

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410195

研究課題名(和文) DNAナノ粒子複合体を用いたレアメタルイオンの回収

研究課題名(英文) Accumulation of rare-earth ion by DNA-immobilized nano-particles

研究代表者

山田 真路 (Masanori, YAMADA)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：80443901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 微粒子と DNA、シランカップリング剤からDNA 担持磁性体(DNA磁性体)を作製した。DNA磁性体は磁石により水中から回収することができた。また、DNA磁性体は金属イオンを集積することが可能であった。更に、DNA磁性体は金属イオン選択性を有し、重金属およびレアアースイオンの集積に有効であった。その上、金属イオン集積 DNA磁性体はEDTAの洗浄により再利用が可能であった。以上の事から、DNA磁性体は磁石で回収できるDNA素材として利用できることが示された。今後、体内からの有害金属イオンの集積や精密加工工場の排水からのレアアースイオンの回収等に利用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：DNA-immobilized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particles (DNA-Fe-particles) were prepared by mixing DNA, magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particles, and the silane coupling reagent. These DNA-Fe-particles were stable in water. Additionally, we could simply collect the DNA-Fe-particles by a magnet from an aqueous solution. In addition, we demonstrated the accumulation of various metal ions, such as heavy and rare-earth metal ions, by the DNA-Fe-particles. As a result, although these DNA-Fe-particles could selectively accumulate heavy and rare-earth metal ions, these materials could not accumulate the light metal ions, such as Mg(II) and Ca(II) ions. Furthermore, the metal ion-accumulated DNA-Fe-particles could be recycled by washing them with an aqueous EDTA solution. Therefore, the DNA-Fe-particles may have potential use for biomedical application, such as the removal of harmful heavy metal ion in human body, and environmental applications, such as the accumulation of rare-earth metals from industrial waste.

研究分野：生体関連高分子化学

キーワード：DNA 金属ナノ粒子 レアアースイオン グリーン化学 環境材料 有機-無機ハイブリッド体 金属イオン回収 重金属イオン

### 1. 研究開始当初の背景

「都市鉱山」と言われるように、日本では希少金属（レアアース）が使用されている電子機器が大量に廃棄されている。その為、使用済み電子機器からレアアースを回収することが提案されている。それに加え、精密加工工場や半導体工場からの排水にもレアアースイオンが存在することから、排水中のレアアースイオンを回収することも考えられている。しかしながら、排水からのレアアースイオンの回収技術は確立されておらず、様々な回収方法が探索されている。

資源の少ない日本において、石油由来の材料に代わる資源の探索が急務である。そこで、未使用資源の有効利用という観点から産業廃棄物の一つであるサケ（鮭）の白子から抽出した DNA に注目が集まっている。DNA は遺伝子であるが、らせん構造を形成し様々な分子と特異的・選択的に相互作用する機能性高分子である。その一方で DNA は水溶性高分子であり、生化学的にも不安定であることから、DNA を材料化するには不溶化し、生化学的に安定化する必要があった。そこで、現在までに DNA をゲル中に担持させる方法や界面活性剤と複合化する方法等が報告されており、申請者も紫外線を照射する方法や無機物と複合化する方法を提案した。

### 2. 研究の目的

当研究課題では「DNA を用いたレアアースイオンの回収」を行うこととした。現在までに生体高分子であるキトサンやアルギン酸等を用いた金属イオンの回収が報告されている。このような素材は高い金属イオン回収能を有するが金属イオン選択性に関しては十分ではなかった。一方、DNA と金属イオンの相互作用は 1970 年代から様々な手法により考察されており、十分には解明されていないが DNA のアニオン性と核酸塩基中に存在する金属イオン配位部位に起因していると考えられている。そのため、DNA は高い金属イオン選択性が期待される。

特に本研究では Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> からなる磁性体粒子の上に二重らせん DNA を修飾した DNA 担持磁性体を創製することとした。そこで、DNA 担持磁性体を用いることによって水溶液から重金属イオンやレアアースイオンの集積を行い、金属イオン集積 DNA を磁石により回収することを試みた。それとともに、金属イオン集積 DNA 担持磁性体の再利用も検討した。図 1 に当研究課題のコンセプトを示した。

