

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 14488 号
------	---------------

氏 名 牧野 航海

論 文 題 目

Kinetics of Strand Displacement Reaction with Acyclic Artificial Nucleic Acids, and Its Application to Multiplexed Fluorescent Imaging

(非環状型人工核酸の鎖置換反応の反応速度解析と多分子蛍光イメージングへの応用)

論文審査担当者

主査	名古屋大学	工学研究科	教授	浅沼 浩之
委員	名古屋大学	工学研究科	教授	村上 裕
委員	名古屋大学	工学研究科	准教授	樫田 啓
委員	名古屋大学	理学研究科	教授	田中 健太郎

論文審査の結果の要旨

牧野航海君提出の論文「Kinetics of Strand Displacement Reaction with Acyclic Artificial Nucleic Acids, and Its Application to Multiplexed Fluorescent Imaging (非環状型人工核酸の鎖置換反応の反応速度解析と多分子蛍光イメージングへの応用)」は、非環状型人工核酸であるSNA, L-aTNA, D-aTNAを利用した鎖置換反応に着目した研究であり、細胞内生体分子の網羅的なイメージングを目指した核酸蛍光バーコードの開発及び、鎖置換反応の反応速度論解析について論じている。全3章で構成されており、各章の概要は以下の通りである。

第1章では、本研究を論ずるにあたって関連する研究背景を記している。はじめにDNAのミクロな化学的構造、塩基対形成から、ナノマテリアルとしてユニークなDNA構造体、DNAナノテクノロジーについて述べている。次に核酸ナノテクノロジーの中心技術の一つである鎖置換反応の原理と応用例についてまとめられている。特に生物学的な応用例を示すとともに課題を挙げている。そこから人工核酸と鎖置換反応の研究背景について論じ、非環状型人工核酸の利点と応用、展望について記している。

第2章では、鎖置換反応を利用した蛍光色変化型核酸バーコード(CCFB法)の開発について述べている。蛍光分子を用いたイメージング手法はバイオテクノロジーにおいて必要不可欠な技術であるが、励起・蛍光波長の重なるのために多分子同時イメージングには大きな制限があった。これに対して、本研究で開発したCCFB法は鎖置換反応を利用することで、蛍光色を予め配列した順番に変化させることを実現し、蛍光変化によって多分子標識を可能にしている。本手法には、生物学的利用に要望な生体直交性と酵素耐性を有するD-aTNAが用いられている。はじめに分光蛍光光度計による測定から、設計通りに鎖置換反応で連続的に蛍光変化可能であることを確認している。続いて、核酸蛍光バーコードをビーズ上に担持して共焦点レーザー顕微鏡を用いてイメージングした結果から、3色の蛍光色素のみを用いて9種類の蛍光変化が観察され9種類の同時多重検出可能であることを明らかにした。さらに、HeLa細胞内のタンパク質を標的にCCFB法を利用した免疫染色への応用を行っている。この結果から、本手法がマルチタンパク質イメージングへの応用が可能であることが実証された。

第3章では、SNA, D-aTNA, L-aTNAの鎖置換反応の系統的な解析結果について述べている。はじめにヘテロキラルな反応速度の解析を行っており、ヘリシティの違いによって反応速度が大きく変化しないことを明らかにした。これはキラリティーを変換するシステムの構築に有用な知見である。さらにToehold長さを2~15 ntまで変化させてホモキラルで反応速度解析を行った。その結果、非環状型人工核酸ではDNAと比較して安定性が向上するとともに、反応速度が低下することを明らかにした。さらに、反応温度の依存性を調査した結果、DNAでは反応温度によって反応速度はほとんど変化しないのに対し、aTNAでは反応温度の上昇に伴って、反応速度が大きく上昇することを見出した。

以上のように、本論文では、非環状型人工核酸の鎖置換反応を利用した多分子同時イメージング手法である核酸蛍光バーコード(CCFB法)の開発に成功しており、網羅的なタンパク質イメージングを実現し生物学的分野への貢献が期待される。さらに非環状型人工核酸の鎖置換反応の速度論を明らかにし、核酸ナノテクノロジーの発展に寄与するところが大きいと判断できる。よって、本論文の提出者である牧野航海君は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格があると判断した。