

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12408

研究課題名(和文) サケ白子DNAを用いた生分解性バイオプラスチックの創製

研究課題名(英文) Preparation of biodegradable bioplastic 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・教授

研究者番号：80443901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：海洋中のマイクロプラスチックは世界的な問題である。その問題の解決方法の1つが生分解性プラスチックである。そこで、サケ白子由来二重らせんDNAに注目し、生分解性を有するDNAプラスチックの創製を試みた。その結果、二重らせんDNAとHCHOを用いることでDNAプラスチックを作製することに成功した。DNAプラスチックは硬い素材であったがポリエチレンとほぼ同じ破断強度を有していた。更に、DNAプラスチックは生分解性を有しており、その生分解性はHCHO濃度により制御できることが示唆された。以上のことから、サケ白子DNAが生分解性を有したプラスチックとしても利用できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

石油由来のプラスチックは枯渇資源を原料としているというだけでなく、自然界で分解されないため、環境に大きな負荷をかける。本研究課題で作製したサケ白子DNAからなるプラスチックは、原料が産業廃棄物として処分されている生物資源である。加えて、DNAプラスチックは成形したDNA素材をホルムアルデヒド溶液に浸漬後、加熱するという簡便な操作で作製することができる。更に、生分解性を有しているため、環境に負荷を与えないことが考えられる。また、DNAプラスチックはポリエチレンとほぼ同じ引っ張り強度を有していた。以上のことから、サケ白子DNAの生分解性バイオプラスチックとしての利用を提案することができた。

研究成果の概要(英文)：The microplastic is one of the serious problems at the ocean. The bioplastic consisting of biopolymers, which were biodegraded in natural world, is one of the strategies to solve this problem. In this study, we prepared a biodegradable bioplastic consisting of salmon milt DNA. The water-insoluble DNA plastic was prepared by the immersion of a DNA in a formaldehyde (HCHO) solution. The DNA plastic showed thermally stable and highly mechanical properties. These properties were due to the formation of the methylene cross-linkings of HCHO. Furthermore, the DNA plastics indicated a biodegradable property in a nuclease-containing aqueous solution. The biodegradable stability was able to be controlled by the HCHO concentration. Therefore, the DNA plastic with the biodegradable property may have potential use in environmental, agricultural, biomedical, engineering applications, and outdoor leisure products, such as golf tees and fishing fake baits.

研究分野：生体高分子

キーワード：DNA バイオプラスチック 生分解性 分子架橋 機能性材料

1. 研究開始当初の背景

近年、海洋に存在するマイクロプラスチックが世界的な問題になっている。マイクロプラスチックの発生源は様々あるがプラスチック素材が物理的な作用や光化学的なプロセスを経て生成すると考えられている。このようなマイクロプラスチックの大部分は石油由来であり、自然界では分解されない。そのため、海洋に長時間浮遊し、海洋生物に摂取された後、食物連鎖を介して人体に蓄積されると考えられている。これらの問題を解決する方策の1つとして生物由来のバイオプラスチックがある。現在、バイオプラスチックとして生物由来デンプンの発酵で得られた乳酸を重合したポリ乳酸の利用が考えられている。しかし、ポリ乳酸はデンプンの発酵や乳酸の重合プロセスでエネルギーを消費するため、改善の余地がある。そこで、重合プロセスを必要とせず、環境に調和した生体高分子に注目し、生体高分子を用いた生分解性バイオプラスチックの創製¹を試みた。

