

審査の結果の要旨

氏名 寺尾 京平

本研究は、遺伝子診断及び生物学への貢献を目指し、基盤技術となる染色体 DNA の 1 分子操作技術の開発を行っている。

第 1 章では、染色体 DNA 分子操作技術の背景、DNA と染色体の構造・機能について述べており、染色体 DNA 操作技術が遺伝子診断と生物学においてどのような役割を担い得るかについて議論している。

第 2 章では、遺伝子診断への応用を目的とした染色体 DNA の展開法について報告している。電気浸透溶液槽の開発、染色体 DNA の単離と電気浸透流による染色体 DNA の展開について述べ、従来の DNA 展開法に対する優位点と残された課題について議論している。第 2 章における研究成果は以下に要約される。

- 1) 再現性・操作性の高い電気浸透溶液槽を開発し、基板表面で一様な溶液流を、速さ・向きが制御された形で発生させることに成功した。
- 2) 基板上で連続的に、細胞の破壊と染色体 DNA の弛緩を行った。
- 3) 電気浸透流により、弛緩した染色体 DNA を展開し、従来法と比較して 3 倍以上長い DNA が展開できることを示した。

しかしながら、以上の結果と共に以下の課題が明らかになった。a) 展開染色体 DNA がバンドル化したまま伸長される、2) 細胞位置がランダムである、3) 染色体 DNA が展開状態で液中保持できない。バンドル化に関しては電気浸透流の向きを変え、染色体 DNA ファイバーを長さの違いによって分離する手法が解決策となりうることを示した。

第 2 章で明らかになった染色体 DNA 展開の課題を受け、それらを解決するためのデバイスを開発し、第 3 章で報告している。このデバイスは細胞配置・染色体 DNA 展開・展開 DNA 液中保持の 3 つの機能が 1 つのチップ上に集積されている。報告されている成果を以下に示す。

細胞配置にはマイクロポケットと呼ぶ微細構造を用い、電気浸透流と組み合わせ、細胞を 1 個レベルで基板上に配置することに成功した。展開 DNA 液中保持には、マイクロピラーと呼ぶ微小柱をアレイ状にパターンニングしたものをを用いた。マイクロピラーには正電荷を付与しておき、展開染色体 DNA を静電相互作用により吸着固定することで染色体 DNA を展開状態で保持することに成功した。

さらに著者は、上記デバイスを応用することで、染色体 DNA を完全に 1 本のファイバー状に展開する手法を提案している。これにより、従来法では不可能だった mm オーダーの染色体 DNA の液中完全展開が実現されている。

第4章では、第3章で開発したデバイスを用いて、遺伝子診断に用いられる解析手法、ファイバーFISHに実際に利用可能であるか確認を行なっている。

FISH解析を行なう際、バックグラウンド蛍光を低減させる必要がある。そこで、まず、自家蛍光が低いことで知られている素材を用いたマイクロピラー作製プロセスを考案しFISH観察条件の改善を実現している。

続いて実際に特定の遺伝子をターゲットとしたファイバーFISHを行っている。ターゲット遺伝子が存在すると期待されるDNAの末端領域でシグナルが確認され、本技術がファイバーFISHに利用可能なことが実証された。このことから遺伝子診断への応用が期待される。

第2章から第4章までは遺伝子診断への応用を目的とした染色体DNA分子集団の展開法について述べている。第5章では染色体DNA1分子に着目し、1分子を物理的に操作するツールを報告している。これは、基礎科学への貢献として、1分子レベルでの染色体DNAの構造・機能の解析に利用することを目的としている。現在までDNA1分子操作は数10 μ mの短いDNAに限られてきた。本論文では、光ピンセットを用いた新たなDNA操作手法を考案し、mmオーダーの長大な染色体DNAを1分子で操作可能なことを示している。成果は以下に要約される。

立体形状により染色体DNAを物理的に捕捉するという手法を考案し、微小な釣針状構造体（マイクロフック）を微細加工技術の応用により開発した。このマイクロフックを光ピンセットで操作することにより、染色体DNAを捕捉し、マイクロフックを介して染色体DNAを部分的に操作することに成功した。さらに、長大な染色体DNA1分子を丸ごと溶液中で操作するため、微小な糸巻構造体（マイクロボビン）を開発し、染色体DNAを溶液中で巻き取ることによりコンパクトにし、染色体DNA1分子の丸ごと操作を可能にした。マイクロボビンからの染色体DNAのリリースはマイクロボビンを巻取り時とは逆方向に回転させることで可能なことを示した。

マイクロフックによる染色体DNA1分子の部分的な操作とマイクロボビンによる1分子丸ごとの操作を組み合わせることにより、従来技術では操作できなかった染色体DNA1分子を液中で自在に操作することが可能になると考えられる。

以上を要するに、本論文はマイクロ加工・操作技術を用いることで従来は困難であった染色体DNAの液中操作手法を提案している。第一は遺伝子診断の実現を目的として、電気浸透流とマイクロ構造体を組み合わせ、染色体DNA分子集団を液中でファイバー状に展開するというものである。実際にこの操作技術が遺伝子診断技術へ利用可能なことが示されている。第二は、基礎科学への貢献を目的として、光ピンセットで駆動された微小構造体を用いて、染色体DNA1分子を液中で自在に操作するというものである。ここで著者が開発した種々の技術は、従来法にはみられない技術的価値を持ち、それぞれの分野における基盤技術と成り得るものと考えられる。

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。