

京都大学	博士 (工学)	氏名	山本 悠樹
論文題目	DNA オリガミを用いた生体分子の固定化およびその液中周波数変調 AFM 評価		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>生体試料についてその機能解明が求められている中で、顕微鏡法はその重要な役割の一端を担ってきた。近年、細胞の生理機能を担うタンパク質分子を分子スケールあるいはサブ分子スケールで計測することが可能な新たな顕微鏡法が複数開発され、より微視的レベルでの生体機能の解析が可能となってきた。これら顕微鏡法の1つである原子間力顕微鏡法(AFM)は、対象となる生体試料を標識化することなく、生理環境において単一分子レベルの空間分解能で計測することが可能である。しかし、実際の測定において高い空間分解能を実現するためには生体試料の基板固定化が不可欠となる。一方で、強固な基板固定は試料の活性を損なってしまう。そのため、試料に応じて適切な固定強度で基板固定を行うことが、AFM測定における基板固定法として求められる。</p> <p>本論文は、DNA オリガミを用いた生体分子の基板への固定化の実現、および固定された分子の基板固定の強さのAFMによる評価について述べたものであり、全7章から成る。</p> <p>第1章は序論であり、顕微鏡法の発展と、それに伴い、生体試料の測定へ向けて顕微鏡法に必要とされる要件についてまとめられている。特に本章では、AFM測定において空間分解能や試料の状態を決定づける試料分子の基板固定法について述べ、DNA オリガミがその有力な候補であることを示している。また、DNA オリガミによる生体試料の固定化においては、AFM測定時の空間分解能の低下についての深い議論が行われていないことに触れ、その必要性を述べている。</p> <p>第2章では、AFMの動作原理および装置構成について述べられている。AFMの動作モードにおいては、生体試料の測定において高い空間分解能を実現しているダイナミックモードがあり、特に周波数変調AFM(FM-AFM)においては定量性のある測定が可能であることを示している。その上で、フォースマッピング法による3次元測定により対象試料の物性計測が可能であることを示し、これらの手法を溶液環境におけるFM-AFM動作に応用するための留意点についても述べられている。</p> <p>第3章では、DNA オリガミを用いた生体分子の固定において、特に分子同定に注目してその典型的な固定手法について述べている。モデル試料として streptavidin(SA)分子を用い、平面構造のDNA オリガミの設計から白雲母(mica)基板への吸着およびDNA オリガミへのSA分子の固定までその具体的な手順について説明されている。SA分子は biotin 分子と特異的に結合するため、DNA オリガミを構成する一部のDNAへ biotin 分子を修飾することで、SA分子が固定可能であることを示している。また、DNA オリガミへ固定されたSA分子は液中FM-AFMによって測定された表面形状像において輝点として観察され、輝点の位置をDNA オリガミの設計と照らし合わせ、mica基板からの高さの評価することにより、輝点がSA分子を表すことを実験的に示している。また、立体構造のDNA オリガミについても同様に、設計から作製および液中FM-AFMによる表面形状測定までの一連の手順が説明されており、立体構造のDNA オリガミについても平面構造のDNA オリガミと同様にSA分子を同定することが可能であることが示されている。</p> <p>第4章では、配向を制御したSA分子上の表面電荷密度の計測について述べられて</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	山本 悠樹
------	---------	----	-------

いる。mica 基板と SA 分子の親和性、および biotin 分子を有する DNA オリガミを利用することで、biotin 結合サイトを分子上面にもたない向きで、SA 分子を mica 基板上に吸着させることができる。液中 FM-AFM を用いて、この SA 分子の表面電荷密度測定を行った。測定の結果、得られた SA 分子の biotin 結合サイトをもたない面上での表面電荷密度は -17.1 mC/m^2 であることが示されたが、この値は先行研究で示された、biotin 結合サイトをもち分子側面上の表面電荷密度に近い値となった。配向の異なる分子間で得られた表面電荷密度の差が極めて小さいことから、得られた表面電荷密度は、biotin 結合サイト近傍の局所的な表面電荷を反映するものではなく、SA 分子全体の領域に及ぶ表面電荷に由来することを示唆している。biotin 結合サイトの局所表面電荷密度を検出するには、より高い空間分解能での表面電荷密度計測が必要となることが示された。また、DNA オリガミと mica 基板を用いて SA 分子の配向を制御できることが示されたことから、DNA オリガミに修飾する分子と基板種の組み合わせによって、SA 分子と同様に、さまざまな生体分子の配向制御へと発展して行くことが期待される。

