

## 論文の内容の要旨

論文題目 新規な定温核酸増幅法の開発と応用

氏名 村上 卓

### 第1章 序論

近年、医療の個人化が叫ばれる中、自動化対応、高スループットでかつ定量性のある次世代型分子診断技術が求められている。すでに 96・384 検体の同時遺伝子発現解析を可能とする次世代遺伝子発現解析プラットフォーム、オリゴ dT 固定化マイクロプレートが実用化されている (1, 2)。当プラットフォームでは細胞溶解液から mRNA を定量的に固相に回収することが可能で、リアルタイム Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法などの RNA 定量法により検体間での遺伝子発現量の比較解析が可能となっている。

しかし、PCR 法では正確な温度サイクル制御が必要なため、サーマルサイクラーと呼ばれる特殊な装置を必要とし、384 検体以上の高スループット化が困難となっている。また、RT-PCR 法においては各反応を別々に行う必要があるため、試料間でのコンタミネーションの危険性が生じたり、作業工程が長くなるなど、診断試験プロトコルとしては改善の余地が残る。そのため、本研究では固相に回収した RNA 配列を 1 段階反応にて定量することができる新規な RNA 定量法の構築を目指す。これにより、オリゴ dT マイクロプレートにて mRNA を固相回収した後、直接反応液を添加・インキュベートすることで各種遺伝子配列の検出を行うことができると期待される。

### 第2章 Primer generation-rolling circle amplification

本章では、上記の問題を解決すべく定温核酸増幅反応 Primer generation-rolling circle amplification (PG-RCA) を新規に考案し、開発した (3)。当核酸増幅法は、DNA 配列の特異的かつ高感度検出に利用することが可能で、様々な核酸プローブと組み合わせることで DNA 配列以外の多様な分子診断への応用も期待できる。当反応では、環状 DNA プローブと DNA 合成酵素・ニック酵素を利用し、一定温度下にて Linear rolling circle amplification (LRCA 反応) とニック反応を相互に連鎖的に誘発することにより、反応生成物を指数関数的に増幅する (Figure 1)。PCR 法を含む既存の核酸増幅法と異なり、しばしば非特異的増幅の原因となりうる DNA プライマーを必要としない点は非常に特徴的である。また、既存の RCA 反応とも原理的に大きく異なり、反応サイクルの中で反応生成物から「プライマー」を次々に生成し、指数関数的に蓄積していく。

複数の立証実験により、当核酸増幅反応が反応機構通りに進むことを確認した。また、最適化した反応条件において、試料 DNA (19 塩基、合成オリゴ) の定量可能な濃度範囲は約 8 桁に及び、84.5 ymol (50.7 分子) の検出限界を得ることに成功した。これは、リアルタイム PCR 法に匹敵する定量可能範囲・検出限界を得たことを示している。さらに、生体試料でも同様に検出できることを確認するため、病原性リステリア菌に特異的な病原遺伝子 *hly* を検出対象とし反応系を構築した。病原性リステリア菌由来のゲノム DNA を用いて PG-RCA 反応を行ったところ、検出限界 0.163 pg (約 60 分子) の感度で検出に成功した。また、病原遺伝子 *hly* もしくは類似配列を持たない、非病原性リステリア菌、サルモネラ菌、大腸菌由来のゲノム DNA には反応せず、26 塩基と非常に短い塩基配列を標的しているにも関わらず、非常に高い特異性を有することを確認できた。

