

氏 名	渡 優有
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 1 1 6 7 号
学位授与の日付	令和 7 年 3 月 21 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	工芸科学研究科 物質・材料化学専攻
学 位 論 文 題 目	Rational design and application of benzo[a]pyrene- modified fluorescence oligonucleotide probes (ベンゾピレン修飾蛍光核酸プローブの合理的な設計と応用)
審 査 委 員	(主査)教授 小堀 哲生 教授 黒田 浩一 准教授 金折 賢二

論文内容の要旨

本論文は、序論および 2 つの章から構成される。

序論では、生体試料中に含まれる核酸成分を精密に測定することの意義、核酸測定に汎用されている手法の紹介、ならびに核酸を利用した臨床現場即時診断 (POCT: Point of Care Testing) の展望について述べられている。ここ 10 年で新型コロナ感染症やインフルエンザ等が全世界的に蔓延したことをきっかけに、ウィルス感染症対策の重要性や、簡易診断キット開発の必要性が認識されつつある。また、ウィルス感染症だけでなく、O157 大腸菌や抗生物質耐性菌による細菌由来感染症の対策も急務の課題として挙げられている。序論前半部に、標的由来遺伝子 (DNA または RNA) に結合する蛍光核酸を利用した分析法がこれら感染症の即時診断に有効である理由がまとめられている。また後半部では即時診断に利用可能な蛍光核酸誘導体の特徴を誘導体ごとに整理するとともに、Light up 型蛍光核酸誘導体開発の重要性について説明している。

第 1 章では、Light up 型蛍光核酸誘導体として、標的 RNA と結合した際にのみ青色蛍光を発するベンゾピレンプローブの合成ならびに蛍光特性について報告されている。当該核酸プローブは既存の Light Up 型蛍光核酸であるピレンプローブの性質を保持しつつ、汎用されている共焦点レーザー顕微鏡やフローサイトメーターに応用可能となるようデザインされた核酸プローブである。ベンゾピレンならびに核酸塩基の分子軌道計算結果をもとにベンゾピレンの消光条件を導くとともに、消光条件に合致するシチジン誘導体の化学合成を行っている。合成されたシチジン誘導体を含む蛍光核酸プローブの蛍光特性を評価した結果、弱酸性条件下において標的 RNA 配列を発現する大腸菌を検出することに成功した。

第 2 章では、ベンゾピレニルウリジンとピレニルウリジンが隣接して導入された核酸誘導体が、RNA の比色測定 (色調変化による標的 RNA の測定・検出) に利用可能であることを示している。当該核酸誘導体は、標的 RNA が添加されると、ウリジンの 2' 位に導入されたベンゾピレン部位と隣接ヌクレオシドの 2' 位に導入されたピレン部位がエキシプレックスを形成することで緑色の蛍光を発する。一方で、標的 RNA にミスマッチが導入された場合には、エキシプレックスが形成されず、青色の蛍光を発することが明らかにされた。この性質により、標的に導入された一塩基

変異を識別可能である。当該の性質は、将来的に変異型ウィルスの検出に応用可能であることも示されている。

論文審査の結果の要旨

蛍光分子が核酸の母核に導入された蛍光核酸プローブは、バイオテクノロジー分野や医学・薬学分野等において幅広く利用されている。その中でも、標的に結合した際に量子収率を大きく上昇することのできる Light Up 型の蛍光核酸プローブは、使用の際に洗浄操作を必要としないことから用途に合わせて様々なプローブが開発されてきている。申請者は、Light Up 型の核酸プローブの中でも蛍光退色に高い耐性を持つピレンを骨格にもつベンゾピレンプローブの開発に取り組んだ。

博士論文第 1 章では、量子化学計算から得られた結果をもとに、ベンゾピレン誘導体が発する蛍光の On/Off 制御法について報告している。一般に蛍光核酸プローブは、中性条件下での利用を想定して開発されているものが多いため、弱酸性条件で機能を発揮する蛍光核酸プローブは独自性の高い蛍光核酸プローブと評価できる。また、蛍光核酸プローブの性質を in vitro 系だけでなく、大腸菌を利用した測定系でも評価しているため、理学的知見の獲得から工学的実践応用を含む包括的な研究であると判断できる。第 2 章では、既存のピレン導入核酸プローブと新規に開発されたベンゾピレン導入プローブを融合することにより、標的の有無に応じて色彩変化が誘起される核酸プローブについて報告している。色彩の変化する核酸プローブは、核酸プローブの濃度非依存的に標的分子の有無を判断可能であることが報告されていることから、細胞内に発現している標的核酸の有無の判別に適している。とくに、本発表で開発された核酸プローブは標的核酸の一塩基の差を高感度に識別可能であるため学術的意義は高く、今後の Light Up 型蛍光核酸プローブ開発の一つの道標となる研究成果が得られたと判断できる。

本論文は審査を経て掲載された以下の 2 編の学術論文（うち 2 編とも申請者が筆頭著者である）に基づいて作成されている。

1. Yu Watari, Kaito Nakatani, Kazuya Matsuo, Tomonori Waku, Akio Kobori
“Wash-free FISH of bacterial ribosomal RNAs by benzo[a]pyrene-modified oligonucleotides”
Results in Chemistry, 7, 101214 (2024).
<https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101214>
2. Yu Watari, Kaito Nakatani, Kentaro Kobata, Kazuya Matsuo, Tomonori Waku, Akio Kobori
“Ratiometric sandwich-type assays for RNAs with a point mutation using benzo[a]pyrene-modified probes
Chemical Communications, 60, 7610-7613 (2024).
<https://doi.org/10.1039/d4cc02188f>