

透析膜内DNA水溶液によるダイオキシン類の濃縮 - 微量汚染物質の除去と分析技術への応用 -

生態環境科学専攻 資源化科学講座
博士課程1年 佐藤 秀哉 (指導教官: 西 則雄)

【研究背景】

DNA (デオキシリボ核酸) は遺伝情報媒体として広く認知されている物質であると同時に、2重螺旋状の分子骨格や核酸塩基対の積層構造といった特殊な構造を含む天然高分子である。これらの構造に起因する特徴的な現象の一つとして、核酸塩基対の間に芳香族化合物など平面的な構造を持った分子が入り込む「インターカレーション」(Figure 1) という現象が知られている。近年我々はダイオキシン類 (Figure 2) を含む一部の環境ホルモン類 (内分泌攪乱化学物質) がこれと同様にしてDNAと結合することを報告し、DNA含有材料による有害物質の分離/回収についての可能性を提言した¹⁾⁻³⁾。DNAを材料として扱う際にはその生化学的な不安定性のために何らかの安定化処理が要件となるが、当研究室ではこれまでに別種の高分子とのポリオンコンプレックス化¹⁾や、紫外線照射による架橋体DNAの生成²⁾⁻³⁾等について幅広く検討を行い、小規模な実験系において良好な結果を得てきた。しかし大規模な系に含まれる有害物質の回収を目標とした場合にはキャパシティの観点から多量のDNAが材料に保持されることが重要であり、また、簡易な方法によってシステムを構築できることが望ましい。そこで本研究では半透性素材によるDNAの隔離という単純な方法によって外部の分解酵素等を遮断、対象物質と接触させるシステムを構築し、その評価を行うこととした。

【実験】

1. 透析膜によるDNA溶液の隔離封入と有害物質回収

再生セルロース透析膜に2本鎖DNA (鮭精巢由来、Mw: ca. 5×10^4) を水溶液として充填したバッグをダイオキシン類混合溶液 (dibenzofuran, dibenzo-p-dioxin, biphenyl) に浸漬し、外液を十分に灌流した後、バッグ内液 (DNA水溶液) に移動したダイオキシン類をヘキサンのより抽出、HPLC分析に供することで物質ごとの濃縮率を求めた。抽出処理後のDNA水溶液は再度透析膜に封入し、反復操作による集積効率の変動の有無を評価した。また実際の環境に近似したモデル溶液中での物質集積について、より高効率での分離性能を期待できる中空糸膜システム (Figure 3) を用いて試験した。

2. ゼル ゲル法によるDNA-シリカコンポジットの調製と有害物質回収

無機材料の常温液相合成法として知られるゼル ゲル法を応用し、高分子量DNAとシリカとのコンポジット化を試みた。原料として2本鎖DNA (鮭精巢由来、Mw: ca. 5×10^4)、tetraethoxysilane (TEOS) および各種の3官能性シラン化合物を用いた。塩酸で処理したTEOS加水分解物 ($[H_2O]/[TEOS]=5$) とDNA溶液 (0.1M リン酸緩衝液) 適当な3官能基性シラン化合物を混合した後、熟成、脱塩と凍結乾燥を経て白色の粉末状試料を得た。これらを臭化エチジウム溶液およびダイオキシン溶液に添加し、物質吸着作用を評価した。同様の実験を H_2O-CH_3CN 混合系において行い、さらに吸着処理と脱離処理を複数回繰り返した場合の物質吸着効率の変動についても調べた。

【結果/考察】

1. 透析膜によるDNA溶液の隔離封入と有害物質回収

再生セルロース透析膜にDNA水溶液を充填、ダイオキシン類を含有する外液に浸漬した後にHPLC分析によって物質濃縮率を求めたところ 50ppb 程度の低濃度溶液を容易に数百倍にまで集積、濃縮できることが確認された。また、この透析操作とヘキサン等の疎水性溶媒による抽出（洗浄）を反復して行った場合でもDNAを変質させることなく集積効率をほぼ完全に保つことが確認できた。これは大量の水に含まれるダイオキシン類を比較的少量のDNAで連続的に除去、濃縮できることを示しており、有意義な結果であった。ただし物質集積効率に関しては溶液の組成やイオン種、イオン強度による影響が強く見られるため、溶媒組成の最適化を継続して行う。中空糸膜システムを用いた試験では、装置を構成する部品への非特異的吸着の増大など、集積効率を低下させる幾つかの要素が見出されたので対策を検討中である。さらに効率の向上をすすめることで、煩雑な操作を省略したダイオキシン類分析の前処理法や水資源の浄化処理法としての応用が可能となるだろう。

