

課題情報シート

課題名：	透析セルを用いた DNA 膜の作製と熱特性の評価		
施設名：	職業能力開発総合大学校東京校		
課程名：	専門課程	訓練科名：	環境化学科
課題の区分：	総合制作実習課題	課題の形態：	研究

課題の制作・開発目的

(1) 課題実習の前提となる科目または知識、技能・技術

有機工業化学（高分子の基本物性に関する知識）、分析化学、物理化学、機器分析法、機器分析実験

(2) 課題に取り組む推奨段階

有機工業化学及び機器分析実験終了後

(3) 課題によって養成する知識、技能・技術

研究課題を通して、環境中の有害物質除去に応用可能な機能性材料に関する知識と、実践的な材料開発技術を身につけます。

(4) 課題実習の時間と人数

人数：1名

時間：324時間

DNA（デオキシリボ核酸）は、2本のDNA鎖が水素結合した二重らせん構造をとり、特異的塩基配列を有しています。私達は、DNAのインターカレーションを利用した有害物質の吸着除去材料を開発しています。DNA膜を作成できれば、環境中の有害物質の吸着除去が容易になり操作性の向上が見込まれます。

本年度の課題では、透析セルを用いたDNA膜の製作について検討しました。DNAとポリカチオンの高イオン強度(I)混合水溶液を透析セル中で純水に対して透析を行い、DNAのポリイオンコンプレックス(PIC)を透析膜上で緩慢に生成させることのできる、新規のDNA膜の作製法を開発しました。さらにDNA膜の熱特性の評価を行うために、示差走査熱量計(DSC)を用いてDNA膜の融解温度を測定しました。

このような新規のDNA膜作製法の開発と特性評価は、機能性材料に関する実践的な技術開発力を養成することが出来るとともに、環境に配慮した「ものづくり」分野への応用に有効であると考えます。

課題の成果概要

イオン強度の高い条件で、DNA とポリカチオン混合溶液を純水に対して透析を行いました。溶液中の低分子イオン濃度の低下とともに、透析膜上に DNA のポリイオンコンプレックス(PIC)が緩慢に生成することで、DNA 膜を作製することが出来ました。この実験から、イオン強度、DNA 濃度、DNA とポリイオンとの混合比、透析時間などを考慮した DNA 膜製作の最適条件を見つけることが出来ました。

図 1 は DNA のモデル図です。DNA は二重らせんの分子鎖にそって、マイナスの電荷をもっています。図 2 は、ポリカチオンとして用いたポリジアリルジメチルアンモニウムクロリド(PDDACL)の化学式です。この DNA と PDDACL の水溶液を混合すると、ポリイオンコンプレックス(PIC)が生成します。透析セルを用いたこのような PIC 形成反応によって、均一な DNA 膜の作製が可能であることを明らかにしました。

図 3 は、今回用いた透析セルです。二枚のアクリル板の間に透析膜を挟み、ネジで固定します。アクリル板の中央のくぼみに DNA と PDDACL 混合溶液を注入します。図 4 は、透析が進行しセル中の透析膜に白い DNA 膜が生成している様子です。

