

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05633

研究課題名(和文) 水で伸縮特性を制御するDNAシートの作製とその機能化

研究課題名(英文) Preparation and functionalization of water-containing solid films made from deoxyribonucleic acid

研究代表者

松野 寿生 (Matsuno, Hisao)

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：50376696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高伸縮性DNAシート作製法の確立、および、その伸縮過程における分子鎖凝集構造ならびに熱運動性を解析することで、特異な力学特性の発現機構を明らかにすることを目的とした。2,5-ヘキサジオンを用いた還元アミノ化反応によりDNA塩基間に非可逆的な分子間架橋を施した。原子間力顕微鏡観察に基づき架橋点を可視化することで、分子レベルでの架橋点の導入がマクロな引張特性に影響を与えることを直接的に示すことに成功した。また、イオン液体として水和リン酸二水素コリンを混合したDNAシートは、長期にわたり引張特性を保持できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Deoxyribonucleic acids (DNAs) were intermolecularly cross-linked using 2,5-hexanedione. Cross-linking points between DNAs were directly observed by atomic force microscopy. While DNA chains near cross-linking points were denatured, DNA chains not near cross-linking points maintained B-form double strands. A self-supported sheet of cross-linked DNA (DNA-c) was obtained by a simple solvent-casting method. The tensile properties of DNA-c sheets were much better than those of non-cross-linked DNA sheets due to the presence of the cross-linking portions. Wide-angle X-ray diffraction measurements revealed that the reorientation of DNA-c was remarkably restricted by the introduction of cross-linking points. Furthermore, to suppress the water evaporation which causes changing the tensile properties of the solid sheets of DNA in a short time, we used hydrated ionic liquid, CDP. The tensile properties of DNA/CDP sheets could be maintained for a time being longer than several days.

研究分野：高分子材料

キーワード：デオキシリボ核酸 高分子固体シート 分子鎖凝集構造 引張特性 分子鎖熱運動性

## 1. 研究開始当初の背景

自然界由来の高分子をバルク材料として応用する取組みが進められている一方、その多様性を考えると、材料展開に成功している天然高分子は未だごく一部に限定されている。将来的に脱化石燃料を実現するためにも、天然高分子の材料応用への期待が益々加速されることに疑いの余地はないが、そのためには、天然高分子に関する基礎的知見、すなわち、バルク状態における分子鎖凝集構造ならびに熱運動性を正確に理解したうえでの機能化が重要となる。

研究代表者らは、自己支持性 DNA シートが、極めて特異な力学特性を示すことを世界に先駆けて明らかにしている。DNA シートは、シート中に含まれる水分量を増加させるという極めてシンプルな手法により、その伸長特性が、ガラス状高分子様から、ネッキング挙動を示す半結晶性高分子様を経て、さらにはゴム状高分子様にまで、ヤング率が3桁以上変化させられることを見出した。未だかつて、これだけのワイドレンジで力学特性の変調が可能な材料は、可塑剤を添加した合成高分子製シートまで含めても例がない。また、動的粘弾性測定および熱物性測定に基づき、DNA シート中の分子鎖熱運動性についても、明らかにしている。本 DNA シートは、鮭精巢由来の DNA を試料に用い、その濃厚水溶液から溶媒キャスト法により作製することができる。すなわち、DNA シートは、天然高分子および水のみで構成されるグリーンな材料であり、かつその伸長特性の制御を、水分子を可塑剤的に利用するだけで達成できる極めてユニークな材料である。

さらには、広角 X 線回折 (WAXD) および赤外 (IR) 分光測定に基づき、シートを形成する DNA 二重鎖のコンフォメーションが、水分率依存的に A 型から B 型に変換されること、また伸長率依存的に分子鎖間の密なパッキングが起こることも明らかにしている。しかしながら、これら分子鎖凝集構造の変化に関する情報は断片的にしか得られていないため、上述のユニークな力学特性との関係についての十分な検討ができていなかった。また水分率を長時間一定に保持する保水性が十分でないことが課題であった。

本研究では、DNA シートを機能性材料として応用展開するために、これらの課題克服に向けた検討を実施した。

## 2. 研究の目的

本研究では、水環境下において機能する高伸縮性 DNA シートの提案に向けて、高保水・高伸縮性 DNA シートの作製法の確立、および、その伸縮過程における分子鎖凝集構造ならびに熱運動性を解析することで、特異な力学特性の発現機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

