

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	向井 博之
題 目	<p style="text-align: center;">Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids (ICAN 法) の開発と応用</p> <p style="text-align: center;">(The development and applications of ICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids))</p>
<p>シンプルな反応組成で等温核酸増幅法を構築できないか模索した結果、独自の増幅法 (ICAN 法) を考案するに至った。5'-DNA-RNA-3'キメラプライマーペア、耐熱性 RNaseH、そして強い鎖置換活性を有する耐熱性 DNA 合成酵素が ICAN 法の必須の構成成分であることを示した。そして、両酵素が十分な活性を有する 55°C 近辺の等温の下で、プラスミド、細菌ゲノム、ヒトゲノム、植物由来の cDNA/RNA ハイブリッドを鋳型として、プライマーに挟まれた約 100 bp の領域を特異的に増幅することができた。</p> <p>当初 ICAN 法のアイデアを思いついた時には、DNA の増幅は nick and run' 反復のメカニズムで起こっていると考えていた。このシナリオでは、RNaseH は伸長する鎖の 5'-RNA/DNA-3' のジャンクション部分にニックを入れることにより、常に同じ RNA 末端からプライミングが起こり、反応を通じて RNA 部分は分解されることなく新しい DNA が合成されることになる。増幅産物はプライマー配列を持たないはずである。しかし、増幅産物を解析したところ 3 種類の異なるバンドが認められ、プライマー配列を全く持たない最も短い断片の他に、両プライマー配列を含む最もサイズの大きい断片と、片方のプライマー配列のみを含む中間の大きさの断片が生じていることが明らかになった。これによって、ICAN 反応においては、'nick and run' 反復のメカニズムとは異なるメカニズムが存在することが示唆された。耐熱性 RNaseH によるキメラプライマーからの伸長鎖の切断位置を調べたところ、当初予想していた 5'-RNA/DNA-3' ではなく、5'-DNA/RNA-3' のジャンクション部分が切断されていることが判った。最終的に著者らは、ICAN 反応においては、マルチプライミングと鋳型交換反応の 2 種類のメカニズムが作用していることを見出した。</p> <p>サイクリングプローブを DNA 増幅系に加えると、増幅断片の増加に応じて蛍光強度が増すので、リアルタイムで増幅の様子をモニターすることができる。サイクリングプローブと ICAN 法との組み合わせ (Cyclecleave ICAN) は特に有効である。Cyclecleave ICAN は、高い特異性が要求される SNP 検出にも応用可能であると考えられたことから、これを用いて、ヒトヒト口腔粘膜から調製した DNA を鋳型にした ALDH2 遺伝子の SNP タイピングを行った。その結果、2 種類の蛍光プローブを用いてリアルタイム、またはエンドポイントでのアッセイ、および、1 種類の蛍光プローブを用いて安価なトランスイルミネーターでの検出を行ったいずれの場合においても、Glu(GAA)/Glu(GAA) (wild/wild) と Glu(GAA)/Lys(AAA) (wild/mutant) 間の遺伝子型を区別できることが分かった。</p>	

