

審査の結果の要旨

氏名 村上 卓

医療の個人化が叫ばれる中、次世代型分子診断技術がこれまでになく重要となってきた。求められている次世代型分子診断とは、自動化対応、高スループットでかつ定量性のある診断技術である。遺伝子発現解析において標準的な技術であるリアルタイム Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法は、感度、定量性ともに非常に優れた技術である。しかし、次に述べるような問題点も残っており、さらなる改善が求められている。まず、Reverse transcription は一定温度での反応、PCR は温度サイクルを繰り返す反応であるため、両反応を同時に行うことはできない。RT 反応後、試料を希釈し PCR 反応を行うといった 2 段階反応を行う必要があるが、希釈の際に試料間でのコンタミネーションの危険性が生じたり、作業時間が長くなるなど、診断プロトコルとしては改善の余地が残る。また、PCR は増幅反応において正確な温度サイクル制御が必要である。従来 of ヒートブロックを利用したサーマルサイクラーなどでは 384・1536 ウェルのマイクロプレートなどウェルが小さくなるにつれて、ヒートブロックとの接触面積が少なくなり、逆に非接触面積（エアギャップ）が大きくなるため、効率的な熱伝導が困難となる。このため、384 ウェルを超える高スループット化はほとんど進んでいないのが実状である。

こうした既存の核酸増幅技術の欠点を踏まえ、本論文では 1 段階反応かつ一定温度で遺伝子配列を定量することを可能とする新規な核酸増幅法を提案し、反応系の構築に成功している。前半部分では、Primer generation rolling circle amplification (PG-RCA) と呼ぶ、環状 DNA プローブ・DNA 合成酵素・ニック酵素を用いた核酸増幅反応を提案し、DNA や RNA 配列検出の実証を行なっている。後半部分では、3-way junction (3WJ) プローブと呼ぶ DNA プローブを利用することにより、PG-RCA による検出の反応特異性や応用可能性をさらに高めることを試みている。

第 1 章は、序論であり、次世代型分子診断として求められている技術的な背景、既存の遺伝子配列定量法の問題点について、説明を行っている。

第 2 章では、環状 DNA プローブ・DNA 合成酵素・ニック酵素を用いた定温核酸増幅反応 PG-RCA の反応原理を構築することを検討している。当反応は、DNA 配列を特異的に認識し、一定温度にて指数関数的にシグナル増幅を行うことができるように設計を行っている。実際に実証

実験を進める中で設計した反応機構からは全く予測できないようなバックグランド増幅を確認しており、その原因を追究し、プローブ設計・反応条件の最適化を進めている。

第 3 章では、当反応を RNA 配列の検出へと応用することを目的とし、DNA 合成酵素・ニック酵素の RNA に対する基質特異性の影響を検討し、RNA 配列検出の可能性を追求している。特に、ニック酵素は 2 本鎖 DNA に特異的な酵素と知られており、RNA に対する活性に関して過去の知見はほとんど存在せず、当核酸増幅反応を用いることにより検討をおこなっている。

第 4 章では、3WJ プローブと呼ぶ DNA プローブ技術を導入し、PG-RCA を用いた RNA 配列の検出へと応用することを目的としている。前章で検討した知見をもとに、プローブ設計・反応設計をより簡便に、かつ応用可能性を広げることを念頭におき検討を行っている。第 2 章で確認したバックグランド増幅とは異なる、再び反応機構から予測できなかったバックグランド増幅を確認し、その原因を追究し、3WJ プローブ設計の最適化を進めている。

第 5 章では、最後に本研究の総括を行っており、本研究の将来性について検討をしている。

以上のように本研究は、将来の分子診断技術に多大な影響を与えられ、新規な遺伝子配列検出系の構築を行っている。得られた技術は、1 段階反応かつ一定温度で遺伝子配列を定量することができるという特徴を備えている。このことから、この成果はバイオテクノロジー、分子生物学、分子診断分野など幅広い分野の進展に寄与するところ大である。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。