

氏名	おおた りょう <b>太田 良</b>
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第985号
学位授与の日付	令和3年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 物質・材料化学専攻
学位論文題目	<b>Development of surface-enhanced Raman scattering-based assays with bioorthogonal Raman reporters for quantification of nucleic acids</b> (生体直交型ラマンレポーターを利用した表面増強ラマン散乱測定法の開発と核酸検出法への応用)
審査委員	(主査)教授 小堀哲生 教授 堀内淳一 准教授 金折賢二

## 論文内容の要旨

本論文は、序論および2つの章から構成される。

序論では、生体試料中に含まれる核酸成分を精密に測定することの意義、核酸測定に汎用されている手法の紹介、ならびに核酸を利用したリキッドバイオプシーの展望について述べられている。近年、重篤疾患の発症と体液中に含まれる核酸の発現量に密接な関係があることが明らかとされてきていることから、体液中の核酸成分は、新しい疾患バイオマーカーとして注目をあびている。既存の核酸測定法としてPCRが汎用されているが、操作の煩雑さや生体サンプルの前処理を必要とする点等、多くの改善点があるため、簡便かつ高感度な新しい核酸測定法の構築が望まれている。そこで新規核酸測定法として、表面増強ラマン散乱(SERS)を基本原理にもつ核酸測定法を開発するに至った。

第1章では、表面増強ラマン散乱(SERS)と生体直交型ラマンタグを組み合わせた核酸検出系の構築について報告されている。生体試料のラマンシグナルと異なる位置にラマンシグナルをもつ生体直交型ラマンタグとしてニトリル基が導入されたラマンタグを新たに合成している。また、SERSを効率的に誘起する金ナノロッド表面に、生体直交型ラマンタグと標的核酸検出用のオリゴ核酸を固定化したSERSプローブを開発している。標的核酸の濃度定量を行った結果、500pMの標的核酸の検出に成功した。

第2章では、表面増強ラマン散乱(SERS)を基本原理にもつ核酸測定系の高感度化ならびに自動化に関する研究について報告されている。一般にSERS測定でえられるシグナル強度は標準偏差が非常に大きいことが知られており、信頼される測定値を得るために測定者の熟練した技術を必要とする。そこで、ラマンシグナル強度の標準偏差の縮小を達成するために、内標用生体直交型ラマンタグとシグナル応答用生体直交型ラマンタグの2種類のタグを導入した核酸測定系を新たに構築した。この核酸測定系を利用することにより、86pMの標的核酸の検出に成功している。さらに、ガラス表面に滴下したサンプル溶液に含まれる標的核酸を顕微ラマンのマッピング測定で検出することにも成功したことを報告している。これらの結果は、生体サンプル中に含まれる

核酸の新しい測定法として、**SERS** と生体直交型ラマンタグを組み合わせた検出系が利用可能であることを示す研究成果であると認められる。

## 論文審査の結果の要旨

クラスター状の金属ナノ粒子や異方性を持つ金属ナノ粒子表面では、表面プラズモン共鳴が生じ、 $10^8$ – $10^{10}$  倍程度に増幅されたラマンシグナル(増強ラマン散乱光：**SERS**)が得られる。この**SERS** を利用した測定法は、単一分子レベルの感度を持つことや、シグナルの分解能が高いこと等の優れた性質を持つ。しかしながら、これまでの表面増強ラマン散乱法に関する研究は、生体分子を標的とした測定法の報告であっても測定装置と金属ナノ粒子の開発に焦点が置かれていることが多く、再現性と定量性の担保された報告は殆どされていない。本論文では、物理化学的側面や工業分野的な視点からではなく、生命科学と有機化学的視点から**SERS** を利用した生体分子測定系の開発に挑戦しているという点で、申請者独自の視点を読み取ることができる。

第1章では、標的核酸由来のシグナルと金ナノロッド上に吸着した生体分子由来の偽シグナルとの明確かつ簡便な分離を目指し、生体直交型ラマンタグを利用した測定系の開発を行っている。極低濃度の生体分子検出を目指したこれまでの報告では、蛍光分子をラマンタグとして用いる例が多く報告されていた。しかしながら実際にラマン散乱測定をすると測定条件を最適化することが難しく、蛍光由来のバックグラウンドシグナルがラマンシグナルの観測を阻害してしまうことが非常に多いという問題を抱えていた。測定条件最適化の難しさについては論文データとして現れないことが多いため見逃されがちであるが、申請者は測定の簡便さ、シグナル解析のしやすさに焦点を絞って研究を進め、生体直交型ラマンタグを用いた測定系を開発するに至っている。

第2章では、第1章でえられた知見をもとに、**SERS** 測定の自動化を目指した研究に取り組んでいる。一般的に**SERS** シグナルの標準偏差は非常に大きいことが知られており、これが**SERS** 測定を生体分子計測分野から遠ざける大きな要因となっている。申請者は、**SERS** シグナルを補正することの可能な内標を開発することによって標準偏差を10%程度にまで低下させることに成功している。

第1章と第2章で見られているように、申請者は一貫して「実際の測定でいかに再現性よく低濃度の生体サンプルを計測するのか」という命題を持ち研究を展開し、**SERS** を利用した核酸測定系の構築に成功している。ここで開発された測定系は、**SERS** を利用した自動測定装置の開発や、疾患バイオマーカー測定への応用に展開可能であると考えられる。

本論文は審査を経て掲載された以下の2編の学術論文(うち2篇とも申請者が筆頭著者である)に基づいて作成されている。

1. R. Ota, N. Takagi, Y. Imaizumi, T. Waku, A. Kobori

“Sandwich-typed detection of nucleic acids by bioorthogonal SERS probes”

*Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 40, 166-177 (2021).

2. R. Ota, Y. Fukushima, Y. Araki, K. Sasaki, T. Waku, A. Kobori

“Ratiometric SERS assays for reliable and automatic quantification of nucleic acids”

*Chemistry Letters*, 2020, in press. <https://doi.org/10.1246/cl.200798>