

氏 名	かわ ぞう なお き 川 添 直 輝
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 1794 号
学位授与の日付	平 成 11 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 材 料 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	SYNTHESIS OF NOVEL MOLECULAR RECOGNITION POLYMERS BY COMBINATORIAL CHEMISTRY

(コンビナトリアル化学による新規な分子認識高分子の創製)

(主査)

論文調査委員 教授 小林 四 郎 教授 田 中 渥 夫 教授 今 中 忠 行

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、コンビナトリアル化学の手法を用いて、新しい分子認識高分子の創出を行った結果をまとめたもので、序論と3編6章および結論からなっている。

序論においては、新しい分子認識高分子の創出に、コンビナトリアル化学、特に、進化分子工学あるいは試験管内進化法と呼ばれる方法が非常に有効であることを述べている。

第一編においては、天然核酸を用いて、試験管内進化法を遂行し、標的分子に特異的に結合するオリゴ核酸を選別し、クローニングによりその配列を明らかにした。

第1章では、抗ガン剤メトトレキセートに特異的に結合するDNAアプタマー (aptamer, ラテン語のfitに相当するaptusから派生した造語) の試験管内進化法による選別に成功した。まず、60塩基のランダム配列を有するDNAライブラリーを固相法により調製した。これを、メトトレキセートが固定化したゲルを充填したカラムを通過させ、結合するDNAを回収した。これをポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法で増殖させ、再度メトトレキセート固定化ゲルによるアフィニティ選別を行った。この一連の操作を6回繰り返すことにより、固定化メトトレキセートに特異的に結合するDNAが選別された。さらに、DNAがクローニングされ、配列が決定された。得られたDNAアプタマーは、特定の三次構造を形成することにより、メトトレキセートに結合することが明らかにされた。

第2章では、甲状腺ホルモンとして臨床分析上重要なサイロキシンに特異的に結合するDNAの選別が行われた。ここでも、第1章と同様な方法で60塩基のランダム配列を有するDNAライブラリーから、サイロキシン固定化ゲルを用いアフィニティ選別を行い、PCR法での増殖を行う操作を繰り返し、固定化サイロキシンに特異的に結合するDNAが選別された。選別されたDNAプールの中から30クローンを選び、クローニングすると、その内8クローンが12塩基からなる共通配列を有することがわかった。この共通配列だけからなるDNAを固相法で合成し、サイロキシンへの結合率を測定すると、約15%の結合率となった。NMR測定から、このDNAはステムループ構造を有することがわかった。

第二編においては、試験管内進化法で得られたDNAアプタマーの分析化学への応用が述べられている。

第3章では、有機染料、リアクティブ・グリーン19 (RG19) と特異的に結合するDNAアプタマーを用いて競争結合アッセイができることが明らかにされた。RG19を固定化したゲルに予めビオチンで標識したDNAアプタマーを結合させておき、ここに溶解状態のRG19を添加すると、加えた量に比例してDNAアプタマーが解離して、その量をビオチン濃度を定量することにより判断することができた。

第4章では、DNAアプタマーを用いて組織染色が可能であることが示された。葉酸を固定化したゲルを用いて、試験管内進化法により、葉酸に特異的に結合するDNAアプタマーを選別した、選別したアプタマーをクローニングすることなく、その蛍光物質であるフルオレセインで標識したプライマーとともにPCRすることにより、標識した。そしてこれを水溶液

として、その中に葉酸をマイクロパターン状に固定化したフィルムを浸せきした。すると、フィルム上の葉酸が固定化された領域にのみ、蛍光標識アプタマーが結合することが、レーザー顕微鏡観察で明らかになった。これによりアプタマーによる局所的組織染色が可能であることが示された。

第三編においては、非天然核酸が試験管内進化法に適用可能であり、これにより新しい機能性オリゴ核酸が合成できることが明らかにされた。

第5章では、ビオチン標識RNAを用いてアデノシン三リン酸(ATP)に結合するアプタマーが選別された。ビオチン標識シチジン三リン酸(CTP)の存在下、ランダム配列DNAを鋳型として転写反応を行い、ランダム配列の側鎖にビオチンを有するオリゴRNA集団を合成した。これをATP固定化ゲルに加え、結合するオリゴRNA集団のみを分離した。これを逆転写反応により天然型のDNAにしたあと、PCR反応により増幅し、再びビオチン標識CTPの存在下で転写反応をし、この集団中から、ATP結合性のビオチン標識RNAを選別した。この操作を繰り返すことにより、ATPに結合するビオチン標識RNAを得、クローニングして配列を決定した。選択されたRNAアプタマーは側鎖に複数のビオチンを有し、分子センサーとして応用できることが明らかにされた。

第6章では、アミノ基を有する非天然RNAを用いて、メチルメソポルフィリンと特異的に結合するアプタマーが選別された。N-メチルメソポルフィリンは、ポルフィリンの金属取り込みの遷移状態アナログとなる。第5章と同様の方法で選別された非天然RNAアプタマーはポルフィリンの銅イオンの取り込み速度を加速することがわかった。

最後は結論であって、本研究で得られた成果がまとめられ、新しい分子センサーや高分子触媒のような分子認識高分子がコンビナトリアル化学の手法を用いて設計、合成できることが論じられている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、コンビナトリアル化学の手法により、新しい分子認識高分子を創出することを目的として行われた研究の成果をまとめたものであって、得られた成果は次の通りである。

1. 抗ガン剤メトトレキセートや甲状腺ホルモンであるサイロキシンのような分析化学上重要な化学物質を特異的に認識して結合するDNAの選別が、コンビナトリアル化学のなかでも試験管内進化法の手法を用いて可能となることがわかった。
2. 選別されたDNAアプタマーは、分析化学や臨床分析において、従来の抗体の代替えとして応用できることがわかった。
3. プローブとなる官能基を自在に導入した核酸アプタマーが合成でき、高感度分子センサーとして、今後は新しい分析手段として発展させられることがわかった。
4. 核酸に種々の官能基を導入した新しいアプタマーが選別できることより、これまでの酵素やリボザイムを超えた新しい高分子触媒が自由自在に設計、合成できることが明らかにされた。

以上、要するに本論文はコンビナトリアル化学の手法の一つ試験管内進化法による、核酸を主鎖骨格とした新しい分子認識高分子の合成法を示したものであって、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)の論文として価値あるものと認める。

また、平成11年1月25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。