

環境・生命工学専攻	学籍番号	943331
申請者氏名	平野 研	

指導教官氏名	水野 彰 桂 進司
--------	--------------

論文題目	Manipulation and Processing of a Single DNA Molecule using Laser Trapping and Electrostatic Effect (レーザートラップと静電効果を用いたDNA 1分子の操作と加工)
------	---

(要旨 1,200字程度)

DNA 1分子を物理的に微小操作することで、DNA分子とタンパク質との相互作用など生命現象を1分子レベルで直接観察する受動的な解析から、DNAの紐(ひも)で結び目を作るなどの人工的な操作やDNA分子を直接加工する能動的な解析をするものまで広い範囲での応用が可能となってきた。これらの解析は、水溶液中でブラウン運動しているDNA 1分子に対して空間や位置の分解能を高めた状態で解析するために、レーザートラップなどの物理的操作技術を組み合わせ、DNA分子の形態を制御する必要が生じる。レーザートラップは、サブミクロンの微粒子の補足(トラップ)を可能とし、かつ空間的な1点で非接触に操作することができるため、DNA 1分子などを扱う上で有効な手法である。一方、静電気力も有効であり、バックボーンに負電荷を持つDNAのに対して操作が容易であり、また微小な空間になる程静電界による効果が増大するため高精度な操作が可能となる。

そこで、本研究は、レーザートラップと静電効果を用いることにより、DNA 1分子を対象とした新たな微小操作および加工技術を確立するとともに、ゲノム解析や1分子生理学等への応用を目的とした。本研究内容は、主に以下に示すとおりである。

- 1) DNA 1分子の直接レーザートラップと巨大DNA分子の操作
- 2) 制限酵素分子の可視化と直接観察による光学的マッピングおよび挙動解析
- 3) マイクロ領域における局所制限酵素活性技術の開発
- 4) チップ上でのDNA 1分子の操作と加工操作

従来ではDNA 1分子を直接レーザーで補足することができなかったが、グロービュールDNAを用いることで、DNA 1分子のレーザートラップを可能にした。また、凝縮させる試薬により、トラップ力に影響することが見いだされた。さらに、水溶液中では断片化の影響により操作が困難であった染色体等の巨大DNA分子を扱うことも可能となった。また、DNAとタンパク質の相互作用の解析として、制限酵素 EcoRI の可視化と直接観察を可能とした。可視化は、新たに開発した手法により可能となり、また可視化した EcoRI を用いて、DNAとEcoRIの複合体から光学的マッピングを行い、かつDNA分子上における挙動解析も直接観察により行った。一方、DNA 1分子の切断などの加工手法として、レーザー局所温度制御技術を用いて、制限酵素 EcoRI の反応場をマイクロ領域に局所化する手法を開発し、これを用いることで1分子上の目的の位置での切断が可能となった。また、スライドガラス上に微小な流路を作製することで、静電効果を有効に作用させ、DNA 1分子の操作や伸張固定、切断、回収といった一連の操作が1枚のチップ上で行うことが可能となった。DNA 1分子操作以外にも、DNA 1分子を観察する際の基礎特性を検討するために、蛍光色素と退色防止剤のDNA分子への影響もあわせて検討を行い、退色防止剤の一つである glucose oxidase-catalase oxidation 系を用いると、酸化反応の副産物である gluconolactone がDNA形態へ影響を与えることを明らかにした。