

PCR(ピーシーアール)

最近のコロナウイルス感染で、よく耳にする**PCR検査**ですが、PCR自体は特定の**DNA断片**の数を増やして遺伝子工学やDNA鑑定に利用されるものだと私は思っていました。しかし**コロナウイルス**の遺伝子は**RNA**なので、何故PCRが使われるのだらうと思ったのが今回の話題になります。

1) PCRとは

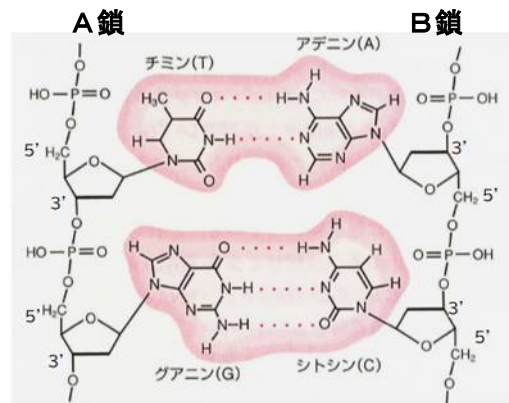
Polymerase Chain Reaction の略で直訳すると『**重合酵素連鎖反応**』になるので、何のこっちゃという感じです。よく利用される訳語は『**ポリメラーゼ連鎖反応**』ですが、これも「重合酵素」を「ポリメラーゼ」に代えただけで今一つ分かりにくいので、私なりに意識をすると『**目的とするDNA断片をDNA合成酵素を利用して連鎖的にたくさん作る反応**』となります(長すぎる!)。

2) DNA合成の基礎

PCRを理解するには多くの生物の遺伝子である**DNA**(デオキシリボ核酸)の**合成(複製)**の仕方を理解する必要があります。それを専門外の私が分りやすく説明することは到底できるものではありませんが、大学院時代に分子生物学分野の研究を少しかじっていたので昔の記憶をたどりながら説明に挑戦です。

①DNAの構造の特徴

- **5炭糖の1位炭素**にチミン等の**4種の塩基**が結合。
- 5炭糖の**2位炭素**にはOH基がない(**デオキシリボース**)。
- デオキシリボースの**3位炭素**は隣のヌクレオシドの**5位炭素**の間でリン酸とエステル結合をしている。
- **デオキシリボースと塩基とリン酸**の三つの成分が1セットとなり、いくつも集まり**一本の鎖**を形成している。
- DNAは相反する方向性の**2本鎖**を形成し、向かい合う**塩基**が**水素結合**でゆるく結合しながら**らせん構造**を保っている。仮に片方をA鎖、相手をB鎖としておく(右上図)。
- 水素結合ができる塩基の組み合わせは決まっており、**チミン(T)**は**アデニン(A)**と2個の水素結合、**グアニン(G)**は**シトシン(C)**と3個の水素結合をしている。このお互いの相性を**相補性**と呼ぶ。
- どちらか一方のDNA鎖が蛋白質の情報を持っており、連続する**3つの塩基**の組み合わせが1種類の**アミノ酸**の情報を持っており**mRNA**を介して**蛋白質**を合成する。



②DNAの合成

ちなみに5ダッシュではなく、5プライムと読みます。

- DNAは合成開始地点を指定する**プライマーDNA**と呼ばれる短いヌクレオシドの集まり(約20塩基分)の結合を発端にしてDNA合成酵素(**DNAポリメラーゼ**)が作用し向き合うDNAを**鋳型**としてデオキシリボースの**5位の炭素(5'末端)**から**3位の炭素(3'末端)**方向に向かって合成される。