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Hiroyuki Mukai
題 目	The development and applications of ICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids (ICAN 法) の開発と応用)
<p>After searching for a method of isothermally amplifying DNA in a simple reaction mixture, we finally developed our own method (ICAN). We demonstrated that a pair of chimeric primers, thermostable RNaseH, and thermostable <i>Bca</i>BEST DNA polymerase, or more generally, strand-displacing activity of the polymerase, was essential for ICAN. About 100 bp fragments between both primers could be amplified specifically at 55°C with a plasmid, bacteria genomic DNA, human genomic DNA and cDNA/RNA hybrid derived from plants as a template.</p> <p>It was first assumed that DNA was amplified by the mechanism of “nick-and-run” repetition in ICAN. In this scenario, RNaseH introduces a nick at the 5'-RNA/DNA-3' junction of an elongated strand, keeping the incorporated RNA residues “intact” throughout the reaction and ensuring constant priming from the same residue. Suppose that DNA is amplified based on “nick-and-run” repetition in ICAN, most of the amplified fragment should not have primer sequences, but sequence analysis of subcloned amplified fragments revealed that the three distinct bands consist of three fragments: one (large) with both primer sequences (forward and reverse), another (middle) with only one (either forward or reverse) primer sequence, and the other (small) with no primer sequence. This discrepancy suggests that a different amplification mechanism other than “nick-and-run” repetition exists in ICAN. We investigated the cleavage mode by thermostable RNaseH of the RNA portion in the ICAN reaction and found that RNaseH did not always cleave between the 5'-RNA and DNA-3' junction in the ICAN reaction. Finally, we elucidated the mechanism of ICAN and found that two mechanisms, which we call multi-priming and template-switching, underlie ICAN.</p> <p>When a cycling probe is added to the ICAN reaction mixture, it emits a fluorescent signal that intensifies as the amount of amplified fragment increases and DNA amplification can be monitored in real time by measuring the intensity of the signal. The combination of a cycling probe and ICAN (Cycleave ICAN) is especially useful. The Cycleave ICAN can be also used to strictly distinguish SNPs (single nucleotide polymorphisms) in amplified fragments. We typed ALDH2 by ICAN with DNA extracted from oral mucosa. SNP typing by Cycleave ICAN could be performed in a short time without thermal cycling, and also without an expensive fluorescence detector by using only one type of dye in the cycling probe, the same as a real-time assay and end-point assay with two cycling probes labeled with different fluorescence. All assays could distinguish the genotype of Glu(GAA)/Glu(GAA)(wild/wild) from that of Glu(GAA)/Lys(AAA)(wild/mutant).</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	向井 博之
審査委員	主査 鹿児島大学 客員教授 加藤 郁之進
	副査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一
	副査 鹿児島大学 客員教授 浅田 起代蔵
	副査 鹿児島大学 客員准教授 小山 信人
審査協力者	
題目	<p>Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids (ICAN 法) の開発と応用 (The development and applications of ICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids))</p>
<p>PCR 法が発明されて以降、種々の等温核酸増幅法が開発されているが、反応組成およびその反応産物を PCR 法と比べると複雑であり応用に際し制限が懸念されるものであった。本研究により、シンプルな反応組成で PCR 法と同様にプライマーに挟まれた領域が増幅される等温核酸増幅法である ICAN 法を開発すると同時に、そのメカニズムを明らかにし種々アプリケーションに応用可能なことを示した。本研究で得られた結果の骨子は以下の通りである。</p> <p>本研究ではまず、5'-DNA-RNA-3'キメラプライマーペア、耐熱性 RNaseH、そして強い鎖置換活性を有する耐熱性 DNA 合成酵素を用いることにより、両酵素が十分な活性を有する 55°C 近辺の等温の下で、プラスミド、細菌ゲノム、ヒトゲノム、植物由来の cDNA/RNA ハイブリッドと配列の複雑さが異なる 4 種類の核酸を鋳型として、プライマーに挟まれた約 100 bp の領域を特異的に増幅することに成功した。</p> <p>次に、その増幅メカニズムを解明するために耐熱性 RNaseH によるキメラプライマーからの伸長鎖の切断位置を調べたところ、5'-DNA/RNA-3'のジャンクション部分が切断されていることが明らかになった。この結果を基にさらに解析を進め、ICAN 反応においては、同じ</p>	

鋳型上で複数のプライマーが同時に働く「マルチプライミング」と1回の伸長反応の過程で鋳型を元の鎖からもう一方のプライマーからの伸長鎖にある頻度で乗り換える「鋳型交換反応」の2種類のメカニズムが作用していることを見出した。

ICAN法の応用として、RNA部分を挟んで一方が蛍光物質で、もう一方がその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質（クエンチャー）で標識されているDNA-RNA-DNAキメラプローブであるサイクリングプローブとの組み合わせ（Cycleave ICAN）により、温度変化を必要としない短時間の反応で、かつ高価な蛍光検出器も必要としないSNPタイピングが可能であることを示すことができた。本研究により、Cycleave ICAN法はオンサイトでのヒトSNPタイピングへの応用の可能性が大いに期待できることが示唆された。

その他のICAN法の応用例として、次の3つの事例を示した。

- ・カンキツグリーニング病の病原細菌様微生物である *Candidatus Liberibacter asiaticus* の検出系を構築しその有用性を調べた結果、再現性、感度においても通常のPCR法と比べて同等以上の性能を示すものであった。

- ・結核菌の検出試薬を構築しその性能試験を行った結果、検出感度、再現性および特異性などの性能試験において、ロシュ社のPCR法検査と比較しても同等以上の結果を示した。

