

学 位 論 文 題 名

High-throughput PCR システムの開発とその性能評価に関する研究

学位論文内容の要旨

現在、ゲノム研究におけるマッピング、塩基配列決定等に膨大な数の Polymerase Chain Reaction(PCR)の反応数が必要とされている。また、その需要はゲノム計画のみならず、様々な領域で益々増加することが予想される。この様に、より多くの検体をより短時間で処理することが要求されることを鑑み、試薬や検体の分注から反応までをオートメーション化することにより、労働量と人為的ミスを減少させること、さらに、コストパフォーマンスを上げるために、試薬の消費量を減らすことなどが益々重要となってきた。しかし、現在まで、大量生産を目的とした PCR 反応装置に関する研究はほとんど報告されていない。本研究ではこれらの要求に対する解決策として、PCR のオートメーション化と反応体積の縮小化に焦点を絞り装置の研究開発を試みた。

PCR において迅速で正確な温度変化によって鋳型とプライマーの非特異的な会合が抑制され、さらに酵素の失活を防ぐことによって、反応の特異性と増幅効率を向上させることが可能である。よって、本装置をデザインするにあたって、熱源であるペルティエ素子から検体への熱伝導率を高めるために、種々の検討を行なった。一般の市販機ではプラスチックチューブに密封した反応液を熱伝導ブロックに乗せ、そのブロックの温度を上昇下降させることで反応を進行させている。熱源からサンプルへの熱伝導ブロックには熱伝導率の高いアルミニウム($2.38 \times 10^{-3} \text{ J/cm.s.K}$, 0°C)が用いられている。本装置ではアルミニウムブロックに 384 個のウェルを設け、DNA・酵素等の非特異的吸着を防ぐためにテフロンコーティングを施し、直接、反応容器として用いることを試みた。この条件においてプラスチック製チューブを用いた時に生じる熱伝導率の低下がなく、より迅速な温度変化が可能となった。また、市販機では熱伝導ブロックとペルティエ素子の間にシリコンラバー等の熱伝導素材を挟むことによって密着性と熱伝導率を高めている。本装置では、さらに熱伝導性のよいカーボングラファイトシート($15.5 \times 10^{-3} \text{ J/cm.s.K}$, 0°C)を使用することによって迅速な温度変化と各ウェルにおける温度の均一性がもたらされた。さらに、加熱時におけるサンプルの蒸発を制御するために、上部温度コントローラーを設けた。上部温度コントローラーの裏に耐熱性シリコンラバーを接着することによって、上部温度コントローラーをセットするだけで気密性を保つことが可能となった。上部温度コントローラーを 105°C に設定し、 96°C -10 秒、 60°C -10 秒、 72°C -2 分のサイクルを行ったところ、上部温度コントローラーの熱により、PCR 反応液の温度下降が阻害された。この条件において反応液の大部分が蒸発し、上部温度コントローラー裏面に凝結した。一方、上部温度コントローラーを PCR 反応液の温度変化と同調して、常に $2\text{--}5^\circ\text{C}$ 高く設定した場合、反応液に接する気相内の飽和蒸気圧が常に低く保たれ、検体の蒸発を最小にすることが可能となった。さらに、前者と比較して正確かつ迅速な温度変化が可能となった。この条件において $1 \mu\text{L}$ の反応ボリュームにおいても蒸発を抑制することが可能

となった。以上の要素技術により、熱伝導性の向上や反応体積の縮小化がもたらされた。また、PCR プレートがロボットアームによって着脱可能であることに加えて、上部温度コントローラーを自動開閉するように調整したことから、多数のモジュール(反応装置、解析装置、分注ロボット、フリーザー等)の集合体であるワークステーション内で、モジュール間の輸送が可能となり PCR の完全自動化が可能となった。

