

平成22年 3月 1日現在

研究種目：若手研究B

研究期間：2007～2009

課題番号：19750187

研究課題名（和文）サケ白子DNAを用いた環境調和型機能性材料の創生

研究課題名（英文）Preparation of environmental materials consisting of salmon milt DNA

研究代表者

山田 真路 (YAMADA MASANORI)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：80443901

研究成果の概要（和文）：DNAと環状オリゴ糖からなる複合体の創製を試みた。その結果、これら複合体はDNAのインターカレーション機能と環状オリゴ糖の包接機能という両方の機能を有していた。そこで、これら複合体を用い、環境浄化剤として利用したところ、水溶液中に存在するダイオキシンやPCB、ビスフェノールAの様な有害物質を効率よく除去できる機能を有していることが確認された。これらのことからDNAと環状オリゴ糖からなる複合体は環境調和型材料として利用できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Recently, we prepared water-insoluble DNA-films by UV irradiation. These DNA-films bound endocrine disruptors having a planar structure, such as dioxin and PCB derivatives. However, other harmful endocrine disruptors, which lack a planar structure, such as bisphenol A and diethylstilbestrol, did not bind to the water-insoluble DNA-films. Therefore, we prepared the DNA-cyclodextrin composite material by mixing the DNA and the cyclodextrin (CD). As a result, these composite materials had properties of both the double-stranded DNA, such as intercalation, and the CD, such as encapsulation of an organic molecule into the intramolecular cavity. Therefore, these materials could accumulate not only the harmful compounds with a planar structure, but also the non-planar molecules, such as bisphenol A and diethylstilbestrol. These DNA-CD composite materials may have the potential as novel environmental materials that absorb harmful compounds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：生体関連高分子化学

科研費の分科・細目：材料化学・高分子・繊維材料

キーワード：DNA、環境浄化剤、生体高分子、内分泌かく乱化学物質、インターカレーション、二重らせん、ダイオキシン、環境調和型材料

1. 研究開始当初の背景

日本は四方を海で囲まれている。そのため、海から容易に有用な海産資源を得ることが出来る。しかしながら、これら海産資源の中には資源として顧みられないだけでなく、産業廃棄物として処分されている物質も数多く存在している。その一つがサケ(鮭)の白子に含まれている DNA (デオキシリボ核酸)である。そこで、近年、産業廃棄物の有効利用という観点からサケ白子由来 DNA の利用が注目されている。特に、DNA は二重らせん構造という特異的な構造を形成しているため、様々な物質と特異的、選択的に相互作用することが知られている。そこで、現在までに申請者は DNA を環境浄化剤として用いることによってダイオキシンや PCB、ベンゾピレンの様な平面構造を有する有害物質を DNA 特有の機能であるインターカレーション(平面構造を有する物質が DNA の塩基対間に平行挿入する現象)により、選択的に捕捉することを見出した。しかしながら、これら DNA 材料は平面構造を有しないビスフェノール A やジエチルスチルベストロールの様な有害物質を除去する機能は有していなかった。そのため、DNA を環境材料として利用するには更なる改良が必要であると考えられている。

環状オリゴ糖の一種であるシクロデキストリン(CD)は D-グルコースからなる物質である。この CD の特徴として、分子内に空孔を有するため、その空孔内に様々な有機化合物を包接することが出来る。また、CD を構成しているグルコースの個数を変えることによって空孔サイズを変えることができるため、目的に合わせた物質を包接することが可能である。そのため、CD の水溶性を高分子化することによって補い、有害物質除去剤や有害物質検出センサーへ応用することが報告されている。それに加え、CD は、食品添加剤としても利用できるほど人体や環境に優しい素材である。これらのことから、CD の利用は本研究課題名にもなっている「環境調和型機能性材料」という概念に沿っていると考えられる。

2. 研究の目的

背景において述べたように、二重らせん DNA はダイオキシンや PCB のように有害な物質を選択的に除去するものの、DNA 特有であるインターカレーション機能を利用しているため、平面構造を有しない物質の除去は出来なかった。そこで、本研究課題では、これら DNA の機能を補うために環状オリゴ

