

氏 名	なり た あつし 成 田 敦
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学位記番号	工 博 第 2895 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 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	Development of New Sensing Technologies toward Non-Invasive Nucleic Acid Analysis (非侵襲的核酸解析に向けた新たな検出法の開発)
論文調査委員	(主 査) 教 授 青 山 安 宏 教 授 森 泰 生 教 授 濱 地 格

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は単一生細胞の遺伝子発現を時間的・空間的に観測する技術を目標に、新たな核酸配列検出法を開発する研究についてまとめたものであり、6章からなっている。

第1章では、細胞内での感度(S/N比)を向上すべく、標的遺伝子をアロステリックエフェクターとする自己切断型プローブ(TASC Probe: Target Assisted Self-Cleaving Probe)を設計している。TASC Probeは、蛍光・消光分子と標的遺伝子認識部位、並びにシス作用型DNAzyme配列をもち、①標的遺伝子との相補的水素結合による活性型DNAzyme構成形成、②DNAzymeによる自己切断に伴う解離・発光、③未切断プローブによる標的遺伝子との結合、の3ステップを経てシグナル増幅型遺伝子検出を行う。そのため、等温条件下において遺伝子のシグナル増幅が可能となり、試薬や酵素等を必要としない。DNAzymeとして8-17DNAzyme, FRETに利用する蛍光・消光分子としてはフルオレセインとダブルシル基を導入し、さらに標的核酸非存在下における自己切断反応を抑えるために分子内ヘアピン構造を形成するようなLocked TASC Probeを合成している。これを用いると、固定化した大腸菌細胞内のrRNAを共焦点顕微鏡により直接観察でき、等温条件下において遺伝子シグナルが増幅できることを確認している。

第2章では、原核細胞適合型の遺伝子発現検出に向けて、非修飾RNAを用いた遺伝子発現検出法の開発を行っている。原核細胞のriboregulation機構に着目し、高次構造変化によって翻訳制御可能なmolecular beacon型mRNA(MB-mRNA)プローブを設計・作成している。レポータータンパク質として酵素活性をもつluciferaseを選択し、2段階の触媒的シグナル増幅を含んだ遺伝子検出を行った。標的核酸配列認識部位をloop部に導入することにより、標的核酸存在下においてのみリボソーム結合部位(RBS: ribosome binding site)が稼動状態となり、レポータータンパク質luciferaseの生成とその発光が見られた。MB-mRNAシステムは原核細胞のタンパク質翻訳システムを利用し、ゲノム及びプラスミドより直接転写可能な非修飾RNAをプローブとする前例のない遺伝子検出法である。

第3章では、第2章で開発したMB-mRNAシステムにRNase Hを共存させることによって検出感度の向上を試みている。標的核酸配列存在下において、MB-mRNAのループ部位が切断され、等量以上のMB-mRNAが活性化される。大腸菌抽出溶液中にて、標的核酸によるon/off効率の上昇と配列選択性の改善を確認している。さらに、レポーターとして β -galactosidase遺伝子を有するMB-mRNAを作成し、*in vitro*解析に特化したDNA配列の1塩基精度での可視化検出系の構築にも成功している。

第4章では、細胞内における切断や非特異的結合による偽陽性シグナルの問題を克服すべく、プローブと蛍光色素が独立した遺伝子検出法を構築している。従来から細胞内の核染色に使用される環境応答性蛍光色素を改変し、特定核酸配列もしくは構造に結合した場合のみ蛍光を発する機能性蛍光分子へと進化させる手法を開発した。細胞膜透過性を有する細胞核染色分子Hoechst 33258に種々の修飾を施した改変ライブラリの中から、本来の結合標的であるB型DNAとの親和性が抑制された改変色素(di-*t*Bu-Hoechst)を選択し、次に、この改変色素に結合する特定DNA配列(DNA-aptamer)を

SELEX法によって探索した。その結果、得られたDNA-aptamer 依存的に強い蛍光を発する生体直交性を有するLight-Up 蛍光色素/DNA配列ペアの創製に成功している。改変Hoechstに得られたDNA-aptamerを加えると、100倍以上の蛍光強度増幅が見られた。続いて、得られたヘアピン型DNA-aptamerを分割し、標的配列認識部位を持たせたbinary probeを作成した。binary probeと改変Hoechst存在下において1塩基識別能を有する高感度標的核酸配列の検出に成功している。

