

平成 21 年 10 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18750160  
 研究課題名 (和文) 疎水性アルキル基によるメッセンジャーRNAの高精度識別に関する研究  
 研究課題名 (英文) Octadecylsilyl Silica Column Method for Extraction of Messenger RNA  
 研究代表者  
 木村 太郎 (KIMURA TARO)  
 福岡県工業技術センター・生物食品研究所・研究員  
 研究者番号：40416491

## 研究成果の概要：

生体内にはメッセンジャーRNA (mRNA) と呼ばれる一群の RNA が存在することが知られている。申請者は、mRNA が特定の条件下で疎水的なアルキル基と選択的に吸着する現象を発見した。一般に核酸の識別は相補的水素結合部位を有する核酸様高分子によってのみ実現されており、アルキル基の様な単純な構造により高精度に mRNA が識別されることは極めて興味深い。本研究ではこの選択的吸着現象のメカニズムの解明を行った。また、この現象を利用した mRNA 分離キットの試作を行った。このキットは従来の mRNA 分離キット (オリゴ dT 法) とは全く異なる原理に基づいており簡便かつ迅速な分離システムとなりうる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,900,000	0	1,900,000
2007 年度	900,000	0	900,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	240,000	3,840,000

## 研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：メッセンジャーRNA, RNA, 分離, ポリ A テイル, 抽出, 疎水性相互作用, トータル RNA, 固相抽出カラム

## 1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子解析技術の進歩により mRNA の抽出、検出技術への関心が高まっている。mRNA は生体内のタンパク質の発現を制御する重要な物質であり、これを精密に識別する方法は非常に重要な技術となる。しかしながら、生体試料中の mRNA を識別することは以下の4つの理由から非常に困難と思われる。 (1) 細胞抽出 RNA に含まれる mRNA は全体の僅か 5 %以下であること、 (2) mRNA とその他の RNA の違いは塩基配

列のみであること、 (3) mRNA 自身も多様性に富んでいること (例えば酵母の mRNA は約 6000 種類)。従って mRNA を他の RNA から明確に識別する手法は、現在のところ核酸誘導体による相補的塩基対形成を利用した方法のみである (オリゴ dT 法)。これに対し本研究の内容は、単純な構造のアルキル基により mRNA を識別する点に特色がある。しかも、核酸誘導体に匹敵する高い選択性を付与することも可能であることが現在明らかとなりつつある。

本研究内容は、非核酸塩基による核酸認識といった学術的な意義のみならず、様々な遺伝子解析支援装置との複合化が期待出来る。一般に、アルキル基は生体高分子である核酸誘導体に比べ、(1) 取り扱いが容易で、(2) 使用条件の広範さに優れ、(3) 加工や装置への組み込みが容易である、といった利点がある。この特色を發揮させることで mRNA 抽出装置や核酸センサーといったバイオ関連装置への波及効果が期待される。

## 2. 研究の目的

生体内にはメッセンジャーRNA (mRNA) と呼ばれる一群の RNA が存在することが知られている。この mRNA は DNA の持つ遺伝情報からタンパク質を生成するための中間物質であり、生命活動を制御する重要な物質である。最近申請者は、mRNA が特定の条件下で疎水的なアルキル基と選択的に相互作用する現象を発見した (Fig. 1)。例えば細胞抽出 RNA 混合物 (total RNA) を 5 °C、40 vol% ジメチルスルホキシド存在下でオクタデシルシリカと接触させると、mRNA のみが選択的に吸着される。同じ RNA であるリポソーム RNA やトランスファー RNA が大過剰に存在する中で、mRNA のみが吸着する現象は、mRNA とアルキル基との間に厳密な識別機構が働いている事を示唆するものである。恐らく、オクタデシル基と mRNA 間に疎水的相互作用を主体とする何らかの複合的な相互作用が働くためと考えられるが、詳細なメカニズムは完全には明らかとなっていない。一般に核酸の識別は相補的水素結合部位を有する核酸様高分子によってのみ実現されており、オクタデシル基の様な単純な構造のアルキル基により高精度に mRNA が識別されることは極めて興味深い。そこで、申請者はこの現象のメカニズムを追究し、新規核酸認識デバイスとして応用することを試みる。