- ・*Chlamidia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae* 同時検出の系を構築し検討した結果、特異性は非常に高かった。また、検出感度は *C.trachomatis* の場合 100 コピー/測定であり、臨床検体におけるPCR法との相関も 100%一致し、検出感度は十分であると考えられた。また、*N.gonorrhoeae* の検出感度も 10 コピーと高感度であった。

ICAN法は単位容量当たりのDNA増幅量がPCR法と比較して通常5倍以上多いだけでなく、等温核酸増幅反応であるので、反応条件を変更することなく反応容量を増加させ、容量に比例して増幅産物の収量を増加させることが容易に行えることが分かった。これまでの検討で、50 μ l ~ 5 ml の間の反応容量で、反応条件を変更することなく単位容量当たりの収量がほぼ同じであることを確認している。一方PCR法の場合、厳密な温度サイクリングが必要であるので、反応容量を 50 μ l から 5 ml に 100 倍増加させて、同じく 100 倍の増幅産物の収量を期待するのは非常に困難なことであろうと推測する。

以上のように、本論文でまとめたICAN法の研究は、PCR法やその他の方法が持たない特徴を有する等温核酸増幅方法を提供するものであり、オンサイトでの一塩基多型解析やDNA検出解析に大きく貢献することが期待できるものである。また、ICAN法による大量の増幅産物取得は、新しいDNAインダストリーの分野に道を開くものである。したがって、審査委員一同は、本論文について博士（学術）の学位論文として十分な価値を持つと判定した。

学力確認結果の要旨	
学位申請者 氏名	向井 博之
審査委員	主査 鹿児島 大学 客員教授 加藤 郁之進
	副査 鹿児島 大学 教授 杉元 康志
	副査 佐賀 大学 教授 渡邊 啓一
	副査 鹿児島 大学 客員教授 浅田 起代蔵
	副査 鹿児島 大学 客員准教授 小山 信人
審査協力者	
実施年月日	平成20年12月26日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input type="radio"/> 口答・<input checked="" type="radio"/> 筆答	
<p>主査および副査は、平成20年12月26日の公開審査会において学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について諮問を行った。具体的には別紙のような質疑がなされ、いずれも満足できる回答を得ることが出来た。</p> <p>また、筆記により、外国語(英語)の学力を確認した。</p> <p>その結果、審査委員会は、申請者が大学院連合農学研究科博士課程修了者と同等以上の学力および識見を有するもと認め、農学の分野だけでなく広く自然科学の分野に貢献する研究成果を提供したことにより、博士(学術)の学位を与えるに十分な資格を持つものと認めた。</p>	

学位申請者
氏 名

向井 博之

[質問 1] マルチプライミングの時に、もともと貼り付いていたプライマーはまだ貼り付いたままと考えられるが、そこにどのようなメカニズムで新しいプライマーが入り込むのか。

[回答 1] 実際のメカニズムについては解らないが、PCR では熱変性を行って一本鎖に解離させてプライマーをアニーリングさせるのに対して、ICAN 反応を行う場合は、鋳型が二本鎖でも熱変性せずに反応がスタートする。ICAN 反応ではキメラプライマーを使用するので、鋳型が二本鎖でも反応温度が 50℃から 60℃ということで、平衡関係でくっついたり離れたりしている。さらに、遊離のプライマーがモル数として十分反応系には存在する。従って、プライマーが二本鎖の鋳型入り込む機会も存在しているのではないだろうか。

[質問 2] ニックが入ることによってもともとあったプライマーがはがれやすいのでは。

[回答 2] その可能性もあるかもしれないが、ニックが入ることによって、そのプライマー部分がテンプレートからはずれて全く違う場所にあるわけではなく、ニックが入るも、そこからディスプレイメント反応はそのまま阻害されずに反応している。ニックが入ることにより、マルチプライミングが起こり易くなっていることは確かである。

[質問 3] Template switching のところであるが、鎖置換型の DNA ポリメラーゼは色々あり、たとえば RCA のように $\Phi 29$ の鎖置換型 DNA ポリメラーゼを使う場合もあると思うが、そういう鎖置換型 DNA ポリメラーゼと template switching の効率などに差はあるのかどうか。あるとすればその差はどの程度なのか。