従来の DNA シートは、自重に対し 50 wt% 程度の保水が可能であるが、この水分率は、

環境および時間依存的に大きく変化する。そこで、長時間 (~数日) にわたり、水分を任意の値で一定に維持できる保水能を賦与する手法の確立を試みた。DNA は、主として魚介類由来の試料を使用し、架橋による網目構造の形成等により大量の水分子の保持が可能となるか検討した。

## ①化学架橋:

試料として、鮭または鯧精巢から精製された市販 DNA を用いた。緩衝液に溶解した DNA を所定温度で加熱し二重らせんを部分的に解離させた後、架橋剤として 2,5-ヘキサレンジオン、還元的アミノ化剤として 2-ピコリンボランを用い、DNA 塩基間に非可逆的な分子間架橋を施した。DNA 固体シートは、濃厚水溶液から溶媒キャスト法に基づき作製した。固体シートの水分率 ( $M_{H_2O}$ ) は、飽和水蒸気下、室温で所定時間静置することにより任意に制御した。 $M_{H_2O}$  は、熱重量分析 (TG) に基づき評価した。固体シートの力学特性は、一軸引張試験に基づき評価した。測定は、大気下、所定温度で行い、引張速度は 10 mm/min とした。架橋 DNA (DNA-c) に加え、リファレンスとして未架橋の DNA から作製した試料について併せて評価した。

## ②異種分子ブレンド

水との親和性に優れた分子をブレンドすることで保水能の賦与を試みた。具体的には、水和リン酸二水素コリン (CDP) に着目した。Figure 1 は CDP の化学構造式である。CDP は DNA の立体構造を安定化するイオン液体として注目されており、DNA 固体材料プラットフォームの確立への貢献が期待できる。CDP 含有 DNA 固体シートを作製し、引張特性ならびに分子鎖の凝集構造および熱運動性について検討した。

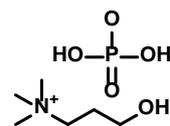


Figure 1. A chemical structure of CDP.

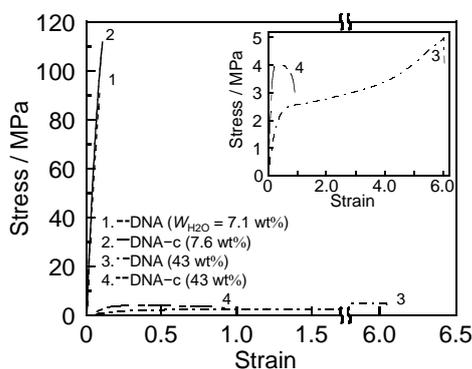
CDP 含有 DNA 固体シート (DC 膜) は、DNA と CDP の重量比を 100/0、90/10、80/20、75/25、70/30、60/40、および 50/50 に調製した混合水溶液から溶媒キャスト法に基づき作製した。以下、得られた固体シートをそれぞれ DC0、DC10、DC20、DC25、DC30、DC40、および DC50 と表記する。各膜の力学特性は引張試験および動的粘弾性試験に基づき評価した。各膜の凝集構造は、WAXD 測定に基づき評価した。

## 4. 研究成果

## ①化学架橋

ゲル電気泳動解析の結果、反応温度 338 K、反応時間 1 h の条件において、最も架橋が進行することが分かった。Figure 2 は、同条件で架橋を施した DNA-c 固体シート、および、未架橋の DNA 固体シートの応力-ひずみ曲線である。Table 1 は、応力-ひずみ曲線より算

出した引張特性に関する各パラメータである。TG 測定に基づき算出した  $M_{H_2O}$  も併記してある。 $M_{H_2O}$  が 7 wt% 程度と低い場合、架橋の有無によらず、固体シートはガラス状高分子様の引張特性を示した。また、引張強さ ( $TS$ ) がわずかに向上したが、ヤング率 ( $E$ )、および、破断歪み ( $E_B$ ) は同程度であった。 $M_{H_2O}$  が 43 wt% と高い場合、DNA-c 固体シートは未架橋膜とは異なる引張特性を示した。DNA-c 固体シートは、未架橋膜と比較して、 $E$  が向上した一方、 $E_B$  は顕著に低下した。これは、未架橋の DNA 固体シートでは、延伸に伴い DNA 鎖が再配向し密にパッキングすることが分かっているが、DNA に分子間架橋を施すことで、延伸に伴う再配向が抑制されたためと考えることで説明できる。



**Figure 2.** Stress-strain curves of DNA and DNA-c sheers with various  $W_{H_2O}$ . (Inset) Enlarged curves for the samples 3 and 4.

