OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Quantitative Detection of DNA and mRNA by the Coamplification Polymerase Chain Reaction
Author(s)	枚本, 卓司
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39546
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【 35 】

氏　　名	杤本卓司
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　12032　号
学位授与年月日	平成7年6月7日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Quantitative Detection of DNA and mRNA by the Coamplification Polymerase Chain Reaction (Coamplification Polymerase Reaction によるDNAとmRNAの定量)
論文審査委員	(主査) 教授　高井新一郎 (副査) 教授　上田　重晴　　教授　木下タロウ

論文内容の要旨

【目　的】

2組のprimerを用いて2種のDNAをPCRで同時に増幅すると生成物DNAの比がtemplate DNAの比に比例することが知られている。簡便，鋭敏なDNAの定量法を開発を目的として，coamplification polymerase chain reaction（同時増幅PCR）の反応条件（primer比，primer design，annealing 温度）とDNA同時増幅の定量性について検討した。発現量の少ない oncogene mRNA を定量するため内部基準と同時増幅しうるprimerの選び方を明らかにし，同方法を用いて腫瘍組織内の Ki－*ras*，c－*myc* mRNA 量を β－actin mRNA を内部基準として定量し相対濃度をmole比で算出した。

【方法と成績】

(1)　定量性の検討

RT－PCR法で増幅合成した200から400塩基対のDNA（β－actinとKi－*ras*）を種々の割合で混合し control template とし2組の primer を加えPCR（30cycle）で増幅した。電気永動後 ethidium bromide の蛍光強度からDNA量を定量し，annealing温度，primer 濃度を変えて同時増幅PCRの定量性に対する影響を調べた。control template の混合比に比例して同時増幅されたDNAの生成比は直線的に変化し，DNAの生成比から未知のtemplateの混合比を算出可能であった。一方の組のprimerの濃度を増やすと対応するDNAの生成比は増加した。control templateの混合比とDNAの生成比の直線性は保たれており，primerの濃度比を変えれば内部基準（β－actin）の1％以下のmRNAでも同時増幅PCRの生成比から精度良く定量できることが示された。同時増幅する control template量と生成したDNA量には直線関係がなく，同時増幅PCRの条件下でPCR増幅の plateau 域に達していた。DNAの生成比が plateau 現象に影響されないのは，同時増幅PCRは2組のPCR増幅が競争的に進行するためで，plateau現象の影響が相殺されるものと考えられた。template量と thermal cycle 数が過剰になり一方がPCR増幅の限界（～5X10^{-8}M）に達すると同時増幅PCRの直線性は失われた。しかし ethidium bromide の蛍光が測定できるDNA濃度（10^{-9}M）であれば直線性は影響されなかった。混合比が同じであれば template の希釈度を100

倍程度変えても生成比の変化は小さく，同様に調整され希釈度が同程度の試料であれば，同時増幅の生成比から未知試料中の2種のDNAの相対濃度を直接比較できることが示された。

(2) primerの設計，同時増幅PCRの制御因子

primer鎖が長く，或いは GC content が多く結合力の強いprimerを用いた場合も同時増幅の生成比が多くなった。annealing 温度を上げるとさらに生成比は増加した。annealing温度での primer template duplex の生成自由energy（ΔG°）を計算すると安定なものほど生成比が多くなり，primer template duplex 濃度によって同時増幅PCRの生成比が決められることが示された（duplex解離平衡の定数K＝exp（－ΔG°／RT））。2組のprimerの熱力学パラメーター（ΔH°，ΔS°）の値が近づくようにprimerを設計し，duplexの生成自由エネルギー（ΔG°＝ΔH°－TΔS°）が同じように変化するprimerの組み合わせを用いると，annealing温度を変えても生成比はほとんどかわらなかった。duplexの熱力学的安定性を支配するprimer濃度，sequence，annealing温度に同時増幅PCRが依存すること，plateau現象に影響されないことから同時増幅PCRの反応機構は次のように考えられた。PCR開始後早期の thermal cycle では生成したduplexのすべてが DNA polymerase でextendされ，増幅は指数関数的に進む（exponential amplification phase）。thermal cycle が進むにしたがい反応系中にduplexが蓄積し，一部のduplexしかextendされず増幅のplateau現象が始まる。その結果，duplex間で DNA polymeraseへの取り込みの競争がおこり，同時増幅の比率はduplex濃度によって決まるようになる。primerの濃度や primer design を変えて同時増幅PCRのDNA生成比を制御できるのはduplexが蓄積しplateau現象が始まってからであり，PCR増幅したDNA生成量から定量する quantitative PCR が early exponential amplification phase に増幅を限らなければならないことと対照的である。

