

Title	Quantitative Detection of DNA and mRNA by the Coamplification Polymerase Chain Reaction
Author(s)	杵本, 卓司
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39546">https://hdl.handle.net/11094/39546</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏 名	すぎもとたくし 枚 本 卓 司
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )
学 位 記 番 号	第 1 2 0 3 2 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  $\beta$  - 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 ( $\beta$  - 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 ( $\beta$  - 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, 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 ( $\sim 5 \times 10^{-8} M$ ) 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 ( $10^{-8} M$ ) 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 ( $\Delta G^\circ$ ) 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  $K = \exp(-\Delta G^\circ / RT)$ )。2組の primer の熱力学パラメーター ( $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ ) 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 ( $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$ ) 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  $\beta$ -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  $\beta$ -actin mRNA の 5% (mole 比) であった。

(2) 種々の混合比の *c-myc* と  $\beta$ -actin の control template DNA mixture を用いて校正し、大腸癌手術材料中の *c-myc* と  $\beta$ -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  $\beta$ -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 ( $\beta$ -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 数で算出される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  $\beta$ -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思われる。