によるその遺伝子の増幅が不可欠であるし、一塩基多型 (SNPs) の解析や微生物感染の検出などにも PCR の技術が応用されている。このように現在の科学に無くてはならない技術となった PCR であるが、増幅する領域を指定するプライマーの誤対合に由来する非特異的増幅が問題となる場合が多々ある。

(2) これまでに、DNA を鋳型に DNA を増幅する反応における非特異的増幅を抑制する手法として、高度好熱菌由来の耐熱性ミスマッチ塩基対認識蛋白質 MutS が利用可能である事を発見した (Fukui *et al.* (2013) *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 6436-6453)。

プライマーの誤対合では、塩基-塩基ミスマッチやバルジループ構造が生じるが、これらの構造はミスマッチ塩基対認識蛋白質である MutS によって認識される。プライマー・テンプレート複合体に結合した MutS は、DNA ポリメラーゼがプライマーに結合する事を阻害し、結果、非特異的増幅が抑制される事を示した。これは、それまでに知られていなかった概念であり、MutS 以外の多くの DNA 結合蛋白質についても同様の利用方法が考えられる事を示唆する。しかしながら、後述する通り、MutS は、RNA から DNA を増幅する際には機能しない。

## 2. 研究の目的

(1) 近年、DNA から DNA を増幅する事と同等に、RNA から DNA を増幅する技術、つまり逆転写反応、も重要視されている。代表例がリアルタイム PCR 関連技術であり、遺伝子の発現量の条件依存的・経時的変動解析といった基礎研究や、組織片からの各種ガン細胞の検出といった臨床診断まで幅広い分野で必須の技術となっている。

RNA から DNA を増幅する逆転写反応の際にも、プライマーにより増幅範囲を指定する事になる。ここでもやはり、プライマーの誤対合に由来する非特異的増幅が解析の大きな障壁となっているが、現状では、逆転写反応時の温度を上昇させ、反応効率を犠牲にすることで増幅の特異性を上昇させるという手段がとられている。本研究では、この問題について根本的な解決方法を提供する事を目的とする。

(2) 逆転写反応においてプライマーの誤対合が起こると、RNA/DNA ハイブリッドにより構成されるミスマッチ構造が生じる。残念なことに、上述のミスマッチ認識蛋白質 MutS は二本鎖 DNA により構成されるミスマッチ構造は認識するものの、RNA/DNA ハイブリッドや二本鎖 RNA には全く結合できなかった。このため、MutS は DNA から DNA を増幅する反応には応用できるが DNA から RNA を増幅する逆転写反応には応用できない。

(3) そこで、DNA/RNA から成るミスマッチを認識するタンパク質を探索し、逆転写反応へ応用することを計画した。

## 3. 研究の方法

(1) 定量逆転写反応は、逆転写とそれに続く定量 PCR のステップからなる。定量 PCR のステップでも機能させるために、耐熱性のミスマッチ認識タンパク質を利用する必要がある。そこで、高度好熱菌および超好熱性細菌由来の候補タンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、それらの DNA/RNA 結合能をゲルシフトアッセイにより調べた。

(2) 望みの活性を示したタンパク質については、DNA から DNA を増幅する PCR 反応における非特異的増幅の抑制効果を確認した。

(3) 次に、バクテリア細胞由来トータル RNA を鋳型として、様々なプライマーを用いて逆転写反応を行い、ミスマッチを含むプライマーからの逆転写反応を抑制する効果の検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 高度好熱菌および超好熱菌由来新奇 DNA 結合タンパク質の発現および精製方法を確立した。これらのタンパク質について、熱安定性および溶解度を調べたところ、十分な耐熱性と溶解度を持つ 2 種類のタンパク質 *Aquifex aeolicus* 由来 MutS2 と *Thermus thermophilus* 由来 LLBP を得た。

(2) 上記 2 種類のタンパク質の基質特異性を調べたところ、MutS2 はバブル構造やループ構造など、分岐部分を持つ DNA 構造に強く結合し、LLBP は大きなループ状構造を好むことが分かった。このような DNA 構造は、プライマーが誤対合を起こした際に生じ得る構造であ

る。期待通り、MutS2 および LLBP は DNA から DNA を増幅する PCR 反応において、非特異的増幅を抑制する効果を示した。

(3) バクテリア細胞から抽出したトータル RNA を鋳型として、ミスマッチを含まないように、またはミスマッチを含むように設計したプライマーを用いて逆転写反応を行い、上記タンパク質の効果を検討した。

その結果、LLBP は、ミスマッチを含むプライマーからの逆転写反応に対して抑制効果を示した(図 1)。この結果は、「プライマーと鋳型の誤対合により生じるミスマッチを認識するタンパク質によって非特異的増幅を抑制する」という原理が、逆転写反応においても有効であることを示すものである。

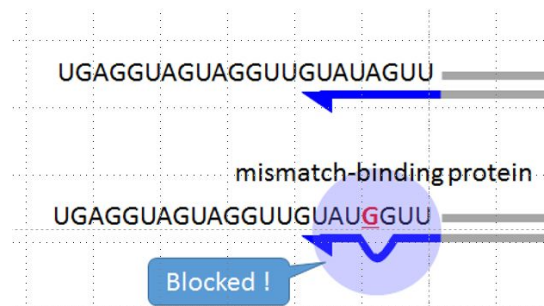


図 1: DNA/RNA ミスマッチ認識タンパク質による逆転写反応の高精度化。(上) プライマー/鋳型複合体がミスマッチを含まない場合にはミスマッチ認識タンパク質が結合しないため反応は阻害されない。(下) プライマー/鋳型複合体がミスマッチを生じる場合にはミスマッチ認識タンパク質が強く結合するため、逆転写酵素がプライマーの末端に結合できず、反応は阻害される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Hitoshi Iino, Takaaki Hikima, Yuya Nishida, Masaki Yamamoto, Seiki Kuramitsu, and Kenji Fukui, Small-angle X-ray scattering analysis reveals the ATP-bound monomeric state of the ATPase domain from the homodimeric MutL endonuclease, a GHKL phosphotransferase superfamily protein, *Extremophiles*, 査読有り、19、2015、p.643-656.  
DOI: 10.1007/s00792-015-0745-2.

福井 健二、「DNA ミスマッチ修復系における DNA 切断活性の制御機構」、生化学、査読有り、第 87 巻、p. 212 - 217  
DOI:10.14952/SEIKAGAKU.2015.870212

〔学会発表〕(計 2 件)

福井 健二、「高度好熱菌由来ミスマッチ認識タンパク質の核酸増幅反応への応用」、日本農芸化学会中四国支部会第 22 回若手研究者シンポジウム、2016 年 4 月 23 日、高知大学農林海洋科学部(高知県南国市)

福井 健二、「高度好熱菌由来 DNA 修復タンパク質の核酸増幅反応への応用」、第 4 回モデル生物丸ごと一匹学会、2014 年 9 月 26 日、大阪大学基礎工学部シグマホール(大阪府豊中市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/med/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

福井 健二 (FUKUI, Kenji)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00466038