

氏 名	さかもと たかし 坂 本 隆
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 3 7 1 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規程第 3 条第 3 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	Novel Approaches for the Real-time Detection of Biomolecules (生体分子のリアルタイム検出のための新たな手法に関する研究)
審 査 委 員	(主査) 教授 村上 章 教授 田嶋邦彦 教授 山口政光 国立循環器病センター生体工学部長 山岡哲二

論文内容の要旨

近年、DNA チップ、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ、プロテインアレイなど、高感度かつ高いスループットで生体分子を検出できる手法が盛んに研究されている。これらの手法により、ゲノミクスやプロテオミクスなどの網羅的な研究が可能となり、その成果をもとにした創薬や病気診断法の開発などが期待されている。しかし、これらの手法は時間分解能が低く、経時的なより高度な生体分子解析が困難であるため、より高い時間分解能をもち、高感度かつ網羅的に生体分子を検出できる手法が求められている。

以上の背景より、本論文では *in situ* で高感度に生体分子を検出し、かつ生体分子間相互作用を解析できる手法を論じている。**Part I** では蛍光偏光解消法に基づく新規手法について、均一溶液中での核酸、タンパク質のリアルタイム検出法としての有用性を明らかにしている。**Part II** では固相上で遺伝子検出を行う RNA チップならびに DNA チップの開発を行い、検体の蛍光ラベルの操作を必要としないリアルタイム検出法への応用可能性を示している。

Part I ではオリゴ DNA-RNA 間相互作用の新規検出法として蛍光偏光解消法に基づく手法を開発している。蛍光修飾核酸プローブを用い、相互作用における蛍光異方性の時間変化から、オリゴヌクレオチドと RNA の相互作用のリアルタイム検出および速度論的な解析が可能であることを明らかにしている。また、蛍光修飾核酸プローブとして、長寿命性の Ru 錯体 ($\tau = 500\text{ns}$) で修飾したオリゴヌクレオチド (Ru-probe) を合成し、16S rRNA との相互作用に伴う時間分解蛍光偏光解消を測定した結果、RNA 鎖の運動性を評価できることを明らかにしている。さらに、長寿命性蛍光プローブを用いた時間分解蛍光偏光解消法は、生体微量成分等の夾雑物存在下でのタンパク質の高感度検出を可能にすることを明らかにし、本法がタンパク質の高感度リアルタイム検出に応用可能であることを論じている。

Part II では、固相型核酸検出チップの開発を論じている。2'ピレン修飾 RNA プローブをガラス表面に固定した場合、相補的な RNA を添加した場合にのみ蛍光増大が起こることを明らかにし、RNA 選択的検出用マイクロチップとして有用であることを示している。また、イオン感応電界効果トランジスタ (ISFET) を用いた遺伝子検出用 DNA チップの開発も行っている。このセンサー

はハイブリダイゼーションに伴う負電荷の集積を捕らえることができ、相補的な配列を持つオリゴ DNA を添加したときにのみ正の出力が得られることを明らかにしている。

論文審査の結果の要旨

本論文は 21 世紀の医療に欠かせない遺伝子診断ならびに遺伝子治療に関する。本論文では病気の早期診断や難病治療に求められる遺伝子診断法ならびに生体微量タンパク質の高感度リアルタイム解析を可能にする手法を論じている。Part I では遺伝子制御分子（アンチセンス核酸）の分子設計に不可欠な対象 RNA 分子の構造解析や生体微量成分の検出を目的とした、蛍光偏光解消法に基づく解析手法（液相法）を論じている。また、時間分解蛍光解消法を採用して、生体試料解析の障害となっている夾雑物の影響を最小にする手法を開発している。Part II では、将来の遺伝子治療に求められる網羅的遺伝子解析に重要な、固相 RNA ならびに DNA 解析チップの開発を新規な概念に基づいて行っている。これらの解析法は新規かつ優れたもので、この手法に関する特許も出願している。今後その重要性を増すものと考えられる。

本論文は審査を経て掲載された以下の 2 編の学術論文、ならびに投稿中の学術論文 1 編、参考論文 1 編をもとに構成されている。

〈学術論文〉

1. Time-resolved luminescence anisotropy-based detection of immunoglobulin G using long- lifetime Ru(II) complex labeled protein A. Takashi Sakamoto, Atsushi Mahara, Tatsuya Munaka, Koich Yamagata, Reiko Iwase, Tetsuji Yamaoka, and Akira Murakami
Analytical Biochemistry, **329**, 142-144. (2004)
2. Analytical method for estimation of kinetics of oligonucleotide/RNA hybridization using fluorescence depolarization spectroscopy. Takashi Sakamoto, Atsushi Mahara, Reiko Iwase, Tetsuji Yamaoka, and Akira Murakami. *Analytical Biochemistry*, **in press**
3. Evaluation of dynamic feature of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA in homogeneous physiological solution. Takashi Sakamoto, Atsushi Mahara, Koich Yamagata, Reiko Iwase, Tetsuji Yamaoka, and Akira Murakami. submitted

〈参考論文〉

1. Study on structure of ribosomal RNA by time-resolved luminescence anisotropy analysis. Takashi Sakamoto, Atsushi Mahara, Reiko Iwase, Tetsuji Yamaoka, and Akira Murakami. *Nucleic Acids Research Supplement*, **1**, 143-144. (2001)

以上、本論文で論じられている蛍光偏光解消法をもとに構築した遺伝子解析法は新規性が高く、また、従来困難であった生体高分子の局所的な運動性解析を可能にするなど、今後の遺伝子診断、遺伝子治療の展開に大いに寄与するものであると考えられる。また、長寿命蛍光剤を用いた相互作用解析法は細胞機能解析にも応用できるなど、生命科学の広い分野への応用が考えられ、本論文は学術的価値が高いことを全審査委員が認めた。