## 3. 研究の方法

mRNA を含む様々な RNA について、アルキル基への吸着挙動の評価を系統的に行い、mRNA とアルキル基の選択的相互作用のメカニズムを解明する。評価方法は、アルキル基を修飾した固相抽出カラムを用いる方法である。RNA を様々な条件下で固相抽出カラムに加え、担体への吸着量を元にアルキル基への親和性について検討を行う。溶液中の RNA の検出は吸光度測定とノーザンブロット実験により行う。mRNA は調製が容易な酵母由来のものを主として用いることにしているが、動物細胞など、その他の真核生物の RNA についても検討する。

## 4. 研究成果

### 【1】均一組成 RNA のオクタデシル基修飾シリカ固相抽出カラムへの吸着挙動の検討

アルキル基修飾シリカに対する塩基組成の異なる RNA の吸着挙動を検討した。モデル RNA として、均一組成 RNA (ポリ A, ポリ C, ポリ G) を用い、オクタデシル基修飾シリカ固相抽出カラム (C18 カラム) への吸着挙動について検討を行った。その結果を Fig. 1 に示す。これによるとポリ A は DMSO が 0-45 % 共存した条件下では C18 カラムへほぼ定量的に吸着することが明らかとなった。また、DMSO 60-70 % 共存下ではカラムに吸着しなかった。また、ポリ G は DMSO 添加量 60 % 以下で定量的に C18 カラムに吸着した。これに対し、ポリ C は DMSO 添加量 30 % 以上でカラムに吸着しないことが明らかとなった。

これらの挙動の違いは各 RNA の塩基構造の違いに起因していると推測される。すなわちプリン環構造であるポリ A, ポリ G は疎水性が強いため C18 カラムへの吸着力が強く、ピリミジン環構造のポリ C は疎水性が比較的弱い C18 カラムへの吸着力が弱いと考えられる。

### 【2】生物由来 RNA の C18 カラムへの吸着挙動の検討

C18 カラムへの生物由来 RNA の吸着挙動を検討した。ここでは酵母由来の mRNA 及び rRNA を用いた。結果を Fig. 2 に示す。これによると、rRNA は DMSO 30 % 以下では C18 カラムに定量的に吸着するがそれ以上の添加量ではカラム吸着が減少した。これは Fig. 1 に示すポリプリン RNA とポリピリミジン RNA の中間の挙動と考えることが出来る。rRNA はプリン塩基とピリミジン塩基がランダムに混合したヘテロな RNA と考えることが出来るため、その吸着挙動も中間的なものとなったと考えることが出来る。

一方、mRNA は DMSO が 0-45 % 共存した条件下で C18 カラムへ定量的に吸着し、DMSO 60-70 % 共存下ではカラムに吸着しないことが明らかとなった。これは Fig. 1 に示すポリ A の吸着挙動に類似している。この挙動は mRNA の持つポリ A テイルの効果によるものと考えられる。真核生物の mRNA は末端にポリ A テイルと呼ばれる 50-300 量体のアデニル基が連続した領域が存在することが知られている。先述の通りアデニンはプリン環を有するのでピリミジン環からなるシトシン、ウラシルよりも疎水性が高い。そのため、ポリ A テイル部分が他のヘテロな配列に比べて疎水的な領域となっていることが予測される。従って、ポリ A テイル-C18 間の疎水的相互作用により mRNA が C18 カラムに強く吸着すると考えられる。

mRNA と rRNA の全体的な塩基組成は大

差ないと考えられるが、ポリ A テイルが疎水的ドメイン構造として存在することで C18 カラムへの吸着挙動を大きく変えることは興味深い現象といえる。

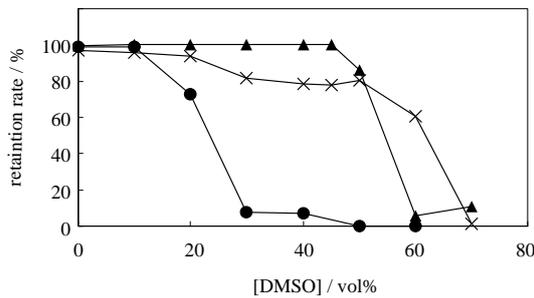


Fig. 1 C18カラムにおけるポリ(A) (▲)、ポリ(G) (×) 及びポリ(C) (◆)の吸着挙動. 試料組成: [RNA] =  $2.5 \times 10^{-4}$  mg / ml, [Tris-HCl] = 100mM, DMSO添加量0-70%. 操作温度 5 °C.