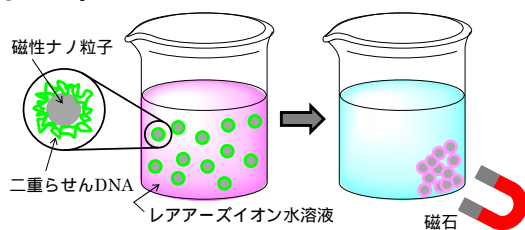


図 1 当研究課題のコンセプト

### 3. 研究の方法

DNA にはサケ白子由来二重らせん DNA (Mw; 500 万以上) を用いた。磁性体微粒子は既知法に従い塩化鉄(III)と無水酢酸ナトリウムの水熱合成により合成した。DNA 担持磁性体は DNA 水溶液と磁性体微粒子、シランカップリング剤ビス[3-(トリメトキシシリル)プロピル]アミン (SiNSi) とを混合し、乾燥することにより作製した。図 2 に SiNSi の分子構造を示した。磁性体への DNA の固定化量は DNA 担持磁性体を 0.1 M NaOH 中、100、1 時間加熱し、吸光度を測定することによって求めた。また、磁性体に固定された DNA は、SYBR<sup>®</sup> Green II で染色し蛍光顕微鏡で測定することによって評価した。DNA 担持磁性体の形状は走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。DNA 担持磁性体の構造および熱的安定性は X 線回折測定 (XRD) および示差熱-重量測定装置 (TG-DTA) により評価した。

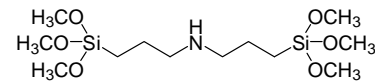


図 2 SiNSi の分子構造

金属イオンの集積実験には Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Y<sup>3+</sup>、In<sup>3+</sup>、Tb<sup>3+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup> の計 8 種類の金属イオンを用いた。集積は、金属イオン溶液に DNA 担持磁性体を添加し一定時間攪拌することにより行った。DNA 担持磁性体の回収は磁石により行い、金属イオンの集積能は DNA 担持磁性体添加前後の吸光度から評価した。金属イオン指示薬としてキシレノールオレンジ、4-(2-ピリジルアゾ)-レゾルシン、メチルチモールブルーを用いた。また、DNA 担持磁性体の再利用は、金属イオンを集積した磁性体を磁石で回収後、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) で洗浄することにより行った。

DNA 担持磁性体による金属イオンの集積メカニズムは、金属イオン集積前後の DNA 担持磁性体の IR 測定 (ATR 法) によって評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) DNA 担持磁性体の調製

作製した Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性体を SEM により観察したところ、直径 200 - 500 nm の球状であった。また、DNA 担持磁性体を SEM で観察したところ、図 3(a) に示す結果が得られた。この結果、DNA 担持磁性体の形状も直径 200 - 500 nm の球状であり、DNA は磁性体上に均一に担持されていることが示唆された。作製した DNA 担持磁性体を SYBR<sup>®</sup> Green II で染色後、蛍光顕微鏡で観察したところ二重らせん DNA と相互作用した SYBR<sup>®</sup> Green II 由来の緑色の蛍光が観察された (図 3(b))。また、臭化エチジウムによる染色ではオレンジ色の蛍光を得ることが出来た。このことから、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性体上に二重らせん DNA が修飾されていることが示唆された。そこで、磁

性体の上に担持された DNA 量を吸光度法により定量したところ、磁性体 1 g に対して DNA が約 20 mg 固定されていることが分かった。また、DNA 担持磁性体を長時間水に浸漬しても DNA の水への溶出は見られなかった。このことから、DNA 担持磁性体は水に安定な素材であり、水中で利用できることが示された。

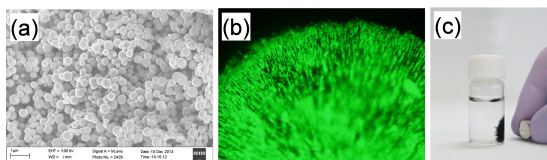


図3 DNA 担持磁性体の (a) SEM 写真、(b) 蛍光顕微鏡写真 (SYBR® Green II で染色)、(c) 磁石による集積写真

### (2) DNA 担持磁性体の構造および物性評価

水熱合成した  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性体と DNA 担持磁性体を XRD により評価した。図 4 に (a) 市販  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、(b) 水熱合成した  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粒子、(c) DNA 担持磁性体の XRD パターンを示した。その結果、DNA を担持しても  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  と同じ XRD パターンが得られ、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  の構造も保持されていることが示された。

