

(論文内容の要旨)

本論文には、生物医学分野で用いる蛍光プローブ、特に培養生細胞における1分子追跡のためのプローブとして応用するための蛍光性シリコンナノ結晶(SiNC)の開発が記載されている。各4章からなる本編2部、および総合考察と業績一覧を記載した第3部からなっている。2部の本編の各々は、次の4章からなっている。第1章は序論で、研究の背景・目的・意義について述べている。第2章は方法で、実験・分析・観察・データ解析の方法を記載している。第3章は結果と考察で、本研究で得られた実験結果を述べ、既存の蛍光プローブと比較し、SiNCの優れた物理的光学的性質について考察している。第4章はまとめであり、本研究で得られた結果をまとめ、生物医学分野への研究応用について述べている。

現在の蛍光法、特に1蛍光分子追跡法で使われている蛍光プローブには、3つの重大な問題がある。すなわち、(1) 蛍光退色の速さ、(2) 蛍光が明滅を繰り返すブリンキング、(3) サイズの大きさ、である。本学位申請者は、SiNCに着目し、これらの問題をすべて解決することを目指して開発をおこなった。また、これまで、SiNCの作製方法は非常に複雑であり、そのためか、物理的光学的性質はほとんど調べられていない。そこで、本研究では、まず、簡便でSiNCを効率的に作製する方法を開発した。さらに、バルク溶液中での測定だけでなく、1蛍光粒子観察法を駆使して、物理的光学的性質を明らかにした。また、親水的な表面コートの方法、生体分子を標識する方法を確立し、実際に生細胞の細胞膜上の受容体を、長時間、1分子追跡することに成功した。

以下、本編の内容を要約する。

本編第1部では、まず、親水性の赤色蛍光性 SiNC の簡便な作製方法の開発が記載されている。すなわち、111面のボロンドープされたp型単結晶シリコンウエハを用い、化学エッチングの後、SiNCをシラン化合物で反応させることで、生体分子の標識が可能な親水性の赤色蛍光性 SiNC (mSiNC) を開発することに成功した。さまざまな分析によって、このmSiNCの物理的光学的性質を明らかにすることで、現在の1分子追跡用蛍光プローブの3つの問題を基本的に解決し、1分子追跡に極めて適した蛍光プローブであることを示した。

さらに、世界に先駆けて、このmSiNCを特異的にタンパク質と1対1で結合させ、生きている細胞中で蛍光1分子追跡することに成功した。具体的には、血清中の3価鉄イオン運搬タンパク質であるトランスフェリン(Tf)とmSiNCを1対1で結合させる方法を開発した。

これを応用して、生きている細胞の細胞膜上で、受容体 1 分子を 2 分間以上連続追跡することにも成功した。これは、生細胞上での 1 分子追跡として、世界最長の記録である。また、これまで観察することのできなかった細胞膜上の受容体 1 分子が、細胞内に取り込まれる瞬間の可視化にも成功した。すなわち、この SiNC が、生細胞中での 1 分子追跡に非常に適した蛍光プローブであることを示した。

第 2 部では、第 1 部で開発した mSiNC をさらに改良した結果が記述されている。すなわち、水中での安定性を劇的に高め、サイズをさらに小さくした、青色蛍光を発する SiNC の開発が記載されている。まず、化学エッチングをさらに工夫することで、mSiNC より小さい結晶を生成した。さらに、アリルアミンで表面被覆することによって、シリコン表面を化学的に安定化し、粒子の表面を親水化し、アミノ基の存在によって生体分子への結合を可能とした (aSiNC)。aSiNC は均一な親水性粒子であり、青色蛍光発光を示すこと、水中で 30 日保存しても、性質が全く変わらないこと、物理的・光学的性質は、mSiNC 以上に、1 分子追跡に適していることを示した。さらに、aSiNC は、細胞中で少なくとも 3 日は安定であった。これは、蛍光標識された細胞を、動物の個体内に戻し、それらの細胞がどのように個体内で分布するかという、医学的に極めて重要な実験を可能にするものである。

以上の結果から、本研究で開発した SiNC は、多くの実験系において既存の蛍光プローブと置き換わり、大きな波及効果を与える可能性があると考えられる。

(論文審査の結果と要旨)

本論文は、生物医学応用のためのまったく新しい種類の蛍光プローブとして、蛍光性シリコンナノ結晶 (SiNC) を開発し、1 分子追跡への応用をおこなった成果をまとめたものである。得られた成果は2部に渡ってまとめられており、主な成果は次のとおりである。

第1部では、まず、親水性の赤色蛍光性 SiNC の簡便な作製方法の開発が記載されている。次に、この SiNC が、現在の蛍光法を用いた1分子追跡の蛍光プローブの、(1)速い蛍光退色、(2)蛍光が明滅を繰り返すブリンキング、(3)サイズの大きさ、という3つの問題をすべて解決するものであることを示した。さらに、この SiNC に特異的にタンパク質 (トランスフェリン) を1対1で結合させる方法を開発した。これを応用して、生きている細胞の細胞膜上で、受容体1分子を2分間以上連続追跡することにも成功した(具体的には、トランスフェリン受容体を用いた)。これは、生細胞上での1分子追跡として、世界最長の記録である。また、これまで観察することのできなかつた細胞膜上の受容体1分子が、細胞内に取り込まれる瞬間の可視化にも成功した。すなわち、この SiNC が、生細胞中での1分子追跡に非常に適した蛍光プローブであることを示した。

第2部では、水中での安定性を劇的に高め、サイズをさらに小さくした、青色蛍光を発する SiNC の開発が記載されている。また、物理的光学的性質を明らかにすることで、赤色蛍光性 SiNC 以上に、1分子追跡に適した蛍光プローブであることを示した。さらに、この SiNC は、細胞中で少なくとも3日は安定であることを示した。これは、蛍光標識された細胞を、動物の個体内に戻し、それらの細胞がどのように個体内で分布するかという、医学的に極めて重要な実験を可能にするものである。

本論文は、生物医学応用のための SiNC の開発と有用性を示したもので、学術的、実用上の寄与が大きい。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。

平成21年2月20日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。