



Title	Oligoribonucleotide (ORN) Interference-PCR (ORNi-PCR) : A Simple Method for Suppressing PCR Amplification of Specific DNA Sequences Using ORNs
Author(s)	谷川, 直紀
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61522
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	谷川 直紀
論文題名 Title	Oligoribonucleotide (ORN) Interference-PCR (ORNi-PCR): A Simple Method for Suppressing PCR Amplification of Specific DNA Sequences Using ORNs (オリゴリボヌクレオチド (ORN) を用いたPCR増幅の配列特異的阻害法 (ORNi-PCR))
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕 Polymerase chain reaction (PCR) 法は、分子生物学分野における必須の技術である。共通のプライマー配列を持つ複数の鋳型をPCR法を用いて増幅する手法は、遺伝子ファミリーメンバーのクローニング、変異マウスの遺伝子型決定および臨床検査における微生物の検出などに広く利用されている。このようなPCR反応では、より多く存在する鋳型の増幅が、より少ない鋳型の増幅より優勢となることがよくあるため、少ない鋳型DNAを検出することが難しい場合があり、より多く存在する望ましくない鋳型の増幅を抑制し、より少ない望ましい鋳型を増幅させる技術が求められてきた。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 そこで、我々はオリゴリボヌクレオチド (ORN) を用いたPCR増幅の配列特異的阻害法 (ORNi-PCR) を開発した。望ましくない鋳型と相補的なORNは低濃度でそれら鋳型の増幅を阻害したが、ORN配列を持たないコントロール鋳型の増幅には影響しなかった。ORNを用いた阻害のIC ₅₀ は10 nM程度の低濃度であった。ORNi-PCRでは、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を持つ <i>Taq</i> ポリメラーゼは利用できないが、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を持つKODや <i>Pfu</i> ポリメラーゼは利用できた。 〔総 括(Conclusion)〕 我々の結果からORNが配列特異的にPCR増幅を阻害することが示され、ORNi-PCRが分子生物学研究や臨床検査において有用な手法となり得ることが示唆された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)			
谷川 直紀			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学准教授	藤 井 穂 高
	副 査	大阪大学教授	堀 口 孝 三
	副 査	大阪大学教授	飯 田 哲 也

論文審査の結果の要旨

PCR法は、生物学・医学分野で広く利用されている基盤技術の一つである。PCR法を実施する際に、検出したい配列の他に、プライマー配列が結合する他のDNA配列が存在するため、バックグラウンドが高くなることで、検出したい配列由来のPCR産物の検出が困難になるケースがしばしば存在する。例えば、遺伝子ファミリーの新規メンバーの同定、微生物の検出等の際に、こうした問題が頻出する。

申請者は、PCR増幅を配列特異的に抑制するoligoribonucleotide interference-PCR (ORNi-PCR) 法を開発した。ORNi-PCR法は、臨床診断や分子生物学的研究等に広く応用可能である。特に、近年注目されている腸内細菌叢解析への応用は有望である。例えば、これまでは優占種のDNAがPCRテンプレート内で大部分を占めるため、次世代シーケンサーによる同定・検出が困難だった希少な細菌を、優占種特異的にPCR増幅を阻害することで同定・検出できるようになる。実際、申請者は、ORNi-PCR法を用いて、腸内細菌の優占種16S rDNAのPCR増幅の特異的な抑制が可能であることも示している。

これらの理由から、申請者は学位の授与に値すると考えられる。