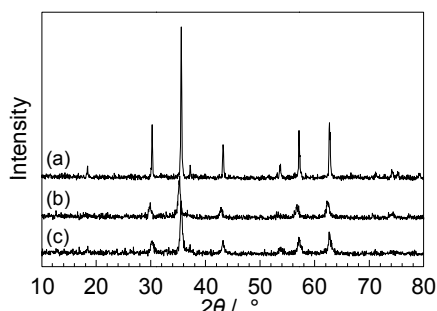


図4 磁性体の XRD パターン。(a) 市販  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、(b) 水熱合成した  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粒子、(c) DNA 担持磁性体粒子。

TG-DTA により、 $\text{N}_2$  雰囲気下での DNA 担持磁性体の熱的安定性を評価した。その結果、DNA は  $\text{SiNSi}$  とのハイブリッド化により熱安定化し、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  上に担持されも 200 以下において熱的分解性を示さなかった。この結果、DNA 担持磁性体は 200 以下において安定であることが示された。

### (3) DNA 担持磁性体による金属イオンの集積

作製した DNA 担持磁性体は水中において安定であることから、DNA 担持磁性体による水中からの金属イオンの集積を行った。金属イオンの集積は金属イオン水溶液に DNA 担持磁性体を添加後、一定時間低速で攪拌することにより行った。金属イオンを集積した DNA 担持磁性体は磁石により水中から回収した (図 3(c))。

初めに、DNA 担持磁性体による金属イオンの集積時間を検討した。その結果、金属イオンの集積量は時間とともに増加し、2 - 3 時間で一定になった。そこで、金属イオンの集積時間を 3 時間とし、様々な濃度および金属イオンの集積実験を行った。図 4 に例として様々な濃度における  $\text{Cu}^{2+}$  の集積量を示

した。この結果、 $\text{Cu}^{2+}$  の集積量は初期濃度とともに増加し、200 ppm ではほぼ一定に達した。一定になった値は 13.1  $\mu\text{g}$  であった。そこで、一定になった値を金属イオンの最大集積量とした。同様の測定を他の重金属およびレアアースイオンでも試みたところ、ほぼ同じ集積挙動が得られ、最大集積量を求めることが出来た。しかし、 $\text{Mg}^{2+}$  や  $\text{Ca}^{2+}$  の軽金属イオンの集積実験においては金属イオンの集積挙動が得られず、集積量を求めることはできなかった。そこで、DNA 担持磁性体の金属イオン選択性を評価するために、ヌクレオチドと金属イオンのモル比を各金属イオンの最大集積量から求めた。

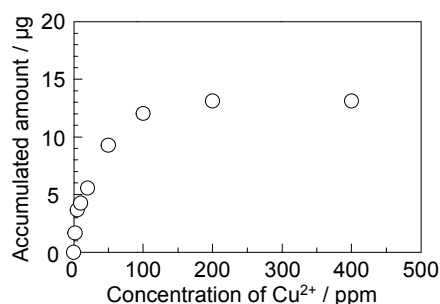


図4 DNA 磁性体による  $\text{Cu}^{2+}$  の集積

図 5 にヌクレオチドと DNA 担持磁性体により集積された金属イオンのモル比 (= [金属イオン] / [ヌクレオチド]) を示した。この結果、 $\text{Cu}^{2+}$  とヌクレオチドのモル比は約 0.4 であり、ヌクレオチド 2 つに対して金属イオンが 1 つ相互作用していることが示唆された。この値は現在までに我々が報告している DNA-無機ハイブリッド体による金属イオンの集積結果 や紫外線照射二重らせん DNA による金属イオンの集積結果 とほぼ一致した。その他の重金属イオンやレアアースイオンのモル比は 0.1 - 0.25 であり、 $\text{Cu}^{2+}$  と比較すると小さな値をしますが、金属イオンの集積が示された。一方、 $\text{Mg}^{2+}$  や  $\text{Ca}^{2+}$  のような軽金属イオンに関しては DNA 担持磁性体による集積が見られなかった。このことから、DNA 担持磁性体は重金属イオンやレアアースイオンに対して高い選択性を示すことが示唆された。

