

## 論文内容の要旨

氏名	叶 盛
<p>題名 Genetic analysis using long-read sequencing to overcome the difficulties in <i>VWF</i> gene (和訳) <i>VWF</i> 遺伝子解析の困難性を克服するロングリードシーケンシング法の構築</p> <p>von Willebrand 病 (VWD) は、止血タンパク質 von Willebrand 因子 (VWF) の遺伝子異常に伴う止血機能低下により発症する。その発症原因バリエーションの同定は、確定診断、病型分類、病態解明のために重要である。しかし、VWF 遺伝子 <i>VWF</i> はエクソン 52 個、全長約 178 kb と大きく、さらに複数の反復配列を含むことや、別の染色体に偽遺伝子 <i>VWFP1</i> が存在することから、サンガー法やショートリードの次世代シーケンシング (NGS) では解析が困難であり、遺伝子解析が実施されない場合も多い。</p> <p>これまで我々は、構造バリエーションだけでなく 1 塩基バリエーションも高精度に検出できる Nanopore ロングリードシーケンシング法で、先天性血栓性血小板減少性紫斑病の責任遺伝子 <i>ADAMTS13</i> の解析を進めてきた。そこで今回、<i>VWF</i> を対象に、イントロンを含めた <i>VWF</i> 全体から原因バリエーションを同定するストラテジーの構築を目指した。</p> <p>方法としては、<i>VWF</i> 全体をカバーするよう、互いに重複する約 15 kb の PCR 産物を調製し、ライブラリ調製後、Nanopore システムで解析するという手順である。まず、健常者の検体を用い、ゲノムの調製方法や PCR プライマーの設計、PCR 反応条件、ライブラリ調製方法等を最適化した。反復配列による非特異的増幅および <i>VWFP1</i> の増幅を回避するために、PCR プライマー設計の段階で標的配列への特異性を慎重に確認した。その結果、<i>VWF</i> 全体の特異的かつ高効率な増幅とシーケンシングに成功した。</p> <p>この最適化された実験条件にて、国立循環器病研究センターのバイオバンクに登録された症例試料 (1 型 VWD 症例 1 名と AVWS 症例 2 名) を用い、遺伝子解析を進めた。その結果、VWD 症例に候補変異は検出されなかったが、AVWS の 2 症例において、リスクバリエーション候補 p. Gln2442His と g. 6087520_6090118del をそれぞれ検出した。サンガー法による検証の結果、p. Gln2442His は確認されたが、g. 6087520_6090118del は PCR アーティファクト、すなわちスリップストランド (2 個の繰り返し配列間で生じるヘアピンループによるミスペアリングの一種) によるものであることが分かった。</p> <p>ロング PCR では、繰り返し配列等に起因するアーティファクトが特に生じやすく、ロングリードシーケンシングだけで真偽を見極めることは困難であるため、周辺配列の分析を含めた慎重な検証が重要であることが示唆された。今後、ロングリードシーケンス技術の普及に伴い、本研究で構築した <i>VWF</i> 遺伝子解析法は、VWF 関連疾患の発症機序研究や臨床治療などへの広範な応用が期待される。</p>	