

氏 名	カマシエヤ KAMAKSHIAH	チャリル CHARYULU	デバラヤパリ DEVARAYAPALLI
学位(専攻分野)	博 士 (エネルギー科学)		
学位記番号	エネ博第 153 号		
学位授与の日付	平成 19 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	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	Fabrication of DNA-immobilized solid surface and its use for the base-sequence-dependent detection of targeted nucleic acids in liquid phase (固体表面への DNA 固定化および液相塩基配列認識による標的認識法の開発研究)		
論文調査委員	(主査) 教授 牧野圭祐	教授 森井孝	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 マイクロアレイの中で、これまでに達成されていない転写産物の定量的解析法開発を目的とし、同様に研究例のないフロー系 DNA アレイを用いて行った研究の成果を纏たものであり、以下の 4 章からなっている。

第 1 章は序論で、一般的作製法を含む DNA アレイ全般に関する説明、核酸の特性を基盤とした検出の基本機序とプローブとして使用する DNA オリゴマーの調製、安定なプローブ DNA 固定化に必要な化学的背景、データ解析法、フロー検出法の過去の研究例等に関して詳細を纏めている。

第 2 章では、これまでに全く研究結果が報告されていないフロー系中での DNA オリゴマー分離法の開発結果がまとめられている。この研究で採用した分離・検出原理は、標的 DNA オリゴマーと相補的塩基配列を持ったプローブ DNA オリゴマーをキャピラリー内壁に固定し、これに標的 DNA オリゴマーを含む試料溶液を通液し、固体表面上で標的とプローブの二重鎖形成を行い、これを溶液中における両鎖の二重鎖の融解温度付近に昇温することで二重鎖解離を誘発し、この化学平衡を制御することによって標的 DNA オリゴマーの溶出の遅れを生じて検出することを基本としているが、これを達成するために必要なパラメーターは全く不明であった。本研究ではパラメータ数を最小にして系を単純化するために、長さ 30 cm、内径 75 μm の、いわば最小単位の中空キャピラリーカラムを用いた系を採用し、カラム内壁に対しては 3-aminopropyltrimethoxy silane 固定化によるアミノ基導入、butyltrimethoxysilane による未反応シラノールのキャッピングによるアミノ基反応性の向上、disuccinimidyl glutarat によるアミノ基の活性化、5' 端をアミノ化した DNA オリゴマーの固定化、によって長期使用に耐えうる DNA アレイカラムを作成した。キャピラリー内壁の表面積は限られているために固定化されたプローブ分子量が少ない。このため、この系で測定するための工夫が施されており、カラムは昇温機能をもったオープンに固定し、カラム入り口をナノリットル/分の送液が達成できるポンプに装着されたナノリットルの試料注入装置に結合し、出口をキャピラリーを通過する溶液を直接検出できるように改造した 268nm 紫外検出器に結合し、システムを構築した。種々条件を探索してこの系を作動することに成功し、初めて標的とプローブ DNA オリゴマーの二重鎖形成によるピークを検出することに成功している。特に、二重鎖融点の接近した二つの標的 DNA オリゴマーについても、二重鎖融点付近の温度勾配を選択することによって二つの異なるピークとして検出することに成功している。また、一塩基のミスマッチをもつ標的 DNA オリゴマーが、ミスマッチの位置が異なる場合には異なる位置に溶出することも明らかにされている。またピーク面積は標的の量を示すため、単純な系を駆使して、流路系で標的とプローブの二重鎖形成を行い、DNA オリゴマーを塩基配列選択的にしかも定量的に計測する方法を発見している。

第 3 章には、アミノ基修飾を行ったガラス表面へ効率よくしかも副生成物を残すことなくプローブ DNA オリゴマーを固定化するための開発の結果が示されており、特に市販の DNA マイクロアレイ作成で用いられる 80 度付近での Baking が活

性化を行っていないカルボキシル基とアミノ基の反応を誘発することを明らかにし、これに代わる方法として、鎖中にアミノ基と直接反応する構造をもったオキザニン塩基を導入した DNA オリゴマーの反応条件を精査している。その結果、系の温度と湿度を変化し、反応時間を調節することで高いプローブ固定化率が達成でき、紫外線照射等と組み合わせることによって、長期使用に耐える DNA アレイ調製が可能であることを示している。

第4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規診断技術である DNA マイクロアレイ法開発研究において未検討課題である転写産物の定量的解析法開発を目的とし、プローブ DNA を固定化したキャピラリーカラム中でのフロー系中標的分離・検出法の開発に関する。固定化プローブ DNA オリゴマーを用いてフロー系で標的 DNA オリゴマーを分離・検出する方法も、装置開発の困難さから未検討であった。本論文では、シリカキャピラリー内表面をアミノ化し、ブチル基修飾によってアミノ基反応性を向上した後、5' 端にアミノ基を持った DNA オリゴマーを活性化剤を用いて固定化して長期使用に耐える安定な分離・検出カラムを作成した。入り口部分をナノリットル試料注入装置を介してナノリットル/分の流量を制御できるポンプと結合し、市販装置を改良して作成した検出器に出口を結合した。キャピラリーカラムは昇温機能をもったオープン内に固定した。本システムを用いて、プローブ DNA オリゴマーの相補鎖を標的とし、これらの作る二重鎖の溶液中融解温度付近で温度条件等を変化させて測定を行い、非相補鎖や一塩基が異なる試料と標的を分離・検出する条件設定に成功し、さらには融解温度付近のゆるい勾配の温度グラジエントを施すことによって、溶液中二重鎖融解温度の接近した試料の分離にも成功している。詳細な検討の結果、本論文で組み立てられた試作的システムが、生体試料から得られる DNA オリゴマーの塩基配列依存的分離に対して有効であることを明らかにしている。また、固定化する DNA オリゴマー構造に関してもアミノ基指向性反応性塩基オキザニンの応用の可能性を探り、これを鎖中に有した DNA オリゴマーの固体表面アミノ基への反応はもとよりオキザニンの使用条件を明らかにし、オキザニンが生体試料中の DNA オリゴマーの分離・検出に有効に使用できるリンカーであることを示しており、総合的に定量性をもった新規 DNA オリゴマー検出法開発への大きな貢献を行った。

以上、本研究は、膨大な遺伝子情報を迅速計測する DNA マイクロアレイ開発に関し、未検討課題であったフロー系での分離を基盤とする方法の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19年1月25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。