

学 位 論 文 題 名

Studies on the DNA-collagen complex
for the application as the DNA composite material

(DNA 複合材料への応用を目指した DNA
- コラーゲン複合体に関する研究)

学位論文内容の要旨

地球環境問題の解決にとって廃棄物の有効利用を進めることは、今後、さらに重要な課題になるものと予測されている。牛皮、鮭白子、蟹殻それぞれから得られるコラーゲン、DNA、キチンキトサンは、食品や化粧品などに利用されている事が知られている。しかし、一部の牛皮、鮭白子、蟹殻は有効利用されず、廃棄物として処理されている。本研究室では、特に鮭白子由来のDNAを活用して付加価値を持った新規の機能性材料を開発し、また、その応用面を検討してきた。これまでに鮭白子由来のDNAと牛皮由来のコラーゲンに注目し、DNA-コラーゲン複合体の検討をしてきた。その結果、鮭白子由来のDNAはコラーゲンに結合し、DNA-コラーゲン複合体を形成することが明らかとなっている。このような複合体を高機能性材料として活用するためには、この複合体の形成過程及び構造を明らかにすることが、きわめて重要である。しかし、この複合体の形成過程や構造に関する情報は不明瞭かつ不足していた。その原因の一つとして、利用している鮭白子由来のDNAは、分子量と形状が共に不均一である事が挙げられる。この問題点を解決するために、分子量及び形状の均一なDNAが必要となる。そこで、本研究では、分子量及び形状が均一であると報告されているプラスミドDNAを用いて、DNA-コラーゲン複合体の形成過程及び構造について詳細に検討した。

プラスミドDNAを制限酵素処理及び熱処理などの遺伝子工学的な手法を用いることにより、形状の異なる分子量の均一なDNAを調製し、DNA-コラーゲン複合体の形成過程及び構造へのDNA形状の影響について調べた。コラーゲンに添加するDNAは、二本鎖直鎖状(ds/lin. DNA)、二本鎖環状(ds/cyc. DNA)、一部一本鎖DNAを持つ二本鎖直鎖状(ds/ss/lin. DNA)の三種類を用いた。複合体の形成過程は濁度と動的光散乱法を用いて調べ、生成した複合体の構造は透過型電子顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡などを用いて調べた。濁度の経時変化測定から、コラーゲンに分子量が均一なDNAを添加した場合は、いずれの形状のDNAを添加した場合でもコラーゲンのみの場合と比べて濁度の増大速度が著しく低下した。また分子量が均一なDNAの中でもds/cyc. DNAを添加した場合には、濁度の増大速度が最も低下した。生成した複合体線維の透過型電子顕微鏡観察において、ds/lin. DNA及びds/cyc. DNAをコラーゲンに添加した場合は、新規の

コラーゲンが規則的に配列した網状のねじれた線維構造が観察された。一方、ds/ss/lin. DNAをコラーゲンに添加した場合には、コラーゲンが規則的に配列した直線的な線維構造と網状の線維構造の二種類が観察された。共焦点レーザー顕微鏡によるゲルネットワーク観察及びその画像解析から、ds/lin. DNA及びds/cyc. DNA の場合には、複合体のゲルネットワークは均一であり、コラーゲンとDNAが共存している事が分かった。一方、ds/ss/lin. DNAを添加した場合には、ゲルネットワークは不均一で、部分的にDNAが凝集している様子がみられた。従って、DNAの形状により、複合体の形成過程が異なり、複合体の構造は、添加するDNAの構造が一本鎖、二本鎖によって大きく異なることが明らかとなった。

次に、新たに見出された網状の線維構造を持つ複合体 (ds/lin. DNA-コラーゲン及びds/cyc. DNA-コラーゲン複合体) を更に詳しく調べるために電荷比 (+/-) による複合体の形成過程及び構造への影響を調べた。コラーゲンとDNAの混和する体積比とコラーゲンの濃度を一定にし、添加するds/cyc. DNAの濃度を変化させる事により、電荷比を0.4から18まで変化させた。様々な電荷比における複合体の様子を濁度、透過型電子顕微鏡、蛍光、円偏光二色性 (CD)、偏光顕微鏡を用いて調べた。濁度の経時変化測定により、複合体の形成速度は、電荷比に大きく依存し、電荷比が1.8の時に最も複合体形成速度が低下した。透過型電子顕微鏡による複合体線維の観察から、コラーゲンが規則的に配列した網状のねじれた線維は、すべての電荷比において観察されたが、複合体線維の太さ及び密度が電荷比により変化した。複合体のCDスペクトルは電荷比により異なり、電荷比が1.8以下の時のCDスペクトルと偏光顕微鏡観察から、複合体の構造が液晶構造に似た規則的なものである事が明らかとなった。従って、DNA-コラーゲン複合体の構造及び形成過程はコラーゲンとDNAの電荷比に大きく影響を受けることが明らかとなった。更に複合体の構造は、DNAとコラーゲンの相互作用により、規則的に配列していることが示唆された。

