

氏名	山本貴富喜
学位(専攻分野)	博士(工学)
学位記番号	工博第1815号
学位授与の日付	平成11年3月23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	工学研究科機械工学専攻
学位論文題目	静電分子マニピュレーションによるDNAのモレキュラーサージェリー (主査)
論文調査委員	教授 鷲津正夫 教授 吉川恒夫 教授 立花明知

### 論文内容の要旨

本論文は、電気力学的手法と微細加工技術とを用いて対象となる分子を加工に適した位置・配向で固定し、酵素を固定化したプローブを物理的なマイクロマニピュレーションの手法により押し当てて局所的に酵素反応を起こし、対象分子の望みの位置に切断や化学修飾などの加工を加える手法「モレキュラーサージェリー」を提案し、かつ、DNA切断酵素固定化微粒子をレーザーマニピュレーションにより押し当ててDNAの任意位置での切断を示すことにより、その実証を行っている。この手法によれば、プローブのサイズで決まる高い空間分解能で、酵素の種類に応じた様々な化学修飾を分子上の任意の位置に行うことが期待できる。本論文は、6章からなっている。

第1章は序論であり、研究の背景にある従来のマイクロマニピュレーション技術の問題点、特に生体分子の操作・加工を行う際の問題点を指摘し、新規な分子加工法「モレキュラーサージェリー」を提案している。

第2章では、モレキュラーサージェリーのためのDNA分子の固定法の開発を行っている。DNAのようなひも状分子は、溶液中ではブラウン運動のためランダムコイル状の形態をとる。このような分子の任意の位置を指定した操作を行うには、あらかじめDNAを直線状に引き伸ばして固定しておく必要がある。さらに、伸長固定したDNAに酵素を作用させるためには、固定する基板自体が酵素反応の立体障害とならないように、DNAと基板との間にクリアランスをつくり、DNAが基板に吸着しないように配慮する必要がある。このような条件を満たすDNAの固定を実現するため、固定すべきDNA長よりもわずかに短いギャップを持ち、かつギャップに相当する部位の基板をエッチングにより掘込んだ構造の電極系を考案し、その微細加工プロセスを開発している。また、その電極系を用いれば、DNAを電気力学的に伸長し、かつ、伸長されたDNA分子を、隣り合った2つの電極間を橋絡する形で、全長にわたり固体表面と接触しないように固定できることを実証している。

第3章では、分子加工の工具となる酵素固定化粒子の開発を行っている。DNA切断酵素としては、1) DNAの塩基配列に依存せずあらゆる位置を切断するDNase, 2) 特定の塩基配列(制限部位)のみを切断する制限酵素、の2種類を使用し、各々を分子リンカーを用いて微粒子上に共有結合で固定する手法を開発している。また、酵素を固定化した微粒子は基板に対して非常に吸着し易くなり、一旦吸着した微粒子はレーザーマニピュレーションでは動かせなくなるため、酵素を微粒子上に固定化する際に、微粒子表面に吸着防止用のスペーサー分子を同時に導入する手法を開発し、その有効性を示している。

第4章では、酵素固定化粒子を操作するためのレーザーマニピュレーション装置の設計がなされており、極めて低収差の装置が実現されていることを確認している。

第5章では、第2章で開発した微細電極構造に伸長固定したDNAに対し、第3章で開発した酵素固定化粒子をレーザーマニピュレーションにより押し当てることによって、モレキュラーサージェリーの実証を行っている。まず、コントロール実験として酵素を固定していない粒子を伸長固定DNAに押し当て、DNAが全長の150%以上にまで伸長しないと機械的に

切断されないことを明らかにしている。次に、DNAの変形量が上記の機械的切断の生じない範囲内で酵素固定化粒子を押し当て、DNAの切断を試みている。その結果、1) DNaseを用いた場合には、押し当てた任意の位置で瞬時的に切断が生じ、2) 制限酵素を用いた場合には、制限部位のみで切断が生じることを実験的に示している。

第6章は結論であり、本論文で得られた成果について要約している。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、微細加工技術、電気力学的手法、マイクロマニピュレーションなどの物理的手法の組み合わせにより1分子の任意の位置に加工を加える手法「モレキュラーサージェリー」を提案し、かつ、DNA切断酵素固定化微粒子を押し当てることにより、固定化DNA分子の位置を特定した切断を実験的に示し、その手法の実証を行ったものである。得られた主な成果は次の通りである。

1. 直鎖状の分子であるDNA上の任意の位置を加工出来るように、かつ後の酵素反応において酵素の立体阻害とならないように、分子両端以外の部位が基板表面に接触しないような形で固定を行うための微細電極構造を考案し、これを用いた電気力学的なDNAの固定を実証している。
2. 固定した分子を加工するための工具として、DNA切断酵素および吸着防止スペーサー分子の両者を同時に固定化した微粒子を作製し、その酵素活性および吸着防止能を明らかにしている。
3. 微細電極構造を用いて固定したDNA分子に対し、酵素を固定していない粒子を押し当てた場合は、自然長の150%以上にまで伸長させないとDNAの機械的な切断が生じないことをまず明らかにし、次に、機械的な切断が生じない範囲内で酵素固定化粒子を押し当てる事によって、1) DNAの任意の部位を切断する酵素を用いた場合は押し当てたその位置で瞬時に切断が生じる事、2) 特定の塩基配列のみを切断する制限酵素を用いた場合はその配列のところでのみ切断が生じることを実験的に示している。

以上要するに、本論文は、酵素反応の生ずる部位を物理的操作手段により特定するという新しい分子加工の手法を開発したもので、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成11年2月5日、論文内容とそれに関連した試問を行った結果、合格と認めた。