博士（地球環境科学）　佐　藤　秀　哉

学位論文題名

Studies on DNA-conjugating Materials as Separating Devices for Environmental Pollutants

（環境汚染物質分離デバイスを指向したDNA複合材料の開発とその応用に関する研究）

学位論文内容の要旨

人類社会の拡大、そして科学技術の進歩に伴って人為的に産生された化学物質は膨大な量と種類に及び、時に公害のような大規模な災禍を引き起こす要因となった。近年には内分泌撹乱化学物質による生殖異常誘発現象に代表される、環境中の微量物質による生態系への負の影響が報告されるなど、これまで認知されていなかったリスクの顕在化に対して懸念が広がっている。多くの場合、それらの汚染実態の調査は非常に困難であるとされ、その最大の原因として対象の環境中濃度が非常に稀薄であるのみならず、種々の夾雑成分や包摂成分と共に存在していることが挙げられる。そのため高感度分析を行う際には多段階抽出や濃縮を重ねる煩雑な前処理が不可避となる。また、対象系が巨大であることから分解処理の適用も容易ではない。このような課題を前に、特定の有害物質を選択的に分離回収しうるアフィニティー材料の開発は有望な取り組みとして世界中の研究者の関心を集めている。

本申請者もまた、以前より環境修復・環境浄化技術に強い関心を抱き、内分泌撹乱化学物質を始めとする難分解性化学物質を対象とする物質分離デバイスの開発をテーマとして研究活動を行ってきた。本申請者はDNA（デオキシリボ核酸）と、ある一群の内分泌撹乱化学物質・発がん性物質との間に見られる選択的物質吸着作用に着目しDNAをホスト物質として組み込んだ物質分離システムの構築を目指した。ＤＮＡは遺伝子の本体として生態遺伝機構の根幹を成す物質であり、分子生物学の礎たる物質である。また、近年「二重らせん構造」や「核酸塩基対の積層構造」などの特徴的な構造と、それらに基づく種々の特異な物性からナノテクノロジー分野のキーマテリアルとして注目されている高分子量物質でもある。前述の物質吸着作用は、主として、ＤＮＡの積層した核酸塩基対が形成する疎水ドメインに

環式化合物が取り込まれ安定化される「インターカレーション」という現象によるものであり、他の合成高分子では模倣しがたいＤＮＡのナノオーダーの規則構造が導く機能である。過去にもＤＮＡを分析デバイスとして応用する取り組みは少なからず報告されており、多くの場合には合成化学的手法を介してオリゴヌクレオチドを固相修飾するといった方法論が採られている。これらの材料は安定性において優れるものの絶対的な担持量に制約を課され、また、その合成において精細な技術を要する。本研究はＤＮＡを有害物質に対する吸着材として適用し、大規模な系に含まれる有害物質の分離技術へと展開することを目的とするものである。故に十分量のＤＮＡが安定に担持され吸着キャパシティが確保されることが第一義であり、従来の合成化学的手法は必ずしも最善の選択肢ではない。しかし機能性材料としてのＤＮＡの実際的な応用までを目的とする本研究において、材料の安定性の確保、即ち十分な機械的強度の付与と水溶性・生分解性の抑制は特に重要な課題である。本研究では固相固定によるＤＮＡの安定化を図り、後述する材料化方法を用いて種々のＤＮＡ複合材料を得た。