以上の結果から、分子量や形状の均一なDNAを用いることによって、DNA-コラーゲン複合体の構造及び形成過程を詳細に調べる事が可能となり、添加するDNAの形状や濃度により、DNA-コラーゲン複合体の形成過程及び構造を制御できる事が明らかとなった。分子量と形状の均一な二本鎖DNA-コラーゲン複合体は、特殊な構造を形成しているため、新しい機能性材料として期待できる。分子量や形状の不均一な鮭白子由来のDNAの質を向上させることにより、鮭白子由来のDNAを用いたDNA複合材料の応用は、更に発展する事ができると考えられる。このように本研究によりDNA複合材料の応用を考える上で非常に重要な知見が得られた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 則 雄
副 査 教 授 坂 入 信 夫
副 査 教 授 荒 木 義 雄
副 査 助 教 授 外 山 吉 治 (群馬大学工学部)

学 位 論 文 題 名

Studies on the DNA-collagen complex for the application as the DNA composite material

(DNA 複合材料への応用を目指した DNA
- コラーゲン複合体に関する研究)

地球環境にとって廃棄物の有効利用は、今後更に重要になるものと考えられる。牛皮, 鮭白子, 蟹殻から得られるコラーゲン, DNA, キチン・キトサンは、食品や化粧品などに利用されているが、一部の牛皮, 鮭白子, 蟹殻は利用されず、廃棄されている。本研究室では、特に鮭白子から得られる DNA の高付加価値機能性材料としての利用を目指している。本研究室では、以前に鮭白子由来の DNA とコラーゲンに注目し、DNA-コラーゲン複合体の研究を行った。この複合体の応用に向けて、その構造及び形成過程を詳細に明らかにすることが極めて重要である。しかし、この複合体の構造や形成過程についての情報は不明瞭かつ不足していた。それは、鮭白子由来の DNA が、分子量分布が広く、形状が統一されていないという事が原因として挙げられる。この問題を解決するためには、分子量及び形状のそろった DNA を用いる事が必要となる。そこではじめに、コラーゲンに添加する DNA を鮭白子由来から大腸菌由来のプラスミド DNA に換えるため、イオン交換カラムを用いて生化学で取り扱う DNA の 1000 倍量のレベルでプラスミド DNA を大量に調製し、複合体の構造や形成過程について詳細に検討を行った。

このプラスミド DNA を酵素処理及び熱処理などの遺伝子工学的手法を行うことにより、今まで不可能であった統一された形状及び分子量の DNA を取り扱い、DNA-コラーゲン複合体の構造及び形成過程における DNA 形状の効果について検討を行った。添加する DNA は、二本鎖直鎖状(ds/lin. DNA)、二本鎖環状(ds/cyc. DNA)、一部一本鎖 DNA を持つ直鎖状(ds/ss/lin. DNA)の3種類を用いた。複合体の形成過程は濁度と動的光散乱法を用い、複合体の構造は透過型電子顕

顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡などを用いて調べた。コラーゲンに単一分子量の DNA を添加した場合の濁度の挙動は、分子量分布を持つ鮭白子由来の DNA を添加した場合と大きく異なり、いずれの形状の DNA を添加した場合でもコラーゲンのみの場合と比べて線維化速度が大きく減少した。複合体の線維構造においては、ds/ss/lin. DNA をコラーゲンに添加した場合は、コラーゲンが規則的に配列した直線的な線維が観察され、ds/lin. DNA 及び ds/cyc. DNA の場合は、コラーゲンが規則的に配列した新規の網状の線維が新たに観察された。ゲルネットワークにおいても ds/ss/lin. DNA を添加した場合は、不均一で部分的に DNA が凝集している様子が観察され、ds/lin. DNA 及び ds/cyc. DNA の場合は、複合体のゲルネットワークは均一であり、コラーゲンと DNA が共存している事も明らかとなった。従って、複合体の構造は、添加する DNA の構造が一本鎖、二本鎖によって大きく異なっていることが分かった。以上から添加する DNA の形状によって複合体の構造及び形成過程が大きく異なることが明らかとなった。

次に、新たに見出された網状の線維構造を持つ複合体 (ds/lin. DNA-コラーゲン及び ds/cyc. DNA-コラーゲン複合体) を更に詳しく調べるために電荷比(+/-)による複合体の構造及び形成過程の影響を濁度、透過型電子顕微鏡、蛍光、円偏光二色性を用いて調べた。その結果、複合体の線維化速度とコラーゲンに対する ds/cyc. DNA の結合量は電荷比に依存している事が明らかとなった。コラーゲンが規則的に配列した網状のねじれた線維は、すべての電荷比において観察された。また、電荷比が 1.8 以下の複合体の CD スペクトルから、複体内で DNA が液晶構造に似た構造を有している可能性が示唆された。このことから、DNA-コラーゲン複合体の構造及び形成過程はコラーゲンと DNA の電荷比に大きく影響を受けることが明らかとなった。

以上の結果から、分子量や形状の統一された単一分子量の DNA を用いると、添加する DNA の形状や濃度により、DNA-コラーゲン複合体の構造及び形成過程を制御できる事が明らかとなった。分子量と形状の統一した二本鎖 DNA-コラーゲン複合体は、特殊な構造を形成しているため、新しい機能性材料として期待できる。分子量や形状の統一されていない鮭白子由来の DNA の質を向上させることにより、鮭白子由来の DNA を用いた DNA 複合材料の応用も、更に発展すると考えられる。このように本研究により DNA 複合材料の応用を考える上で非常に重要な知見が得られた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、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。