

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 梶 聖 哉			
論 文 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			
論文調査委員	主 査	九州大学	准教授	沼田倫征
	副 査	九州大学	教授	角田佳充
	副 査	九州大学	教授	松岡 健
	副 査	九州大学	名誉教授	石野良純

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、DNA 型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 型鑑定は犯罪の立証に不可欠な手段となっている。現在、警察において犯罪捜査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が連なった領域を利用するものである。この DNA 領域は **Short Tandem Repeat (STR)** と呼ばれる。現在用いられている DNA 型鑑定は、この繰り返し回数に個人差があることを利用して STR の長さを指標に個人を特定するものである。STR 型分析は、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、試料からの DNA 採取量の過少や分解、また、複数人の DNA が混合した試料については判定が困難となり、さらに改良や新技術の開発が求められている。

本論文の第 1 章では、DNA 型鑑定法の誕生から現在までの経過を調査して、現在、警察の科学捜査研究所において日常的に利用されている STR 型検査における問題点を分析した。その結果、解決すべき問題点の一つとして、本来の遺伝子配列よりも 1 反復単位分の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、解決すべき課題を導き出した。スタターが特に問題となるのが、複数人の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ことである。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と推定されるので、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、DNA 増幅反応において重要な要素である DNA ポリメラーゼに着目し、様々な DNA ポリメラーゼの至適反応条件を調べた。また、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 を分析対象として選定し、これら DNA ポリメラーゼの DNA 型鑑定への利用可能性を検討した。DNA 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、ターミナルトランスフェラーゼ活性の有無などがあるが、本研究では、標準的に用いられている PCR 酵素に加えて、商品化されていないものや PCR への応用が報告されていない酵素を含む超好熱性アーキア由来の DNA ポリメラーゼを使用した。まず、これらの酵素を用いて PCR の反応条件を検討した。特に 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 ポリメラーゼについては PCR への利用に関する情報が少なく、詳細に反応条件の最適化を行なった。得られた条件を参考に、DNA 採取から STR 増幅、アレル検出までの

操作を、実際に科学捜査研究所で行われている標準の手順を用いて行った。8種の DNA ポリメラーゼで増幅条件の検討を行ない、得られたピーク検出結果を詳細に分析した。その結果、用いた全ての酵素で基本的な目的のアレルピークが検出され、これらの酵素が DNA 型鑑定へ適用できることを示した。また、使用する酵素の種類とその反応条件の違いがスタターの発生に影響することを示した。スタター発生率を詳細に調べたところ、アーキアのファミリーB 型酵素の中で PfuPol が TaqPol およびその関連酵素と同等の結果を示し、しかもターミナルトランスフェラーゼ活性による1ヌクレオチド付加反応が起きないことから、DNA 型鑑定における PfuPol の優位性も示した。他のファミリーB 型酵素は、本研究で行なった条件下ではスタター出現率は上昇していたが、反応条件によってはより良くなる可能性を含み、さらに耐塩性が高いなど各酵素の特徴を活かすことによる新たな実験法の開発に繋がることも指摘した。

以上要するに、本論文は多種の DNA ポリメラーゼを用いて、実際に犯罪捜査の現場で利用されている遺伝子座を用いて STR 型判定を行い、その結果を分析したもので、現行法よりも精度の高い DNA 型鑑定のための優れた試薬・キット開発のための基盤情報を提供するものであり、分子生物学および遺伝子工学の進歩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と認める。