第一章では、ＤＮＡ分子間でのラジカル架橋反応により不溶性ゲルマトリックスが形成される現象を応用し、多孔質ガラス担体の表層にこれを固定することで材料化を行った。ＤＮＡを構成する４種の核酸塩基として知られる A(アデニン)・T(チミン)・G(グアニン)・C(シトシン)の内、ピリミジン塩基として分類されるチミン、シトシンは紫外線感受性が高く適当な波長と強度の紫外線照射によって容易に二量体を形成することが知られている。本研究ではシランカップリング反応を介して担体にアミノプロピル基を導入し、塗布・乾固したＤＮＡ層を接着、さらに全体への紫外線照射を一定時間施してＤＮＡマトリックスを不溶化する処理を施した。得られたＤＮＡ担持体は充分な洗浄により未反応画分を除去した後に、その安定性と物質吸着特性を始めとするその性状について評価を行った。臭化エチジウムをモデル物質とした吸着試験の結果から、この材料がＤＮＡ結合性物質に対して高い吸着作用を保持していることが確認された。さらに、吸着された物質の脱着(濃縮)処理が種々のＤＮＡ凝縮因子の添加ないし有機溶媒での抽出操作により非破壊的に可能であることを見出した。結合性物質の吸着と脱着が反復可能であることは、物質分離デバイスとしての要件を満たすものである。実際にオープンカラム型の濾過システムを試作し微量な試料溶液についてその分離／濃縮操作を行い、良好な結果を得た。

第二章では、有機無機複合材料の有力な合成手段である「ゾル‐ゲル法」を応用してＤＮＡとシリカを成分とする有機無機複合材料の作製を試みた。ゾル‐ゲル法は、反応性末端

を有する金属化合物の均一溶液から加水分解反応と縮合反応とを経て、無機マトリックスを生成する常温液相合成法である。温度や溶媒、圧力等の影響による膨潤や収縮の少ない無機高分子を構成要素とすることで、高い送液圧と多様な溶媒環境への耐久性が求められるHPLC用充填材への応用を図った。本研究ではテトラエトキシシラン(TEOS)を酸触媒により部分加水分解して得た前駆体溶液と、ＤＮＡおよびアミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)を混合してこれをゲル化、熟成処理と脱塩処理を施した後、これを凍結乾燥して半透明粉末状試料を得た。このＤＮＡ-シリカ複合材料についてもその安定性、物質吸着特性について評価を行った。ＤＮＡに由来する物質吸着特性の継承の可否と材料組成には関連がみられ、最適化された複合材料ではＤＮＡ結合性物質に対する高い吸着作用が得られた。また多成分系における競合吸着処理では、各成分のＤＮＡへの親和性の差に基づく分離結果が得られた。この吸着物質は適当な極性の有機溶媒を用いた抽出操作によって脱着可能であり、ＤＮＡ-シリカ複合材料の再使用性も確認された。この材料は無機マトリックス中にＤＮＡを均一的に分散して保持することで、アルコール濃度やイオン強度の極端に高い溶液など、通常はＤＮＡ分子の凝集や沈殿が発生するような溶媒環境下においても安定に性状を保った。

本研究はＤＮＡとの相互作用を有する微量汚染物質の高精度分析および回収技術に関わる有用な材料を提案するものである。特定有害物質を選択的に分離回収するアフィニティー技術の発展は環境浄化への道程であり、本研究で開発したＤＮＡ複合材料そしてそれを基に構築した物質分離デバイスは、その発展に大いに貢献すると考える。またＤＮＡは天然において無尽蔵に産生される未開発のバイオマスであり、これを高価値資源に転化することの意義は非常に大きい。この点についても本研究は大いに貢献するものである。

本研究とその成果は地球環境科学ならびに生態環境科学研究に大きく寄与するものであると確信する。

学位論文審査の要旨

主　査	教　授	西　　則　雄
副　査	教　授	坂　入　信　夫
副　査	助教授	春　木　雅　寛
副　査	助教授	古　月　文　志

学 位 論 文 題 名

Studies on DNA-conjugating Materials as Separating Devices for Environmental Pollutants

（環境汚染物質分離デバイスを指向したDNA複合材料の開発とその応用に関する研究）

近年、内分泌撹乱化学物質によるリスクに対して懸念が広まっている。それらの汚染実態の調査は非常に困難であるとされ、その最大の原因として対象の環境中濃度が非常に稀薄であるのみならず、種々の夾雑成分や包摂成分と共に存在していることが挙げられる。そのため高感度分析を行う際には多段階抽出や濃縮を重ねる煩雑な前処理が不可避となる。このような課題を前に、特定の有害物質を選択的に分離回収しうるアフィニティー材料の開発は有望な取り組みとして世界中の研究者の関心を集めている。