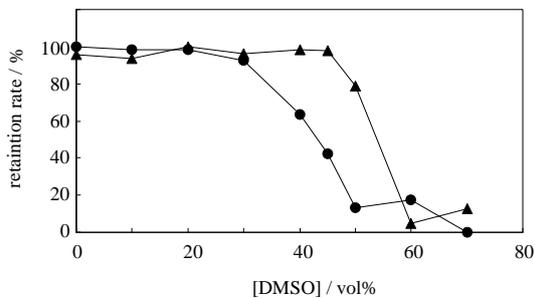


Fig. 2 C18カラムにおけるrRNA (●) 及び mRNA (▲)の吸着挙動. 試料組成: [RNA] =  $1.7 \times 10^{-2}$  µg / µl, [Tris-HCl] = 100mM, DMSO添加量0-70%. 操作温度 5 °C.

### 【3】C18 カラムを利用した新規 mRNA 分離技術の確立

前述までの結果から、mRNA が C18 カラムに対して強い親和性を持つことが示された。この現象を利用して、C18 カラムを用いて RNA 混合物 (total RNA) より mRNA を分離することを試みた。最適化実験の結果、分離操作は以下のとおりとした。

分離は (1) 溶液調製、(2) フィルター透過、(3) すすぎ、(4) mRNA 溶出、の 4 つの操作よりなる (Fig. 3)。

(1) 溶液調製・・・total RNA 溶液を Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 100 mM/ DMSO 45 vol%、体積 200 µl、となるように調製する。

(2) カラム透過・・・total RNA 溶液を C18 カラムへ透過する。

(3) 洗浄・・・Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) をカラムに加える (0.5 ml x 2)。

(1)、(2)、(3) の操作は低温 (5 °C) で行われなくてはならない。

(4) mRNA 溶出・・・カラムを室温に出し

て 65°C に加熱しておいた DEPC 処理水/50 vol% メタノール 100 µl を加え、溶出させる。

この一連の操作は 10 分で完了することが出来る。mRNA 分離の従来技術 (オリゴ dT 法) では 30-60 分程度かかることを考えると非常に簡便かつ迅速な方法といえる。

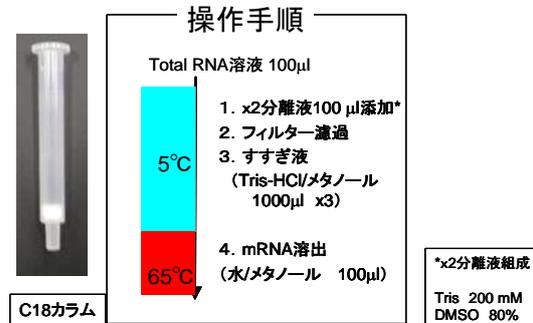


Fig. 2 C18法におけるmRNA分離操作

### 【4】分離性能の評価

実際に先に示した分離操作で mRNA の分離が可能であることを確認した。この操作ではサンプルを透過して得た液 (透過液: フラクシオン 1)、すすぎ液を透過して得た液 (すすぎ液: フラクシオン 2, 3)、溶出するための加熱した水/メタノール混合液を透過した液 (溶出液: フラクシオン 4, 5) が得られる。これらの各フラクシオンに含まれる RNA 総量を吸光度測定 (260 nm)、mRNA 量をノーザンドットプロットにより検討した。Fig. 4 に total RNA 100 µg をカラム透過した時の結果を示す。これによると、総 RNA の 95% 以上はすすぎ操作 (フラクシオン 3) までに