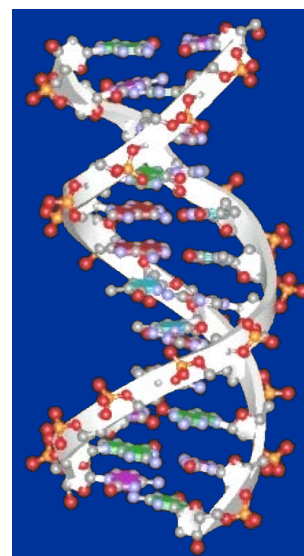


図 1 DNA モデル図

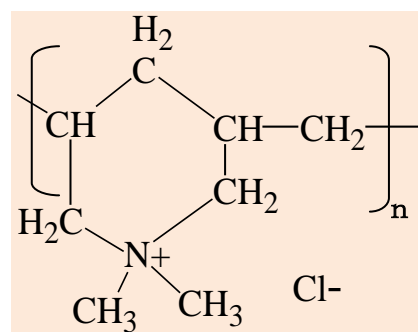


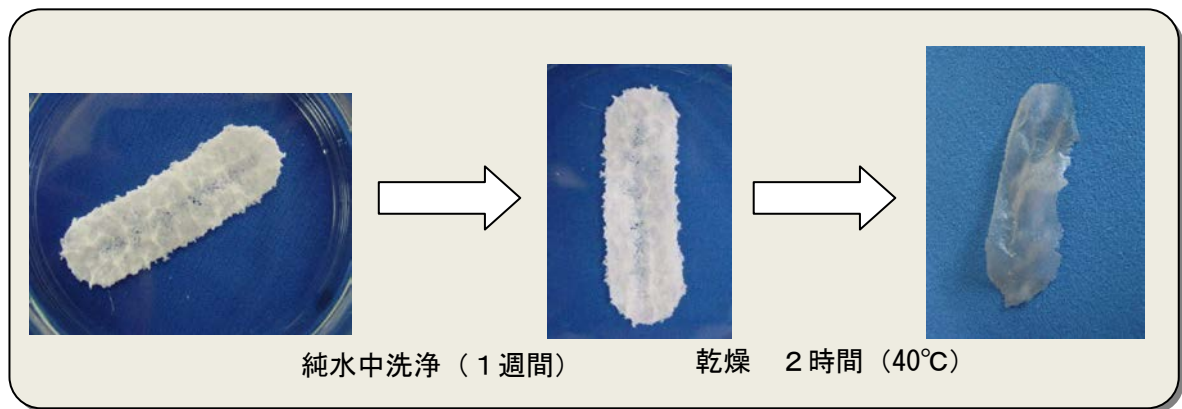
図 2 ポリカチオン試料



図 3 透析セル



図 4 透析セル中に生成した DNA 膜



純水中洗浄（1週間） 乾燥 2時間（40℃）

図5 DNA膜の洗浄と乾燥

このDNA膜を透析セルから取り出して、シャーレ中で純水を交換しながら1週間洗浄した後、40℃で2時間乾燥すると丈夫なDNA膜が得られます。洗浄と乾燥の状況を図5に示しました。

図6はDNA水溶液とDNA膜のDSC曲線を示したものです。

膜にしていないDNA水溶液のDSC曲線(A)では、5つの吸熱ピークが見られます。この様な多数の吸熱ピークは、DNA融解の微細構造として知られているものです。DNAは、73℃から84℃の間で5段階に分けて数塩基対のブロック毎に、二本の分子鎖がほどけることがわかりました。

DNA膜のDSC曲線(B)では融解の吸熱ピークが94.5℃と106.6℃の2か所に見られます。DNA分子鎖の融解が2段階で起こり、融解の微細構造が消失していることがわかります。

DNAとポリカチオン間のPIC形成によって膜を調製すると、90℃以下の温度であればDNAの二重らせん構造は保持され、融解の耐熱温度が約20℃上昇することがわかりました。DNA膜の耐熱性が向上すれば、有害物質除去の適用温度範囲が広がり操作性の向上が見込まれます。

今回の研究で明らかにしたDNA膜の作製法は、耐熱性の向上とDNAの二重らせん構造を保持させたまま製膜のできる優れた方法であることが明らかになりました。今後は、モデル吸着物質として平面構造を持つ多環式芳香族化合物の吸着除去実験を行うことで、DNA膜の吸着除去材料としての有効性を検討する必要があります。

