

等温遺伝子増幅法による遺伝子の一塩基置換判別法 開発

道行, 悟

<https://hdl.handle.net/2324/4475200>

出版情報：九州大学, 2020, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：



氏 名 : 道行 悟

論文題名 : 等温遺伝子増幅法による遺伝子の一塩基置換判別法開発

Development of single nucleotide discrimination method using isothermal nucleic acid amplification.

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は安価・簡便かつ高精度な一塩基置換判別法を開発することを目的とし、等温核酸増幅法である Loop mediated isothermal amplification (LAMP) 法を応用した技術開発を行ったものである。

広く一般的に普及している核酸増幅法である PCR 法と比較して LAMP 法は等温 (65℃ 付近) で増幅が可能であることに特徴を有しており、安価な装置で実施できること、操作が簡便であることを利点としている。現在までに臨床応用として、主に、病原性の真菌、細菌、ウイルスを検出する体外診断薬に利用されている。一方で、LAMP 法を用いた一塩基置換判別法の研究例は少なく、これまでにインナープライマーの 3'末端あるいは 5'末端に検出対象塩基が配置される設計によって SNP あるいは SNV の判別を増幅の有無によって検出する技術は報告されているが、プライマーのミスマッチアニーリングによって非特異的増幅反応が起きやすく、偽陽性が生じるリスクが課題とされていた。LAMP 法を用いたより精度の高い一塩基置換判別法を開発することができれば、病原性微生物の薬剤耐性検出やがん分子標的薬の治療効果予測などの検査に応用でき、安価かつ簡便という特徴を活かして、検査にかかるコスト低減やポイントオブケア検査の実現につながることを期待される。

従来法の課題を解決するため、プライマーのアニーリング配列に検出対象塩基を配置しない 3つの異なる手法について検討を実施した。まず、第一の手法では、人工核酸 Bridged Nucleic Acid (BNA)を用いたブロックオリゴヌクレオチドによる LAMP-Clamp 法について評価検討を行った。本手法は BNA-DNA ハイブリッドが DNA-DNA ハイブリッドよりも高い安定性を有することから、LAMP 法で用いる *Bacillus stearothermophilus* 由来 DNA Polymerase の伸長反応を効果的に阻害できるのではないかと考え、非対象塩基と完全マッチする BNA 含有 Clamp oligomer を LAMP 反応液に添加し、対象塩基の選択的増幅が可能か検証した。その結果、サンプル中に含まれる 1% の置換配列を選択的に増幅可能であることを見出し、がん関連遺伝子変異の検査など検体中に含まれる変異配列の比率が低いことが想定されるような検査に有用と考えられた。しかしながら、非対象塩基由来の増幅産物も僅かながら同時に得られることから、偽陽性の低減については課題が残った。そこで、第二の手法では、検出工程に BodipyFL®によって蛍光修飾された一塩基置換判別領域 (検出部位) と対象遺伝子領域とハイブリダイズする領域 (保持部位) をリンカー配列で介した蛍光プローブを用いた方法を検討した。本手法は検出部位の配列数を制限することによって一塩基の差を顕著にし、ハイブリダイズの特異性を向上させることで偽陽性の低減が実現されるものと期待し実施した。本蛍光プローブを LAMP 反応液に添加し、反応後ハイブリダイゼーションアッセイを実施した結果、対象塩基を有する配列の存在下でのみハイブリダイゼーションによる蛍光値の変動が観測されたことから、非特異的反応のない精度の高い一塩基置換判別が可能であることを示した。さらに、第三の手法として、第一の手法と第二の手法を組み合わせることで検体中の低頻度配列を簡

便かつ高い精度で検出する方法の開発を行った。本手法では完全マッチするアレルタイプがそれぞれ異なる **BodipyFL®**プローブと競合するオリゴヌクレオチド（競合オリゴ）を反応系に添加することによって、目的とする塩基においてのみハイブリダイズする反応系の構築を試みた。検討の結果、第二の方法と同様に非特異的反応を抑え、対象塩基を検出可能であることが判明した。さらに、この方法の有用性を評価するため、**Haptoglobin** プロモーター領域の **SNP rs5472** について唾液から抽出したゲノム DNA を検体としてアレルタイプを判別する臨床研究を実施し、ダイレクトシーケンスによる判明した塩基配列結果と完全一致（N=36）することを確認した。また、病原微生物の薬剤耐性検出モデルとして結核菌薬剤耐性関連遺伝子である **rpoB Asp516Val** について本法の検出性能評価を行い、検体中 5%の変異検出が可能であることを確認した。

以上のように本論文では **LAMP** 法を応用した一塩基置換判別法について、これまで解決されなかった課題を解決する 3つの手法を提案し、その有効性を示している。さらに、臨床研究の結果、ヒトゲノム DNA を対象に精度の高い **SNP** タイピングが可能であることを示し、さらに検体中に低頻度で起こる突然変異の検出への適用可能性も示している。これらのことから本論文は幅広い遺伝子検査の分野において、等温遺伝子増幅法による遺伝子の一塩基置換判別法は、従来法と比較して、より簡便・安価に実施される検査手法であることを示したものである。