第 5 章では、DNA オリガミへ固定された SA 分子について、AFM 測定における空間分解能の低下を引き起こす構造ゆらぎの影響について述べられている。構造ゆらぎを熱ゆらぎと探針-試料間相互作用力(接触力)に分類し、それぞれの AFM 測定における影響を、AFM 探針が SA 分子遠方および近傍にある場合に分けて評価を行なっている。特に、探針が SA 分子近傍にある場合、探針はその接触力により固定の弱い SA 分子(on-SA 分子)の表面形状を変形させる結果が得られ、この変形は on-SA 分子の頂上部から外れた領域において大きく現れることが示されている。この原因を解明するために行われた SA 分子の等価ばね定数計測においては、SA 分子の頂上部とその周囲部で等価ばね定数が異なる結果が得られ、先の計測結果と合わせて Hertz の接触理論を用いた解釈がなされている。一方で、on-SA 分子のみ表面形状の変形が引き起こされた原因について、on-SA 分子の重心位置の移動が見かけの表面形状の変化を引き起こしたためであると結論づけられている。このように、AFM による表面形状測定においては、固定が弱い分子についてその表面形状が変形されて測定されることから、AFM 測定を試料の固定強度を評価する手法として用いることが可能であることについても言及している。

第 6 章では、DNA オリガミを用いた分子固定の精度向上に向けて、DNA オリガミの詳細構造の解析について述べられている。DNA オリガミは、これまで B 型 DNA から構成されるという前提で設計されてきたが、実際の構造においては、DNA の捻れや歪みに起因する変形を有していることが考えられる。そのため、液中 FM-AFM を用いて、実際に作製された DNA オリガミの詳細な構造解析を行っている。液中 FM-AFM により取得された表面形状像から、DNA オリガミ構造中の欠陥部の DNA 構造を同定することに成功し、また、多数観察されたホリデイ構造部の溝間隔は、通常の B 型 DNA がもつ値に一致したことから、DNA オリガミは B 型構造を有していることが改めて示されている。加えて、DNA オリガミ構造に対して架橋する DNA を用いて DNA オリガミへ負荷を加えた際の影響についても述べられており、特にねじり負荷を印加した場合、架橋 DNA の表面形状が大きく変化し、架橋 DNA に対して DNA オリガミ構造中の DNA の位相は安定であり、同時に DNA オリガミ構造中の修飾分子の方位は安定であることが示されている。

第 7 章では、結論と展望が述べられている。本研究により、生体分子の DNA オリガミを用いた基板固定法が実現され、生体分子の基板固定化の強さを AFM により評価することが可能となることが示された。今後、本研究のさらなる進展により、単一生体分子の熱ゆらぎ運動を AFM によって直接捉えることが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、AFM 測定において必須となる、DNA オリガミを用いた生体分子試料の基板固定化技術の確立、および固定された生体分子の基板固定の強さの AFM による評価に関する研究の結果をまとめたものである。本論文により得られた主な研究成果は、以下の通りである。

- (1) DNA オリガミおよび mica 基板を用いることにより、streptavidin(SA)分子の配向を決定した状態で固定することに成功した。DNA オリガミ構造に窓を設け、SA 分子を mica 基板へ接触させた状態で DNA オリガミへ固定することで、SA 分子はその長軸を立てた配向で固定された。
- (2) SA 分子の高さヒストグラムおよび平均的な断面形状による SA 分子の表面形状の評価を行うことにより、SA 分子の系統的な表面形状の変形を評価することに成功した。この評価により、DNA オリガミへ弱く固定されていた on-SA 分子の見かけの表面形状が、AFM 探針による接触力により変形していることが明らかとなった。
- (3) 時間波形測定による SA 分子の等価ばね定数およびカンチレバーのたわみの計測により、SA 分子の頂上部とその周囲部でそれぞれ値が異なり、それぞれ接触時の接触半径の違いと SA 分子の重心位置の移動による影響であることが示された。これにより、on-SA 分子の頂上周囲部においてのみ確認された見かけの表面形状の変形について、その原因を解明することに成功した。
- (4) DNA オリガミの設計構造と、実際に作製された DNA オリガミとの対応関係を明らかにした。DNA オリガミ内部に生じた DNA の欠陥について、AFM 高分解能観察により欠陥部の詳細構造を明らかにすることに成功した。また、らせん構造に由来する溝幅は通常の B 型 DNA のものと等しく、DNA オリガミ構造中の DNA は、B 型構造であることが示された。
- (5) DNA オリガミ構造に対して位相が半周期異なる DNA を架橋し、架橋 DNA によるねじり負荷に対して架橋 DNA の表面形状が変形して観察された。これは、外部からのねじり負荷に対して DNA オリガミ構造中の DNA の位相が安定であることを示し、そこへ修飾された分子の方位についても同様に安定であることが示された。

本論文は、生体試料の分子スケール観察・解析を可能にする AFM 技術において必要不可欠となる生体分子の基板固定化に関する研究をまとめたものであり、学術上、実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、令和 3 年 2 月 22 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行なって、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。