

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	標的miRNAの3'末端における鎖長多様性を識別する人工核酸プローブの開発
Title(English)	
著者(和文)	飯島良紘
Author(English)	Yoshihiro Iijima
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9401号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:清尾 康志,関根 光雄,湯浅 英哉,林 宣宏,大窪 章寛,相澤 康則
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9401号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

(博士課程)

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	飯島 良紘	
論文審査 審査員		氏名	職名	氏名	職名
	主査	清尾康志	准教授	大窪章寛	准教授
	審査員	関根光雄	教授	相澤康則	講師
		湯浅英哉	教授		
林 宣宏		准教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「標的 miRNA の 3'末端における鎖長多様性を識別する人工核酸プローブの開発」と題し、序論と 4 章から構成されている。

序論では、miRNA の生物学的重要性と、miRNA の 3'末端における鎖長多様性を検出することの重要性について説明し、研究の背景および解決すべき問題点について解説している。さらに、塩基部アミノ基にシクロヘキシルリン酸残基を有するアデニン誘導体 (以下 A*) を 5'末端に有する人工核酸が miRNA の 3'末端における鎖長多様性を識別する能力を有することを報告した先行研究について説明し、これに基づく本博士論文の研究指針を述べている。

第 1 章「N 末端に A* を有する PNA の合成と性質」では、A* を有するペプチド核酸 (PNA) の合成法とその RNA 結合能について述べている。PNA の N 末端への A* の導入法を検討した結果、固相担体上での PNA のリン酸化条件を新たに最適化することによって、A* を有する PNA の効率的な合成に成功したことを報告している。また、合成した PNA を用いて標的 RNA との二重鎖形成能および標的 RNA の 3'末端における鎖長多様性を識別する能力を UV-熱融解温度を測定して調べたところ、A* を有する PNA はその骨格が柔軟なため、RNA の鎖長多様性を識別する能力が先行研究により報告された A* を 5'末端に有する DNA より低下したことを述べている。

第 2 章「5'末端に dA*c3dU を有するオリゴヌクレオチドの合成と性質」では、A* を塩基部にもつデオキシヌクレオチド (以下 dA*) 残基の 3'側のリン酸基と下流のデオキシウリジン残基の塩基部 5 位をプロピレンリンカーによって架橋した化合物 (以下 dA*c3dU) の設計と合成について述べている。また、dA*c3dU を 5'末端に導入したオリゴデオキシヌクレオチド (以下 ODN) を合成し、標的 RNA の 3'末端の鎖長多様性を識別する能力を UV-熱融解温度の測定および RNA の逆転写反応により調べたところ、5'末端に dA*c3dU を有するプライマーよりも、先行研究で報告されている架橋をもたない dA* を有するプライマーの方が優れていることを明らかにしている。

また、この結果に基づいて dA* 残基の 3'側のリン酸骨格のコンホメーション特性と標的 RNA の 3'末端の鎖長多様性を識別する能力の関係について考察している。

第 3 章「5'末端に 8odA* を有するオリゴデオキシヌクレオチドの合成と性質」では、dA* の塩基の配向を *anti* に固定した誘導体 (以下 8odA*) を 5'末端に有する ODN の合成と性質について述べている。ODN に導入した dA* の塩基部を *anti* 配向に固定化しシクロヘキシルリン酸残基の動きを制限すると、ODN が標的 RNA の 3'末端の鎖長多様性を識別する能力が向上すると考え、糖部 5'水酸基とアデニン環 8 位をエーテルで架橋した 8odA* を有する ODN を設計し合成したことを報告している。また合成した ODN を逆転写反応のプライマーとして用いた逆転写反応を行い、予想に反して 8odA* を有するプライマーよりも先行研究で報告されている架橋をもたない dA* を有するプライマーの方が優れていることを明らかにしている。また、この結果に基づいて dA* の塩基配向と標的 RNA の 3'末端の鎖長多様性を識別する能力の関係について考察している。

第 4 章「5'末端に dA* を有する DNA プライマーの逆転写 PCR 法への応用」では、dA* を 5'末端に有するプライマーを用いた新しい逆転写 PCR 法を開発し、miRNA 検出のモデル実験を行った結果について述べている。第 2 章および第 3 章で述べた結果に基づいて、最も性能が優れていると考えられる架橋構造をもたない dA* を有する ODN をプライマーとして選択し、逆転写 PCR 法に応用した結果について述べている。その結果、標的 miRNA よりも 1 塩基長いもしくは短い isomiR よりも標的 miRNA が有意に速く増幅されることを明らかにし、従来用いられていたヘアピン型プライマーを用いた逆転写 PCR 法ではなしえなかった miRNA と isomiR の識別に成功したことを報告している。

以上を要するに、本論文は、miRNA の検出に有用な新規人工核酸の設計と合成ならびにそれらを用いた新しい逆転写 PCR 法について述べており、理学的に貢献するところが大きい。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。