

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 宮地寛登

本論文は DNA 測定用マイクロデバイスの開発に関するものであり、6 章より構成されている。

第 1 章は緒論であり、本研究の行われた背景について述べ、本研究の目的と意義を明らかにしている。

第 2 章では、半導体作製技術であるプラズマ重合法を用いた DNA 固定化技術の開発について述べている。一般に DNA 検出を行う際、DNA が固定化担体上へ非特異的に吸着することが問題であり、これが原因でハイブリダイゼーション効率が低下するばかりでなく、吸着によるバックグラウンドの上昇で得られたデータの解釈が難しくなる。そこで、プローブ周囲の環境を疎水性とすることで、DNA の担体表面への非特異的吸着を抑制することについて検討している。このため、ビオチンとの結合能を保持したままストレプトアビジンをプラズマ重合法により成膜した薄膜を用いて固定化する方法を試みている。その結果、疎水性プラズマ重合膜を成膜した担体にストレプトアビジンを吸着させ、そこに膜厚 30 から 45 Å の 2 層目のプラズマ重合を成膜することでビオチンとの結合能を保持したままストレプトアビジンを担体に固定化できることを明らかにしている。さらに、この技術を応用した DNA アレイの作製について述べている。この結果、作製した DNA アレイは疎水性の膜により既存のアレイと比較してバックグラウンドが低く抑えられることを示しており、これにより S/N 比の向上につながると述べている。

第 3 章では、標的 DNA (ターゲット) を効率よく調製するための反応系を工夫している。ターゲット DNA は片側突出端 DNA (unilateral protruding DNA; UPD) とし、プローブ結合部位以外の部分は二本鎖 DNA の構造をとるように設計することによって、標的 DNA の構造の安定化を図っている。このような構造を持つターゲット DNA を RNA-DNA オリゴヌクレオチドをプライマーとして用い PCR を行っている。

その結果、PCR 産物は二本鎖 DNA の片側が RNA:DNA ハイブリッド構造を持つことを明らかに

している。またこの部分を RNase H で消化することによって UPD を作製することに成功している。このようにして作製した UPD をターゲットとして用い、表面プラズモン共鳴現象 (SPR) 法と第 2 章で示した手法により作製した DNA アレイを用いて配列特異的に DNA を検出することに成功したことを明らかにしている。

第 4 章では、DNA アレイの表面状態がハイブリダイゼーションに与える影響を調べたのち、ヒトゲノムを鋳型として UPD を作製し、一塩基多型 (SNP : single nucleotide polymorphism) のタイピングについて検討している。

実験の結果、DNA アレイ表面を疎水性にすることによって S/N 比が向上し、遺伝子配列特異的に検出できると述べている。さらに、第 3 章で述べた技術を用い、ヒトゲノムから UPD 構造を持つターゲット DNA を作製して SNP のタイピングについて検討している。この結果、プラズマ重合法を用いて作製した DNA アレイを用いて SNP のタイピングが可能であることを明らかにしている。

第 5 章では、電場中でのハイブリダイゼーションを用いることで、一塩基の違いを持つオリゴヌクレオチドを迅速で配列特異的に検出する技術について検討している。このため、白金電極上に第 2 章で述べた技術を用いストレプトアビジンを固定化し、そこにビオチン標識したプローブ DNA を配置することで DNA 検出用デバイスを設計している。またここで示されたデバイスは電場中でターゲット DNA を移動させて遺伝子検出できるようキャピラリーを配置した構造を有すると述べている。

その結果、ターゲット DNA は電場中で電極上に存在するプローブ DNA と短時間にハイブリダイズすることがわかり、ハイブリダイゼーションに必要な時間が大幅に短縮できると述べている。また、本デバイスを用いて配列特異的に一塩基変異も検出できることを確認している。

第 6 章は結論であり、本研究を要約して得られた研究成果をまとめている。

このように本論文では、DNA 固定化技術の開発及び固定化担体表面の性質の改変、ターゲット DNA の調製法、DNA が負の電荷を持つ性質を利用した、電場中での DNA ハイブリダイゼーションについて検討している。これにより DNA ハイブリダイゼーションを迅速にかつ、配列特異的に検出する DNA 測定用マイクロデバイスの開発に成功している。

よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。