2. ゼル ゲル法によるDNA-シリカコンポジットの調製と有害物質回収

珪素アルコキンドを原料とした重合反応によって生成されたゲルマトリックスはDNAを安定に保持し良好な機械的強度を示した。コンポジットからのDNA溶出は緻密なゲルマトリックスにより大幅に抑制され、さらに 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) を導入したDNA シリカコンポジットの場合には24時間での溶出量が約0.2%にまで低減された。水溶液系およびH₂O-CH₃CN混合系において行った物質吸着試験では興味深い結果が得られた。水溶液中では全般に非特異的な吸着作用が主となり、DNA由来の物質選択性が明瞭でなかったが、適当な混合比の下ではAPTESを含むDNA-シリカコンポジットが有意な分離効果を示した。APTES がゲルマトリックスとDNA間でリンカーとして働き、コンポジット内のDNAと溶質が効率よく相互作用できる自由度を与えているものと推測する。なおDNAに集積された物質の脱着は溶媒組成の調節によって容易に行うことが可能である。また、この操作の反復による不可逆的変質もなく集積効率はほぼ完全に保たれた。この材料はカラム充填材として非常に有望な物性を備えたものであると考える。今後は実際にHPLCへの接続を行い、分離特性について評価を行う。

DNAは遺伝子の本体として生命の根幹を成すのみならず、その特徴的な分子構造とそれに起因する興味深い物性から近年、機能性高分子としても注目されつつある物質である。一方で海産資源とともに大量に得られる不要品としてのDNA（白子）が存在し、経済と、そして環境に負担を与えつつ処分されている現状を、北海道という土地に立つ我々は熟知している。DNAは天然において無尽蔵に産生されるバイオマスであり、これを価値ある資源に転化することの有益性は非常に大きなものである。DNAという新規の材料が広く実用にいたるまでには多くの課題が存在するが我々の研究とその成果がそれを促すことを願う。

〔研究発表〕

1. 原著論文

“Accumulation-Exclusion combined system for the harmful chemicals with insolubilized DNA”

Shuya Satoh, Masanori Yamada, Motoyoshi Nomizu, and Norio Nishi

Polymer Journal **35** (11) 872-878 (2003)

2. 学会発表

第52回 高分子年次大会 (名古屋)

「ゾル ゲル法を用いたDNA シリカコンポジットの調製とその応用に関する検討」

佐藤秀哉、野水基義、西則雄

第52回 高分子討論会 (山口)

「ゾル ゲル法を用いたDNA シリカコンポジットの調製とその応用に関する検討」

佐藤秀哉、野水基義、西則雄

2003年度繊維学会秋季研究発表会 (仙台)

「DNA-金属マトリックスの調製とその応用に関する検討」

佐藤秀哉、横田美穂、山田真路、野水基義、西則雄

〔参考文献〕

1) K. Iwata, T. Sawadaishi, S. Nishimura, S. Tokura and N. Nishi,

Int. J. Biol. Macromol., **18**, 149 (1996)

2) M. Yamada, K. Kato, K. Shindo, M. Nomizu, M. Haruki, N. Sakairi, K. Ohkawa, H. Yamamoto, N.

Nishi, *Biomaterials* **22**, 3121 (2001)

3) M. Yamada, K. Kato, M. Nomizu, N. Sakairi, K. Ohkawa, H. Yamamoto, N. Nishi,

Chem. Eur. J., **8**, 1407 (2002)

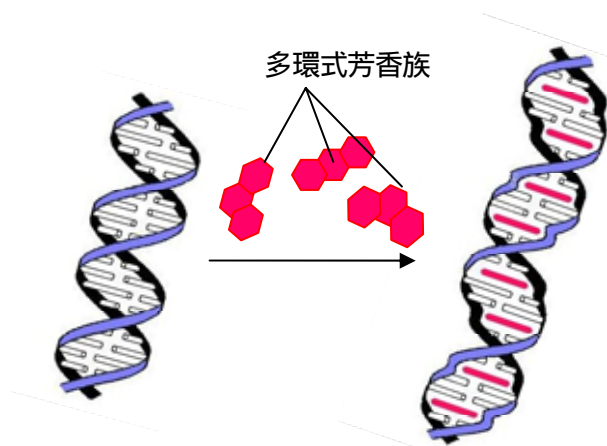


Figure 1. インターカレーション(模式図)

