

氏名	た い なか かず き 田 井 中 一 貴
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学位記番号	工 博 第 2684 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 合 成 ・ 生 物 化 学 専 攻
学位論文題目	Design of Novel Fluorescent Nucleosides and Their Applications (新規蛍光性ヌクレオシドのデザインとその応用)
論文調査委員	(主 査) 教 授 青 山 安 宏 教 授 濱 地 格 教 授 西 本 清 一

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、蛍光性ヌクレオシドの開発とその応用についての結果をまとめたものであり、15章からなっている。

第1章から第4章は、ピリドピリミジン誘導体骨格を有する蛍光性ヌクレオシドの開発に関する結果についてまとめられている。第1章では新規の蛍光性核酸塩基ベンゾピリドピリミジン (BPP) の開発とその応用について述べられている。BPPはグアニンあるいはアデニンと水素結合を形成する縮重塩基であり、アデニン塩基と塩基対を形成したときは強い発光を示し、グアニン塩基との水素結合に際しては消光されるという性質を有している。この性質を利用して蛍光による相補鎖側の塩基識別について検討している。第2章ではBPPのグアニンによる消光の機構について検討を行っている。BPPのグアニンによる消光過程において、距離依存性の電子移動消光過程と塩基対形成時のBPPのプロトン化による静的な消光過程が存在していると結論付けている。更に第3章において、RNAにおいても同様に蛍光によりプリン塩基を識別できることが示されている。最後に第4章では、BPPにベンゼン環を縮合させたナフトピリドピリミジン (NPP) がBPPよりも高い塩基識別能を示すことを報告している。

第5章では、塩基識別型蛍光 (Base-Discriminating Fluorescent; BDF) 核酸塩基を利用した新規のSNP解析法についてまとめている。BDF核酸塩基であるPyUとPyCを含むオリゴヌクレオチドを用いてヒト遺伝子のgenotyping法について報告されている。

第6章と第7章では、PRODAN含有BDFプローブの開発についてまとめられている。第6章ではPRODAN含有ウリジン (PDNU) の開発について述べられている。PDNUは相補的であるアデニンと塩基対を形成したときだけ強い蛍光発光を示す性質を有していることを見出ししている。また、これまで困難であった450nmという長波長における検出が可能なことから、PyCと組み合わせたgenotyping法についても報告している。第7章ではPRODAN含有シトシン、アデニン、グアニンの開発についてまとめられており、それぞれグアニン、チミン、シトシンを検出するBDFプローブとして働くことを明らかにしている。

第8章と第9章では、5-メチルシトシン選択的な酸化を用いた新規エピジェノタイピング法の開発について述べている。第8章ではオスミウム酸化による反応性の違いを利用したメチルシトシンとシトシンを識別できる系の構築を目指しており、ターゲット部位にバルジを誘起させるガイドDNAを用いることによって部位特異的なメチルシトシン検出を可能にしている。第9章では、オスミウムによるメチルシトシン検出法の配列依存性及びミスマッチ効果について検討を行っている。

第10章ではタンパク内部の極性環境をプローブする極性応答型蛍光プローブ (DNCU) の開発についてまとめている。DNCUの最大蛍光波長からDNCUの周辺環境の誘電率を得ることができることを利用してポリメラーゼであるKlenow Fragment内部の誘電環境のマッピングを行っている。

第11章では、(4-ジメチルアミノフェニル)ピレンアミドを含む修飾ウリジンのDNA二重らせん環境下における蛍光挙動についてまとめられている。(4-ジメチルアミノフェニル)ピレンアミドは、LEとCTの二重蛍光を示し、水溶液中で

は高温律速であるのに対し、構造が堅固な DNA 内部においては、同じ温度領域において低温律速を示すことを報告している。

第12章と第13章では溶バトクロミックな修飾塩基であるナイルレッドヌクレオシドについての結果がまとめられている。第12章ではナイルレッドの溶バトクロミックな性質を利用して、DNA 中のナイルレッドヌクレオシドの局所構造変化をシクロデキストリンとの相互作用によりモニタリングした結果を報告している。続く第13章ではナイルレッドヌクレオシドの疎水性に着目し、この分子を楔形塩基として用いることで、ヘリックスの内側にスタックしたピリミジン塩基を部位特異的にフリップアウトすることに成功している。

第14章と第15章は、DNA への機能性分子導入法の開発についてまとめている。第14章では、ホルミル基を有するユニットを DNA に導入し、ヒドラジンを有する機能性分子を導入する方法について述べている。第15章では、ビニル基を有するデアザグアニンを DNA 中に導入し、Diels-Alder 反応を介してマレイミド基を有する様々な機能性分子を導入する成功例を挙げている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、様々な蛍光性修飾核酸をデザインし、それぞれの発色団の蛍光特性の解明と応用を目標に研究した成果についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 特定の塩基と塩基対を形成したときだけ発光強度が大きくなる塩基識別型蛍光 (BDF) 核酸の開発を行った。これにより、従来のラベル化法としての蛍光分子では不可能な、サンプルを混合させて蛍光をモニタリングすることで多型を検出できる Homogeneous Assay を可能にした。また、実際にヒトゲノムサンプルの genotyping も行っており、実用面においても優れた研究である。
2. オスミウムによる酸化反応を利用してシトシンのメチル化を部位特異的に検出する方法を開発した。シトシンのメチル化は生体内で遺伝子配列を変更することなく遺伝子の発現を制御するエピジェネティックな機構として知られており、新規のエピジェノタイピング法としての応用が期待できる。
3. ポリメラーゼ内部の局所的誘電率の測定を可能にする環境応答型蛍光核酸の開発を行った。これまで困難であった蛍光特性から誘電率を見積もるための詳細な光化学測定法を確立した。静電相互作用を示す様々なタンパクについても応用可能であり、DNA とタンパクの相互作用についての詳細な情報が得られると期待できる。
4. ピレンとジメチルアニリンを結合させた二重蛍光性分子をデザインし、DNA の堅固な構造を利用して TICT の発光をコントロールすることに成功している。温度ではなく DNA の構造を利用した環境の変化による TICT の発光挙動の制御はこれまでに報告されておらず、光化学の観点からも画期的な成果といえる。
5. 通常の条件では導入が困難な機能性分子を DNA 合成後、穏和な条件により直接、部位特異的に導入できる鋳型修飾塩基を開発した。バイオマテリアルとして期待されている DNA の機能を拡張するための技術として有用である。

本論文で示された蛍光性修飾核酸塩基は、光化学的な現象としての有意性だけでなく、未知の生命現象解明に向けた解析技術としての応用も期待でき、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成18年2月17日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。