

2007年6月29日

エコロジー工学専攻	学籍番号	015514
申請者氏名	Rahman Md. Masudur ラーマンモハマドマスデウル	

指導教官氏名	水野 彰
--------	------

論文要旨 (博士)

論文題目	A study of metal complex and protein tag binding to DNA and its characterization for biotechnology 「DNA と特異的に結合する金属錯体およびタンパク質タグに関する基礎的研究とバイオテクノロジーへの応用」
------	--

プラチナを含む金属錯体であるシスプラチンは、非常に有効な抗癌剤として広く使われている。その抗癌作用のメカニズムに関する基礎的研究により、ターゲットが細胞内の染色体DNAであることが分かっている。ただ、シスプラチンは副作用が強く、患者への投与も一日あたり100mg 程度に制限されるといった問題がある。他のプラチナ系金属であるロジウムを含む金属錯体 tetrakis(μ -carboxylato) dirhodium(II)は今後有望な抗癌剤として注目されている。これらは、生体内でのDNA合成反応を阻害するが、その詳しいメカニズムは明らかにされていない。また、このロジウム錯体はポリアデニル酸 (poly-A) には結合するが poly-G や poly-C とは結合しないとの報告があり、DNAの特定の塩基を標識できる金属としての幅広い利用への可能性を持っている。本研究ではロジウム錯体に着目し、DNAとの相互作用について詳しく解析することを目的とした。

ロジウム錯体として Rhodium (II) acetate ($\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4$, 以後 Rh1 とする)、または Rhodium (II) trifluoroacetamide ($\text{Rh}_2(\text{NHOCCH}_2\text{F}_3)_4$, 以後 Rh2 とする)を選び、大腸菌のプラスミド DNA (pUC19 DNA) との相互作用を調べた。Rh1 と pUC19 DNA が結合することを、アガロースゲル電気泳動と ICP-MS によって確認した。まず、直鎖化した pUC19 DNA に対して Rh1 が結合し、電気泳動でより遅い移動度になることを示した。次に、超らせん構造を持つ pUC19 DNA と Rh1 または Rh2 と結合させた結果、プラスミド DNA のトポロジカルな構造変化を引起すことが観察された。DNA と Rh1 あるいは Rh2 の量比を調節することにより、様々な超らせん状態の DNA が得られた。pUC19 DNA の構造変化と巻き戻しは AFM (atomic force microscopy) によっても観察された。Rh1-DNA 複合体の結合の様子を実験的に調べた結果、それが配位結合であることが確かめられた。これは、 $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4$ が pUC19 DNA と反応して配位結合し、安定な Rh1-DNA 複合体を形成していることを明確に示している。また、DNA との複合体形成の反応速度は Rh2 の方が Rh1 よりも大きいことが明らかになった。これらに加えて、DNA に結合したロジウム錯体が DNA に及ぼす影響について実験を行った。Rh1 あるいは Rh2 が DNA に結合することで、制限酵素反応が阻害されることが電気泳動の結果から示された。

認識配列の異なる複数の制限酵素を調べた結果、Rh1 は A-T あるいは G-C ペアのどちらかに特異的に結合するものではないことを、Rh2 は G-C ペアにより高い親和性を持つことを明らかにした。また、この結合は PCR による DNA 増幅を阻害することが明らかになった。これは Rh1 あるいは Rh2 の DNA への結合が試験管内の DNA 合成反応を阻害することを示している。次に、Rh1 が細胞内の DNA 複製を阻害するかを調べるため、Rh1 処理したプラスミド DNA による大腸菌の形質転換を行った。微量の Rh1 がプラスミド DNA に結合することで形質転換が阻害されたことから、Rh1 は細胞内の DNA 複製も阻害することが示された。結論として、ロジウム錯体は pUC19 DNA に配位結合し、制限酵素活性を阻害し、試験管内あるいは生体内の DNA 合成を阻害するということが分かった。これらの研究により、ロジウム錯体は有力な抗癌剤の候補となり得ることが示された。

上記研究は DNA と金属との結合に関わるものであり、最近新規な素材として DNA が注目されているマイクロエレクトロニクス分野への興味を持つに至った。長い DNA の特定の領域に、3重らせん DNA 構造を形成する短い塩基配列を導入し、その部分にタンパク質を結合させること（タンパク質タグ）を試みた。まず、3重らせん DNA 構造が形成されていることをポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析で明らかにした。長さの異なる2種類の DNA において、3重らせん DNA を介してタンパク質タグをつけることに成功した。AFM による解析の結果、DNA 上にタンパク質タグが存在し、その位置は3重らせん形成部位に対応していることが確かめられた。DNA 上の特定の箇所にタンパク質タグをアドレスする技術は、DNA による配線方法やネットワーク形成への一助となると考えられる。