糖の 1 つである CD と複合化することによって、様々な有害物質を除去できる環境調和型材料の創製を試みた。また、より実際の環境に近い条件として様々な有害物質が存在する溶液(多成分系)からの有害物質の除去も試みた。それと共に、物理的な強度を有した DNA と CD からなる複合体、また、空孔サイズの異なる CD を用いた DNA 複合体の創製も試みた。

3. 研究の方法

本研究課題は以下に示した手法により実験を遂行した。

(1) CD を修飾した高分子の合成

CD は高い水溶性のため環境材料として使用する場合は、高分子化する必要がある。そこで、ピリジン溶液法によってトシル化した β -CD とポリカチオンであるポリアリルアミン(PAA、分子量 10 万以上)とを反応させることによって CD 修飾 PAA(PCD) を合成した。合成スキームを図 1 に示した。物質の同定は $^1\text{H-NMR}$ と IR スペクトルにより行なった。また、PAA への CD の修飾率は $^1\text{H-NMR}$ から求めた。

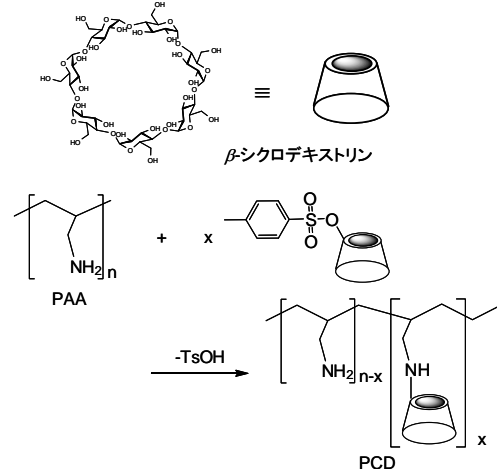


図 1 PCD の合成スキーム。

(2) DNA と CD からなる複合体の創製

DNA と CD からなる複合体は DNA 水溶液(サケ白子由来二重らせん DNA、分子量 500 万以上)と PCD 水溶液をテフロン板上で任意の割合で混合することによって作製した。複合体の水に対する安定性は、260 nm の吸光度から評価した。また、物理的な強度を得るために、シランカップリング剤を添加することも試みた。複合体の分子構造は IR スペクトルから考察し、物理的な強度は引っ張り試験機によって評価した。

(3) DNA-CD 複合体による有害物質の除去

DNA で除去できる有害物質として、ダイオキシン誘導体であるジベンゾ-*p*-ジオキシンとジベンゾフラン、PCB 誘導体であるビスフェニルを用いた。また、DNA で除去出来ない有害物質としてビスフェノール A やジエチルスチルベストロール、ノニルフェノールなどを用いた。用いた有害物質の構造を図2に示した。また、これら有害物質水溶液として飽和水溶液を用いた(濃度:数 ppm~数 10 ppm)。有害物質の除去率は作製した複合体を溶液に浸漬後、24 時間放置し、吸光度の変化から計算した(バッチ法)。また、多成分からなる有害物質の除去は、同様に複合体を多成分系の溶液に添加後、HPLC により分析することによって除去率を求めた。

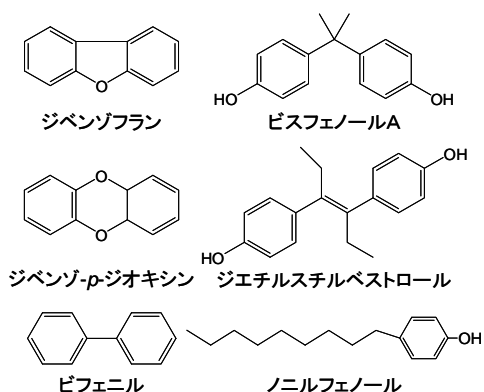


図2 実験に用いた様々な有害物質。

(4) DNA-CD 複合体のフィルターへの固定化

シランカップリング剤はガラス表面と容易に反応することが知られている。そこで、PCD 溶液にシランカップリング剤を加え 24 時間攪拌した溶液と DNA 水溶液とをガラスフィルター上で混合することによって、DNA-CD 複合体修飾ガラスフィルターを作製した。このフィルターをシリンジホルダーに固定化し、有害物質を含んだ溶液をシリンジに通して流すことによって有害物質の除去を試みた。