2. 研究の目的

生体高分子を用いたバイオプラスチックの研究は古くから行われており、セルロースなどの多糖由来、カゼインなどのタンパク質由来のバイオプラスチックが報告されている。しかし、多糖を利用する場合は、多糖のOH基部位に官能基を導入してから樹脂化する必要がある。また、タンパク質を利用する場合は、タンパク質の精製に時間を要することや、分子量が小さいタンパク質は多量の架橋剤を加えないと利用できない等の欠点がある。そこで、本研究課題では現在までに報告例がないサケ白子由来DNAを用いた生分解性バイオプラスチック(DNAプラスチック)の創製を試みた。DNAプラスチックの利点は原料となるDNAは産業廃棄物として処分されているサケの白子から高分子量(>500万)かつ容易に得ることができる。DNA分解酵素・ヌクレアーゼは土壌や水中など我々の身近な環境に存在する。DNAは自然界で加水分解を受け易いリン酸エステル結合を有する。そのため、DNAをバイオプラスチックとして利用できるならば、素材化のコンセプトを含め従来のバイオプラスチックと一線を画す新素材として利用が可能である。

3. 研究の方法

(1) DNAプラスチックの作製

DNAにはサケ白子二重らせんDNA(分子量:>500万)を用いた。SYBR® Green Iを用いサケ白子DNA中の二重らせん割合を測定したところ78.6%であった。DNAプラスチックは次のように作製した。DNAをハンドプレスにより加圧することでΦ13mmのDNAペレットを得た。DNAペレットを様々な濃度のホルムアルデヒド(HCHO)溶液に一定時間浸漬後、80℃で1時間加熱した。この操作は2回繰り返した。

(2) DNAプラスチックの構造および物性評価

DNAプラスチックの構造評価は赤外吸収スペクトル測定(KBr法又はATR法)にて行った。IRサンプルはペレットの表面を削り取ることで作製した。DNAプラスチックの引っ張り強度測定は、サンプル長5mm、掃引速度10mm/minで行った。比較する市販の高分子素材としてポリエチレン(PE)、ポリプロピレン(PP)を用いた。熱物性評価はTG-DTAを用い窒素雰囲気下、昇温速度10℃/minで行った。DNAプラスチックの膨潤性評価は、DNAプラスチックを一定時間溶媒に浸漬し、浸漬前後の質量比から求めた。膨潤率は次式により求めた。

$$\text{膨潤率} = \frac{(\text{浸漬後の質量} - \text{浸漬前の質量})}{\text{浸漬前の質量}}$$

溶媒には体積比で調製した水-エタノール混合溶媒を用いた。

(3) DNAプラスチックの生分解性評価

DNAプラスチックの生分解性評価は次のように行った。DNAプラスチックをDNA分解酵素(*Micrococcal nuclease*)を含んだ溶液(20mM Tris-HCl(pH 7.4) + 5mM NaCl)に浸漬し、37℃で一定時間インキュベートした。酵素濃度は4-40 units/mlで行った。DNAプラスチックの分解量は260nmの吸光度から評価した。また、生分解メカニズムは酵素溶液に浸漬前後のDNAプラスチックを目視で評価した。

4. 研究成果

(1) DNAプラスチックの作製

DNAプラスチックはDNAペレットを様々な濃度の架橋剤溶液に浸漬することで作製した。架橋剤としてはHCHO以外にグリオキサル、グルタルアルデヒド、1,3,5-トリオキサン等を用いたが、HCHOが最も効率的に水に安定なDNAプラスチックを形成した。また、HCHO溶

液への浸漬が1回の場合には水に安定なプラスチックを形成しなかったが、2回浸漬した場合、水に安定な複合体を形成した。そこで、DNAプラスチックの作製はDNAペレットをHCHO溶液に浸漬することで作製することとした。

図1にHCHO濃度の異なるDNAプラスチックの水に浸漬前後の写真を示した。20% HCHOよりも低濃度で調製した場合は水に安定なプラスチックを形成しなかったが、20%以上のHCHOを用いた場合、水に安定なプラスチックを形成した。24時間水に浸漬後乾燥した場合は、20%および23%で調製したプラスチックは変形が見られたが、25%および30%で調製したプラスチックは変形も示さなかった。また、30%より高い濃度で調製した場合は乾燥後、クラックが生じ、プラスチックとして使用することができなかった。更に、熱処理を伴わないDNAペレットは水に安定なプラスチックを形成しなかった。そのため、熱処理によりDNA鎖間に架橋反応が生じていることが示唆された。一方、DNAプラスチックは臭化エチジウムおよびSYBR® Green Iでも染色できることから二重らせん構造を形成し、DNAのインターカレーション能をしていることが示唆された。