**Table 1.** Tensile property of DNA-n and DNA-c sheets.

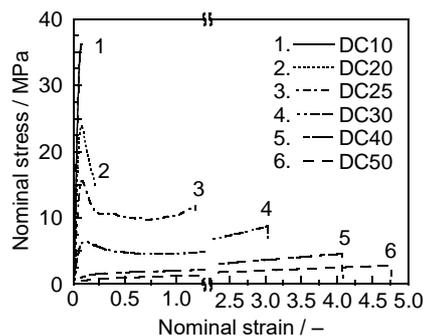
Sample	$W_{H_2O}$ / wt%	$E$ / Pa	$TS$ / MPa	$E_B$
DNA-c	7.6	$1.4 \times 10^9$	112	0.11
DNA-n	7.1	$1.1 \times 10^9$	91	0.88
DNA-c	43	$2.9 \times 10^7$	4.1	0.92
DNA-n	43	$8.1 \times 10^6$	5.0	6.0

架橋を施した DNA 鎖の分子形態を原子間力顕微鏡観察に基づき評価した。その結果、DNA の二重らせんが部分的に解離し複数の鎖が接近した様子が観察され、分子間の架橋点の可視化に成功した。また、導入された架橋度をシートの引張特性に相関がある直接的な証拠を見出した。しかしながら、架橋の導入によるシートの保水性の向上はわずかであったことから、次に述べるブレンド法による検討を行った。

## ② 異種分子ブレンド

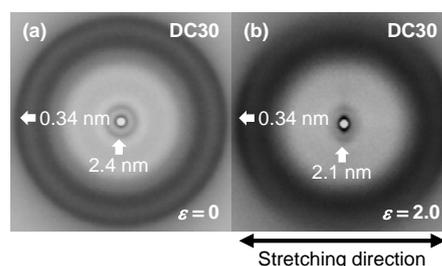
Figure 3 は DC 膜の応力-ひずみ曲線である。固体シートの引張特性は、CDP 含有量に著しく依存した。DC10 膜は、脆性であり最も大き

なヤング率を示した。一方、DC20 膜は、ひずみ ( $\epsilon$ ) = 0.1 付近で降伏点に達した後、破断した。CDP 含有量をさらに増加させると、DC 膜は延性を示すようになり、半結晶性高分子様からゴム状高分子様へと変化した。DC30 膜は、降伏点に達した後、冷延伸が観測され、 $\epsilon = 1.2$  付近から顕著なひずみ硬化が観測された。CDP 含有量の最も高い DC50 膜では降伏点が観測されず、ゴム状高分子に特徴的な S 字曲線を示し、 $\epsilon = 4.6$  で破断した。全体的な傾向として、CDP 含有量の増加に伴い、DC 膜の破断ひずみは増加するのに対し、ヤング率および降伏応力は減少した。



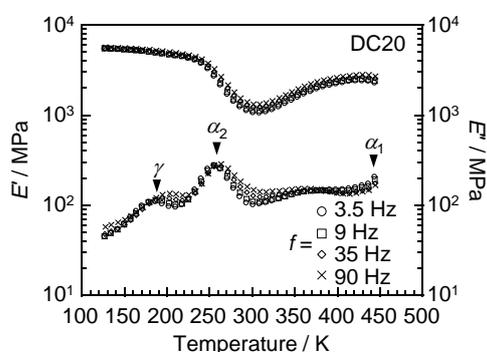
**Figure 3.** Stress-strain curves for DC sheets.

