

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 工 学 )	氏名	佐野 創太郎
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論 文 題 目			
Development of elemental technologies for a simple and rapid nucleic acid amplification test (簡便・迅速な核酸増幅検査のための要素技術開発)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	河 本 正 次	
審査委員	教 授	黒 田 章 夫	
審査委員	教 授	秋 庸 裕	
〔論文審査の要旨〕			
<p>ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を基調とした核酸増幅検査技術は医療・食品分野をはじめ、我々の生活に必要不可欠な技術として深く浸透している。本技術は遺伝子の増幅工程と検出工程の2工程から構成されるが、現行技術の両工程はそれぞれ複数の酵素を用いた煩雑な分析操作ならびに高額な分析機器が必要であり、人員や設備の措置が困難な開発途上国や小規模施設においては当該技術に対する大きなニーズがあるものの、その導入が制限されているのが現状である。更には近年の新興・再興感染症に対する対策の一環として、早期診断により感染拡大を未然に防ぐことが喫緊の課題となっており、オンサイトで誰でも簡便かつ高感度に実施可能な核酸増幅検査技術の開発が強く求められている。本研究では、核酸増幅検査の各工程を簡便・迅速化する要素技術を開発することを目的とした。本論文では、まず緒言にて背景と課題及び本研究の目的が明示されている。第一章では核酸の増幅工程を簡便化するツールとして、逆転写酵素活性と DNA ポリメラーゼ活性を併せ持つ耐熱性酵素の開発を試みている。第二章においては核酸の検出工程に焦点を当て、PCR 産物の多検体迅速検出技術の開発に関する研究結果が記載されている。また総括では、当該要素技術を用いた核酸増幅検査系の確立に係る今後の展望等が議論されている。</p> <p>第一章では、核酸増幅検査の増幅工程に用いられる逆転写 PCR を1ステップで遂行可能とすべく、DNA 依存性 DNA ポリメラーゼに逆転写酵素活性を賦与した新規耐熱性酵素の開発が試みられている。これを達成するために著者はまず、高い安定性と正確性を有する超好熱性細菌 <i>Thermotoga petrophila</i> K4株由来のDNA依存性DNAポリメラーゼI(K4 PolI)を単離している。続いて著者はK4 PolIの逆転写酵素化に取り組み、本酵素の鋳型結合ドメインを構成する複数のアミノ酸残基が逆転写酵素基質 RNA に対して立体障害となっていることを見いだすと共に、当該立体障害を解消する部位特異的変異の導入によりK4 PolIに逆転写酵素活性を賦与することに成功している。</p>			

第二章では、核酸増幅検査の増幅工程の効率化を目標として、簡便な PCR 産物の検出技術の開発に係る検討結果が記載されている。本章において著者は、アゾベンゼン修飾プライマーを導入することにより、増幅効率を維持したまま PCR 産物に DNA タグの導入が可能であること、また、当該タグ導入 PCR 産物を相補的 DNA プローブが固定化されたペーパークロマトグラフィーチップに供することにより、PCR 産物の迅速検出を実現できることを示している。更に著者は、本検出系を用いて Herpes Simplex Virus 1, 2 の同時識別検出が可能であることも実証しており、本技術が簡便・迅速な multiplex-PCR 産物の検出技術として有用であると結論している。

本研究では、核酸増幅検査における遺伝子の増幅工程、ならびに検出工程を簡便・迅速化するための要素技術として、逆転写酵素活性と DNA ポリメラーゼ活性を併せ持つ新規耐熱性酵素を開発すると共に、ペーパークロマトグラフィーチップを駆使した PCR 産物の迅速多検体同時検出技術を開発した。一連の研究成果は、小規模医療施設や開発途上国における核酸増幅検査技術の早期普及を促進するのみならず、新興・再興感染症に対する感染拡大の防止にも有用な技術的知見を与えるものと期待される。よって本論文の著者は、博士（工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。

備考 審査の要旨は、1,500 字程度とする。

試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 （ 工 学 ）	氏名	佐野 創太郎
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Development of elemental technologies for a simple and rapid nucleic acid amplification test (簡便・迅速な核酸増幅検査のための要素技術開発)			
試験担当者			
主 査	教 授	河 本 正 次	印
審査委員	教 授	黒 田 章 夫	印
審査委員	教 授	秋 庸 裕	印
〔試験の結果の要旨〕			
判定 合格			
<p>学位請求論文の内容、および関連する専門分野の知識について、核酸増幅検査に関する研究開発の現状、オンサイトでの簡便・迅速な核酸増幅検査を実用化するための技術的課題と将来展望、および逆転写酵素活性を賦与された DNA 合成酵素の構造・活性相関などに関する質問を含む口頭による試験を行った。その結果、本申請者はいずれの質問に対しても生化学、分子生物学、および生物工学に関する十分な基礎知識をもとに論理的かつ明快に説明できる能力を有することを確認できた。従って、本申請者は博士（工学）の学位を授与するに値する学識を有する者であることを審査委員全員の一致により認めた。</p>			

備考 要旨は、400字程度とし、試験の方法も記載すること。