

遺伝子を標的とした機能性分子の開発研究

Development of Artificial Molecules Targeting Gene Expression



萩原 正規
Masaki Hagihara

弘前大学大学院理工学研究科
准教授
Associate Professor,
Graduate School of Science
and Technology,
Hiroasaki University

研究の目的、背景

Purpose and Background of the Research

新型コロナウイルス(COVID-19)の爆発的感染拡大の状況の中、将来、大流行する可能性のある新興・再興感染症に対する、検査キット、抗ウイルス薬、ワクチンなどの開発促進は喫緊の課題である。迅速かつ的確な検査、防疫活動は感染の拡大及び蔓延の防止につながる事が期待されるため、病原体感染の有無を簡便に迅速に判断する検査キットの拡充は急務の課題である。

現在ウイルス感染確定に利用されているPCR法は検出感度が高いものの、高価な専用の機器を必要とするため保健所等の特定の検査施設でのみ行われる。抗原検出用イムノクロマト法は、検査のためのステップ数が少ないことから実験室感染などの危険性が低いことが最大のメリットであるが、特異性と感度の高い抗体が必須であり新規病原体に迅速に対応できない。本研究では、臨床現場即時検査対応可能な新たな遺伝子増幅可視化技術の開発を目的とする。

In the circumstances of the explosive spread of the novel Coronavirus (COVID-19), it is an urgent task to promote the development of test kits, antiviral drugs, and vaccines to prepare for emerging and reemerging infectious diseases of pandemic potential that may occur in the future. Since rapid and accurate testing and quarantine activities are expected to lead to the prevention of the spread of infection and epidemics, the development of test kits that can easily and rapidly determine the presence or absence of pathogen infection is an urgent issue.

The PCR method, which is currently used to determine viral infection, has high detection sensitivity, but it is performed only at specific laboratories such as public health centers because it requires expensive specialized equipment. The immunochromatographic method for antigen detection has the greatest advantage in that the number of steps for testing is small and the risk of laboratory infection is low, but it requires antibodies with high specificity and sensitivity and cannot

respond rapidly to new pathogens. Here, we try to develop a new gene amplification visualization technology that can be used for point-of-care testing (POCT).

研究成果

Research Results

遺伝子特異的プライマーに酵素活性を有する塩基配列を融合したプライマーを設計し、遺伝子増幅反応後に反応溶液に、金属錯体等の試薬を添加し、酸化された発色基質が呈色することにより遺伝子増幅を検出する。本反応は触媒反応のため呈色は経時的に増強され、5-10分後には遺伝子増幅の有無を視覚的に判断できると期待した。

『化学構造修飾ユニットの探索』

遺伝子増幅を色調の変化で検出可能にするために必要な、触媒活性を有するDNA配列のスクリーニングを行った。多様なDNA塩基配列ライブラリーから、遺伝子増幅反応産物の検出に十分な触媒活性を示す配列ユニットを見出した。『化学構造修飾ユニットを修飾したプライマーを用いた遺伝子増幅産物の可視化』

先に探索した酵素活性配列を遺伝子増幅反応用のプライマーに導入し、PCR反応を用いた遺伝子増幅反応の進行を酵素活性の変化により検出する方法論を開発した。また、塩基配列が示す酵素活性は周辺配列の特定の塩基により制御される発見を利用し、遺伝子増幅に伴い、(a)発色基質の呈色が抑制されるタイプ、(b)発色基質の呈色が増強されるタイプの2種類のPCR反応の可視化に成功した。

『化学修飾プライマーを用いた、ウイルス検出への展開』

遺伝子増幅用のプライマーへの化学修飾法の有用性を判断するために、イヌパルボウイルスの検出法に本手法を展開した。遺伝子増幅プライマーに本化学修飾を施し、遺伝子の増幅量に従い酵素活性の増強を確認した。現在、より検出特異性・感度の高い検出手法へ改良を試みている。

We designed a chemically modified primer that fused a gene-specific primer with a catalytically active sequence. Since primer consumption is correlated with progression of the gene amplification, the progression of the amplification could be monitored by detecting the catalytic activity.

"Screening for Chemical Modification Units"

We first screened for DNA sequences with catalytic activity necessary for detecting gene amplification by color change. From a variety of DNA sequence libraries, characteristic features of putative guanine quadruplex forming sequences for the expression of catalytic activity were found.

"Visualization of gene amplification products using chemically modified primers."

A DNA enzyme-tagged primer was prepared by tethering the catalytic sequence to the 5' end of the gene specific primer and used for PCR-amplification. The color changes of the PCR aliquot were enough to be seen with the naked eye within five minutes.

"Development of chemically modified primers for virus detection"

The chemical modification of primers was applied to the detection of canine parvoviruses (CPV), to determine this particular method's usefulness, and we observed that the increase in the PCR products correlated well with the increase of the color.