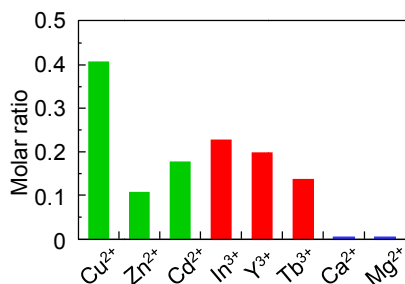


図5 ヌクレオチドと金属イオンのモル比

### (4) DNA 担持磁性体の金属イオン集積メカニズム

DNA 担持磁性体による金属イオンの集積メカニズムを考察するため、金属イオン集積前後の DNA 担持磁性体の IR スペクトル測定

を行った。図 6 に  $\text{Cu}^{2+}$  を集積した DNA 担持磁性体の IR スペクトルが得られた。この結果、 $\text{Cu}^{2+}$  を集積する事により  $1210\text{ cm}^{-1}$  付近のリン酸基に由来するシグナルが低波数側にシフトすることが示された。またそれと同時に、 $1530\text{ cm}^{-1}$  付近の核酸塩基に由来するシグナルが、ブロード化することが示された。これらの事から、DNA 担持磁性体に集積された金属イオンは DNA のリン酸基と核酸塩基部位と相互作用していることが示された。同様の相互作用は、DNA-無機ハイブリッド体や紫外線照射 DNA による金属イオンの集積でも得られている。

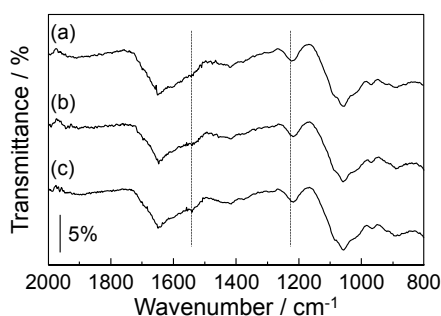


図 6  $\text{Cu}^{2+}$  溶液浸漬前後の DNA 担持磁性体の IR スペクトル。(a) 0 ppm、(b) 500 ppm、(c) 1000 ppm。

一方、DNA 担持磁性体による金属イオンの集積量は現在までに報告している DNA-無機ハイブリッド体や紫外線照射二重らせん DNA の結果と比較して低かった。これは、DNA を  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  上に担持することにより DNA の二重らせん構造が歪み、リン酸基および核酸塩基部位による金属イオンの集積能が低下するためであると考えられる。

#### (5) DNA 担持磁性体の再利用

金属イオンを集積した DNA 担持磁性体を再利用するために、金属イオン集積 DNA 担持磁性体をキレート剤である EDTA により洗浄後、再利用することを試みた。図 7 に  $\text{Tb}^{3+}$  集積 DNA 担持磁性体の再利用結果を示した。この結果、5 回目までの集積量は約  $7\text{ }\mu\text{g}$  であり、再利用前と比較してもほぼ一定であった。同様の結果は  $\text{Cu}^{2+}$  集積 DNA 担持磁性体の再利用でも得られた。これらの事から、金属イオンを集積した DNA 担持磁性体は水中から磁石により集積後、EDTA で洗浄することによって容易に再利用できることが示唆された。

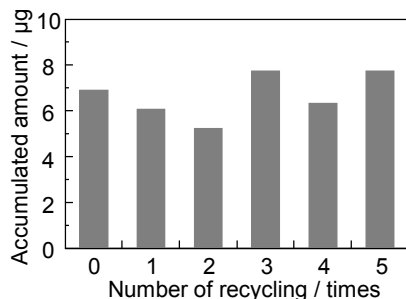


図 7  $\text{Tb}^{3+}$  集積 DNA 担持磁性体の再利用

#### (6) まとめ

$\text{Fe}_3\text{O}_4$  微粒子と DNA 溶液および SiNSi 溶液を混合することにより DNA 担持磁性体を作製した。DNA 担持磁性体は磁石により水中から容易に回収することができた。また、DNA 担持磁性体は水中に存在する金属イオンを集積することが可能であった。更に、DNA 担持磁性体は金属イオン選択性を有しており、重金属イオンやレアアースイオンの集積に有効であった。その上、EDTA を用いて金属イオン集積 DNA 担持磁性体を洗浄したところ、再利用が可能であった。

以上の事から、DNA 担持磁性体は磁石で回収することができる DNA 素材として利用できることが示された。今後、精密加工工場の排水からのレアアースイオンの回収等に利用できると考えられる。

#### <引用文献>

X. D. Liu, *et al.*, *Adv. Polym. Sci.* **209**, 149 (2007).

M. Yamada, *et al.*, *Chem. Eur. J.* **8**, 1407 (2002).

M. Yamada, *et al.*, *Polymer* **49**, 4658 (2008).

Z. Yu, *et al.*, *Ind. Eng. Chem. Res.* **52**, 11956 (2013).

M. Yamada, *et al.*, *Polym. J.* **46**, 366 (2014).

M. Yamada, *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **75**, 1627 (2002).

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 8 件)

