

平成 15 年 2 月 27 日

豊橋技術科学大学長 殿

審査委員長 菊池 洋



## 論文審査及び最終試験の結果報告書

このことについて、下記の結果を得ましたので報告いたします。

記

学位申請者	松浦 俊一	学籍番号	第 9 6 3 8 3 3 号
申請学位	博士 (工学)	専攻名	環境生命工学専攻
論文題目	DNA 1 分子直接観察法を用いた酵素動態解析に関する研究		
公開審査会の日	平成 15 年 2 月 6 日		
論文審査の期間	平成 15 年 1 月 23 日～平成 15 年 2 月 27 日	論文審査の結果	合格
最終試験の日	平成 15 年 2 月 6 日	最終試験の結果	合格

論文内容の要旨

従来のDNA多分子を対象とした解析法とは異なり、1分子観測を基にしたDNA-酵素間相互作用の解析では個々の分子の詳しい動態を知ることが可能であるために新たな知見が得られることが期待されている。本論文はDNA 1分子の固定化および形態制御技術を開発し、DNA結合性酵素の動態解析に応用した成果を記述したものである。

本論文は7章から構成されており、第1章では1分子観測における研究背景と本研究の目的を述べ、第2章ではDNAの蛍光観察法について記述している。第3章では顕微鏡下でλエキソヌクレアーゼによるDNA 1分子分解反応の反応速度を測定し、反応素過程を解析できる1分子観測の有用性を示した。第4章では機能性シランを用いてガラス基板表面を改質することによりDNAの非特異的吸着を抑制し、かつチオール修飾DNAを末端特異的に固定する手法について述べ、さらに固定化DNAの伸張の程度が直流電場によって制御可能であることを示した。第5章では制限酵素EcoRIを対象に酵素活性を保持できる蛍光標識法ならびにDNA-EcoRI相互作用の直接観察の結果を示している。第6章では電界によるDNAの形態制御およびDNA結合性酵素の蛍光標識法を真核細胞のDNAポリメラーゼβの動態解析に応用し、DNAポリメラーゼβがDNAの損傷部位を認識し結合する様子をDNA 1分子レベルで示した。第7章では上記の結果の総括および今後の展望について述べている。





審査結果の要旨

本研究では、DNA 1分子レベルの酵素反応を顕微鏡下で可視化できる実験系を構築した。この実験系において最も問題となるのが蛍光標識による酵素活性の低下であったが、制限酵素EcoRIや真核細胞のDNAポリメラーゼβを対象として酵素の活性部位を保護しながら標識することにより活性を有する標識酵素を調製することに成功した。また、顕微鏡視野内においてDNA 1分子の挙動を解析するために、ガラス基板表面へのDNA分子の片端固定、直流電場によるDNA分子の伸張制御などの基本操作技術を確立した。この技術を利用して、λエキソヌクレアーゼによるDNA 1分子の分解反応やDNA上のDNAポリメラーゼβの挙動をリアルタイムで観測し、従来法では得られなかった知見を得た。また、従来のDNA分子の固定化技術ではガラス基板表面へのDNAの非特異的吸着が問題となっていたが、基板表面を疎水処理することによってDNAの非特異的吸着を抑制するとともにDNAの片方の末端のみを特異的に固定する手法を提案した。以上の研究成果は、今後、真核細胞のDNA複製反応などDNA-酵素間相互作用の1分子解析に大きく寄与するものと期待される。

これらの成果は、学術論文2編（海外2編）のほか、国際会議発表3件、国内学会発表10件として発表し、高い評価を得ている。

以上により、本論文は博士（工学）の学位論文に相当するものと判定した。

審査委員

菊池 洋  水野 彰  浴 俊彦   
桂 進司  印 印

(注) 論文審査の結果及び最終試験の結果は「合格」又は「不合格」の評語で記入すること。