第5章では、蛍光タンパク質（FP：fluorescent protein）を用いたタンパク質発現のリアルタイム解析法を参考に、mRNAのリアルタイムな局所化解析・発現検出を目指した蛍光性RNA配列（FR：fluorescent RNA）を創製している。第4章で開発した探索法を用いて、Light-Up 蛍光色素/RNA配列（RNA-aptamer）ペアを創生した。本来、B型DNAが結合標的のHoechst色素を改変して得られたdi-tBu-Hoechstであるが、得られたRNA-aptamerを加えると、50倍程度の蛍光強度の増幅が見られた。次いで、そのRNA-aptamerをRNAタグ配列（FR）として用いた融合mRNAの転写モニタリングを実施した。改変Hoechst存在下において、タグ配列をもたないmRNAの転写においては蛍光の増加は見られなかったのに対し、タグ配列を3'末端に有するmRNAの転写では、時間とともに蛍光増加が見られ、mRNAの転写モニタリングが可能であることを明らかにしている。

第6章では、真核細胞適合型の遺伝子発現検出に向けて、非修飾RNAを用いた遺伝子発現検出法の開発を試みている。真核細胞のRNA干渉（RNAi：RNA interference）の機構に着目し、核酸配列依存的な構造変化によって遺伝子抑制が可能なMB型siRNA（short interfering RNA）システムを構築した。標的核酸配列認識部位をloop部に導入したMB型shRNA（short hairpin RNA）を用い、HeLa細胞内においてサイレンシング実験を実施した。標的核酸存在下にてサイレンシングが活性化され、luciferaseの発現抑制が起こることをsiRNAの抑制標的であるluciferaseの発光強度により確認している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、単一生細胞の遺伝子発現を時間的・空間的に観測する技術の確立を目標に、新たな核酸配列検出法を開発する研究についてまとめたものであり、得られた主な成果は次の通りである。

1. 細胞内条件で酵素活性を有するDNAzymeを利用し、等温条件下において外来の酵素・試薬等を必要としないシグナル増幅型遺伝子発現診断プローブ（TASCプローブ）を開発した。TASCプローブを用い、固定化大腸菌細胞内rRNAの等温条件下におけるシグナル増幅検出に成功した。

2. 原核細胞のriboregulation機構に着目し、核酸配列依存的な構造変化によって翻訳を制御することができるmolecular beacon型mRNA（MB-mRNA）を設計・作成した。レポータータンパク質にluciferaseを用いることにより、原核細胞自身のタンパク質翻訳システムを利用した標的核酸配列の検出法を構築した。

3. MB-mRNAシステムにRNase Hを共存させることにより、*in vitro*解析に特化した高感度なDNA配列検出法を構築した。さらに、レポータータンパク質として β -galactosidaseを有するMB-mRNAを構築し、これを用いた標的遺伝子の1塩基精度での可視化検出に成功した。

4. 細胞内の核染色に使用される環境応答性蛍光色素Hoechstを改変し、特定核酸配列/構造に結合した場合にのみ蛍光を発する機能的蛍光分子へと進化させる手法を開発した。また、得られた改変色素とそれに対するDNAアプタマーを用いた1塩基精度の核酸配列検出系を構築した。

5. 特定RNA配列存在下においてのみ蛍光を発する改変Hoechst色素/RNAペアを創製した。このRNA配列をタグとする融合RNAを用いることによりmRNAの転写モニタリングが可能であることを明らかにした。

6. 真核細胞のRNA干渉（RNAi）機構に着目し、核酸配列依存的な構造変化によって制御可能なmolecular beacon型siRNA（MB-siRNA）を設計・作成した。また、HeLa細胞内での遺伝子発現がターゲットとした核酸配列依存的に抑制されることを見出し、新たな遺伝子検出法として応用できることを明らかにした。

本論文は、上記の通り、細胞適合性を有する新たな核酸配列検出手法を明らかにしたものであり、学術上、実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19年1月29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。