

氏名	ナゲンドラ　クマー　カミセティ NAGENDRA KUMAR KAMISSETTY
学位(専攻分野)	博士 (エネルギー科学)
学位記番号	エネ博第 145 号
学位授与の日付	平成 19 年 1 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	エネルギー科学研究科エネルギー社会・環境科学専攻
学位論文題目	Development of Advanced DNA Microarray System by High Density Amine Functionalization of Solid Surface and Functional Design of DNA Probes (固体表面の高密度アミノ化および DNA プローブの機能設計による先進的 DNA マイクロアレイシステムの開発研究)
論文調査委員	(主査) 教授 牧野圭祐　教授 尾形幸生　助教授 小瀧 努

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、遺伝子情報を基本とした新しい診断技術である DNA マイクロアレイ開発において必須の技術であるプローブ固定化法に関して行った研究の成果を纏めたものであり、以下の 5 章からなっている。

第 1 章は序論で、DNA アレイに関する概説、作製法、関係する化学、プローブとして使用する DNA オリゴマー、基板として用いるシリカ担体およびその改良法、プローブ DNA の基板への固定化、得られるデータの解析法、等に関して詳細を纏めている。

第 2 章では、DNA プローブを固定化してマイクロアレイ化する基板として用いるガラスの表面改良法の開発に関する研究結果を纏めている。DNA マイクロアレイの作製では、顕微鏡用カバーガラスの表面をより均一化したものを用い、化学修飾によってこの表面を反応性とし、個々に異なる塩基配列を持った DNA プローブ溶液（数ピコリットル）をその上にスポッティングして固定化し（多いときは数万スポット）、このスポット上で蛍光標識した標的 DNA 断片とのハイブリッド形成を行い、プローブと相補的な塩基配列をもった標的 DNA の有無を高性能蛍光スキャナーで検出・解析して被検者の個性の差別化を行う。しかし市販されている DNA マイクロアレイに関しては、スポットの変形や位置の変位などに加え、固定化反応が不十分なために起きるプローブ分子の剝離が大きな問題として残っている。本章では、数ピコリットルのプローブ液滴の溶媒蒸発時間内でプローブ固定化反応が完結することを目標に、適切なガラス表面化学修飾法が詳細に検討されており、その結果がまとめられている。ガラス表面のシラノール基への化学反応によって導入されたアミノ基が未反応シラノール基と水素結合あるいはイオン対を形成して存在することによって活性が低下することが原因であるという仮定の下、化学的修飾法によってガラス表面にアミノ基を導入するに当たり、アミノ基導入後に未反応シラノール基に付加的に短鎖アルキル基を導入することによって未反応シラノールとアミノ基の相互作用を除去し、アミノ基の反応性低下を防止する方法を開発している。本研究では、導入したアミノ基に安定蛍光色素（Cy3-*N*-hydroxysuccinimide）を結合して活性アミノ基量の経日的変化を精密計測する方法を開発し、日本ガイシ(株)開発の最先端精密スポットターを使用することによって位置・形状の安定したスポッティングを行い、蛍光スキャナーによって個々のスポットの精密な解析を行い、導入アミノ基の反応性変化を詳細に測定して開発した固定化方法の効果を評価することによって、適当なアルキル鎖長および最終的に得られる表面化学構造の適切化の指針を纏めている。また、ガラス表面の接触角測定を行い、得られたガラス表面の疎水性とアミノ基活性との関係を数値的に評価し、短鎖アルキル基導入がもたらすアミノ基の反応性向上効果を数値として表している。高精度スポットターおよびスキャナー等の特殊解析装置、さらには測定結果の信頼性を確保するために必要な膨大な試料量の調製等が要求されるため、今日まで未解決であった本課題が詳細に記載された初めての報告である。

精緻で高い安定性を持った DNA マイクロアレイ作成にとって重要な第二の課題はプローブとして用いる DNA オリゴマーの供給である。本論文では、活性化ガラス表面に導入するプローブ DNA の適切な構造に関しても検討を行い、結果を第

3章に纏めている。その一つはアミノ基反応性塩基であるデオキシオキザノシンを鎖中に持ったDNAオリゴマーの調製法開発であり、新規なDNAオリゴマー合成法を纏めている。他の一つはH-ホスホネート法を用いたアミノ基を有したDNAオリゴマーの簡便合成法の開発であり、アミノ基の保護基として trifluoroacetyl 基を、5' 端保護基として monomethoxytrityl 基を用いるこれまでの複雑で安定性を欠くアミノ基含有DNAオリゴマー合成法の欠点を克服し、さらには重要な要素である低コスト化に成功している。反応性官能基をもった新規構造DNAオリゴマー調製法開発の結果が示されている。

第4章には、上で述べた2種類のDNAオリゴマーのガラス表面への固定化に関する結果が纏められており、アミノ基修飾を行ったガラスへのデオキシオキザノシンを含有したDNAオリゴマーの固定化ならびに市販の活性化カルボキシル基をもった表面へのアミノ化DNAオリゴマーに関する結果を詳細に示している。第2章で示されたアミノ基導入を行った後にアルキル基を導入したガラス表面へ、デオキシオキザノシンを有したDNAオリゴマーがより効果的に導入され、本研究のガラス表面活性化法が有効であったこと、さらにはこのプローブが過酷な条件下で高い安定性を示し、本研究で開発されたガラス表面の活性アミノ化が有効であり、またデオキシオキザノシンが有効なリンカーになりうることを示されている。さらには、アミノ基を導入したDNAオリゴマーが同様に簡便かつ有効な固定化能ならびに固定化された後の高いハイブリッド形成能を有することが纏められている。

第5章には、全体の結論が纏められている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、遺伝子情報を基本とした新しい診断法における基本技術DNAマイクロアレイ開発において必須の技術である、プローブ固定化法に関して行った研究の成果を纏めたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

DNAマイクロアレイ調製では、種々の塩基配列のプローブDNAを、数ピコリットルの液滴として、多いときは数万滴一枚の表面修飾ガラスに塗布して固定化し、これと相補的な塩基配列をもった試料DNA塩基配列の有無を検出して被検者の個性の差別化を行うが、検出結果の信頼性確保が強く希求されてきた。これを達成するためには、数ピコリットルの液滴の溶媒の蒸発時間内でプローブDNAの固定化反応が完結しなければならない。第一の課題は基板ガラス表面の活性化法改良であるが、本研究では、シラノール基への化学的修飾法によってアミノ基を導入するに当たり、導入後に付加的短鎖アルキル基導入を施し、未反応シラノールとの相互作用によるアミノ基反応性低下防止法を開発し、さらには至適化のための諸条件の決定を行っている。この研究を高精度に行うために、導入したアミノ基に蛍光色素を結合して活性アミノ基量の経日的変化を計測する方法を開発し、日本ガイシ(株)開発の最先端スポッターを使用することによって、導入アミノ基の経時的反応性変化等を詳細に測定し、開発した方法の効果を評価している。また、得られたガラス表面の疎水性とアミノ基活性との関係を数値的に評価し、実際に短鎖アルキル基導入がもたらす効果を実証した。第二には、活性化ガラス表面に導入するプローブDNAの適切な構造に関する検討を行い、効果的かつ正確な標的塩基配列検出システム構築に成功している。

以上、本研究は、膨大な遺伝子情報を迅速に計測するDNAマイクロアレイ開発に関し、微細スポット上で行う研究の困難さを克服し、診断結果の高精度化の重大な課題である安定なDNAマイクロアレイ開発に大きな貢献を行ったと評価する。よって、本論文は博士(エネルギー科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成18年11月29日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。