本研究をさらに進めることで、優れた有害物質の吸着膜材量の開発につながるものと考えます。

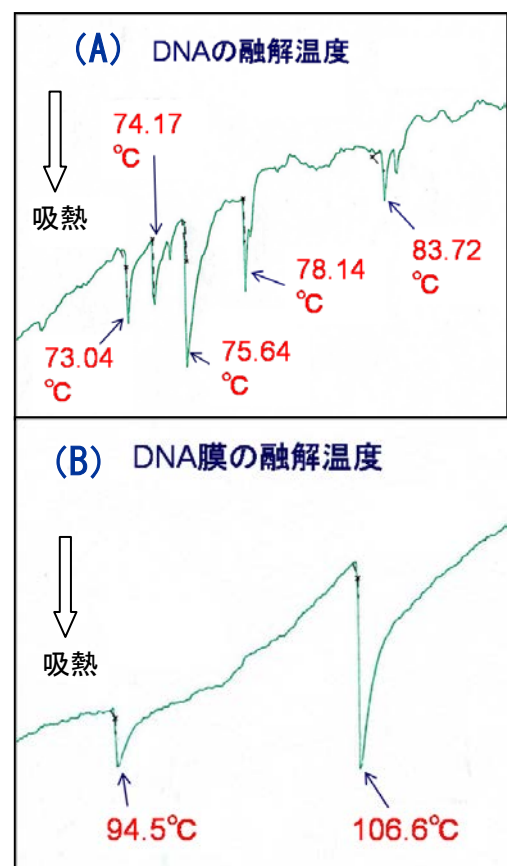


図6 DNAとDNA膜のDSC曲線

<DNA分子特性の理解について>

DNA分子の二重らせん構造を理解させる必要があります。さらに、DNAの特性として、多環式平面化合物がDNA塩基対の隙間に挿入し吸着するインターカレーションという現象の理解も必要です。これらのDNA分子の持つ特性を理解させることで、DNAが環境中の有害物質を選択的に吸着除去できる可能性を持つ、優れた機能性材料になることを学ばせます。

<DNAの固定化とDNA膜について>

現在までに行われているDNA固定化方法を理解させ、種々のDNA包括固定化に関する予備実験を行わせました。これにより、DNAの取り扱い方法、調製方法、固定化DNA材料の評価法に関する技能・技術の向上が図れました。

DNAの膜を得る方法としては、DNAと合成脂質間でポリイオンコンプレックスを作らせ、高温条件でプレスして膜を得る方法があります。しかし、高温・高圧の過酷な製膜条件であり製作手順も煩雑です。今回の課題では、もっと温和な条件で簡便なDNA膜を作製する方法を検討させました。

<DNA膜の作製条件について>

DNA膜を作製するポイントは、透析セル内で緩慢にDNAとポリカチオン間のポリイオンコンプレックスを反応させることです。溶媒のイオン強度を上げることで、DNAとポリカチオン間の静電的相互作用を効果的に抑制させることが出来ることを学ばせます。透析法の理解により、溶媒中の低分子イオンの除去に関する原理をモデル実験で確認させました。その結果、透析セルの取り扱いがスムーズになり作業精度が向上し、透析についての理解が向上しました。

DNA膜の作製条件の検討として以下の5項目を取り上げました。

- (1) DNA濃度
- (2) ポリカチオン濃度
- (3) DNAとポリカチオンの混合比
- (4) イオン強度
- (5) 透析時間と純水交換間隔

上記(1)～(5)について種々の組合せで実験を実施させ、最適なDNA膜作製条件を見つけるように指導しました。DNA膜が上手くできる条件がなかなか見つからず苦労しましたが、透析セルの中に初めて薄いDNA膜が生成した時の感動と達成感を、学生に体験させることが出来ました。

透析セルへDNAとポリカチオン混合溶液の仕込み方法や、透析セルの純水の交換方法などは、学生のアイデアを積極的に取り上げ、効率的な方法を提案させました。忍耐強い努力と、自分なりの創意工夫が大切であることを実感させることが出来ました。

<DNAの熱特性評価について>

作製したDNA膜の熱特性の評価として、示差走査熱量計（DSC）を用いてDNA膜の融点測定を行いました。DSC測定でDNAの融解温度が測定できる原理の理解が必要です。DNAの融点は一段階で起こらずに数塩基対のブロックで分子鎖が融解するという融解の微細構造の理解も必要です。