(3) 腫瘍組織内の Ki－*ras*，c－*myc* mRNA の定量

(1) 一定量の control template DNA を未知試料に加えて同時増幅の変化を調べた。人胃癌株 H－111 の total RNAを random hexanucleotide primerを用いて逆転写し，得られた cDNA mixture から β－actin と Ki－*ras* を同時増幅した。加えた control template DNA 量を横軸に生成比をplotすると，横軸切片からcDNA量の濃度が算出され Ki－*ras* mRNA は β－actin mRNA の5％（mole比）であった。

(2) 種々の混合比の c－*myc* と β－actin の control template DNA mixture を用いて較正し，大腸癌手術材料中の c－*myc* と β－actin mRNA の相対濃度を同時増幅の生成比から直接に算出した。腫瘍組織で c－*myc* mRNAは β－actin mRNA の1％から10％で周囲正常組織の10から100倍であった。

【結　論】

coamplification PCR は（1）2組のPCR増幅の競争反応であり2つの増幅反応の加え合わせではない。（2）同時増幅されるDNA生成比は primer template duplex 濃度に依存する。duplex量を等しくする様にprimer混合比，primerの長さ，sequence，annealing 温度を選べば，混合比1％以下のtemplateも同時増幅でき内部基準（β－actin）に比べ少量のmRNAも定量可能である。（3）PCR増幅のplateau現象に影響されず，ethidium bromide 蛍光強度から容易に2種の template DNA の相対濃度を定量できる。（4）少量の臨床材料から同時増幅によってmRNA量はmole数で算出される。腫瘍組織内で Ki－*ras* mRNA や c－*myc* mRNA の数％であり，大腸癌組織内で c－*myc* の10倍から100倍の過剰発現が確認された。定量にblottingやhybridization操作がなくmRNA量が arbitrary unit ではなく，mole数で算出されので多数の臨床材料の定量的な比較が容易である。

論文審査の結果の要旨

本論文は新しく考案したDNAやmRNAの定量法，coamplification polymerase chain reaction（PCR）法について反応機構などを詳しく検討したものである。本方法では2種類のDNAを同時に増幅し，生成したDNAの相対比から定量する。そのため従来のPCR法による定量の欠点とされた増幅の非線形性に影響されない。本論文で

coamplification PCR 法の生成比が，プライマーとテンプレートDNAのduplexの熱力学的安定性に支配されることを証明し，DNAを定量に必要なプライマーの設計，反応条件の設定を系統的に検討した。本方法が高感度，簡便で実用性の高いDNA定量法であることを明らかにしている。さらにmRNAを逆転写しcDNAとした後，本方法を用いることにより腫瘍組織内の癌遺伝子，c－*myc*，Ki－*ras* のmRNA量が定量された。人胃癌株中の Ki－*ras* mRNA は内部基準として用いた β－actin mRNA のmole比で数%と算出され，また大腸癌手術材料中で c－*myc* が正常組織の10倍から100倍の発現増加する事を確認した。Northern blot 法では分子数の比でmRNA量を直接算出することは困難であり，本方法の有用性を証明するものである。本方法を用いれば臨床材料から種々の遺伝子の発現量が容易に定量でき，臨床医学に大きく貢献すると思われ学位論文に値すると考える。