

DNA型鑑定技術の分析と有用なDNAポリメラーゼの探索に基づくPCR技術開発に関する研究

興梠, 聖哉

<https://hdl.handle.net/2324/7329539>

出版情報 : Kyushu University, 2024, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)



氏 名 : 興梠 聖哉

論文題名 : DNA 型鑑定技術の分析と有用な DNA ポリメラーゼの探索に基づく PCR 技術
開発に関する研究

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、DNA 鑑定法の精度向上を目指した研究をまとめたものである。刑事事件における客観的証拠が重要視される中で、DNA 鑑定の果たす役割が大きくなっており、個人識別上の有用性から犯罪の立証に不可欠な手段となっている。現在警察における犯罪捜査で実際に用いられている方法は、ヒトゲノム上に存在する数塩基の繰り返し配列 (Short Tandem Repeat (STR)) の繰り返し回数に個人差があることを利用した STR 型分析であり、その高い識別精度から日本のみならず世界における基本手法となっている。しかし、分析試料の状態によって判定が困難であり、DNA が分解している試料や微量な試料並びに複数人の DNA が混合した試料については、判定が困難な場合が多く、その解決策が求められている。

第 1 章では、DNA 鑑定法の誕生から現在までの経過を分析し、現在警察で日常的に利用されている STR の繰り返し回数を調べる STR 型検査における問題点を分析した結果、未だ解決すべき課題があり、本来の遺伝子配列よりも 1 反復単位分長短が生じるスタターと呼ばれる現象が判定結果の信頼性に影響を及ぼすことを指摘した。特に問題となるのが、微量・混合試料を検査する場合に、検出される低いピークが本物のアレルピークなのか、スタターであるのかの判別が困難となるのである。スタターは PCR による増幅中に新生鎖と鋳型鎖の誤対合が起きることにより生ずる副産物であるので、この問題の解決にはスタターが発生しない DNA 増幅反応系の構築が必要であると指摘した。

第 2 章では、実際に法医学的 STR 型判定に使用されている遺伝子座のうち、異なる反復配列特性を持つ D18S51、D2S1338 および D22S1045 を PCR の増幅材料とし、PCR における重要な要素である DNA ポリメラーゼに着目して、用いる酵素によってスタターの起こり方を比較した。スタター発生に関連するポリメラーゼの特性として、連続伸長性の違い、鎖置換活性の有無、校正機能の有無、温度特性などが考えられる。本研究では、現在市販されている PCR 酵素に加えて、自身で調製した超好熱性アーキア由来の DNA ポリメラーゼも使用した。すなわち、現行法で用いられている Taq DNA ポリメラーゼの代わりに、他の特性を有する DNA ポリメラーゼを用いて DNA 増幅反応系を改変し、それがスタターの発生に与える影響を調べた。特に、校正能力を持つ DNA ポリメラーゼが、それを持たない Taq DNA ポリメラーゼと比較してスタター産物の生成度合いにどのような違いがあるか詳細に分析した。さらに 3 種の超好熱性アーキア、*Methanopyrus kandleri*、*Pyrodictium occultum*、*Aeropyrum pernix* 由来のファミリー B 型 DNA ポリメラーゼを調製し、その PCR パフォーマンスを比較分析した。その結果、PCR 増幅に使用する酵素の種類および PCR 条件の違いによってスタターの発生率が影響を受けることを実験によって明らかにした。現在 STR 分析用の市販キットに用いられている Taq DNA ポリメラーゼに加えて、超好熱性アーキア由来のファミリー B 型 DNA ポリメラーゼも STR 解析に利用でき、それらの特性から Taq DNA ポリメラーゼを用いる場合よりも操作プロトコルを簡略化できる有利な点も指摘した。そして、これらの実験結果を要約し、どのような試料にとっても最適な酵素という決定的なものは現時点において無く、

各酵素の独自の特性によって、個々の STR 増幅時に特定の酵素の反応条件を最適化することがスター発生を最小限に抑える最良の戦略であることを結論として述べている。