

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	KEVIN MAAFU JUMA
論文題目	Studies on enzymes and reaction conditions in recombinase polymerase amplification (リコンビナーゼポリメラーゼ増幅法の酵素と反応条件に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>リコンビナーゼポリメラーゼ増幅法 (RPA 法) は、リコンビナーゼ (Rec)、一本鎖 DNA 結合タンパク質 (SSB)、鎖置換 DNA ポリメラーゼ (Pol) を用いて、等温 (37~42°C) で標的 DNA を増幅する技術である。RPA 法では、ATP 存在下で Rec がプライマーと結合し、Rec・プライマー複合体を形成する。この複合体が、二本鎖 DNA 中の相補的な領域に結合する。生じた一本鎖 DNA に SSB が結合することで、二本鎖 DNA の再形成が防がれる。その後、Pol が作用し、二本鎖 DNA が複製される。この反応が繰り返されることにより、標的 DNA が増幅される。</p> <p>RPA 法は PCR 法と比較すると、サーマルサイクラーが不要という長所をもち、設備が整っていない現場では、病原菌を対象とした核酸検査に優位性をもつ。しかしながら、今日市販されている RPA キットは高価であること、凍結保存を必要とすること、試薬組成を改良できないという問題がある。また、Rec、SSB、Pol の組換え体の製法や反応液の組成は十分に開示されていない。さらに、現場での核酸検査に好ましい、常温保存が可能な RPA の凍結乾燥試薬が報告されていない。その結果、RPA 法を用いた現場での核酸検査は、十分に普及していない。</p> <p>本論文では、RPA 法の普及を目的として、Rec、SSB、Pol の組換え体の調製と改良、試薬組成の最適化ならびに凍結乾燥試薬の作製を行った。本論文は以下のように要約される。</p> <p>第一章では、PCR 法あるいは RPA 法によるイネ黄斑病ウイルス (RYMV) DNA の検出系、ならびに RNA 増幅法による同ウイルス RNA の検出系を構築した。PCR 法と RPA 法による検出系構築には市販の PCR キットおよび RPA キットを用いた。RNA 増幅法による検出系構築には、市販のトリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素と T7 RNA ポリメラーゼを用いた。RPA 法を用いた検出系は他の検出系と同程度の感度を示した。RPA 法あるいは RNA 増幅法を用いた検出系は標的 DNA あるいは RNA を 5 分で検出し、PCR 法を用いた検出系よりも迅速であった。</p> <p>第二章では、Rec である T4 ファージ由来の <i>uvsX</i> と <i>uvsY</i> ならびに SSB である T4 ファージ由来の <i>gp32</i> の組換え体の調製を行った。N 末端と C 末端の両方にヒスチジンタグ ((His)<sub>6</sub>) とトロンビン認識部位を有する <i>uvsX</i>、<i>uvsY</i>、<i>gp32</i> を大腸菌で発現させ、菌体からニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。<i>uvsX</i> と <i>gp32</i> はトロンビン処理して(His)<sub>6</sub> を除去したものを陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。<i>uvsY</i> はトロンビン処理により凝集したため、トロンビン処理を行わなかった。得られた <i>uvsX</i>、<i>uvsY</i>、<i>gp32</i> ならびに市販の <i>Bacillus stearothermophilus</i> 由来の Pol (<i>Bst</i>-Pol) を用いた RPA 試薬は十分な性能を有した。本 RPA 試薬の反応条件を検討した結果、至適 pH は 7.5~8.0、至適 CH<sub>3</sub>COOK 濃度は 40~80 mM、至適温</p>			

度は 37～45℃であった。

第三章では、RPA 試薬の組成の最適化を、タグチメソッドとして知られている統計学的手法を用いて行った。RPA 試薬は 13 種類の成分 (uvsX、uvsY、gp32、*Bst*-Pol、クレアチンキナーゼ、ジチオスレイトール、ポリエチレングリコール 35,000、dNTP、ATP、CH<sub>3</sub>COOK、Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.2)、Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>、DNA プライマー) を含む。各成分に対して 3 種類の濃度を設定した。直交表に基づき、27 種類の反応条件を設定し、各反応の性能を数値化することで、各成分について最適濃度を決定するとともに、成分ごとの寄与率を求めた。この作業を 3 回行うことで、各成分の濃度を最適化した。SARS-CoV-2 DNA および RNA を標的とした RPA において、反応時間 30 分での試薬の検出限界は、最適化前は 60,000 分子であったが、最適後は 60 分子であり、最適化により感度が増加した。

第四章では、uvsY のヒスチジンタグ ((His)<sub>6</sub>) の位置が RPA の性能に与える影響を調べた。(His)<sub>6</sub> をもたない uvsY (uvsY-Δhis)、(His)<sub>6</sub> を N 末端にもつ uvsY (uvsY-Nhis)、(His)<sub>6</sub> を C 末端にもつ uvsY (uvsY-Chis)、(His)<sub>6</sub> を N 末端と C 末端にもつ uvsY (uvsY-NChis) を大腸菌で発現させ、それぞれ菌体から精製した。uvsY-Nhis を含む RPA 試薬は、uvsY-Δhis、uvsY-Chis あるいは uvsY-NChis を含む RPA 試薬よりも反応効率が高かった。このことから、uvsY-Nhis が RPA 法に最適であると結論した。