(5) 径の異なる CD による有害物質の除去

CD は結合するグルコースの個数が 6,7,8 と変わることによって、 α -、 β -、 γ -CD と言われ、空孔径の大きさが変化する。そこで、 β -CD 修飾 PAA (β -PCD) だけでなく、 α -CD 修飾 PAA (α -PCD) や γ -CD 修飾 PAA (γ -PCD) も合成し、同様に DNA と複合化を試みた。有害物質の除去は、(3) に示したバッチ法によって評価した。

4. 研究成果

(1) DNA-PCD 複合体の作製

DNA-PCD 複合体は DNA 水溶液と PCD 水溶液を任意の割合で混合することによ

って作製した。図3に DNA-PCD 複合体の写真を示した。この複合体が DNA と CD の機能を有しているか確認するため、DNA にインターカレートする臭化エチジウムと CD の空孔に包接される *p*-ニトロフェノールで染色した。その結果、図3に示すように、白色の複合体が臭化エチジウムによって赤色に、*p*-ニトロフェノールによって黄色に染色されることが確認できた。この結果、作製した DNA-PCD 複合体は DNA のインターカレート機能と CD の包接機能を有していることが確認された。一方、このような DNA-PCD 複合体は、長時間の水への浸漬においても安定であった。

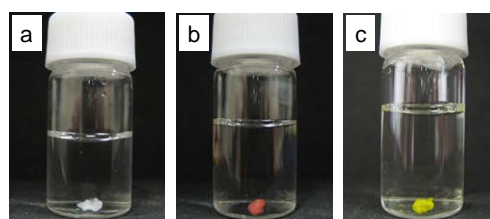


図3 DNA-PCD 複合体の写真。a, 染色前の複合体; b, 臭化エチジウムで染色した複合体; c, *p*-ニトロフェノールで染色した複合体。

(2) DNA-PCD 複合体の分子構造

作製した DNA-PCD 複合体の分子構造を IR スペクトルから解析した。その結果、複合化することによって 1230 cm^{-1} 付近の DNA のリン酸基に由来する吸収と 3100 cm^{-1} 付近の PCD のアミノ基に由来するシグナルが、低端数側にシフトすることが確認された。このことから、複合体は DNA のリン酸基と PCD のアミノ基が静電的に相互作用し、架橋構造を形成することによって、安定化していることが示唆された。

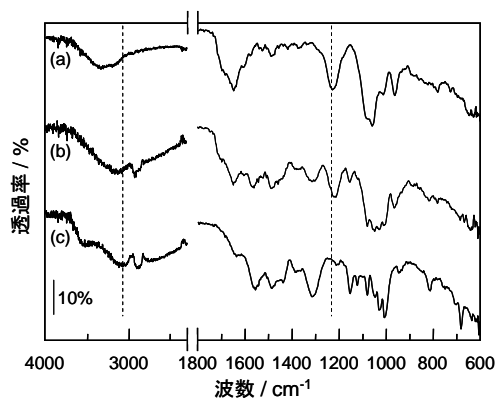


図4 DNA-PCD 複合体の IR スペクトル。(a), DNA; (b), DNA-PCD 複合体; (c), PCD。

(3) DNA-PCD 複合体による有害物質の除去

DNA-PCD 複合体を用いた有害物質の除去は、有害物質を含んだ水溶液に複合体を添加し、24 時間放置(バッチ法)することによ

て行なった。有害物質の除去率は複合体添加前後の吸光度変化から求めた。図5に複合体および紫外線照射DNA素材（DNAだけからなるDNA材料）添加前後のジベンゾ-*p*-ジオキシンとビスフェノールAのUVスペクトルを示した。

