

所属・資格 化学科・教授

申請者氏名 栗原 正靖

研究課題		核酸バイオマーカー検出法の開発
報告の概要	研究目的 および 研究概要	本研究では、遺伝子変異や mRNA など疾患に関わる核酸バイオマーカーを簡便且つ迅速に検出する方法の開発を目的とする。これまでに、アナライトに関連試薬を混ぜて、等温下（例えば 37°C）で放置するだけで、標的とするアナライトを蛍光発色等により検出可能な測定系を構築した。SATIC（signal amplification by ternary initiation complexes）法と名付けられた当該方法により、等温下、1つのテストチューブ内で、且つ、1ステップ(洗浄操作や試薬の逐次添加が不要)で、核酸バイオマーカーを目視による簡易検出が可能になった。本研究では、アナライト対象分子のさらなる拡張と検出限界の向上について検討を行う。
	研究の結果	恒常的変異 KCNJ5 細胞等から抽出した成熟 mRNA から、正常型および変異型（2種類）の配列を挿入したプラスミドを作製した。正常型は 480 位がグアニン（G）であるのに対し、変異型の 2 種類は、それぞれ、アデニン（A）およびシトシン（C）である。これらの 3 つのターゲットをそれぞれ特異的に検出できる SATIC 系を構築するために、プライマー鎖（Primer 1）および環状 DNA 鋳型鎖（cT1β）の配列設計を行い調製した。検出対象の変異部位（480 位）が、ターゲット RNA、Primer 1 および cT1β で形成される Three-way junction（TWJ）構造の根元にくるように配列設計を行うことで、塩基識別能の先鋭化を図った。これは、その TWJ 構造、すなわち、三者開始複合体の熱力学的安定性によって、SATIC 系におけるローリング・サークル増幅（RCA）反応の進行が支配されているためである。当該部位（480 位）の塩基対がマッチする配列のとき、最小の熱力学安定性をもって TWJ 構造が形成されるような配列設計とした。
	研究の考察・反省	検出試薬として、Primer 1（P1-G480, P1-G480A, P1-G480C のいずれか）および Primer 2、環状 DNA 鋳型鎖（cT1β および cT2）、デオキシヌクレオチド三リン酸（dNTPs）、φ29DNA ポリメラーゼ、蛍光指示薬（チオフラビン T 誘導体）を含む緩衝液と、ターゲット RNA（G480 および G480A, G480C のいずれか）を含む溶液、もしくは、ターゲットを含まない溶液（蒸留水）とを混合させ、37°C で静置し、検出反応をモニターしたところ、P1-G480 を用いたときは正常型の G480 が、P1-G480A を用いたときは異常型の G480A が、P1-G480C を用いたときは異常型の G480C が、それぞれ特異的に検出された。今後、検出感度の向上や迅速性、装置化等、SATIC 検出系の実用化に向けた検証を行う。
研究発表 学会名 発表テーマ 年月日/場所	研究発表 学会名 発表テーマ 年月日/場所	※この欄は、本報告書提出時点で判明している事項についてご記入ください。 NanoTech Poland 2018 Development of unique nucleic acid materials for diagnosis and therapeutics 2018 年 6 月 8 日 / NanoBioMedical Centre (NBMC), Poznań, Poland Asian 3 Roundtable on Nucleic Acids (A3RONA) Target-Directing Fluorescent Molecular Rotors 2018 年 9 月 16 日 / KIST Gangneung Training Center, Gangneung, Korea Advances in Noncanonical Nucleic Acids 2018 (ANNA2018) Thioflavin T derivatization: Creation of fluorescence indicators for various targets 2018 年 10 月 25 日 / Portorož, Slovenia