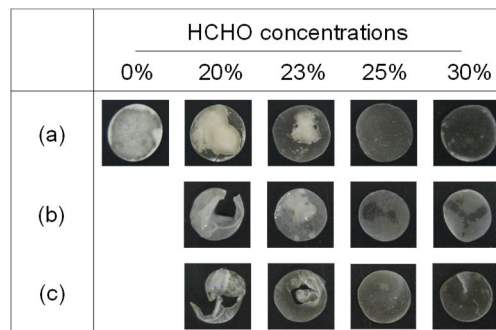


図1 様々なHCHO濃度で作製したDNAプラスチックの写真。(a) 水に浸漬前、(b) 24時間水に浸漬後、(c) 水に浸漬後、乾燥。

(2) DNAプラスチックの膨潤率

DNAプラスチックを溶媒に浸漬し、浸漬前後の質量比から膨潤率を求めた。20% HCHOおよび30% HCHOで調製したDNAプラスチックの水中での膨潤率は、それぞれ0.40, 0.31であった。この値はエタノールの割合が増えると小さくなり、エタノールのみの場合はほぼ0であった。このことから、DNAプラスチックは水およびアルコールに対してほとんど膨潤性を示さないことが示唆された。

(3) DNAプラスチックの力学的物性

DNAプラスチックの引っ張り強度の値を図2に示した。HCHO濃度が20%の場合は、DNAの水への溶解によりプラスチック中のDNA密度が下がり、引張強度も低下した。HCHO濃度25%以上ではDNA素材よりも高くなり、最大の引っ張り強度は約18 MPaであった。得られた値は市販のポリエチレン(PE)とほぼ同等であった。以上のことから、25%以上のHCHO溶液に浸漬することで物理的強度を有したDNAプラスチックが形成されることが示された。一方、SS曲線から求めたDNAプラスチックのひずみ割合は20%以下であり、PEと比べ非常に小さかった。この結果、DNAプラスチックは硬い素材であることが示された。

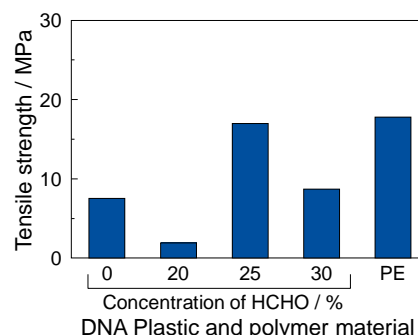


図2 様々なHCHO濃度で作製したDNAプラスチックとPEの引っ張り強度。

次に、DNAプラスチックがアフィンネットワークモデルからなると仮定し、十分に膨潤したDNAプラスチックの引っ張り強度から架橋密度と架橋点間距離を求めた。その結果、それぞれ、 5950 mol m^{-3} 、 $6.54 \times 10^{-10} \text{ m}$ であった。架橋密度および架橋点間距離は、HCHO濃度によって大きく変わるものの、他の高分子に材料と比較すると相対的に小さく、DNAプラスチックの形成にはメチレン架橋だけでなく、水素結合等が大きく関与していることが示された。

(4) DNAプラスチックの構造評価

DNAプラスチックの構造評価をIRスペクトルから行った。図3に様々なHCHO濃度で調製したDNAプラスチックのIRスペクトルを示した。その結果、アデニン、グアニン、シトシンに由来するアミノ基部位のシグナル強度はHCHO濃度が高くなると減少することが示された。また、C-Nのシグナル強度はHCHO濃度が高くなると増加することが示された。この結果、HCHOを加えることで、核酸塩基のアミノ基部位がHCHO介してメチレン架橋を形成していることが示された。