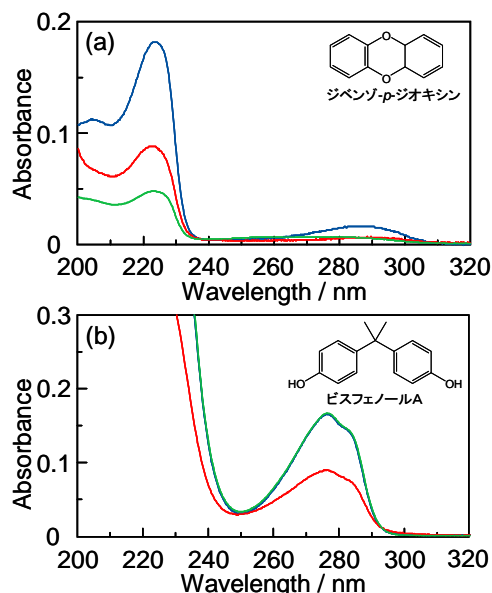


図5 DNA-PCD複合体添加前後のUVスペクトル。(a), ジベンゾ-*p*-ジオキシン; (b), ビスフェノールA。青, 複合体添加前; 赤, 複合体添加後; 緑, DNA添加後。

この結果、複合体を添加することによって、DNAによって除去することが出来るジベンゾ-*p*-ジオキシンを除去できることが確認された。これは、複合体中のDNAの機能が有効に働いたためであると考えられる。そこで、DNAで除去することが出来ないビスフェノールAの除去を試みた。その結果、DNAでは除去することが出来ないビスフェノールAを約40%除去できることを確認することが出来た。これは、複合体中に含まれるCDがビスフェノールAを空孔内に取込んだためであると考えられる。一方、ジベンゾ-*p*-ジオキシンにおいて複合化することによってDNAのみより除去率が低下しているのは、複合化することによって、DNAの構造に歪みが生じインターカレーション機能が低下したためであると考えられる。

次に、DNA-PCD複合体を用い様々な有害物質の除去を試みた。その結果を図6に示した。また、コントロールとして紫外線照射DNA素材を用いた有害物質の除去の結果も示した。この結果、DNA-PCD複合体はDNAで除去することが出来るジベンゾフランやビフェニルを除去出来るだけでなく、DNAでは除去することが出来ない、ジェチルスチルベストロールやノニルフェノールを除去

することが出来た。また平面構造を有しているが環構造が小さいためDNAにインターカレーションする事ができないベンゼンも除去することが出来た。これら、平面構造を有さない物質および環構造の小さな物質の除去はCDの包接機能に基づいているものであると考えられる。この結果、今回作製したDNA-PCD複合体は、平面構造を有する有害物質だけでなく、平面構造を有しない有害物質を除去する機能を持った新規な素材であることが確認された。

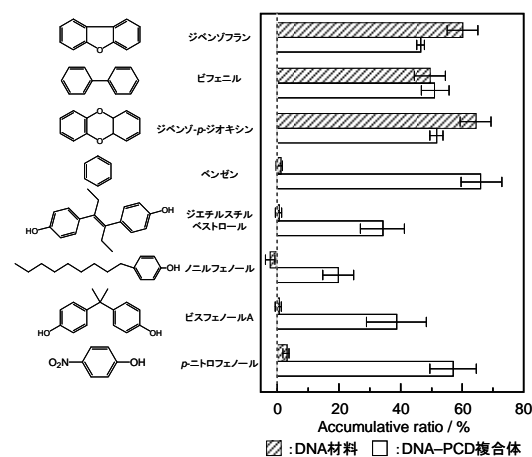


図6 DNA-PCD複合体による様々な有害物質の除去。

(4) 多成分からの有害物質の除去

(3)の結果において、DNA-PCD複合体が単一系において平面構造を有した有害物質だけでなく、平面構造を有しない有害物質も除去する機能を有していることが確認された。しかし、実際の環境において有害物質は単一成分として存在しているのではなく、多成分系として存在している。そこで、多成分からなる有害物質（ジベンゾフラン、ビフェニル、ビスフェノールA、ナフタレンの4成分）の溶液を調製し、この溶液に複合体を添加後、HPLCで分離することによって有害物質の除去を試みた。

図7に多成分系の有害物質溶液に複合体を添加した場合のクロマトグラムを示した。この実験において、CD修飾高分子として、CDを分岐型ポリエチレンイミン（PEI、分子量8万以上）に修飾したPEICDを用いた。その結果、DNA-PEICD複合体を用いることによって、それぞれの物質に由来するピークの減少が見られ、平面構造を有する有害物質だけでなく、平面構造を有しない有害物質を除去できることが確認された。また、これら有害物質の除去率は単一系からの除去率と大きく変わらなかった。これは、有害物質に対してCDおよびDNAが過剰量存在しているためであると考えられる。これらのことから、DNA-CD複合体は、単一系からだけでな