第五章では、好熱性細菌由来の Pol を調製し、RPA 法に応用した。*Aeribacillus pallidus* (H1) と *Geobacillus zalihae* (C1) からそれぞれ新たに同定された Pol (H1-Pol と C1-Pol) の組換え体が大腸菌で発現させ、菌体から精製した。H1-Pol を含む RPA 試薬は、C1-Pol あるいは *Bst*-Pol を含む RPA 試薬よりも反応効率が高かった。このことから、H1-Pol は C1-Pol あるいは *Bst*-Pol よりも RPA 法に適していると結論した。次に、RPA 試薬の凍結乾燥を試みた。ゲルろ過に uvsX、gp32、H1-Pol の混合物をゲルろ過にかけ、保存溶液中のグリセロールを除くとともに緩衝液を揮発性である酢酸アンモニウムに置換した。その後、uvsY を含めた他の成分ならびにトレハロースを加えて凍結乾燥した。常温で 0～14 日保存された本凍結乾燥試薬の性能は、-30℃で同日数保存された液状試薬と同程度であった。

第六章では、RPA 法の利用拡大の一環として、DNA 断片中の一塩基変異のマイクロ温度勾配ゲル電気泳動 (μTGGE) による検出について検討した。SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質の 614 位のアスパラギン酸 (D614) が、遺伝子の一塩基変異によりグリシン (G614) に置換されると、感染性が高まることが知られている。本変異部位を含む 80～140 bp の DNA 断片の μTGGE でのパターンは、D614 と G614 をコードするもので異なり、両者の識別が可能であった。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は 1 頁を 38 字×36 行で作成し、合わせて、3,000 字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し  
審査結果の要旨は日本語 500～2,000 字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

リコンビナーゼポリメラーゼ増幅法 (RPA 法) は一定温度 (37~42°C) の DNA 増幅法であり、サーマルサイクラーが不要なため、現場での核酸検査への応用が期待されている。本論文は、RPA 法で使用するリコンビナーゼ (Rec)、一本鎖 DNA 結合タンパク質 (SSB)、鎖置換 DNA ポリメラーゼ (Pol) の組換え体の調製と改良、RPA 試薬の組成の最適化ならびに凍結乾燥試薬の作製についての一連の研究をまとめたものである。評価すべき主要な点は以下の六つに要約される。

1. RPA 法によるイネ黄斑病ウイルス DNA の検出系を構築した。本検出系の性能を、PCR 法を用いた検出系と比較すると、感度は同程度であり、迅速性はより優れていることを示した。
2. Rec である T4 ファージ由来の *uvsX* と *uvsY* ならびに SSB である T4 ファージ由来の *gp32* の組換え体を、大腸菌を宿主として発現し、菌体から精製した。これらの組換えタンパク質を用いた RPA 反応が十分な性能を有することを示し、その至適 pH、至適 CH<sub>3</sub>COOK 濃度、至適温度を求めた。
3. RPA 試薬に含まれる 13 種類の成分の濃度の最適化を、タグチメソッドとして知られている統計学的手法を用いて行った。最適化後の RPA 試薬は、最適化前のそれよりも高い性能を有することを示した。
4. *uvsY* のヒスチジンタグ ((His)<sub>6</sub>) の位置が RPA 反応に与える影響を検討した結果、N 末端に(His)<sub>6</sub>をもち、C 末端に(His)<sub>6</sub>をもたない *uvsY* を用いた RPA 試薬の性能が最も高いことを示した。
5. 好熱性細菌 *Aeribacillus pallidus* (H1) から同定された Pol (H1-Pol) の組換えタンパク質を大腸菌で発現させ、H1-Pol を含む RPA 試薬の性能が、従来の *Bacillus stearothermophilus* 由来の Pol (Bst-Pol) を用いた RPA 試薬よりも高いことを示した。さらに、H1-Pol を用いた RPA の凍結乾燥試薬を調製し、室温保存が可能であることと液状試薬と同等の性能を有することを示した。
6. SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質の 614 位のアスパラギン酸 (D614) のグリシン (G614) への置換に相当する一塩基変異を含む 80~140 bp の DNA 断片のマイクロ温度勾配ゲル電気泳動でのパターンは、D614 と G614 をコードするもので異なり、両者の識別が可能であることが示された。

以上のように、本論文は、Rec、SSB、Pol の組換えタンパク質の調製と改良ならびに試薬組成の最適化を行うとともに、RPA の凍結乾燥試薬を実現させたものであり、酵素化学、食品生理機能学、農産製造学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和 6 年 1 月 23 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から 3 ヶ月以内)