

審査の結果の要旨

氏名 スラチャダ チュアイチョブ

数十塩基程度の DNA で高密度に表面修飾されたナノ粒子 (DNA 担持ナノ粒子) は極めて高いコロイド分散安定性を示す。この分散安定性は DNA 構造に応じて異なる。一本鎖 DNA で覆われた粒子は高塩濃度下でも安定的に分散するのに対し、完全に相補的な DNA と二重らせん構造を形成すると凝集する。しかし、一塩基変異によりその部分だけ塩基対形成しないと、粒子は安定的に分散しつづける。この現象は分子架橋による粒子凝集とは異なるので非架橋凝集とよばれ、極めて早い色調変化をもたらす。たった一塩基の変異の有無がコロイド粒子の分散・凝集として目視判定することが可能となるので、簡易遺伝子診断材料としての利用が期待されている。

この特異な界面現象を特徴づける因子としてエントロピー斥力の差異が考えられる。高次構造の違いによる DNA 鎖の柔軟性や運動性の差異がこの界面現象を制御するとの考えである。温度や pH などの環境変化に加え、タンパク質などの化合物 (リガンド) と複合体形成をすることで DNA はその構造を変化させる。したがって、DNA の構造変化をもたらすあらゆる事象がセンシング原理として利用できるはずである。本研究では、その実証実験として DNA 四重鎖構造に着目し、バイオセンサーへの応用を検討した。DNA 四重鎖はリガンドと特異的に結合することで構造を大きく変化させると予想され、その変化を駆動力とした手軽な高感度センサー開発に繋がると期待される。

本論文では、上記の着想に基づき、DNA 四重鎖で金ナノ粒子表面を修飾し、非架橋凝集現象を用いたバイオセンシングに関する結果が述べられている。単にセンシング材料を開発するだけでなく、分光学的手法や放射光 X 線散乱法を駆使しながら条件検討をすることで、ナノ粒子の凝集メカニズムに関する理解を深化させている。また、DNA の塩基配列を設計することで、外部刺激に応答して色調変化をもたらす DNA 担持ナノ粒子系の構築にも展開している。

本論文は 5 章から成り、第 1 章では研究全体の概要、第 2 章では DNA 四重鎖修飾金ナノ粒子 (G4-AuNPs) を用いたシスプラチンの簡易検出法の開発について、第 3 章では G4-AuNPs を用いたトロンビンの簡易検出法の開発について述べている。第 4 章では pH 応答性材料への展開とそのメカニズムについて記述している。最後に第 5 章で研究全体を総括している。

第 2 章では、立体構造の異なる 3 種類の DNA 四重鎖を対象に、金ナノ粒子表面への固定化法の確立について先ず検討している。シスプラチンは白金系抗がん剤の一種であるが、強い毒性を持つことが懸念されており、環境中への曝露が問題視されている。そのため、シスプラチンの簡易検出システムの構築が必要である。そこで G4-AuNPs をシスプラチン検出に適用することを試みた。シスプラチンが特異的に作用することで、四重鎖構造のアンフォールディングが誘発さ

れ、粒子の凝集が起きていることを明らかにした。シスプラチン以外の白金系抗がん剤との比較をしたところ、本系はシスプラチンに対して極めて高い特異性を示すことがわかった。また、作用時間 10 分で検出限界 $12.9 \mu\text{M}$ を達成している。

第 3 章では G4-AuNPs をトロンビン検出のために適用した。トロンビンと特異的に結合する配列（トロンビン結合アダプター；TBA）は G4 構造を形成する。TBA にスペーサーであるポリアデニンを結合させた DNA 配列を設計し、AuNP 表面に固定化した。そのような G4-AuNPs はトロンビンを作用させることで非架橋凝集することが明らかとなった。検出限界は 0.72nM であった。トロンビン以外の血清タンパク質の場合は凝集が起こらず、トロンビンを特異的に検出できることを示した。

第 4 章では、第 3 章で取り扱った DNA 配列に基づいて、pH 応答性の G4-AuNPs 系を構築した。酸性条件下では四重鎖構造が崩壊し自己ループ構造を形成することで粒子は安定に分散する。一方、中性からアルカリ条件下では安定に四重鎖構造を維持する。しかし、このとき相補鎖が共存していると二重らせん構造を形成し、非架橋凝集を誘発することができる。この原理に基づき、pH に応答して系の色調変化をもたらす材料の開発に成功している。

本論文のうち第 2 章は、Prince of Songkla University の C. Thammakhet-Buranachai、P. Kanatharana、P. Thavarungkul、C. Buranachai、国立研究開発法人理化学研究所（理研）の藤田雅弘、前田瑞夫各氏との共同研究、第 3 章と第 4 章は理研の藤田雅弘、前田瑞夫各氏との共同研究の内容を一部含むものであるが、論文提出者が主体となって実験遂行および分析・考察を行なったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

よって本論文は博士（科学）の学位請求論文として合格と認められる。

以上 2033 字