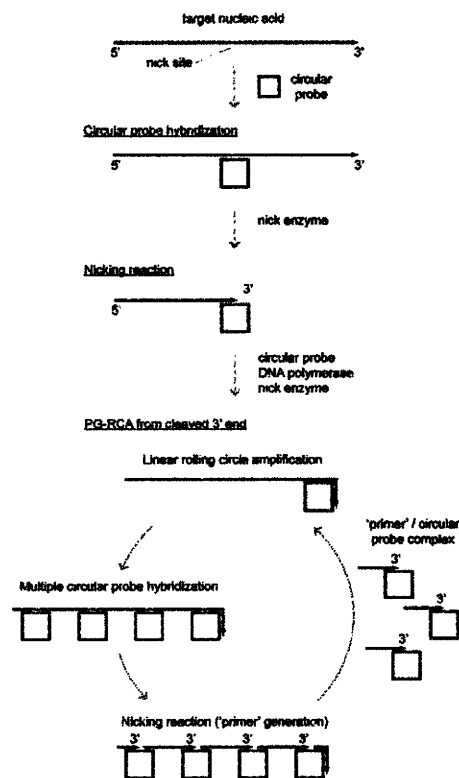


Figure 1. PG-RCA の反応機構

本章の結果により、新規に考案した定温核酸増幅反応 PG-RCA が反応機構通りに機能し、PCR に匹敵する感度、特異性にて、DNA 塩基配列を検出できることが確認された。

### 第 3 章 RNA 検出への応用

本章では、PG-RCA を RNA 配列の検出へ応用することを検討した (4)。PG-RCA により RNA の特定塩基配列を検出するためには、1. ニック酵素により RNA・DNA の 2 本鎖 (試料 RNA・環状 DNA プロブ複合体) を認識し、RNA 鎖を切断、2. DNA 合成酵素により切断断片 (RNA) の 3' 末端から LRCA 反応を開始する必要がある (Figure 1)。しかし、第 2 章で使用したニック酵素 *Nb.BsmI*、*Vent(exo-)* DNA 合成酵素のいずれも、DNA を基質とした際と比較し RNA に対して各々約 0.13%、約 0.00094% と大幅に反応効率が劣ることが確認された。そこで、RNA 鎖切断のために耐熱性 RNaseH を反応液に添加し、RNA 断片からの LRCA 反応開始のために *Bst* DNA 合成酵素を使用することにより、両反応過程を高効率化することを試みた。最終的に、これらの酵素を用いて最適化した反応条件において、検出限界 25.3 zmol の感度で RNA 検出が行えることを確認できた。本章の結果により、PG-RCA の反応機構を用いて RNA 配列検出に応用できることを示すことができた。

#### 第4章 3-way junction プローブを用いた遺伝子配列検出法

前章の反応系では検出する遺伝子配列毎に相補的な環状 DNA プローブを用意する必要があり、環状 DNA プローブの塩基配列の違いにより PG-RCA の反応速度が異なる可能性が生じ、複数遺伝子を同じマイクロプレート上で同時に反応を行うことを想定すると、複数遺伝子間での比較解析が困難になると予想される。本章では、この問題を解決するため、複数遺伝子を同じ環状 DNA プローブを用いて検出できる遺伝子解析法の構築を目的とした。

異なる遺伝子配列を同じ環状 DNA プローブを用いて検出するためには、各遺伝子配列を認識し同じ反応効率にて PG-RCA の反応サイクルを開始する機構が必要となる。そこで、3-way junction (3WJ) プローブと呼ぶ DNA プローブ技術を考案した (Figure 2)。3WJ プローブは 3WJ テンプレートと 3WJ プライマーから構成され、互いに相補的な塩基配列は 6 ~ 8 塩基程度と非常に短く設計してあるために反応温度 60°C においてプローブ同士では相互作用をしない。しかし、検出対象の遺伝子配列が存在すると、プローブ同士が近接して相補鎖形成することにより 3WJ プローブ・遺伝子配列からなる 3WJ 構造を形成する。この 3WJ 構造は、PG-RCA 反応条件下において、19 塩基の 1 本鎖 DNA (シグナルプライマー) を連続的に合成できるよう設計されている。このシグナルプライマー生成反応は 1 次直線的増幅反応であり増幅効率は低いものの、同じ反応液において PG-RCA により生成シグナルプライマーを高感度に検出することが可能である。このように、3WJ プローブを介することにより、特定の遺伝子配列から PG-RCA の反応サイクルを開始し、高感度に検出することが可能となる。また、異なる遺伝子配列に対して各々 3WJ プローブを用意することで、同じ環状 DNA プローブを用いて PG-RCA 解析を行うことができる。

