	まはら　あつし
氏　　名	馬　原　　淳
学位(専攻分野)	博　　士（学術）
学位記番号	博甲第３２１号
学位授与の日付	平成 15 年 7 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	Design and Application of Fluorescence-Labeled Oligonucleotide for the Detection of RNA （蛍光標識核酸プローブを用いた RNA 検出法の開発とその応用）
審査委員	(主査) 教　授　村上　章 教　授　黒田　裕久 教　授　田嶋　邦彦 助教授　山岡　哲二

論文内容の要旨

ヒトゲノムプロジェクト（第一期)により、ヒト遺伝子の全遺伝子配列が解明されたが、得られた遺伝子配列情報を基に、細胞内に分布する遺伝子産物の機能解析が今後の課題となる。とりわけ RNA はタンパク質合成に関わるのみならず、近年様々な機能が見いだされてきている。従って、RNA の構造・構造相関を生理的条件下、理想的には細胞内で解明することは、生命現象の解明に重要である。本論文は新規蛍光標識核酸プローブを開発し、RNA 解析を行った結果を論じている。

論文は５章からなる。

第１章では RNA を特異的に検出する蛍光核酸プローブを開発する目的で、糖環の 2'水酸基にピレンを導入したウリジン（Upy）を含む 2'-O-メチル型 RNA (OMUpy）を合成している。OMUpy は相補的な配列をもつ RNA と結合することで 380nm 付近の蛍光発光を 200～340 倍増感させることを示している。この性質を利用し高次構造を持つ RNA 上のアンチセンス核酸結合部位検索を行った結果、塩基対を形成していない領域を標的とした OMUpy のみ、ピレンの蛍光強度が著しく増感することを明らかにしている。

第２章では細胞内で RNA を検索を行う目的で、紫外領域よりも長波長側で蛍光シグナルを示す新規蛍光核酸プローブを開発している。Upy ユニットを２分子連続して導入した 2'-O-メチル型 RNA (OMUpy2)を合成している。OMUpy2 は RNA と結合した場合、480nm 付近にブロードな蛍光発光が観察され、OMUpy2 は RNA との結合を可視光領域の蛍光増感によって RNA を検出できるプローブであることを示している。

第３章では、OMUpy2 が RNA に結合した場合に示される 480nm の蛍光発光メカニズムについて吸収スペクトル、励起スペクトルおよび時間分解蛍光法を採用して検討している。以上の結果より、480nm に観察された蛍光発光は主に基底状態におけるピレン２量体からの蛍光発光に由来していることを明らかにしている。

第４章では、OMUpy および OMUpy2 と FRET を組み合わせた新規核酸プローブの合成、およびその蛍光特性について検討している。蛍光剤として

7-diethylamino-3-(4'-isothiocyanatophenyl)-4-methylcoumarin (CPI) ならびにフルオレセインを採用し、ピレンからの FRET を評価した。その結果、これらのプローブが RNA と結合した場合効率よく FRET が観測され、新規プローブが RNA 検出に有効であることを示している。

第５章では第４章までに開発した蛍光プローブを採用して細胞系での標的 RNA をリアルタイム検出を行っている。プローブは核酸分解酵素耐性や、細胞膜透過性などの性質をもつ必要があるため、バックボーンを一部、あるいは全てホスホロチオエート修飾した OMUpy2 を採用している。このプローブを用い、細胞の刺激応答に速やかに反応する、*c-fos* mRNA を対象とし、その *in situ* 検出を行っている。その結果、血清刺激 15 分後に細胞内において蛍光発光が観察され、コントロール実験、スクランブル配列プローブの結果より、細胞内において *c-fos* mRNA をリアルタイムに検出できたことを考察している。

論文審査の結果の要旨

申請者は２１世紀の医療に求められる最も重要な課題、すなわち遺伝子治療に不可欠な遺伝子情報の解析法開発に取り組んでいる。遺伝子治療の発現を制御するアンチセンス法は新規概念に基づく疾病治療法として注目されているが、用いる化合物の分子設計法の展開が遅れている。細胞内での遺伝子発現態様の解析には対象ＲＮＡの直接検出が必要であるが、それに用いる良好なプローブは開発されていなかった。本論文はその問題を扱っており、顕著な成果を上げている。すなわち、ＲＮＡ選択性の極めて高い蛍光標識核酸プローブを分子設計し、ＲＮＡの高感度検出に成功している。これまでＤＮＡとＲＮＡをその構造を基に識別するプローブは開発されてきておらず、このプローブは極めて新規性が高いものと判断される。また、多くのＲＮＡ検出法が非細胞系あるいは細胞を固定化した系を対象にしているのに対し、本論文のプローブは生細胞内でＲＮＡを検出できるという際だった性能を有し、同時にＲＮＡ発現のリアルタイム解析も可能にするものである。一方、申請者は本プローブのＲＮＡ検出機構を蛍光分光法により詳細に明らかにしている。本論文のプローブ並びにそれを用いる遺伝子解析法はＲＮＡに着目した遺伝子発現機構（トランスクリプトーム）のリアルタイム解析を可能にする優れたものであると判断され、今後その重要性を増す可能性が高いものと考えられる。

本論文は審査を経て掲載された以下の２編の論文をもとに構成されている。

(1) Mahara A., Iwase R., Sakamoto T., Yamana K., Yamaoka T. and Murakami A. Bispyrene-Conjugated 2'-O-Methyloligonucleotide as a Highly Specific RNA-Recognition Probe. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41, 3648-3650 (2002).

(2) Mahara A., Iwase R., Sakamoto T., Yamaoka T., Yamana K., and Murakami A. Detection of Acceptor Sites for Antisense Oligonucleotides on Native Folded RNA by Fluorescence Spectroscopy. *Bioorg. Med. Chem.*, 11, 2783-2790 (2003).

以上、本論文で論じられている蛍光標識核酸プローブは極めて新規性の高いこと、さらにこのプローブを用いた遺伝子解析法は今後の遺伝子治療に大いに寄与することが考えられることなどの観点から、本論文は学術的価値が高いことを全審査委員が認めた。