

審査の結果の要旨

氏名 黒澤修

本論文は、微細加工技術と電気力学的効果の組み合わせにより、DNA 分子を微細構造中の指定位置に伸長固定する技術の開発を行い、その応用として、特に、伸長 DNA の指定位置を切り出して増幅する「モレキュラーサージェリー」に基づいた DNA 解析を実現するために行った研究開発の結果をまとめたものである。

第 1 章では、序論として、本研究の背景、従来の研究、目的を述べている。

第 2 章では、電気力学的効果を用いた分子操作の一般的な原理と、対象を DNA に特定した場合の原理につき述べている。

第 3 章においては、高周波・高電界中における DNA 分子の挙動を明らかにし、電気力学的効果を用いた DNA の伸長固定の手法の開発を行っている。具体的には、1) 1 MHz、1 MVp/m 程度の高周波・高電界の印加により、DNA 分子を、電界と平行に配向させ、構造定数 $1 \mu\text{m}/3\text{kbp}$ で決まる長さまで伸長できること、2) 薄膜電極の作る不平等電界を用いれば、伸長した DNA を誘電泳動により駆動し、多数の DNA 分子を電極エッジに配向配列することができること、3) 電極材料としてアルミニウムを用いれば、電極エッジに接した分子端を永久的に固定することができること、4) 伸長配向 DNA を基板上に固定する方法として、a) 2 価の正イオンの架橋効果で、ガラス基板上に全体固定する方法、b) 電極エッジに伸長配列固定した DNA を流れにより電極面側に反転させ、電極面（金属面）上に全体固定する方法、c) 電極間に分子パターンニングを施して、DNA 分子を多点で固定する方法、5) DNA 分子よりもわずかに狭いギャップを持つフローティングポテンシャル電極系を用いて、電極間を橋絡した形で DNA 分子の両端を固定する、DNA High-Wire System の開発、などを示している。

第 4 章では、本研究で開発した手法で、電極エッジに一端を揃えて伸長配列した DNA 分子の長さを直接測定することにより、数キロベース以上の DNA の分子量の測定を、従来のゲル電気泳動法やパルス電気泳動法に比べ、はるかに簡便に行うことができること、および、DNA を末端から消化するエクソヌクレアーゼの活性測定を簡便に行うことができることを示している。

第 5 章においては、電極エッジに伸長配列固定した DNA 分子を、物理的手法を用いて、位置を指定して切断・加工を施す手法（モレキュラーサージェリー）として、集光した紫外

線レーザーを照射することで、DNA 上の任意部位を光学分解能の範囲内の精度で瞬時に切断することができること、および、AFM 探針で物理的に切断することができることを示している。

第 6 章においては、伸長配列固定した DNA 分子を、狙った位置で切断・回収して配列解析を行うという、モレキュラーサージェリーに基づく DNA の配列解析法を提案し、そのための要素技術の開発を行っている。具体的には、基板上に伸長固定した DNA の任意部位を AFM 探針で物理的に切断した後、切断した DNA 断片を効率的に回収するため、犠牲層、キャリア層および電極からなるマイクロデバイスを開発し、基板上で切断した DNA 断片を損失なく回収できることを実験的に示している。また、回収した DNA 断片の両末端にアダプターと呼ばれる既知配列のオリゴヌクレオチドを付加し PCR 増幅するため、切断端の損傷を制限酵素で除去する手法を考案し、これにより、切断回収した DNA 断片の約 10% を増幅できることを実験的に明らかにしている。

以上の結果は、DNA を末端から順次切断し、回収した断片を、もとの DNA 上の位置情報を保存したままで配列解析をするといった、順次的配列解析が実現可能であることを示しているといえる。

第 7 章においては、本研究で開発した DNA の電気力学的操作法を基本技術として、筆者との共同研究として行われた発展的研究に関してまとめられている。具体的には、以下の結果が示されている。1) 基板上に全体固定した λ DNA の AFM での直接観察による伸長固定 DNA の密度測定。2) 電極エッジに片端固定した DNA 分子のもう一方の末端を AFM 探針の先端に捕まえることによる、DNA 1 分子レベルでの操作。3) DNA High-Wire System を用いた、DNA 結合タンパクの DNA 上での 1 分子ダイナミクス直接観察。4) DNA High-Wire System と酵素固定化プローブとの組み合わせによる、場所を指定した DNA の分子切断。5) 電気力学的手法による 1 本鎖 DNA の High-Wire System の構築。

これらの研究を通じ、DNA の電気力学的な分子操作の方法を確立するとともに、その応用が開発された。この技術は、DNA の配列解析・オプティカルマッピング・DNA/タンパク相互作用の解析・DNA をもとにした分子組立や分子エレクトロニクス素子の構築など、いわゆる DNA のバイオナノテクノロジーの基本技術として、今後の広範囲な発展・応用が期待される。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。