

【 研究テーマ 】

核酸増幅過程における副産物ピロリン酸の高感度酵素的測定法の構築

【 研究背景 】

遺伝子検査における核酸増幅法は、現在までに PCR 法や LAMP 法、TMA 法など様々な方法が開発されており、これら核酸増幅法における検出法としては、核酸増幅産物を、蛍光色素を用いて励起後の蛍光を検出する技法¹⁾が主流となっている。しかし、この方法では高価な蛍光試薬や、励起装置や蛍光検出器など特殊な装置を必要とし、さらに検出に時間を要する。蛍光検出法の他にも酵素を用いた比色法²⁾や金属錯体を用いた比色法³⁾、マグネシウムイオンを用いた濁度比色法⁵⁾など、様々な方法が開発されている。これら比色法を検出原理とする方法は反応が早く、簡便であるという利点がある一方で、感度や特異性が低いという改善点がある。このように遺伝子検査において、特に細菌やウイルス感染の有無を検査する際には迅速性と簡便性が重要である。緊急時や災害発生時などのライフラインが滞った際には特に、使用できる機械が限られることが想定される。ゆえに、遺伝子検査においても迅速で簡便に結果が得られる技術を備えていることが重要であり、汎用性が高く、低価格な核酸増幅における定性および定量検出技術が求められているといえる。そこで、特殊な機器を必要とせずに出検を行うことができる方法を開発することができれば、遺伝子検査領域において有用かつ汎用性の高い検査となるのではないかと考えられる。そこで、核酸増幅過程で副二次的に生成されるピロリン酸に着目した。

【 研究目的 】

核酸増幅過程で生成されるピロリン酸を、酵素を用いて可視領域において高感度に検出することで、目視にて検出可能で、特別な機器を必要としない、より簡便で迅速、廉価な核酸増幅量の検出技術の開発を試み、本法の技術応用の可能性について検証する。修士課程までの研究では、核酸増幅過程の副産物であるピロリン酸を、XOD を用いた酵素的測定法における検出を試み、二価鉄と 5-Br-PAPS の錯体呈色反応を利用することで、可視領域において高感度に検出できた。しかし、実検体を用いた検討は実施していない。そのため、今後の研究では実検体を対象とした研究を引き続き行う。それと同時に、本測定法の改良も検討している。本測定法の問題点として、核酸増幅試薬に含まれる dNTP が反応に影響を与えることが挙げられる。その原因としてピロリン酸測定試薬に含まれている金属 Fe^{3+} と dNTP が結合してしまう可能性が考えられた。さらに、Fe は酸化反応が起こりやすく、試薬安定性も良好とはいえない。修士課程の研究では dNTP を分解する作用のある酵素を試薬に添加することで dNTP の影響を回避したが試薬に含まれている Fe を別の金属にすることで、反応阻害物質に影響を受けず、より高感度に測定法できるのではないかと考えている。その他にも、核酸増幅後試料に含まれてるピロリン酸以外の物質に着目し、高感度検出法を構築することも検討している。このように、新たな核酸増幅量の検出法の開発も視野に入れながら検討を行う。さらに、使用できる機械が限られる緊急時や災害発生時などのライフラインが滞った場合にも測定することを想定して、検出技術をポータブル吸光度計で応用することも計画している。本研究における核酸増幅検出法の臨床検査への応用の可能性を検証し、検出技術の確立を目指す。

【 研究方法 】

まず、修士課程の研究で構築したピロリン酸測定法の試薬組成を見直す。金属キレーター 5-Br-PAPS や

金属 Fe^{2+} を別の物質にすることで、反応阻害物質に影響を受けず、より安定性の高い測定法が構築できるのではないかと考える。さらに、核酸増幅後試料に含まれてるピロリン酸以外の物質に着目して、高感度検出法を構築することも検討する。例えば、核酸増幅試薬にはマグネシウムが含まれているが、このマグネシウムの減少量を測定することで核酸増幅量を検出できるのではないかと考える。その後、構築した測定法を用いて実検体を対象とした測定を行う。実検体には熊本大学病院で行われているコロナ抗原定量検査などの感染症検査の残試料を想定している(倫理審査申請予定)。さらに、本検出技術をポータブル吸光度計で応用する。使用を検討しているポータブル吸光度計は、カネカ温調機能付き吸光度計 MyAbscope で、この機器は温度調節機能と吸光度測定機能を兼ね備えており、核酸増幅から吸光度の測定まで1台で可能である。

【 研究の意義 】

核酸増幅法における検出法は蛍光検出法が一般的であるが、高価な蛍光試薬や、特殊な装置が必要であり、検出に時間を要するという改善点がある。その他にも酵素を用いた比色法などがあるが、感度や特異性が低い。本研究では、このような改善点を踏まえて安価で特別な機器を必要とせず、高感度に核酸増幅産物を検出できる測定法の開発が期待される。さらに、ポータブル吸光度計において本検出技術が応用可能であれば、災害時などの使用できる機器が限られる状況においても検出結果をその場で迅速かつ簡便に得ることができる。

【 参考文献 】

- 1) P. Nyren: Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. Analytical biochemistry, 167: 235-238, 1987.
- 2) M. Tagiri-Endo: A colorimetric assay for inorganic pyrophosphate that is also useful for measuring product accumulation in polymerase chain reactions. Analytical biochemistry, 315: 170-174, 2003.
- 3) E. Durward and W. J. Harris: Colorimetric method for detecting amplified nucleic acids. BioTechniques, 25: 608-614, 1998.
- 4) カネカ温調機能付き吸光度計 MyAbscope™ | カネカ検査診断製品サイト.
< <https://www.kaneka-labtest.com/product/myabscope.html> > (2024/8/16 参照)