[回答 3] Taq DNA ポリメラーゼが鋳型交換反応をするという報告があるが、実際は非常に効率が悪い。Taq DNA ポリメラーゼは鎖置換型ではない。鎖置換型の $\Phi 29$ でも当然 template switching の効率は十分あるとは思いますが、BcaBEST と比べてどうかは実際に試していないのでよくわからない。また、 $\Phi 29$ と BcaBEST では反応最適温度が異なる。BcaBEST は 55℃くらいで反応させるのに対して $\Phi 29$ では 37℃前後だと思うので、そのあたりで違いがあるのかもしれない。

[質問 4] ICAN 法は PCR に比べて多くの産物を合成する。この利点をまだ生されていない。ICAN 法は大変ユニークな増幅法であり、PCR に比べて多くの利点を持っていると

考えるが、これの普及に対してのアイデアはないか？どのような応用が考えられ、そのためにはさらに何が必要であるか。

[回答 4] 大量に増えるということも特長だが、PCR と同様に高感度な反応もする。最近では核酸抽出も簡単にでき、反応も特殊な機器も必要なく簡単に検出ができる。大量にできるということだけでなく、そのあたりのことも含めて総合的な観点から新たな利用方法を考えていけたらと思う。産物量が多いという利点を生かして実際に経験したのは、DNA チップの原料となる DNA を ICAN 法で増幅させ、チップ製造に使用したということがあるのでこれらの分野を含めた利用を期待している。

[質問 5] 現在の PCR 法は安価で簡便に出来る。それに対し、ICAN 法は実用という立場では不利な点が見られる。原理的には優れているので、ブレイクスルーが必要である。

[回答 5] 原料としては PCR に比べてキメラプライマーを使っていることはあるが、特に高いというわけではない。たくさん製造した DNA がすべて消費できなければ原価として高くなってしまう。

[質問 6] アスパラギン酸プロテアーゼは増殖にどう関与しているのか。

[回答 6] そこまで実際には確認していない。cDNA がクローニング出来た際に、カンジダ症の診断に使えないかということで調べたが、実際に真菌症になっても血中にでてくる菌数は非常に少ないので、困難であった。残念ながら、クローニングした以上のことは進んでいない。

[質問 7] プライマー量あたりの DNA 増幅量が PCR に比べてすごく高い。それはなぜか。

[回答 7] ICAN 法の場合は、ディスプレイメント反応を行いながら進む。それに対して PCR は熱変性させてプライマーをアニーリングさせるという反応である。PCR による増幅は、サイクルの後半で著しくターゲット領域が増えてくると増幅したものの同士がアニールする。そのため、プライマーがアニールし難くなる。PCR 反応の後半にそういう現象が起こるので、プラトー効果と呼ばれているが PCR の場合はサイクル数が後半になると増幅産物量が頭打ちになってしまう。ICAN 反応の場合は、二本鎖の DNA になってもそこにプライマーが入り込んでいくということで、増幅産物が増えても関係なくプライマーが入り込んでディスプレイメントしながら反応していく。そのため、単位容量あたりの増幅産物量が PCR に比べ 5 倍から 10 倍違うということになる。

[質問 8] ICAN 法で増幅可能なサイズはどのくらいか？

[回答 8] 高感度な反応を期待する場合は、100 ベース前後が最適である。また、増幅量を期待する場合は 1 kb 以下でないと対応が難しい。約 3 kb の断片を増幅した経験があるが、これは稀である。ICAN 増幅では、なるべく短い断片の増幅が有利である。

[質問 9] プライマーの設計について教えて欲しい。

[回答 9] 設計のパラメーターはほとんど PCR の場合と同じ。ただ、ICAN の場合は、プライマーに挟まれた領域の 2 次構造が重要である。なるべく、2 次構造を取り難い増幅領域を選択することが大事である。

[質問 10] RNA の検出に関してどうか。

[回答 10] ICAN の場合、2 本鎖の DNA が鋳型となるより、cDNA と RNA のハイブリッドが鋳型となった方が高感度に反応する。これは、ハイブリッドの RNA 部分に RNase H によりニックが入り、その部分からプライミングが起こり、ICAN 反応がスタートするからだと考えている。ただ、ワンステップの RT-ICAN は欠点がある。これは RT 時に RNase H が存在するために、RT の効率が著しく低下するからである。RNase H の抗体作製にもチャレンジしているが、60℃前後で失活する抗体の取得は難しい。抗体よりアプタマー技術の利用の方が適しているかも分からない。