Figure 4 は、DC30 膜の未延伸および延伸下における 2 次元 WAXD パターンである。 $\epsilon = 0$  において、周期長 0.34 および 2.4 nm に相当する同心円状の回折が観測された。二重らせん DNA の B 型コンフォメーションにおける塩基対間距離が 0.34 nm であることを考慮すると、CDP を混合した固体シートにおいても、DNA 鎖は B 型コンフォメーションを維持し等方的に存在していることがわかる。一方、周期長 2.4 nm は、B 型 DNA の直径 2.0 nm と比較してやや長かった。これは、CDP が吸着した DNA 鎖同士の分子間距離を反映していると考えられる。 $\epsilon = 2.0$  において、延伸方向に 0.34 nm に相当するアーク、および、垂直方向に 2.2 nm に相当するアークが観測された。これは、CDP が吸着した DNA 鎖が延伸方向に配向し、また、分子鎖間距離が短くなったと考えることで説明できる。全ての DC 膜において、ひずみが大きくなるに従い、分子鎖間距離は短くなった。以上の結果から、DC 膜は、DNA 鎖の配向ならびに分子鎖間距離の減少を主とする構造再編成を伴い延伸されることがわかった。



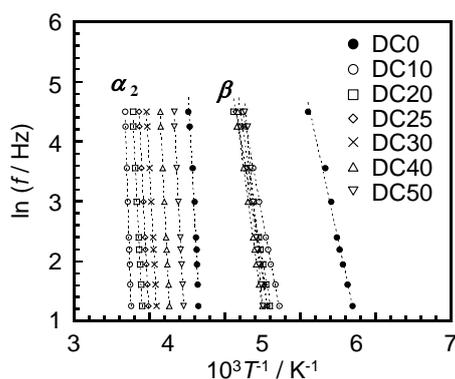
**Figure 4.** Two-dimensional WAXD patterns for a DC30 sheets. The strain was set to be (a) 0 and (b) 2.0, respectively. The X-ray wavelength was 0.1 nm and the camera distance was 309 mm.

Figure 5 は各周波数における DC20 膜の貯蔵弾性率 ( $E'$ ) および損失弾性率 ( $E''$ ) と温度の関係である。440、260 および 190 K 付近において、 $E'$  の分散と  $E''$  の吸収ピークが観測された。440 K 付近のピークは、CDP を含まない DNA 固体シートにおいて観測された DNA 主鎖のガラス転移と考えられる。260 および 190 K 付近の  $E''$  ピークは周波数の増加に伴い、高温側にシフトした。したがって、高温側からそれぞれ  $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$  および  $\beta$  緩和過程に帰属した。 $\alpha_1$  緩和については直後に膜が融解したため議論することは困難であった。



**Figure 5.** Temperature dependence of  $E'$  and  $E''$  for a DC20 sheet.

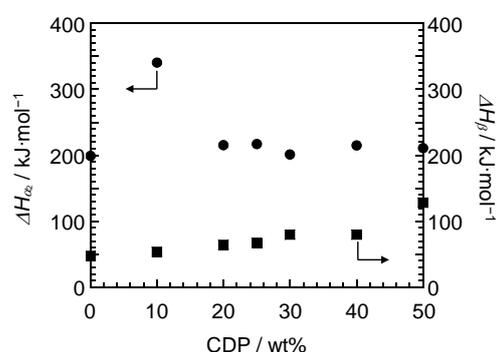
Figure 6 は、各 DC 膜の吸収極大温度の逆数と周波数の自然対数との関係である。アレニウ式に基づき、各過程の活性化エネルギー ( $\Delta H$ ) を算出した。



**Figure 6.** The relationships between  $\ln f$  and reciprocal absolute temperature for two relaxation processes.

Figure 7 は、 $\Delta H_{\alpha_2}$  および  $\Delta H_{\beta}$  の CDP 含有率依存性である。DC0 膜における  $\Delta H_{\alpha_2}$  は  $200 \pm 10 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  であり、この値は、CDP の添加に伴

い極大 (DC10 膜) を示した後、ほぼ一定となった。DC0 膜の  $\alpha_2$  緩和は水和 DNA の協同的分子運動に帰属されるが、CDP 存在下における  $\alpha_2$  緩和は DNA に吸着した CDP および水と DNA 鎖の協同的分子運動であると考えられる。DC10 膜では、CDP が DNA に吸着したことにより  $\Delta H_{\alpha_2}$  が大きくなったが、CDP 含有率がさらに高くなると、CDP の DNA への吸着が飽和し CDP の可塑剤としての効果が顕著になるため、 $\Delta H_{\alpha_2}$  が減少したと考えられる。一方、 $\Delta H_{\beta}$  は、CDP 含有率の増加に伴い増加した。DC0 膜において、 $\beta$  緩和は DNA のリン酸骨格のコンフォメーション変化である  $B_I$ - $B_{II}$  遷移に帰属される。DC 膜では、CDP が DNA のリン酸骨格に強く相互作用することで  $B_I$ - $B_{II}$  遷移を抑制している可能性が示唆された。