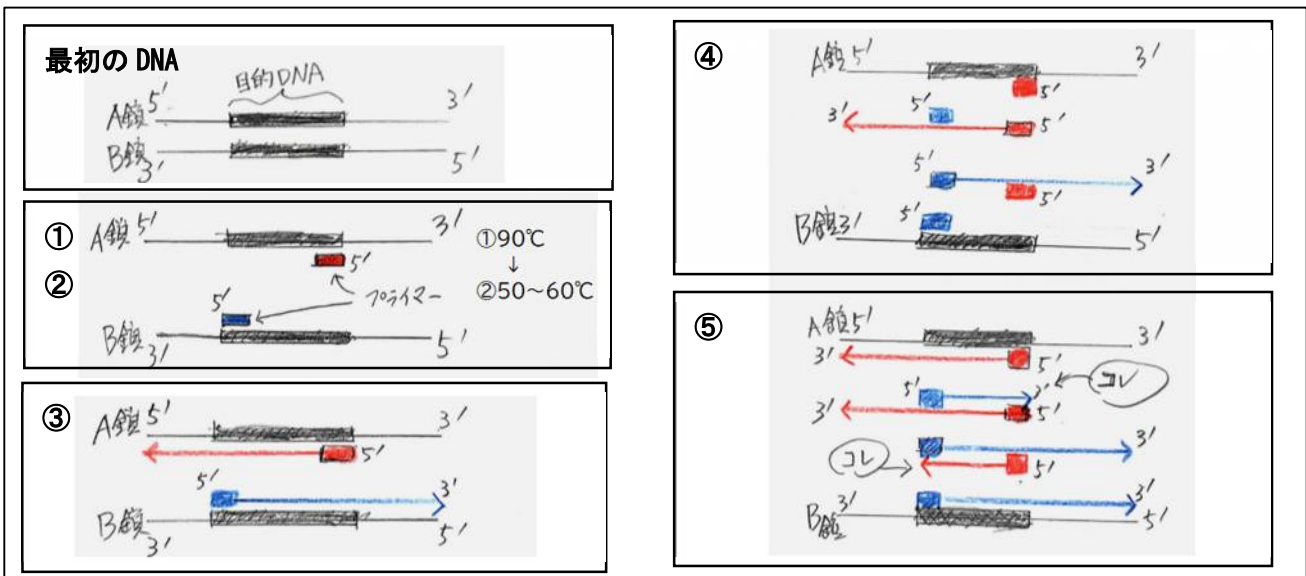
以上がPCRの原理を理解する上での最低限のDNAの知識になるでしょうか?

3) PCRの原理

- 増幅したい**目的のDNA断片**(数百~数千程度の塩基対)を決める(塩基配列が既知でないとダメ)。

・目的とする二本鎖DNA部分のA鎖の始まりの塩基配列と同じ塩基配列とA鎖の終わりの塩基配列と相補性の塩基配列の2種類の5'末端側から20個程度のヌクレオチドを予め人工的に合成しておく。これを**プライマーDNA**とする(説明が難しかったですが、以下下手くそな図と共に解説・・・)

- ① DNAを**95℃**の反応液につける⇒二本鎖DNA間の水素結合がはずれて**一本鎖**になる。
 - ② 2種類の**プライマーDNA**を投入し、50～60℃まで反応液の**温度を下げる**と各プライマーDNA(赤色と青色で表示)はA鎖とB鎖の対応する相補性をもった部分に結合(**アニーリング**)する。
 - ③ 耐熱性の特殊な**DNAポリメラーゼ**を投入してA鎖、B鎖に結合した各プライマーDNAからDNA合成を開始させる(5'から3'方向)⇒目的のDNAを含んだ**長めのDNAが複製**される。
 - ④ 再度**95℃**にし**一本鎖DNA**にして**プライマーDNA**を投入。温度下げ相補性の部位に結合させる。
 - ⑤ 再びDNAポリメラーゼを働かせると各プライマーDNAの5'から3'方向へDNA鎖が伸びる⇒目的のDNAを含んだ長いDNAと共に**目的のDNA領域部分だけのDNA**(図中の**コレ**の部分)も出現し始める。
- ☛ 再び温度上昇させDNAを解離、プライマーDNA投入して温度下げてDNA合成していく過程を何度か繰り返すと**目的のDNA部分**がわずかな時間で**大量に合成**される(と理解しているのですが)。



4) コロナウイルスのRNA遺伝子のPCR検査とは

手描きの下手くそな図で余計混乱されたかもしれませんが、目的とする**DNAの増幅(量産)**はとにかく**可能**なわけです。PCR法もいろいろな手法が開発されており、実際にどの手法がコロナウイルスRNAの増幅に利用されているかは分かりませんが、一つの方法に**逆転写酵素**を用いてウイルスRNAの塩基配列と**相補性のあるDNA(cDNA)**を合成して、その**cDNA**を前述の**DNA-PCR法**を利用して増幅する方法があります。患者さんの検体を対応するPCR試薬に入れて機械にかけて中にコロナウイルスRNAがあると、対応するcDNAがどんどん増えるので陽性、いなければ増えないので陰性となるわけです。ただ検査としての感度が**30～70%(平均50%)**という話ですから、陽性は陽性と確定できますが、陰性の取扱いには慎重にならざるを得ないわけですね。

5) PCR法とノーベル賞

ちなみにPCR法を開発した人はアメリカの**キャリー・バンクス・マリス**(1944年生)で遺伝子工学関係の会社シータス社の一研究員でした。**1993年にノーベル化学賞**を受賞していますが、残念ながら昨年2019年8月に74歳で亡くなりました。(終わり)

参考資料：野島博著『遺伝子工学-基礎から応用まで-』東京化学同人(2017年)