今後の展望 Future Prospects

本研究で開発したプライマーの化学修飾手法は、PCRをはじめとする多くの遺伝子増幅手法に適用可能であると考えられることから、感染症等の即時検査に有効であると期待できる。

The chemical modification method developed in this study can be applicable to other DNA amplification methods, including isothermal amplification, and is expected to be effective for immediate testing of infectious diseases.

主な研究資金(直接経費) Main Research Funding (Direct Costs)

弘前大学次世代機関研究/2020年度～2021年度
/4,000,000 円

JSPS 科研費 JP16K01910/2016年度～2018年度
/3,500,000 円

旭硝子財団研究助成/2014年度～2015年度/2,000,000円

Hirosaki University Institutional Research Grant for Future
Innovation FY2020-2021/4,000,000 Yen

JSPS KAKENHI JP16K01910/FY2016-2018/3,500,000 Yen

Asahi Glass Foundation/FY 2014-2015/2,000,000 Yen

Specific Shapes Defined by Nucleotide Sequences — Guanine Quadruplexes —

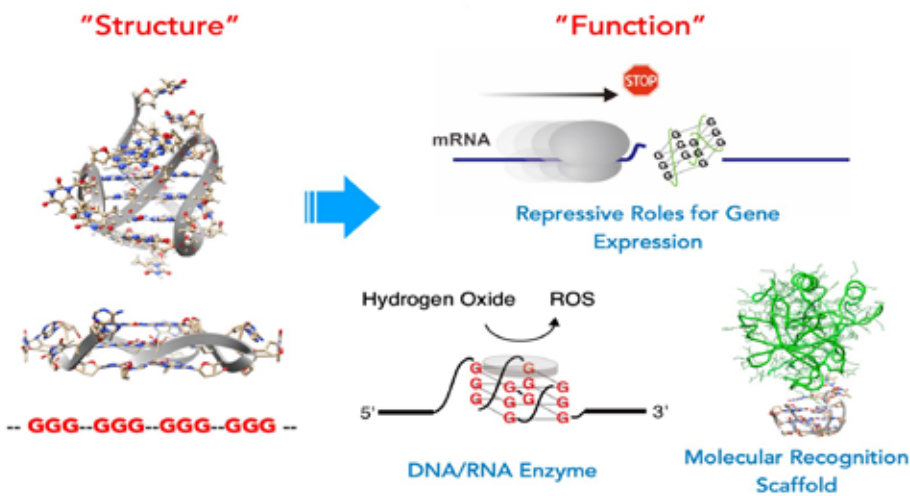


図1. グアニン四重鎖は遺伝子発現制御などさまざまな機能を有することから、注目を集めている核酸構造である。
Figure 1
The guanine quadruplex is a unique nucleic acid structure that has attracted much attention because it has a variety of functions, including the regulation of gene expression.

DNA Detection by Changes in Coloration

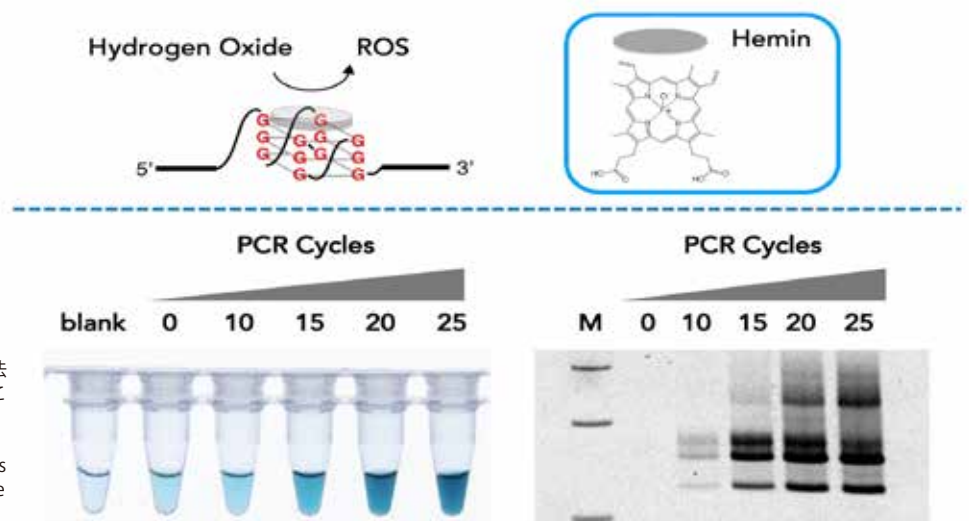


図2. グアニン四重鎖構造のプライマーへの化学修飾法を開発し、PCR産物の増幅に従い触媒活性が向上することにより発色を増強させることができた。

Figure 2

Chemical modification of the guanine quadruplexes to the primers enabled the detection of the PCR-products by the changes of coloration.