

論文審査の結果の要旨

氏名：鈴木 梓

博士の専攻分野の名称：博士（工学）

論文題名：環境感応型蛍光プリンヌクレオシドの開発とDNAプローブへの応用

審査委員：（主査）教授 根本 修克

（副査）准教授 齋藤 義雄 教授 加藤 隆二

京都大学准教授 田邊 一仁

極性、粘性、pH などの様々な環境変化に応じて蛍光強度の変化のみならず蛍光波長が劇的に変化するようなセンサー機能を有する環境感応型蛍光 (ESF: Environmentally Sensitive Fluorescent) 核酸塩基は、標的となる DNA/RNA の検出や、SNP タイピングのような一塩基変異の検出、塩基欠損などを蛍光発光色の変化で簡便に識別できるプローブとして利用できると考えられる。一般的に、分子内に電子供与（ドナー）性置換基と電子吸引（アクセプター）性置換基をもつ芳香族化合物は、光励起によって分子内電荷移動 (ICT) を生じるため、周辺の極性や誘電率変化に応じて光化学的性質を変化させることが知られている。従って、核酸塩基に芳香族発色団を共役させて、分子内電荷移動状態を創出することができれば溶媒フルオロクロミックな蛍光特性を示す人工核酸塩基を得ることが可能となる。以上の背景から、本論文は、プリンおよびその類縁体に種々の芳香族発色団を導入した蛍光プリンヌクレオシドや DNA プローブの開発について述べている。さらに、得られた環境感応型蛍光プリンヌクレオシドが一塩基変異などの核酸の微細な構造変化を蛍光波長の変化で認識するプローブとして応用できることを示した新規性の高い研究成果がまとめられている。

本論文は六章から構成されている。

第一章は、本論文の序論にあたり、研究計画の背景、目的や意義、ならびに本論文の構成について述べている。

第二章は、天然塩基であるアデニンの 8 位に様々な置換基を有するナフタレン分子を三重結合で共役させた 2'-デオキシアデノシン誘導体を合成し、それらの光学特性および遺伝子検出能の評価について述べている。ナフタレンに電子吸引基であるシアノ基、および電子供与基である *N,N*-ジメチルアミノ基のどちらの置換基を有する場合でも溶媒フルオロクロミックな蛍光特性を示すことを明らかにしている。さらに、これらを含むオリゴデオキシヌクレオチド鎖は標的遺伝子の有無を蛍光強度の増大によって識別できるプローブとして利用できることも明らかにしている。

第三章は、7-デアザアデニンの 7 位に様々なアリアルエチニル基を連結させた 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体およびそれらを含むオリゴデオキシヌクレオチド鎖を合成し、光学特性や核酸塩基認識能の評価について述べている。7-デアザプリン骨格を取り入れたことで、天然の DNA 二重鎖と同等の熱安定性を示すことを見出し、さらに、溶媒フルオロクロミックな蛍光特性を示した 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン含有 DNA プローブは、標的 DNA の一塩基変異を蛍光波長のシフトで識別することができた。塩基対形成を可能にしたことによって、核酸の微細な構造変化を蛍光波長の変化で識別することが可能であることから、さらに優れた遺伝子検出用プローブを開発できる可能性を見出している。

第四章は、8-アザ-7-デアザグアニンを骨格にもつ新しい環境感応型蛍光プリンヌクレオシドの開発について述べている。8-アザ-7-デアザグアニンの 7 位に 2-エチニルナフタレンを連結した誘導体を含むオリゴデオキシヌクレオチド鎖が、修飾塩基の対面塩基がシトシンの場合のみ安定な Watson-Crick 塩基対を形成していることに加え、ミスマッチ塩基に比べて、およそ 30 nm もの長波長シフトを伴って蛍光発光を示すことを明らかにしている。従って、標的 DNA のシトシンを水素結合形成し、蛍光波長変化で識別できる環境感応型核酸の開発に成功している。

第五章は、LE 発光と ICT 発光の二重蛍光を利用した DNA プローブの開発について述べている。6-エチニル-2-ナフトニトリルを蛍光分子として修飾した 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体が、分子内ドナー・アクセプター構造を有することで溶媒の極性に伴った ICT 発光、さらに、グリセロールのような粘度の高い溶媒中では、塩基-蛍光色素間で分子回転が抑制されることにより、ICT 発光に代わり、6-エ

チニル-2-ナフトニトリル由来の LE 発光が現れる二重蛍光性を示すことを明らかにしている。さらに、この二重蛍光核酸塩基が、DNA 二重鎖中でチミンとのみ安定なワトソン-クリック型の塩基対形成を示すことから、シトシン塩基とも安定な塩基対を形成する 7-デアザアデニン骨格をもつ誘導体に比べて、塩基認識能が優れていることを明らかにしている。それに加えて、DNA 二重鎖のフルマッチ構造では波長の短い LE 発光およびミスマッチ構造では波長の長い ICT 発光を示すことが判明し、核酸の局所的環境変化を明瞭に識別できる一塩基変異認識プローブとして利用できることも明らかにしている。

第六章は、これまでに合成した各誘導体およびその光学特性や遺伝子検出プローブとしての性能を総括して評価している。

以上述べたように、本論文は、分子周辺の極性環境などの変化に応答して、蛍光波長が変化する環境感応型蛍光プリンヌクレオシドの開発について述べている。さらにこれらを含む新規蛍光 DNA プローブが高い遺伝子検出能を示すことを明らかにしている。特に、8-アザ-7-デアザプリン骨格を有する環境感応型蛍光プリンヌクレオシドは、従来の誘導体に比べて、一塩基変異識別プローブとして優れた性能を示すことから、独創性の高い研究成果が得られていると判断できる。

このような研究成果が得られたことは、論文提出者の豊富な学識と優れた研究能力を裏付けるものである。

よって本論文は、博士（工学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成26年7月24日