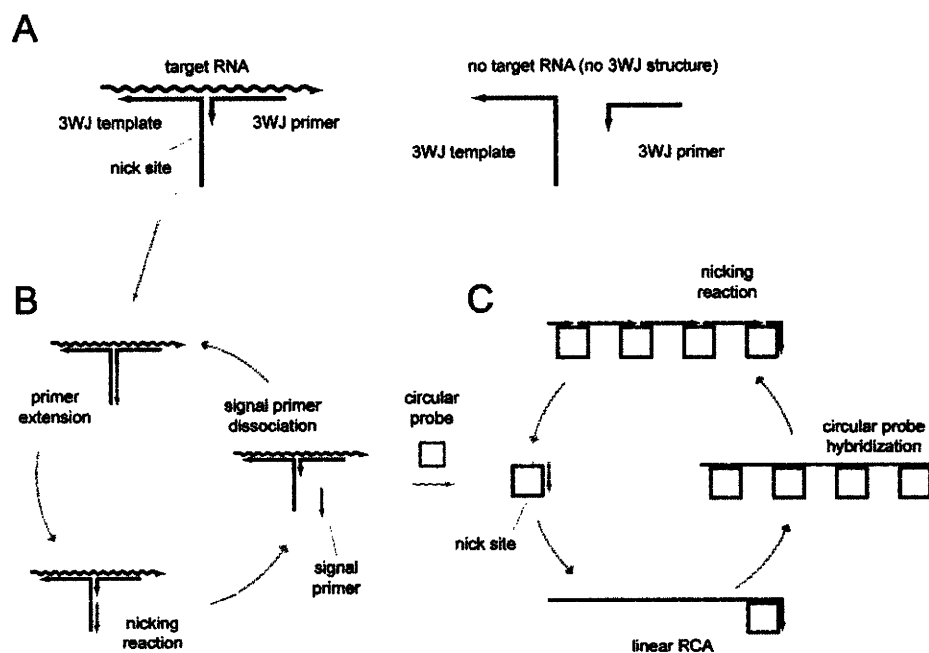


Figure 2. 3WJ プローブを利用した RNA 検出機構

本章では、Human CD4 遺伝子を検出対象として 3WJ プローブの設計を行い、3WJ プローブを介した遺伝子検出系を構築した。3WJ テンプレートのプライマー非依存性相補鎖合成を原因とするバックグランド増幅の存在を確認し、様々な修飾を 3WJ テンプレートに施すことにより効果的にバックグランド増幅を抑制することができ、遺伝子配列の検出感度を向上できることを示した。最終的に、設計最適化した 3WJ プローブを用いて、15.9 zmol ( $9.6 \times 10^3$  分子) の検出感度にて Human CD4 遺伝子配列を含んだ RNA 配列を検出することに成功した。

## 第 5 章 総括

本研究では、新規な定温核酸増幅反応 Primer generation-rolling circle amplification (PG-RCA) を考案、開発した。当核酸増幅法は、DNA 配列及び RNA 配列の特異的かつ高感度検出に利用することが可能である。当反応は、環状 DNA プローブと DNA 合成酵素・ニック酵素を利用し、一定温度下にて反応生成物を指数関数的に増幅するため、サーマルサイクラーのような特別な装置を必要とせず、反応の小容量化や高スループット化などが容易に行える。環状 DNA プローブの設計は非常に容易であるため、様々な診断技術開発に利用しやすい。また、本研究では 3WJ プローブと呼ぶ DNA プローブ技術も開発し、DNA・RNA に関わらず特定の遺伝子配列を特異的に認識し、PG-RCA 反応により定量的に検出できることを確認した。異なる遺伝子配列に対して各々 3WJ プローブを設計することにより、共通した PG-RCA 反応液を用いて同じプラットフォームで検出することが可能となった。

## 引用文献

1. Murakami, T. and Mitsuhashi, M. (2003) *Microarrays & Microplates: Chapter 6.*
2. Matsuda, K., Tomozawa, S., Fukusho, S., Yoshino, T., Murakami, T. and Mitsuhashi, M. (2002) *BioTechniques*, **32**, 1014-1016, 1018, 1020.
3. Murakami, T., Sumaoka, J. and Komiyama, M. (2009) *Nucl. Acids Res.*, **37**, e19
4. Murakami, T., Sumaoka, J. and Komiyama, M. *Epicentre Forum Newsletter* (Submitted)