本申請者はＤＮＡ（デオキシリボ核酸）と、ある一群の内分泌撹乱化学物質・発がん性物質との間に見られる選択的物質吸着作用に着目しＤＮＡをホスト物質として組み込んだ物質分離システムの構築を目指した。ＤＮＡは近年「二重らせん構造」や「核酸塩基対の積層構造」などの特徴的な構造に基づく種々の特異な物性から、ナノテクノロジー分野のキーマテリアルとしても注目を集めている。前述の物質吸着作用は、主として、ＤＮＡの積層した塩基対が形成する疎水ドメインに環式化合物が取り込まれる「インターカレーション」という現象によるものであり、他の合成高分子では模倣しがたいＤＮＡの機能である。本研究はＤＮＡを有害物質に対する吸着材として適用し、大規模な有害物質分離技術へと展開することを目的とするものである。本研究では後述する材料化方法を用いて種々のＤＮＡ複合材料を得た。

第一章では、ＤＮＡの分子間ラジカル架橋反応を応用し、多孔質ガラス担体への固定を行った。ＤＮＡの核酸塩基のうち、ピリミジン塩基は紫外線感受性

が高くある波長域の紫外線照射によって容易に二量体を形成する。本研究ではシランカップリング反応を介して担体にアミノプロピル基を導入してＤＮＡ層を接着、さらに全体への紫外線照射を一定時間行うことでＤＮＡマトリックスを不溶化した。臭化エチジウム吸着試験の結果からは高い吸着能力が示された。さらに、種々のＤＮＡ凝縮因子の添加ないし有機溶媒での抽出操作によって吸着された物質の脱着が可能であることを見出した。オープンカラム型の濾過システムを試作し希薄な汚染水溶液について特定成分の分離／濃縮操作を行ったところ良好な結果が得られた。

第二章では、有機無機複合材料の有力な合成手段である「ゾル‐ゲル法」を応用してＤＮＡとシリカを成分とする有機無機複合材料の作製を試みた。ゾル-ゲル法は、反応性末端を有する無機化合物から無機ゲルマトリックスを生成する常温液相合成法である。温度や溶媒、圧力等の影響による膨潤や収縮の少ない無機高分子を構成要素とすることで、高い送液圧と多様な溶媒環境への耐久性が求められるHPLC用充填材への応用を図った。本研究ではテトラエトキシシラン(TEOS)を酸触媒により部分加水分解して得た前駆体溶液と、ＤＮＡおよびアミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)を混合してこれをゲル化、熟成処理と脱塩処理を施した後、これを凍結乾燥して半透明粉末試料を得た。多成分系競合吸着処理では、各成分のＤＮＡへの親和性の差に基づく分離結果が得られた。吸着物質は適当な極性の有機溶媒を用いた抽出操作によって脱着可能であり、ＤＮＡ-シリカ複合材料の再使用性も確認された。この材料は無機マトリックス中にＤＮＡを均一的に分散して保持することで、アルコール濃度やイオン強度の極端に高い溶液など、極端な環境下においても安定に性状を保った。

本研究はＤＮＡとの相互作用を有する微量汚染物質の高精度分析および回収技術に関わる有用な材料を提案するものである。特定有害物質を選択的に分離回収するアフィニティー技術の発展は環境浄化への道程であり、本研究で開発したＤＮＡ複合材料そしてそれを基に構築した物質分離デバイスは、その発展に大いに貢献すると考える。またＤＮＡは天然において無尽蔵に産生される未開発のバイオマスであり、これを高価値資源に転化することの意義は非常に大きい。

本研究とその成果は地球環境科学ならびに生態環境科学研究に大きく寄与するものであると確信する。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。