

( 続紙 1 )

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                               |    |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 博士 (エネルギー科学)                                                                                                  | 氏名 | 松本桂彦 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Development of fluorescent probes for sequence-specific detection of DNA and RNA (DNAおよびRNAの配列特異的検出蛍光プローブの開発) |    |      |
| (論文内容の要旨) (枠内に1700字程度)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                               |    |      |
| <p>本論文は、簡便かつ正確に一本鎖DNAおよび一本鎖RNAの塩基配列を識別する蛍光プローブの開発を目的として、環境によって蛍光強度が変化する蛍光性核酸塩基を設計・合成し、これを用いた標的DNA配列を標識することなく検出できる蛍光プローブの作製と、標的DNAと二重鎖を形成(ハイブリダイゼーション)する際の正確さを向上させるためのPNAを用いた蛍光プローブの作製原理を論じた結果をまとめたものであり、全7章からなっている。</p> <p>第二章では、核酸塩基グアニンの8位にビニル基を介して芳香族化合物ピレンを共役させた蛍光性グアノシン誘導体を合成した。この蛍光性グアノシン誘導体は紫外光と可視光によってcis-trans異性化を引き起こすことがわかり、このフォトクロミックな核酸塩基の光化学的な特性を検討した。</p> <p>第三章では、グアニン塩基の8位からアミノアルキル基を介してピレンを連結させたグアノシン基誘導体 <sup>Py</sup>G を作製した。<sup>Py</sup>G を含むDNAは一本鎖状態では蛍光発光を示すが、二重鎖を形成すると蛍光が消光した。この性質を利用して、消光分子を用いる必要がないモレキュラービーコン型蛍光プローブを作製した。</p> <p>第四章では、第二章で作製した蛍光性グアノシンをもとにして、光異性化が起きないようにグアニン塩基の8位からエチニル基を介して電子吸引性のアセトフェノン及び電子供与性のジメチルアニリンを共役させた蛍光性グアノシン誘導体を設計、合成した。アセトフェノンを共役させた場合には、アセトフェノンが電子吸引基、グアニン塩基が電子供与基としてはたらき、push-pull型の色素を形成することにより、周辺の極性環境の違いによってその蛍光強度が大きく変化した。8位に電子吸引性置換基を共役させたグアノシンをDNAへ導入した蛍光プローブは標的DNA中のアデニンを特異的に検出することができた。</p> <p>第五章では、第四章でエチニル基でアセトフェノンを共役させたように、ビニル基でアセトフェノン共役させたグアノシン誘導体 <sup>Ac</sup>G を作製した。<sup>Ac</sup>G は、ビニル基を有するにもかかわらず光によるcis-trans異性化をほとんど起こさず、エチニル基で共役させたものに比べ、極性環境に対してより敏感に蛍光強度、蛍光波長が変化した。<sup>Ac</sup>G を用いることにより、相補的なDNAと二重鎖を形成すると蛍光波長が短波長シフトして色と蛍光強度が変化する蛍光DNAプローブを作製した。</p> <p>第六章では、シトシンーイノシン塩基対を含むペプチド核酸(PNA)/DNA及びPNA/RNA二重鎖を用いた蛍光プローブを作製した。シトシンーイノシン塩基対を含む二重鎖の熱的安定性が完全に相補的な二重鎖よりも若干安定性が低</p> |                                                                                                               |    |      |

下することを利用して、PNAによるDNAもしくはRNA配列の認識能を向上させることができた。この原理をもとにして、標的DNAもしくはRNAの配列の一塩基の違いを識別できる蛍光プローブを作製した。また、開発した蛍光プローブの塩基配列認識能が高いことを利用して、一塩基だけ異なる配列を有するDNAまたはRNAを異なる波長で同時に検出することに成功した。