く、多成分系からも有害物質を除去する機能を有していることが示唆された。

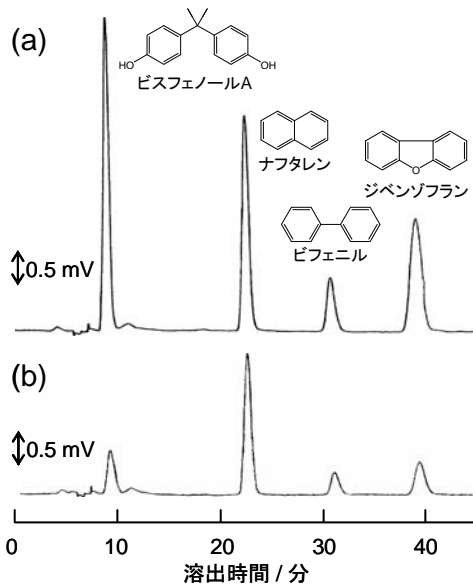


図7 DNA-PEICD 複合体添加前後のクロマトグラム。それぞれのピークに由来する有害物質の構造を示した。(a), 複合体添加前;(b), 複合体添加後。

(5) 無機物を添加した DNA-PCD 複合体

DNA-PCD 複合体を実際の環境下で用いる場合は、その物理的な強度が問題になる。そこで、無機物としてシランカップリング剤を添加し、物理的な強度を有した DNA-PCD 複合体の作製を試みた。その結果、DNA-PCD 複合体にシランカップリング剤として 3-アミノプロピルトリエトキシシランを添加することによって、2 倍以上の力学的強度の増加が確認された。また、得られた強度を既存の高分子と比較するとポリスチレンと同等であった。そこで、物理的な強度を有した DNA-PCD-シランカップリング剤複合体を用い単一系および多成分系からの有害物質の除去を試みたところ、同様に有害物質を除去することが出来た。これらのことから、物理的な強度を有した DNA-PCD 複合体の創製に成功した。

一方、シランカップリング剤はガラス表面と反応することが知られている。その為、DNA-PCD-シランカップリング剤複合体はガラス表面と反応することが期待される。そこで、ガラス繊維から出来たガラスフィルターに DNA-PCD-シランカップリング剤複合体を固定化し、この DNA-PCD フィルターを用いた有害物質の除去を試みた。その結果、シリンジを用い、DNA-PCD フィルターに有害物質を流したところ、効率よく有害物質を除去することが確認された。また、このフィルターを用いた有害物質の除去はバッチ法を用いた場合より、短時間で、かつ除去率

が高かった。これは、複合体をフィルター化することにより、溶液と接触する面積が大きくなったためであると考えられる。これらのことから、DNA および CD のガラスフィルターへの固定化法としてシランカップリング剤の添加は、極めて有用な方法であることが示唆された。

(6) 径の異なる CD を用いた有害物質の除去

CD は結合するグルコースの個数によって径のサイズが異なることが知られている。そのため、空孔サイズを変えることによって、有害物質の除去量を制御できることが期待される。そこで、 β -CD (空孔サイズ: ca. 0.7 nm) より径のサイズが小さい α -CD (空孔サイズ: ca. 0.5 nm) と径のサイズが大きい γ -CD (空孔サイズ: ca. 0.9 nm) を用いた実験を行なった。

