

|               |                                                     |
|---------------|-----------------------------------------------------|
| 氏 名           | なが はら しゅん じ<br>永 原 俊 治                              |
| 学 位 の 種 類     | 博 士 (学 術)                                           |
| 学 位 記 番 号     | 博 甲 第 6 号                                           |
| 学 位 授 与 の 日 付 | 平 成 4 年 3 月 25 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 芸 学 研 究 科 機 能 学 専 攻                               |
| 学 位 論 文 題 目   | インターヌクレオチド部位を標識した DNA プローブの合成と<br>液相遺伝子検索への応用       |
| 審 査 委 員       | (主査)<br>教 授 牧 野 圭 祐<br>教 授 佐 藤 昌 憲      教 授 宗 川 吉 汪 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

本研究は、遺伝子を検査して遺伝性疾患や感染症の発症前診断を行う DNA プローブ法の開発に関する。DNA プローブ法とは、対象遺伝子の塩基配列に相補的な DNA をプローブとして用いて検体中の対象遺伝子の有無を判定する新規な方法であるが、放射性同位体の使用や B/F 分離（対象遺伝子とハイブリッドを形成したプローブと形成しなかったプローブを分離すること）の必要性に大きな問題がある。この研究では、非放射性 DNA プローブを添加して分光学的測定を行うだけで対象遺伝子を検出（液相遺伝子検索）する新しい DNA プローブ法を確立することを目的としている。具体的には、ホスホロアミダイト法とハイドロジェンホスホネート法を組み合わせ、オリゴヌクレオチドに電子スピン（4-アミノ-TEMPO）あるいは蛍光色素（フルオレセイン）を導入し、プローブを合成することに成功した。これらと対象遺伝子のハイブリッド形成は EPR 法と蛍光偏光解消法により検出した。ラベルの導入は 5'側インターヌクレオチド結合に行った。またラベルの導入によって生成したホスホロアミデート結合のリン原子に関する立体異性体は RPLC を用いて単離した。両ラベルオリゴヌクレオチドは、天然型オリゴヌクレオチド同士のハイブリッドと同等の融解温度で天然型相補鎖と安定なハイブリッドを形成した。また、蛍光ラベルオリゴヌクレオチドの励起ならびに発光スペクトル、蛍光量子収率、蛍光寿命に関する測定を行い、フルオレセインが核酸塩基間にインターカレーションしないことを確認した。CD スペクトルの測定からは、ラベルオリゴヌクレオチドと相補鎖のハイブリッドが B 型の二重らせん構造をとることも確認している。これらの標識プローブを用いて液相での相補鎖とのハイブリッド形成を詳細に検討し、スピンラベルプローブでは相補鎖形成による見かけの分子量の増加にともなった EPR スペクトルの線幅増加を、蛍光ラベルの場合は蛍光の異方性 (r) の増加を指標に、ハイブリッド形成を検出することができることを見いだした。さらにはここで開発した液相遺伝子検索を核酸の高次構造解析に用い、M 13 mp 8 ssDNA 中の Eco RI

認識領域の検出、さらには 5 S-rRNA のループ構造領域の検出に成功している。さらに、D ならびに  $^{14}\text{N}$  で標識した 4-アミノ-TEMPO を合成して用い、非標識電子スピンと組み合わせて用い、対象遺伝子の異なる領域を同時に検索することにも成功し、検出精度の向上を行った。

### 論文審査結果の要旨

永原俊治の博士論文について詳細な審査を行った。論文のまとめ方は詳細かつ論理的であり、高く評価する。論文の内容については、以下に示したように、多くの新しい結果が含まれていることを高く評価する。本論文に記載されている新規な点とは、(1)遺伝子検索は今日では診断の不可能なあるいは非常に困難な疾病などを精度よくしかも迅速に行うことを目的として開発されつつある新しい方法であり、社会的にも大きな期待の寄せられている方法である。この方法の具現化のために科学的に明らかにされなければならない点についての調査が非常に克明に行われている。(2)液相遺伝子診断法の開発は、既知遺伝子診断法の最大の問題点である放射性同位元素の使用ならびに B/F 分離を回避するために行われたが、これは報告例のない新規な取り組みである。このための方法論の選択ならびに用いるプローブの分子設計が詳しく報告されている。(3)世界に先駆けて EPR 法ならびに蛍光偏光解消法という分光学的方法を取り入れており、未知の方法を遺伝子診断に用いるための基本的取り組みが行われ報告されている。(4)標的遺伝子とのハイブリッド形成を妨げないプローブを用いるという基本構想に基づき、電子スピンならびに蛍光色素標識したプローブの分子設計が計画的に行われており、これを二つの異なったオリゴヌクレオチド合成法を駆使して合成することに成功している。またこの新規な分子について生じる異性体の持つ特性についても詳細な検討が加えられている。(5)開発した方法論を用い、巨大 DNA ならびに RNA の特異的構造の検出に成功している。(6)検出精度向上のために、D ならびに  $^{14}\text{N}$  で標識した電子スピンを合成してプローブを標識し、多重検出にも成功している。

以上、本研究は詳細かつ論理的に展開されている。記載内容は、有機合成化学、物理化学、生化学の総合的知識と方法論を要求するが、学位申請者はこれらを十分に収得して研究を計画的に遂行しており、高い水準にある研究報告としてまとめている。記載内容は 8 編の国際的学術雑誌に既に報告されており、本学の博士号（学術）を授与するに十分値するものと結論する。