**Figure 7.** CDP content dependence of activation energies for  $\alpha_2$  and  $\beta$  relaxation processes.

DC 膜の引張特性は、作製後 10 日程度室温大気下で静置した後でも、ほとんど変化しなかった。すなわち、水の一部をイオン液体に置換えることで、長期にわたり引張特性を保持できる DNA シートの作製方法を確立することができた。

## 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 2 件)

- ① Chien-Chung Shih, Cheng-Yu Chung, Jeun-Yan Lam, Hung-Chin Wu, Yuma Morimitsu, Hisao Matsuno, Keiji Tanaka, Wen-Chang Chen, Chem. Commun., 査読有, 2016, 52(92), 13463-13466. DOI: 10.1039/c6cc07648c
- ② Yuma Morimitsu, Hisao Matsuno, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, and Keiji Tanaka, ChemNanoMat, 査読有, 2016, 2(11), 1023-1027. DOI: 10.1002/cnma.201600222

[学会発表] (計 9 件)

- ① Hisao Matsuno, Yuma Morimitsu, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Atsushi Takahara, Keiji Tanaka, Mechanical Properties of Solid Films of

Deoxyribonucleic Acid, The 33rd Annual Meeting of the Polymer Processing Society, 2017.

- ② 盛満 裕真、松野 寿生、太田 昇、関口 博史、高原 淳、田中 敬二、イオン液体含有デオキシリボ核酸固体シートの分子鎖凝集構造と力学特性、第 66 回高分子学会年次大会、2016.
- ③ Yuma Morimitsu, Hisao Matsuno, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Atsushi Takahara, Keiji Tanaka, Mechanical Properties of Ionic Liquid-contained Deoxyribonucleic Acid Films, The 11th SPSJ International Polymer Conference, 2016.
- ④ Yuma Morimitsu, Hisao Matsuno, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Atsushi Takahara, Keiji Tanaka, Rubbery-like behavior of solid films of deoxyribonucleic acid, The International Rubber Conference 2016 Kitakyushu, 2016.
- ⑤ 松野 寿生、盛満 裕真、太田 昇、関口 博史、田中 敬二、水和イオン液体含有 DNA フィルムの分子鎖凝集構造と力学特性、平成 28 年度繊維学会秋季研究発表会、2016.
- ⑥ Yuma Morimitsu, Hisao Matsuno, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Atsushi Takahara, Keiji Tanaka, Rubber-like Behavior for Solid Films of Hydrated Ionic Liquid-containing Deoxyribonucleic Acid, The XVIIth International Congress on Rheology The XVIIth International Congress on Rheology, 2016.
- ⑦ Yuma Morimitsu, Hisao Matsuno, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Keiji Tanaka, Rubber-like Behavior for Solid Films of Hydrated Ionic Liquid-containing Deoxyribonucleic Acid, The 12th International Symposium on Polymer Physics, 2016.
- ⑧ Yuma Morimitsu, Hisao Matsuno, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Keiji Tanaka, Mechanical properties of self-supported films of cross-linked deoxyribonucleic acid, 65th SPSJ Annual Meeting, 2016.
- ⑨ 盛満 裕真、松野 寿生、太田 昇、関口 博史、高原 淳、田中 敬二、水和イオン液体含有 DNA 固体シートの引張特性、日本レオロジー学会第 43 年会、2016.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称 : DNA 固体シートとその作製方法

発明者 : 田中 敬二, 松野 寿生, 盛満 裕真, 宮地 伸英

権利者 : 田中 敬二, 松野 寿生, 盛満 裕真, 宮地 伸英

種類 : 特許権

番号 : 特願 2016-221059

出願年月日 : 2016 年 11 月 11 日

国内外の別 : 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野 寿生 (Matsuno Hisao)

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号 : 50376696

(4) 研究協力者

① 田中 敬二 (Tanaka Keiji)

九州大学・大学院工学研究院・教授

② 盛満 祐真 (Morimitsu Yuma)

九州大学・大学院工学府・大学院生

③ Wen-Chang Chen

National Taiwan University

Department of Chemical Engineering.