M. Yamada, A. Fujisawa, K. Morishige, and E. Hosono: "Preparation of DNA-immobilized magnetic particles and their utilization as an accumulative material of metal ions." (査読有り) *J. Mater. Res.* **31**, 360-369 (2016). DOI: 10.1557/jmr.2016.14

M. Yamada and M. Tsuruzumi: "Utilization of milk protein as an environmental material. Accumulation of metal ions by a protein-inorganic hybrid material." (査読有り) *Polym. J.* **48**, 295-300 (2016). DOI: 10.1038/pj.2015.113

M. Yamada and T. Ogino: "Anhydrous proton conductor consisting of pectin-inorganic composite material." (査読有り) *J. Appl. Polym. Sci.* **132**, 42433-42439 (2015). DOI: 10.1002/APP.42433

M. Yamada and S. Shiiba: "Preparation of pectin-inorganic composite material as accumulative material of metal ions." (査読有

り) *J. Appl. Polym. Sci.* **132**, 42056-42063 (2015).

DOI: 10.1002/APP.42056

M. Yamada, S. Hara, T. Yamada, F. Katagiri, K. Hozumi, and M. Nomizu: "Double-stranded DNA stereo-selectively promotes aggregation of amyloid-like fibrils and generates peptide/DNA matrices." (査読有り) *Biopolymers* **102**, 465-472 (2014).

DOI: 10.1002/bip.22571

M. Yamada and Y. Moritani: "Polypeptide for anhydrous proton conductor." (査読有り) *Electrochim. Acta* **144**, 168-173 (2014).

DOI: 10.1016/j.electacta.2014.08.076

M. Yamada and K. Abe: "Selective accumulation of rare earth metal and heavy metal ions by DNA-inorganic hybrid material." (査読有り) *Polym. J.* **46**, 366-371 (2014).

DOI: 10.1038/pj.2014.5

M. Yamada, Y. Kanamori, and T. Yamada: "Immobilization of double-stranded DNA onto glass beads by psolaren." (査読有り) *Int. J. Biol. Macromol.* **60**, 39-44 (2013).

DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.05.006

[学会発表](計 11 件)

西村朱十、山田真路: "DNA-シリカコンポジット体による金属イオンの集積と触媒材料への利用" 第 65 回高分子学会年次大会、2016 年 5 月 25 日、神戸国際会議場(兵庫)

西村朱十、山田真路: "DNA-シリカコンポジット体による金属イオンの集積" 日本化学会第 96 春季年会、2016 年 3 月 25 日、同志社大学(京都)

鶴住真弓那、山田真路: "カゼイン-無機ハイブリッド体による金属イオンの除去" 第 64 回高分子討論会、2015 年 9 月 15 日、東北大学(宮城)

三木沙彩、山田哲也、山田真路: "DNA 担持磁性体を用いた環境浄化材の創製(2) 内分泌かく乱物質の除去" 第 64 回高分子学会年次大会、2015 年 5 月 28 日、札幌コンベンションセンター(北海道)

藤澤 祥、山田哲也、山田真路: "DNA 担持磁性体を用いた環境浄化材の創製(1) 金属イオンの集積" 第 64 回高分子学会年次大会、2015 年 5 月 28 日、札幌コンベンションセンター(北海道)

山田真路: "サケ白子 DNA を用いた環境材料の創製" OUS フォーラム 2014、2014 年

11 月 21 日、岡山プラザホテル(岡山)

遠山知佳、山田真路: "RNA-無機ハイブリッド体による金属イオンの集積" 第 63 回高分子学会年次大会、2014 年 5 月 30 日、名古屋国際会議場(愛知)

椎葉秋香、山田真路: "ペクチン-無機ハイブリッド体を用いた金属イオンの集積" 第 63 回高分子学会年次大会、2014 年 5 月 28 日、名古屋国際会議場(愛知)

遠山知佳、山田真路: "RNA-無機ハイブリッド体の創製とその利用" 第 62 回高分子討論会、2013 年 9 月 11 日、金沢大学(石川)

川崎貴司、山田真路: "DNA 担持セルロースによる金属イオンの集積" 第 62 回高分子討論会、2013 年 9 月 11 日、金沢大学(石川)

守谷祐一、曾我部知輝、山田真路: "ポリペプチドを用いた非水系プロトン伝導体の創製" 第 62 回高分子学会年次大会、2013 年 5 月 29 日、国立京都国際会館(京都)

[その他]

ホームページ等

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

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