生体分子には局所的に極性環境の異なる場所があるため、極性環境に敏感に蛍光が応答する蛍光色素は生体分子内の微妙な環境変化を検出するうえで有用である。DNAは一本鎖では親水環境にあるが、二重らせん構造を形成した際にはらせん内部が疎水環境になるため、極性環境に敏感に応答するpush-pull型の蛍光色素へと改変した核酸塩基をDNA鎖に組み込んだDNAプローブの作製原理を考案した。この蛍光核酸塩基を含むDNAプローブは標的DNAと二重鎖を形成した際に、導入した修飾塩基周辺の極性が変化し、それによって標的DNAを蛍光検出する事ができた。また、DNAプローブを設計する上での根本的な問題として、通常の二重鎖形成を利用するだけでは、一塩基レベルでDNAやRNA配列を厳密に識別することは難しい点にも着目した。プローブとして用いるPNA配列と相補的なDNA中のグアニン塩基をイノシン塩基に置換した擬似的な相補鎖を設計し、それと一本鎖PNAプローブにより準安定な二重鎖を形成させたプローブを用いると、PNAが一塩基違いのDNAと二重鎖を形成しにくくなるために、PNAプローブの配列認識能が向上した。この方法論を発展させて、イノシンを含むRNAを相補鎖としたPNAをプローブとして用いると、完全な相補鎖のRNAのみを特異的に認識することができた。

以上、本論文では極性環境に敏感に蛍光が応答する蛍光色素の開発と、そのDNAプローブへの応用、そして生化学的なDNAもしくはRNA検出の基礎である二重鎖形成法（ハイブリダイゼーション法）の精度を容易に向上させる手法を開発した。本法を既存のDNAもしくはRNA検出プローブに応用することで、これまでに広範に用いられてきたDNAもしくはRNAプローブ、そしてマイクロアレイなどの高速かつ高効率に遺伝子配列、遺伝子発現状況を検出する方法を高精度化できると期待される。本論文で開発した方法論を応用すると、これまで以上に正確にDNAもしくはRNA塩基配列情報を検知することができるようになるため、生物のエネルギー利用・変換機能を解明するための基盤技術となると期待される。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨) (枠内に800字程度)

本論文は、一本鎖のDNAまたはRNAを高い塩基配列特異性で簡便に識別する蛍光プローブの開発を行った。得られた主な結果は以下の通りである。

1. 二本鎖DNAの周辺と内部の極性環境の違いによって蛍光強度が変化する蛍光性核酸塩基を設計・合成した。蛍光性核酸塩基の光学特性を解析するとともに、これを用いて標的DNAを標識することなく検出できる蛍光プローブを作製した。グアニン塩基の8位からアミノアルキル基を介してピレンを連結させた<sup>py</sup>G塩基を含むDNAは一本鎖状態では蛍光発光を示すが、二重鎖状態では消光する性質がある。この性質を利用して、消光分子が不要なモレキュラービーコン型蛍光プローブの開発に成功した。

2. 標的一本鎖DNAとの二重鎖形成をより正確にするためにペプチド核酸(PNA)を用いた蛍光プローブを作製した。DNA配列認識能がDNAより高いPNAを用いた場合でも、標的とする一本鎖DNA配列の一塩基の違いを完全に識別することはできない。そこで、PNAを用いてDNA塩基配列を一塩基レベルで識別するために、シトシン-イノシン塩基対を含むDNAとの準安定な二重鎖を形成した蛍光性PNAプローブを作製した。このPNAプローブをRNA検出プローブとして応用し、一塩基だけ異なるRNA配列を逆転写反応やラベリング作業を行わずに高精度に検出できる蛍光プローブを開発した。

以上、本研究では、新しい原理にもとづく蛍光DNAプローブを開発するとともに、汎用的なDNAもしくはRNA検出の基盤である二重鎖形成の精度を飛躍的に向上させる手法を開発した。本法を既存のDNAもしくはRNA検出プローブに応用することで、すでに広い研究分野で用いられているDNAもしくはRNAプローブをも高精度化できることが期待できる。本研究は、高速かつ高効率に遺伝子配列、遺伝子発現状況を検出する方法への応用も可能と考えられるため、生物のエネルギー利用・変換機能を解明するうえでの基礎的な知見として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24年2月17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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降