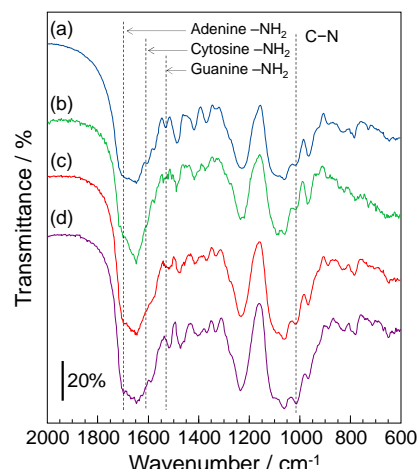


図3 様々なHCHO濃度で調製したDNAプラスチックのIRスペクトル。HCHO濃度 (a) 0%、(b) 10%、(c) 20%、(d) 30%。

DNAの核酸塩基はらせん構造の内側に存在するため、HCHOと反応することは難しいことが推測される。しかし、本実験で用いたサケ白子DNAの二重らせん含有量は78.6%であることから、らせん構造の一部は崩壊

していると考えられる。そのため、らせん構造が崩壊した部位に存在する核酸塩基が HCHO を介してメチレン架橋を形成すると考えられる。また、溶液からの DNA プラスチックの作製はできなかつたため、固体状態で分子間の距離が非常に接近している必要があることが示唆された。

(5) DNA プラスチックの熱物性評価

DNA プラスチックの熱物性を TG-DTA から評価した。図 4 に 25% HCHO 濃度で調製した DNA プラスチックの TG-DTA の結果を示した。この結果、作製した DNA プラスチックは 180 °C 以上において熱分解を示すものの、150 °C 以下において安定であることが示された。一方、乾燥状態の DNA はガラス転移を示さない素材であるが、DNA プラスチックも同様にガラス転移に関連するシグナルは観察されなかつた。これらのことから、DNA プラスチックは熱による成形加工ができないことが示された。

180 °C 付近の熱分解は HCHO と脱脂大豆タンパク質からなる大豆プラスチック²でも同様のシグナルが得られた。このことから、180 °C 付近の熱分解は DNA 鎖の分解によるシグナルではなく、HCHO を介して形成したメチレン架橋の分解によるシグナルであると考えられる。

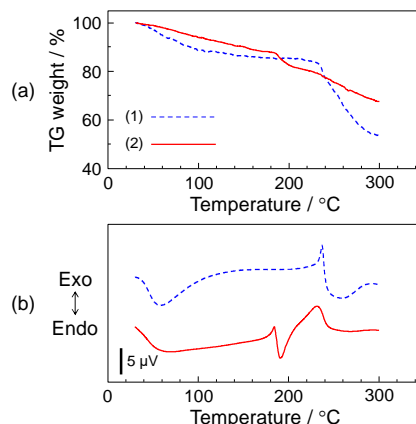


図4 DNAとDNAプラスチックの(a) TGと(b) DTA。(1) DNAのみ、(2) DNAプラスチック。

(6) DNA プラスチックの生分解性評価

DNA プラスチックの生分解性評価を DNA 分解酵素 (*Micrococcal nuclease*) を含んだ溶液³に DNA プラスチックを浸漬することで行った。酵素濃度は 4 – 40 units/ml で行った。酵素量の unit 単位の定義から計算される 40 units/ml における DNA の分解割合は、海水中での DNA の分解割合とほぼ同じであった。生分解割合は 260 nm の吸光度から求めた。