α -CD 修飾 PAA (α -PCD) と γ -CD 修飾 PAA (γ -PCD) は β -CD 修飾 PAA と同様の方法により合成した。複合体は、DNA と混合することによって作製した。有害物質の除去は (3) に示したバッチ法により試みた。その結果、 α - β - γ -複合体ともに DNA で除去できる有害物質 (ジベンゾ-*p*-ジオキシン、ジベンゾフラン、ビフェニル) を集積する機能を有していた。その一方で、DNA で除去出来ない物質 (ビスフェノール A、ジエチルスチルベストロール、ベンゼン) の集積には大きな差が生じ、 α -PCD 複合体ではビスフェノール A とジエチルスチルベストロールの除去を確認することが出来なかった。これは、 α -CD の空孔サイズが小さいため、有害物質を包接することが出来なかったためであると考えられる。また、 γ -PCD 複合体では β -PCD 複合体を用いた場合より、除去率が低かった。これは、 γ -PCD の空孔径が大きいため、安定に包接されなかったためであると考えられる。この様な包接能の違いは、ビスフェノール A を用いた蛍光スペクトルの測定からも示唆された。

以上のことから、有害物質の除去率は β -複合体 > γ -複合体 > α -複合体であり、環境調和型材料として β -CD を有した複合体が最も適していることが示唆された。

(7) 今後の展望

本研究課題において、二重らせん DNA と環状オリゴ糖である CD からなる複合体の創製に成功した。この複合体は、DNA のインターカレーション機能と CD の包接機能を有していた。そのため、水溶液中から様々な有害物質を集積することが出来た。また、無機物を添加した複合体はガラスフィルター等に固定することができ、効率的に有害物質を除去することが可能であった。このため、今回作製した DNA 材料は、汚染された水の浄

化などの環境調和型機能性材料としての利用だけでなく、分析溶液の前処理、水溶液中からの有用成分の回収などに幅広く利用できると思われる。

一方、このような素材は、DNA を基本骨格としたバイオ成分だけからなる環境材料であり、産業廃棄物の有効利用という観点から、極めて有用な材料あると考えられる。それに加え、今回作製した素材は従来考えられている材料開発とは全く異なった側面からのアプローチであるため、学術的な意味も十分あると考えている。これらのことから、研究代表者が提案した「サケ白子DNAを用いた環境調和型機能性材料の創生」は生体高分子を利用した新しい材料開発に一石を投じることが出来たと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① M. Yamada and A. Hamai: Selective accumulation of harmful compounds by the DNA-inorganic hybrid-immobilized glass bead. *Anal. Chim. Acta* (査読有), **674**, 249-254 (2009).
- ② M. Yamada and A. Maeda: Heteropolyacid-conjugated chitosan matrix for triphase catalyst. *Polymer* (査読有), **50**, 6076-6082 (2009).
- ③ M. Yamada and K. Hashimoto: DNA-cyclodextrin composite material for environmental applications. *Biomacromolecules* (査読有), **9**, 3341-3345 (2008).
- ④ M. Yamada and H. Aono: DNA-inorganic hybrid material as selective absorbent for harmful compounds. *Polymer* (査読有), **49**, 4658-4665 (2008).
- ⑤ M. Yamada and M. Amoo: Enzymatic collapse of artificial polymer composite material containing double-stranded DNA. *Int. J. Biol. Macromol.* (査読有), **42**, 478-482 (2008).

[学会発表] (計 21 件)

- ① 田淵慎也, 山田真路: DNA-シクロデキストリン複合体を用いた有害物質の選択的除去, 日本化学会西日本大会 2009, 2009年11月7日, 愛媛大学
- ② 山田真路: バイオ素材、特に DNA を用いた環境汚染物質除去担体の作製, 財団法人 八雲環境科学振興財団 平成 21 年度研究発表会, 2009 年 10 月 30 日, 岡山大学
- ③ 濱井亜加吏, 山田真路: DNA-無機ハイブ

リッドカラムによる有害物質の集積, 第 58 回高分子討論会, 2009 年 9 月 17 日, 熊本大学

- ④ 山田真路, 濱井亜加吏: DNA-無機ハイブリッド体を用いたダイオキシン類の選択的除去, 核酸・核蛋白機能性研究会 第 4 回学術集会, 2009 年 7 月 31 日, 恵庭 RBP
- ⑤ 山田真路: サケ白子由来 DNA の環境分野への応用, 岡山地区高分子懇談会 平成 21 年度第 1 回定例講演会, 2009 年 7 月 15 日, 岡山リサーチパーク

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.ous.ac.jp/~biopoly/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 真路 (YAMADA MASANORI)
岡山理科大学・理学部・准教授
研究者番号: 80443901

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: