

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 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			
論文調査委員	主 査	九州大学	准教授	田代 康介
	副 査	九州大学	教授	古屋 茂樹
	副 査	九州大学	教授	片倉 喜範

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、等温遺伝子増幅（Loop mediated isothermal amplification、LAMP）法における一塩基置換判別手法を確立したものである。広く普及している核酸増幅法である PCR 法と比較して、LAMP 法は等温で増幅が可能であることから、安価な装置で実施でき操作が簡便であることを利点としている。現在、臨床応用としては、病原性の微生物やウイルスを検出する体外診断法として利用されている。一方、LAMP 法の核酸増幅反応では、プライマーのミスマッチアニーリングによる非特異的増幅反応が起きやすく、高精度な一塩基置換判別は困難である。そこで、本研究では、一塩基置換判別のための手法として、人工核酸 Bridged Nucleic Acid (BNA)を用いた増幅反応阻害手法やリンカー付加型オリゴ DNA を用いた検出手法などを考案し、詳細な検討を行っている。

まず、LAMP 法で用いる *Bacillus stearothermophilus* 由来 DNA Polymerase の伸長反応を配列特異的に阻害するブロックオリゴヌクレオチドとして BNA を導入した Clamp oligomer を用いた LAMP-Clamp 法を検討している。その結果、LAMP-Clamp 法は一塩基置換した配列の増幅が可能で高感度の検出手法であることを示している。しかし、非特異的な増幅反応による特異性の低下が起こることを見出し、これは増幅反応制御の困難さに起因すると考察している。次に、増幅反応後に一塩基置換を判別する手法として、一塩基置換した配列に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの検討を行い、対象遺伝子領域を限定するオリゴ配列（保持配列）と一塩基置換検出を行うオリゴ配列（検出配列）をリンカー配列で連結したリンカー付加型オリゴ DNA によって、一塩基置換した配列の特異的な検出が可能であることを見出している。また、ハイブリダイゼーションによって消光する蛍光色素 BODIPY FL でオリゴ DNA 末端を標識することによって簡便な検出が可能であることを見出している。さらに、ハイブリダイゼーション反応時に競合オリゴヌクレオチドの添加により特異性と感度が大幅に増加することを示し、LAMP 法における一塩基置換判別手法として提案している。

次いで、LAMP 法と検討した一塩基置換判別手法を組み合わせ、ヒト遺伝子診断および病原微生物の変異解析を行っている。ヒト Haptoglobin 遺伝子プロモーター領域の SNP rs5472 について被験者の唾液から抽出したゲノム DNA を用いて本提案手法によってアレルタイプ判別を実施し、判別結果は、遺伝子塩基配列決定結果と完全一致（N=36）であることを示している。さらに、病原微生物の変異検出として結核菌薬剤耐性関連遺伝子である *rpoB* 遺伝子の Asp516Val 変異検出について評価を行い、検体中 5%の変異検出が可能であることを示している。

以上要するに、本研究は、LAMP 法に応用可能な新規一塩基置換判別法を確立し、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、病原微生物において出現する突然変

異の高感度検出への適用が可能であることを示したものである。これらの成果は、ヒトをはじめ動植物の SNP 解析および微生物やウイルス遺伝子の変異解析に威力を発揮するものであり、分子生物学および遺伝子工学技術の応用発展に寄与する価値ある業績と認める。

よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。