図 5 に DNA プラスチックの生分解性の結果を示した。25% HCHO を用いて調製した DNA プラスチックを酵素濃度 4 units/ml の溶液に浸漬したところ、6 日間で約 10% の分解が見られた。そこで、酵素濃度を高くしたところ酵素濃度とともに分解割合が高くなり、40 units/ml の酵素を用いたところ、2 日間で 90% 以上の分解が見られた。この結果、HCHO を用い作製した DNA プラスチックは生分解性を有していることが示唆された。一方、30% HCHO 濃度で調製した DNA プラスチックを酵素濃度 4 – 40 units/ml で生分解したところ、分解割合は 6 日間でも 10% 以下であった。そこで、40 units/ml で測定を行ったところ、20% HCHO で調製した DNA プラスチックより分解速度は低下したが、4 日間で 90% 以上の分解を示した。これは、HCHO 濃度が高くなると DNA ペレット表面の架橋が進行することで、生分解性が抑制されたと考えられる。これらのことから、DNA プラスチック調製時の HCHO 濃度を変えることでプラスチックの生分解性を制御できることが示唆された。

DNA プラスチックの生分解性メカニズムの評価は生分解前後のプラスチックを目視することで行った。その結果、水に浸漬したのみでは DNA プラスチックにクラックは入らなかつたものの、酵素溶液に浸漬するとクラックが入り、クラックが入ると急速に生分解が生じることが示された。これらのことから、DNA プラスチック表面は架橋体形成により酵素耐性を有しているが、内部は架橋度が低いため酵素耐性が低く、クラックが生じることでプラスチック内部から生分解が生じることが示唆された。

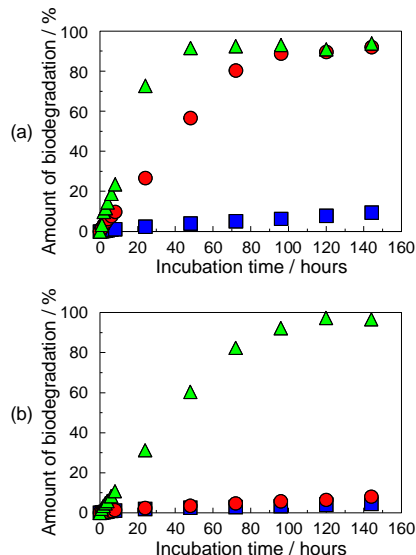


図5 DNAプラスチックの生分解性評価。(a) 25% HCHOで調製、(b) 30% HCHOで調製。DNA分解酵素濃度：(□) 4 units/ml、(○) 10 units/ml、(△) 40 units/ml。

(7) 他の核酸を用いたプラスチックの作製

サケ白子 DNA が生分解性プラスチックを形成することから同じ核酸である酵母由来 RNA からなる RNA プラスチックの創製を試みた。RNA は一本鎖のみから形成され、一部の核酸塩基が液相側を向いている。そのため RNA は DNA より HCHO を介して効率的にメチレン架橋を形成することが期待⁴される。そこで、DNA プラスチックと同様に HCHO、グリオキサール、グルタルアルデヒド等を用い架橋を試みた。しかし、全ての架橋剤において水に安定なプラスチックを作製することはできなかつた。また、曲げ強度を求めたが、8 MPa 以下の小さな値であった。以上のことから、核酸プラスチックの安定性には核酸の分子量が大きく関係していることが示され、分子量の高い DNA の方が優れていることが示唆された。

(8) 総括

二重らせん DNA と HCHO を用いることで DNA プラスチックを作製することができた。DNA プラスチックは硬い素材であったがポリエチレンとほぼ同じ破断強度を有していた。更に、DNA プラスチックは生分解性を有しており、その生分解性は HCHO 濃度により制御できることが示唆された。以上のことから、現在までに DNA 素材は有害物質の集積材³⁻⁵ やプロトン伝導体⁶ として利用できることが知られていたが、HCHO を用いてプラスチック化することで、生分解性を有したプラスチックとしても利用できることが示唆された。更に、我々はタンパク質や多糖などの生体高分子が、様々な機能を有した素材として利用できることを報告⁷⁻⁹ している。そのため、HCHO を用いた架橋法を用いることで、これら生体高分子を様々な機能を有したバイオプラスチックに利用できることが示された。

