

学位論文題名

Studies on utilization of DNA as functional materials

(DNAの機能性素材としての利用に関する研究)

学位論文内容の要旨

サケは食材として盛んに漁獲されているが、それを食品として加工する際に産出されるサケの白子に関しては、これまで有効な利用法もないまま大部分が廃棄されていた。さらにサケ白子から得られるDNAについても、一部は化学薬品や食品として利用されているものの、その9割が処分されている。ここで遺伝子の本体であるDNAは、反応性の高い高分子化合物としてみることができ、これを機能性素材として利用することができれば、天然資源の有効利用の点から有意義であるといえる。しかしながらDNAに関しては一般に機械的強度や生化学的安定性が低いことや水溶性であることのためその利用が限られている。そこで海藻類から抽出されるアルギン酸や牛皮より抽出したコラーゲンを用いてDNAを不溶化し、フィルム、糸などに成形し、主に生医学分野において使用する機能性素材として利用することを試みた。本研究で、DNA分子そのもののDNA結合性の分子の担体としての有効性や、DNA-アルギン酸およびDNA-コラーゲン複合体を調製しその性質を調べ、それらがDNA結合性タンパク質である抗DNA抗体の検出基質として有用であることを示した。本論文は、以下の5章から構成されている。

第1章には、本研究の背景及び目的が記述されている。

第2章では、サケ白子由来DNAについてのキャラクタリゼーションと海藻から得られる酸性多糖であるアルギン酸を用いたDNAの素材化が述べられている。また抗菌剤である銀イオンとDNAとの相互作用が調べられ、以前に当研究室で報告された抗菌性DNA-アルギン酸フィルムについて、その活性のメカニズムと、薬剤の担体としてのDNAの有効性について詳細に検討した。

CDスペクトル分析から、今回使用したサケ白子由来のDNAは銀イオンを分子内に配位することが示された。DNAは銀イオンと複合体を形成し、溶液中の塩化物イオンによる塩化銀の形成を阻害した。塩化銀の形成は銀イオンの持つ抗菌活性を減少させることから、DNAの利用により抗菌活性の持続が期待できる。また、アルギン酸によるDNAの固定化機構についても検討し、カルシウムイオンの存在が必須であることが明らかとなった。DNAは銀イオンとともに培地中に経時的に溶出してくることから、DNAは銀イオンの徐放性担体として有望であることが示された。

第3章では、DNAとコラーゲンよりなるハイブリッド線維を調製し、その性質について検討を行った。

以前に当研究室においてコラーゲンの線維化の過程にDNAを添加すると、ペプシンで消化したコラーゲンを用いたにも関わらず、明確な天然型の横紋構造を持つコラーゲン線維が形成することが報告された。本章では、DNAとコラーゲンの相互作用についてさらに調べ、DNA分子の存在により他の酸性高分子とは異なったメカニズムでコラーゲン分子の秩序だった会合が行われることを示した。またDNAのコラーゲン線維に対する吸着は静電的な結合によることが明らかとなった。このように調製したDNA-コラーゲンハイブリッド線維はDNA結合性蛍光色素を吸着することが蛍光顕微鏡による観察から示された。またこのハイブリッド線維の細胞に対する親和性について、*in vitro*系でヒト線維芽細胞を培養することにより評価した。その結果、コラーゲン線維上では培養時間に依存して線維芽細胞は増殖していったのに対し、DNA-コラーゲン線維上ではほとんど増殖が見られなかった。以上の結果は、DNAはコラーゲンの線維構造のみならず、細胞外マトリックスとしてのコラーゲン線維の機能も変化させる高分子素材であることを示している。

第4章では第2,3章で述べられたDNA-アルギン酸複合体やDNA-コラーゲン複合体に対してDNA結合性タンパク質である抗DNA抗体が反応するかどうかを調べ、これらを血清中の抗DNA抗体の検出に応用することについて述べた。

自己免疫疾患の一つである全身性エリテマトーデス(SLE)の患者血清中に、DNAと特異的に結合する抗DNA抗体が存在することが知られている。現在までにELISA法(酵素抗体法)による抗DNA抗体の測定が検討されてきたが、DNAの固定化剤として用いた塩基性ポリペプチドに対する非特異的な抗体の結合が生ずる欠点があり、新しいDNAの固定化法が望まれている。そこで、DNAを固定化したアルギン酸ゲルにSLE患者由来の抗DNA抗体を含む血清を反応させた。非吸着画分を洗浄除去した後でDNA-アルギン酸複合体に吸着した画分を回収し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびイムノブロットングを行った結果、DNA-アルギン酸複合体に対する抗体の吸着が認められた。またアルギン酸またはコラーゲンを用いてポリスチレン製96穴マイクロプレート上にDNAを固定化し、ELISAにより様々な血清中の抗DNA抗体の検出を行い、ポリリジンを用いる方法と比較した。血清中の抗DNA抗体はポリリジンと同様にアルギン酸もしくはコラーゲンを用いて固定化したいずれのDNAに対しても吸着した。一方ポリリジンと反応する抗体を含む血清試料についても、それぞれの固定化剤に対しての吸着は少なく、ポリリジンを用いる方法で指摘されていた欠点が、改善されていることが分かった。また今回のELISA法による検出と現在流通している市販のキットを用いたRIA法による反応性について比較検討したところ、全く相関を示さなかった。ここで、DNAと抗DNA抗体の反応性について検討したところ、用いるDNAや固定化剤の種類により、その反応性が変化した。このことは、抗DNA抗体の反応性に関して抗原となるDNAの形態が重要であることを意味し、ELISA法とRIA法の検出特性の違いを引き起こす一つの原因であることを示している。以上の結果から、ELISA法による抗DNA抗体の検出を行う上で、アルギン酸はDNAの固定化剤として有効であることが示され、またその反応性はRIA法と異なる特異的な検出法であることが分かった。

第5章は、本研究の総括であり、第2,3,4章で得られた結果から、DNAの機能性素材としての有効性が述べられ、このことから、産業廃棄物として得られるサケ白子DNAの有効利用が可能であることが示されている。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 則 雄  
副 査 教 授 戸 倉 清 一  
副 査 助 教 授 坂 入 信 夫  
副 査 助 教 授 井 上 勝 一

学 位 論 文 題 名

## Studies on utilization of DNA as functional materials

(DNAの機能性素材としての利用に関する研究)

サケは食材として盛んに漁獲されているが、それを食品として加工する際に産出されるサケの白子に関しては、これまで有効な利用法もないまま大部分が廃棄されていた。さらにサケ白子から得られるDNAについても、一部は化学薬品や食品として利用されているものの、その9割が処分されている。ここで遺伝子の本体であるDNAは、一方では反応性の高い天然高分子化合物とみることができ、これを機能性素材として利用することができれば、天然資源の有効利用の点から有意義であるといえる。しかしながらDNAに関しては一般に機械的強度や生化学的安定性が低いことや水溶性であることのためその利用が限られている。そこで本研究では海藻類から抽出されるアルギン酸や牛皮より抽出したコラーゲンをを用いてDNAを不溶化し、フィルム、糸などに成形し、主に生医学分野において使用する機能性素材として利用することが試みられた。本研究で、DNA分子そのもののDNA結合性の分子の担体としての有効性や、DNA-アルギン酸およびDNA-コラーゲン複合体を調製しその性質を調べ、それらがDNA結合性タンパク質である抗DNA抗体の検出基質として有用であることを示した。

本論文は、以下の5章から構成されている。第1章には、本研究の背景及び目的が記述されている。第2章では、サケ白子由来DNAについてのキャラクターゼーションと海藻から得られる酸性多糖であるアルギン酸を用いたDNAの素材化が述べられている。また抗菌剤である銀イオンとDNAとの相互作用が調べられ、以前に当研究室で報告された抗菌性DNA-アルギン酸フィルムについて、その活性のメカニズムと、薬剤の担体としてのDNAの有効性について詳細に検討された。第3章では、DNAとコラーゲンよりなるハイブリッド線維を調製し、その性質について検討された。以前に当研究室においてコラーゲンの線維化の過程にDNAを添加すると、ペプシンで消化したコラーゲンをを用いたにも関わらず、明確な天然型の横紋構造を持つコラーゲン線維が形成することが報告された。本章では、DNAとコラーゲンの相互作用についてさらに調べ、DNA分子の存在により他の酸性高分子とは異なったメカニズムでコラーゲン分子の秩序だった会合が行われることが示された。このハイブリッド線維の細胞に対する親和性について、*in vitro*系でヒト線維芽細胞を培養することにより評価した。その結果、コラーゲン線維上では培

養時間に依存して線維芽細胞は増殖していったのに対し、DNA-コラーゲン線維上ではほとんど増殖が見られなかった。以上の結果は、DNA はコラーゲンの線維構造のみならず、細胞外マトリックスとしてのコラーゲン線維の機能も変化させる高分子素材であることを示している。第4章では 第2,3章で述べられたDNA-アルギン酸複合体やDNA-コラーゲン複合体に対してDNA結合性タンパク質である抗DNA抗体が反応するかどうかを調べ、これらを血清中の抗DNA抗体の検出に応用することについて述べられている。自己免疫疾患の一つである全身性エリテマトーデス(SLE)の患者血清中に、DNA と特異的に結合する抗DNA抗体が存在することが知られている。現在までにELISA法(酵素抗体法)による抗DNA抗体の測定が検討されてきたが、DNAの固定化剤として用いた塩基性ポリペプチドに対する非特異的な抗体の結合が生ずる欠点があり、新しいDNAの固定化法が望まれている。そこで、DNAを固定化したアルギン酸ゲルにSLE患者由来の抗DNA抗体を含む血清を反応させた。非吸着画分を洗浄除去した後でDNA-アルギン酸複合体に吸着した画分を回収し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびイムノブロッティングを行った結果、DNA-アルギン酸複合体に対する抗体の吸着が認められた。またアルギン酸またはコラーゲンをを用いてポリスチレン製96穴マイクロプレート上にDNAを固定化し、ELISAにより様々な血清中の抗DNA抗体の検出を行い、ポリリジンを用いる方法と比較した。血清中の抗DNA抗体はポリリジンと同様にアルギン酸もしくはコラーゲンをを用いて固定化したいずれのDNAに対しても吸着した。一方ポリリジンと反応する抗体を含む血清試料についても、それぞれの固定化剤に対しての吸着は少なく、ポリリジンを用いる方法で指摘されていた欠点が、改善されていることが分かった。また今回のELISA法による検出と現在流通している市販のキットを用いたRIA法による反応性について比較検討したところ、全く相関を示さなかった。ここで、DNAと抗DNA抗体の反応性について検討したところ、用いるDNAや固定化剤の種類により、その反応性が変化した。このことは、抗DNA抗体の反応性に関して抗原となるDNAの形態が重要であることを意味し、ELISA法とRIA法の検出特性の違いを引き起こす一つの原因であることがわかった。第5章は、本研究の総括であり、第2,3,4章で得られた結果から、DNAの機能性素材としての有効性が述べられ、このことから、産業廃棄物として得られるサケ白子DNAの有効利用が可能であることが示されている。

このように本論文は、廃棄されているサケ白子DNAの機能性素材としての利用に関して大きく貢献したと考えられる。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士(地球環境科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。