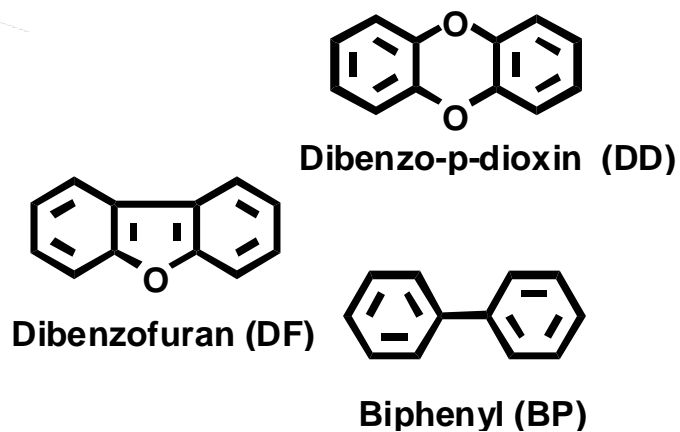


Figure 2. ダイオキシン類分子構造

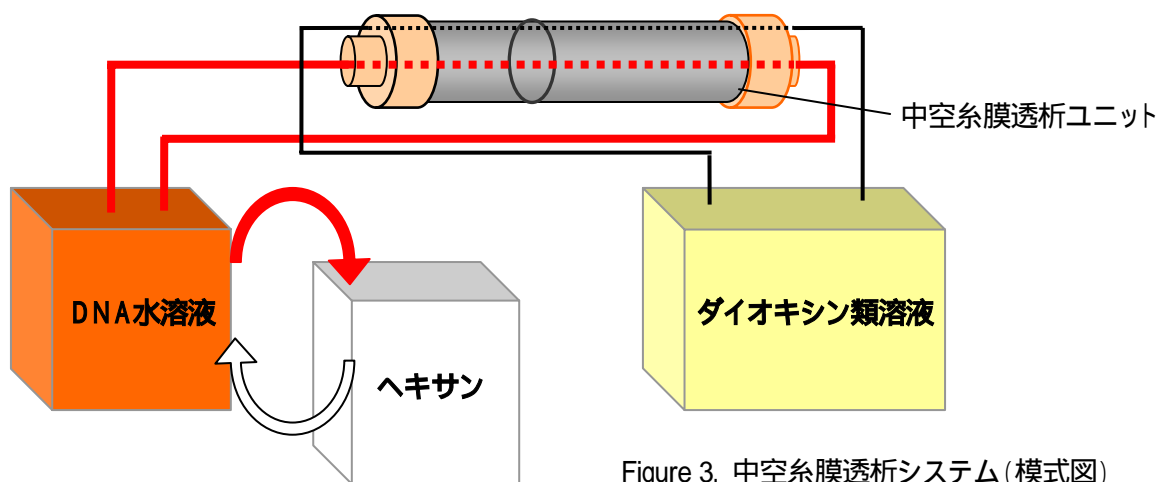


Figure 3. 中空糸膜透析システム(模式図)

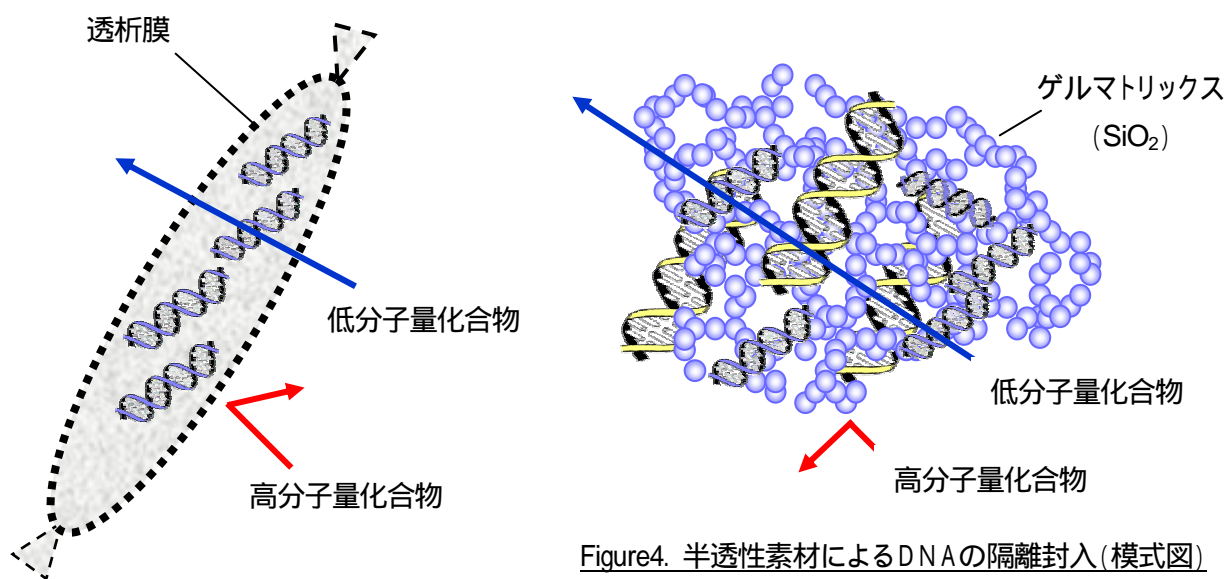


Figure4. 半透性素材によるDNAの隔離封入(模式図)