<引用文献>

1. M. Yamada, M. Kawamura, and T. Yamada: Preparation of bioplastic consisting of salmon milt DNA, *Sci. Rep.* **12**, 7423-7432 (2022).
2. M. Yamada, S. Morimitsu, E. Hosono, and T. Yamada: Preparation of bioplastic using soy protein, *Int. J. Biol. Macromol.* **149**, 1077-1083 (2020).
3. M. Yamada, K. Kato, M. Nomizu, N. Sakairi, K. Ohkawa, H. Yamamoto, and N. Nishi: Preparation and characterization of DNA-films induced by UV irradiation. *Chem. Eur. J.* **8**, 1407-1412 (2002).
4. M. Yamada, S. Funaki, and S. Miki: Formaldehyde interacts with RNA rather than DNA: Accumulation of formaldehyde by the RNA-inorganic hybrid material. *Int. J. Biol. Macromol.* **122**, 168-173 (2019).
5. X. D. Liu, M. Yamada, M. Matsunaga, and N. Nishi: Functional materials derived from DNA. *Adv. Polym. Sci.*, **209**, 149-178 (2007).
6. M. Yamada and K. Tanoue: Synthesis of self-assembled nucleobase and its anhydrous proton conductivity. *RSC Advances* **9**, 36416-36423 (2019).
7. M. Yamada, Y. Nagano, and T. Yamada: Anhydrous proton conduction of soy protein, *Int. J. Electrochem. Sci.* **16**, 151046 (12 pages) (2021).
8. M. Yamada, T. Sugihara, and T. Yamada: Anhydrous proton-conducting material consisting of basic protein protamine, *J. Electroanal. Chem.* **897**, 115586 (7 pages) (2021).
9. M. Yamada and Y. Kametani: Preparation of gellan gum-inorganic composite film and its metal ion accumulation property, *J. Compos. Sci.* **6**, 42-54 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Masanori Yamada, Midori Kawamura, and Tetsuya Yamada	4. 巻 12
2. 論文標題 Preparation of bioplastic consisting of salmon milt DNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 423-7432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-11482-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masanori Yamada and Yoshihiro Kametani	4. 巻 6
2. 論文標題 Preparation of gellan gum-inorganic composite film and its metal ion accumulation property	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Compos. Sci.	6. 最初と最後の頁 42-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcs6020042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masanori Yamada, Takaaki Sugihara, and Tetsuya Yamada	4. 巻 887
2. 論文標題 Anhydrous proton-conducting material consisting of basic protein protamine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Electroanal. Chem.	6. 最初と最後の頁 115586-115592
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jelechem.2021.115586	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masanori Yamada, Yuka Nagano, and Tetsuya Yamada	4. 巻 16
2. 論文標題 Anhydrous Proton Conduction of Soy Protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Electrochem. Sci.	6. 最初と最後の頁 151046-151057
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20964/2021.01.74	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Masanori、Morimitsu Sakura、Hosono Eiji、Yamada Tetsuya 149	4. 巻 149
2. 論文標題 Preparation of bioplastic using soy protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Biol. Macromol.	6. 最初と最後の頁 1077-1083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Masanori、Tanoue Kento	4. 巻 9
2. 論文標題 Synthesis of self-assembled nucleobases and their anhydrous proton conductivity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 36416 ~ 36423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9ra06841d	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川村駿太、山田真路
2. 発表標題 コンドロイチン硫酸を用いた非水系プロトン伝導体の創製
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川村 翠、山田真路
2. 発表標題 DNAを用いた生分解性素材の創製
3. 学会等名 第68 回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻田一慶、山田真路
2. 発表標題 アクリルアミド-DNAインターカレーター共重合体の合成とその機能
3. 学会等名 2019年日本化学会中国四国支部大会 徳島大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関