DSC測定で得られたデータの解析と評価方法を身につけさせるために、金属の融点測定から習得させる指導法が効果的でした。

DSC測定のための試料の調製法、昇温速度の設定、測定温度範囲の設定、試料量の設定などの技能と技術は、実験を通じた経験の中で涵養させることが出来ました。

養成する能力 (知識、技能・技術)	課題制作・開発のポイント	訓練（指導）ポイント
<p>○DNA分子の特性を理解することが出来ます。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・二重らせん構造 ・塩基対の相補的結合 ・DNAの融解 ・インターカレーション機構 <p>※有害物質除去のための機能性材料への発展を理解させることで、DNAを膜にする目的を明確にできます。</p>	<p>◇DNA分子の生化学的特性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・DNA分子鎖の構造と、DNAの融解挙動の理解を涵養するための解説用のスライド資料を作製しました。 ・DNAのインターカレーション機構の理解を通して、有害物質の選択的除去材料への発展性が理解できます。 	<ul style="list-style-type: none"> ●文献をあらかじめ読ませてから、スライドによる解説を行いました。自由な雰囲気でも討論することで理解を深めました。
<p>○DNA膜作製のための透析法を理解します。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・透析原理 ・イオン強度 ・静電的相互作用 	<p>◇透析平衡法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・透析平衡法を理解させるために、簡単な系で透析実験を行わせました。 ・イオン強度、静電的相互作用に関しては、概念を効果的に理解できるスライドを作製し、積極的に提示しました。 	<ul style="list-style-type: none"> ●理論的な項目の理解を助けるために、実際にモデル実験を行わせることが効果的でした。 ●理論式の解説よりも、概念理解を助けるモデル図の多用が効果を上げました。 ●学生とのコミュニケーションが大切で、「ともに考え・共に学ぶ」という姿勢が大切です。
<p>○実験条件の設計や実験方法の工夫を自発的に出来る能力を習得できます。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・DNA膜作製条件の検討を 	<p>◇DNA膜作製条件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・作製条件を学生に考えさせます。 ・DNA濃度、イオン強度の変 	<ul style="list-style-type: none"> ●DNA膜作製条件を効率よく設定できるように適切なアドバイスとフォローが必要です。

養成する能力 (知識、技能・技術)	課題制作・開発のポイント	訓練（指導）ポイント
<p>通して、最適な実験条件を効率よく設定出来る能力を養えます。</p> <p>○DNA 膜の熱特性を理解できます。</p> <p>・示差走査熱量計 (DSC) の原理とデータの評価法を習得します。</p>	<p>化、DNA とポリカチオンの混合比などは、条件設定に高度な知識が必要でした。</p> <p>・透析セル中の純水の交換、セルへの混合液の仕込み方法の検討は、トライ&エラーを通した学生の創意工夫が活かされました。</p> <p>◇DNA 膜の評価</p> <p>・作製した DNA 膜の熱特性を評価させるために、示差走査熱量計 (DSC) を用いて、DNA 膜の融点を測定させます。</p> <p>・DSC のデータ解析法を学ばせるために、金属の融点測定実験を行わせました。</p> <p>・DNA の融解の微細構造が確認できるデータを得るためには、試料調製の工夫が必要です。</p>	<p>●DSC 機器の操作法と試料の前処理法の習熟を必要とします。初めに金属の融点測定などの比較的簡単にデータが取れる実験系で練習させるのが効果的です。</p> <p>●DSC データの評価で、DNA の融解の微細構造を確認させることは、訓練効果が高いと考えられます。</p>

<所見>

この実習課題における一連の取組みを通じて、学生自身で設定した DNA 膜調製条件や、透析セルへの混合液の仕込み・純水交換などの実験方法を工夫する中で、総合的に課題解決を行うための能力を養成することができたと考えます。

さらに、自ら考えて実験を行うとともに結果を予測する能力、得られたデータを検証する能力等も養成されたものと考えます。

課題に関する問い合わせ先

施設名 : 職業能力開発総合大学校東京校
 住所 : 〒187-0035
 東京都小平市小川西町 2-32-1
 電話番号 : 042-341-3331 (代表)
 施設 Web アドレス : <http://www.ehdo.go.jp/tokyo/ptut/>