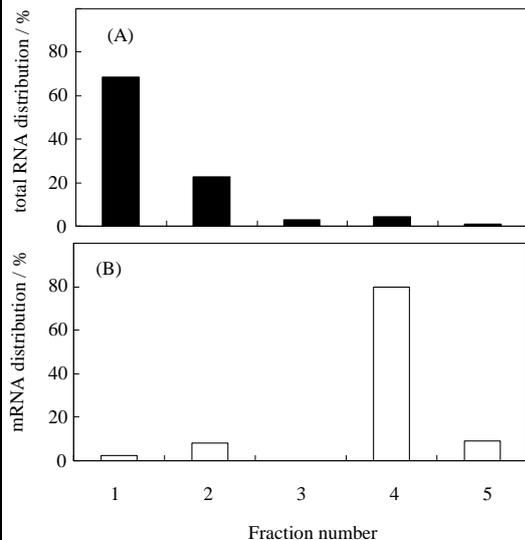


Fig. 4 各フラクシオンに含まれる total RNA (A) 及び mRNA (B) の比率. 試料溶液: 200 ml ([total RNA] = 0.5 mg / ml, [Tris-HCl] = 100mM, DMSO 45 vol%). 操作温度: 5 °C.

溶出していることが分かる。これに対し、mRNA はすぎ操作までにはほとんど含まれず、溶出液（フラクション 4）に高濃度で含まれていることが明らかとなった。つまりこの結果は、カラム透過により total RNA から mRNA のみを選択的に抽出することが可能であることを示したものである。

#### 【5】 様々な生物種の mRNA 分離

酵母以外の生物種由来の total RNA を用いて mRNA の抽出を試みた (Table 1)。その結果、全ての試料から 80 %以上の回収率で mRNA を回収することが出来た。これは本分離方法が汎用的に適用可能であることを示す結果といえる。

Table 1 様々な生物由来のRNAからの分離

生物種	mRNA回収率
Corn	97.7
Mouse Kidney	94.6
Human Tumor Cell Line Hela	93.6
Human Adult Heart	81.2
Rat Kidney	94.3

#### 【6】 実用化への試み

本法を利用した mRNA 分離キットの試作を和光純薬の協力を得て行った (写真)。これは、C18 カラム及び各種溶液から構成される。このキットの評価を行ったところ性能面では従来技術 (オリゴ dT 法) に基づく市販キットに比肩する回収率を示した。また、操作時間は市販キットで 30-60 分程度であるのに対し、本キットでは 10 分以内と極めて優れた操作性を示した。



#### 【7】 結論

一般に mRNA の分離識別には、核酸/核酸間の相補的塩基対形成を利用したオリゴ dT

法が用いられている。少なくとも実用的な手法としてはオリゴ dT 法が現時点でほぼ唯一の方法といえる。これに対し本研究では C18 カラムという比較的単純なツールを用いて mRNA の識別分離を行うことに成功した。これは疎水の相互作用を利用するものであり、従来技術とは全く原理を異にするものである。今後はこの技術の実用化展開を図りたい。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

T. Kimura, K. Sakurai, S. Shinkai, *Anal. BioChem.*, **391**, 72-73 (2009).

Octadecylsilyl Silica Column Method for Extraction of Messenger RNA

〔学会発表〕 (計 5 件)

1. 第 43 回化学関連支部合同九州大会  
ODS 固相抽出カラムを用いたメッセンジャーRNA 抽出法

○木村 太郎

2. 第 55 回高分子討論会

C18 固相抽出カラムによる新規メッセンジャーRNA 抽出方法

○木村 太郎

3. 日本化学会第 87 春季年会

メッセンジャーRNA の疎水性シリカへの選択的吸着

○木村 太郎

4. 第 56 回高分子学会年次大会

疎水性シリカ担体を用いたメッセンジャーRNA の新規分離方法

○木村 太郎、芦高圭史

5. 日本農芸化学会 2008 年度大会

新規メッセンジャーRNA 分離キットの開発

○木村 太郎

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.fitc.pref.fukuoka.jp/center/organization/functional\\_materials.htm#FuncMatDev](http://www.fitc.pref.fukuoka.jp/center/organization/functional_materials.htm#FuncMatDev)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 太郎 (KIMURA TARO)

福岡県工業技術センター・生物食品研究所・研究員

研究者番号：40416491