本装置を用い実際の反応における感度、増幅効率、再現性について種々の検討を行なった。マウス *reeler* cDNA, 1pg(2×10^6 コピー)を鋳型 DNA として、384 ウェル全てを用いて PCR を行ったところ、各ウェルにおける増幅率の差は認められず、温度が正確かつ均一に制御されていることが示唆された。さらに、マウス *reeler* cDNA, 2×10^7 から 2×10^1 コピーを鋳型として PCR を行ったところ、 2×10^2 コピーまで増幅が可能であり、極めて高い検出感度が示された。さらに、*reeler* cDNA を $50\text{fg}/\mu\text{l}$ の濃度で含む PCR 反応液を $50\mu\text{l}$ から $1\mu\text{l}$ まで様々な反応ボリュームに調整し、増幅率の検討を行ったところ、単位体積あたりの増幅率にほとんど差が認められず、上部温度コントローラーの至適化によって、微量な体積においても蒸発が抑制され、十分な増幅が得られることが示された。また、固有の長さや配列をもつ複数の鋳型 DNA に対して、この装置を用いて PCR における反応成功率について検討を行った。マウス胚盤胞 cDNA ライブラリーよりコロニーピッカーを用い、無作為に 10752 クローンを選別し、大腸菌培養液より直接 PCR によって増幅を行った。電気泳動にて増幅の有無、増幅率、サイズについて確認したところ、高い反応成功率(92%)が得られ、そのうち 426 クローンを無作為に選び、サイズを測定したところ、255~4372b(平均 1167b)の間に分布していた。鋳型のサイズにおける反応成功率への影響を検定するため、同ライブラリーの 294 クローンよりプラスミド DNA を抽出し制限酵素にてインサートを切り出たところ、308~3701b(平均 1041b)の間に分布しており、両者のサイズに有意な差は認められなかった。よって約 4kb までの鋳型 DNA については、サイズよりも特異的な塩基配列によって増幅が阻害されていることが示唆されたので、PCR で増幅できなかったクローンについてプラスミドを抽出し塩基配列を決定してみたところ、GC または AG に富む配列を持つクローンが多く、これらの配列は特異な高次構造をとることが示唆された。GC 含量の多い配列の増幅に関して様々な試みがなされているが、すべてを克服できる技術はなく、増えにくい配列を増幅する技術が今後の課題である。さらにこの装置を用いて、PCR 産物 3510 クローンを直接鋳型として、5'末端より塩基配列を決定したところ、高い反応成功率(85%)が得られた。得られたシーケンス 3086 クローンについて BLASTX および BLASTN を用いホモロジー検索を行ったところ、1036 種に分類され、その内、既知の遺伝子および既知遺伝子とホモロジーのあるものは 713 種(68.8%)であり、未知の遺伝子は 323 種(31.2%)であった。

本研究では、GS384 サーマルサイクラーを用いて、1日に 10752 反応が可能であることを実証した。現在 6 台をワークステーション上に設置しており、64512 反応/日が可能である。本装置において PCR プレート上のウェルの数を増やすことや、PCR プレートの熱伝導性を上げることにより、さらに反応数を増やすことが今後の課題である。本研究により作製したシステムはゲノムプロジェクトや DNA 診断等への利用が可能であり、今後このシステムを用いることにより、生物医学において有用な情報を数多く提供することが可能であろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 細 川 眞澄男

学 位 論 文 題 名

High-throughput PCR システムの開発とその性能評価に関する研究

ゲノム研究におけるマッピング、塩基配列決定等に膨大な数のPolymerase Chain Reaction (PCR) の反応数が必要とされている。より多くの検体をより短時間で処理することが要求されることに鑑み、試薬や検体の分注から反応までをオートメーション化することにより、労働量と人為的ミスを減少させること、さらに、コストを下げるために、試薬の消費量を減らすことなどが重要となってきた。これらの要求に対する解決策として、PCRの迅速化、オートメーション化、反応体積の縮小化に焦点を絞り、種々のアイディアを取り入れて装置の研究開発を試みた。本装置を用い、増幅効率と再現性について種々の検討が行われ、PCR装置としての性能は充分であることが確認された。さらに、本装置を用い、ヒトでは解析が困難である32細胞期のブラストシストで発現する遺伝子のカタログ化、さらに未知の遺伝子単離をマウスにおいて試みた。定法によりcDNAライブラリーを作製し、本装置を含むオートメーションシステムにより、一日1,0752検体のインサートDNAの増幅を行った。反応成功率は92%であり、反応成功率に影響を与える要因として、特異な配列が影響を与えていることを明らかにした。増幅できなかった8%については遺伝子の大部分を明らかにする目的上、問題であり反応成功率をあげること今後の課題である。さらに、約4000クローンを無作為に抽出し、塩基配列を決定すれば、任意の細胞で発現するrareな遺伝子以外は大体（約500－1000種類）提示できるという作業仮説の基にシーケンスを決定した。ホモロジー検索の結果、ミトコンドリアの転写産物や繰り返し配列などuninformative cloneを除いた3860タローンは945種に分類され、既知の遺伝子および既知遺伝子とホモロジーのあるものは461種であり、未知の遺伝子は484種類あった。このことにより発生初期では数多くの未知遺伝子が機能していることが示唆された。さらに、ブラストシストは他の組織に比べ細胞分裂関連遺伝子や蛋白の発現に関与する遺伝子群が豊富であり、一方で、細胞間の相互作用や免疫系関連遺伝子の発現は相対的に低い傾向にあることが明らかとなった。このように本装置を用いて短期間で新規遺伝子発見と細胞・組織をキャラクタライズすることが可能であった。さらに、現在7

万反応／日が可能であるシステムを構築した。これに対応するシーケンサーが開発されれば、生物医学において有用な情報を数多く提供することが可能となる。

公開発表はおよそ13名の聴衆の前で行われ、西教授より、あらゆるメーカーのPCR機を試してだめで、自分で作製するのか、1万検体のPCR産物を解析できるシーケンサーの開発を進めているのか、およびゲノムプロジェクトはいつ終了予定なのか等について質問があった。次いで細川教授より、この装置全体が既に完成しているのか、他の装置も考案したか、だれでも使えるシステムになるのか等の質問があった。最後に、守内教授より、ヒトmRNAの全ては今世紀中に登録されるか、DNA診断に応用可能か、およびコンピューター上でのハイブリダイゼーションの概念について質問があった。これらの質問に対して申請者は、解析システムの構築に関する試行錯誤の経験、および現在進行中のゲノム解析に関する豊富な知識に基づいて明解に解答した。さらに、申請者は、あらゆる組織で発現している遺伝子をシーケンスする一方で、ゲノムも大まかにシーケンスし、コンピュータ上でホモロジー解析を行うことによって、転写地図を作製する。さらに、マウス疾患遺伝子のゲノム上の位置を連鎖解析等で明らかにして、標的遺伝子座に存在する候補遺伝子をリストアップし、シーケンス法だけで原因遺伝子を同定することを考えていると解答した。さらに、分化、増殖など細胞の変化と原因遺伝子を結びつけることは非常に困難であるが、このシステムを用いて、どの様なことができるかという質問に対して、申請者は1細胞で発現しているmRNAの分子数は数10万であり、できるだけ転写産物の量比のバイアスのないライブラリーを作製し、数10万シーケンスすると全種類がリストアップできることになり、変化前、変化後の発現プロファイルを比較し候補遺伝子を絞ることが可能であると考えていると解答した。

審査委員は、装置開発には細部にわたり様々な工夫や試行錯誤があり、困難を一つ一つ解決していったこと、技術を開発しデータ生産の効率化をはかる、あるいは、いままで不可能であったことを実現するような研究スタイルは生物学では非常にまれであることを評価した。

さらに、このシステムを用いることにより、特定細胞内で発現している遺伝子の多くの種類のカタログ化、任意の表現形質とその原因遺伝子を結びつけるために必要な転写地図の作製等、生物医学にとって有用な情報を数多く提供することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者を博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。