

論文審査の結果の要旨

氏名 岡野 和宣

本論文は、分子生物学分野で用いる分析技術の研究開発について述べられている。

1) 生物間や個体間のゲノム比較法

ゲノム計画の進展の中で重要度が増しているゲノム比較を効率的に行う観点の研究結果である。比較対象となるゲノム全体をシーケンシングするのではなく、制限酵素切断した変異を含む断片を検出することで比較の効率を上げようとの考えに基づく。膨大な数の制限酵素切断断片を制限酵素認識配列に隣接する2塩基の配列でグループ化して、電気泳動比較することで、変異断片のみを網羅的に検出している。グループ化には制限酵素断片にアダプターライゲーションを行い、アダプターに相補な配列の3'末端に2塩基識別配列を持つプライマーでPCRする方法を用いている。2塩基識別配列のすべての組み合わせでPCRを行えば、検出率90%で断片のグループ化ができる事を実例で示している。このアイデアは以前からあったが、PCRでの識別用2塩基の識別性能が低く、擬陽性シグナルが非常に多いので実用になっていなかった。本報告では、独自の工夫としてプライマーの3'末端から4塩基目が試料DNAと非相補になるようにプライマーを設計することで、プライマーの選択性(忠実度)を劇的に上げることに成功している。識別2塩基がミスマッチのときは3'末端近傍に2塩基の非相補部分ができることになり、識別2塩基が相補である場合のみPCRが進行する条件を見出している。また、比較解析のみならず、識別2塩基を持つプライマーを用いたPCRでの未知断片の培養を用いないクローニングや、シーケンシングへの応用についても検討が行われている。

2) 試料中に存在する特定DNA断片の定量法

PCRとは異なる増幅法を用いたDNA検査法として、3'→5'エキソヌクレアーゼ(ExoIII)でテンプレートにハイブリダイズしたプライマーを分解縮小して検出する方法に関する。

プライマーが分解されて短くなるとテンプレートから脱離するので、新しいプライマー分子がハイブリダイズできるようになる事を利用し、一定温度で増幅反応が起きるように工夫している。また、ExoIIIの基質特異性を調べ、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性のほかに、プライマーがループを形成しやすい部分での分解や、一本差での弱い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が存在することを示している。これらの副反応は高温なほど低下することを明らかにし、60°Cで反応させることができれば 10^{-20} mol/アッセイの高感度DNA検出が可能となることを示唆している。

本報告のうち、比較解析法は、肺がん特異的な発現遺伝子を網羅的に探索する方法に利用し、成果を上げているので評価できる。また、プライマーに人工的な非相補部分を入れてポリメラーゼ反応の忠実度を上げる工夫は、PCR以外にも応用範囲が広いと考えられ、実際にSNPsの検出にも応用されているとの事なので評価できる。ExoIIIを用いたDNA定量法は、感度的には、PCRに比べ劣るが、新しい概念であるし、ExoIIIに今までに注目されなかった微弱な活性があることを明らかにしている。

1)記載の方法は神原秀記氏との共同研究、2)に関しては、植松千宗氏、松永浩子氏、沈美善氏、ならびに神原秀記氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって、研究の計画、実験、結果の検討を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)を授与できるものと認める。