

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20750102

研究課題名（和文） リポ核酸を利用した界面活性剤自己組織体の形態制御と機能化

研究課題名（英文） Control of morphology and functions of Surfactant Aggregate by RNA

研究代表者

太田 明雄 (OHTA AKIO)

金沢大学・物質化学系・准教授

研究者番号：10324104

研究成果の概要（和文）：核酸はアニオンポリマーであることから、カチオン界面活性剤と相互作用を行い、リポプレックスと呼ばれる組織体を形成する。しかしながら DNA を用いた研究例と比較すると、RNA を用いた研究例は圧倒的に少ない。そこで RNA に対象を絞り、カチオン界面活性剤との組織体形成挙動を種々の方法により検討した。その結果、RNA 系においても、使用する界面活性剤の種類に応じて、その会合挙動を pH や界面活性剤濃度によって制御できることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Nucleic acid is a one of the anionic polymers and interacts with some cationic surfactants and as a result a complex, which is called lipoplex, is formed. In this study, we focused the complex of RNA and cationic surfactant, and investigated the aggregation behaviors by several techniques. It was found that the aggregation was controlled by pH or surfactant concentration for the RNA-cationic surfactant system as well as the DNA system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・機能物質化学

キーワード：膜、組織体、界面活性剤、RNA

1. 研究開始当初の背景

生物は驚くほどに組織化・機能化された構造を、自由エネルギー的自己組織化によって達成している。その自己組織化に関与する生体分子は、脂質・ペプチド・核酸等であるが、これらを利用する事によって、人為的に微細な構造と機能を有するナノ構造を生み出す事が取り組まれている。との相互作用の検討の歴史は新しいもので

はなく、特に核酸の場合、直鎖状ポリマーと界面活性剤との相互作用の観点から検討されていることから、その研究に関わる分野も多岐に渡っている。しかしながらこの場合の核酸とはまず DNA を指しており、RNA を用いた研究例は DNA と比較すると皆無に等しい。しかしながら RNA 干渉に代表されるように、RNA 研究は非常に重要かつホットな対象である。また RNA は遺伝情報の伝達という役割にとどまらず、アプタ

マーと呼ばれる構造と目的を持ったタンパク質へのリガンドとしても機能している事が考えられている。このような魅力をもった研究対象にも関わらず、界面化学や材料化学といった分野における報告例の少なさの原因は、とにかくにも RNA が壊れやすく非常に取り扱いが困難な物質だという唯一の点にあり、そのためこの分野における研究者に敬遠され続けてきたのが現状であった。

2. 研究の目的

背景の項でも述べたように、RNA を対象とした集合体形成の報告が非常に少ないため、そのような会合挙動や会合体自体に未知な点が数多く存在する。また核酸を、両親媒性物質が水中で自己組織化して形成する集合体内部に内包する方法で、キャリアとしての機能も検討されているが、本申請研究では核酸 (RNA) 自身を集合体の構成要素として利用する点にも特色がある。本研究では、この RNA を自己組織体の構成要素として利用することで、界面活性剤との相互作用による自己組織体 (Lipoplex) の形態制御を目的とした。またこれらの自己組織体は、RNA 分解酵素から RNA を保護する機能を持つことも期待される。そこで幾つかの系においては、RNA 分解酵素からの保護性能についても検討した。

3. 研究の方法

RNA サンプルとして、比較的塩基長さが短くそろい、かつ入手が容易なトランスファー RNA (tRNA : from brewer's yeast, Roche) を利用した。カチオン界面活性剤には、汎用の 4 級アンモニウム型カチオン界面活性剤 (臭化アルキルトリメチルアンモニウム : C10TAB, C12TAB, C14TAB, C16TAB)、連結鎖にジスルフィド結合を有し、還元剤により連結鎖を切断可能な Gemini 型界面活性剤 (C12SSC12)、pH に応答してカチオン-ノニオン状態へと変化するアミノキシド型界面活性剤 (LAO) を利用した。C12SSC12 は研究室にて合成したものを、LAO に関しては川研ファインケミカル (株) より提供されたものを用いた。各界面活性剤の分子構造の例を Fig. 1 にまとめている。

測定手法として、吸光度、プローブ色素を蛍光スペクトル、CD スペクトルの各分光手法と、恒温滴定型熱量計を用いた熱分析を主に利用した。会合体の形態観察には、蛍光顕微鏡、原子間力顕微鏡を利用し、一部には電子顕微鏡による観察も試みた。複合体表面の荷電状態については、ゼータ電位測定から検討した。

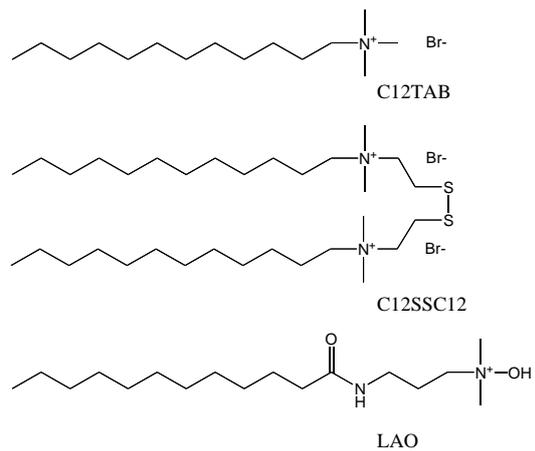


Fig.1 使用した界面活性剤の一例

4. 研究成果

RNA が存在している水溶液にカチオン開演活性剤を添加していくと、ある界面活性剤濃度において自己組織化し集合体を形成する。この集合体は比較的大きな会合体へと成長するため、遠心分離操作により系外に除去される。核酸は塩基の吸収のため、260nm に大きな吸収帯を有している。そこで遠心分離操作後の上澄みの吸光度 (A) を測定し、界面活性剤が存在しない場合の同濃度の RNA 水溶液に置ける吸光度 (A_0) との比 (A/A_0) を求め、界面活性剤濃度に対してプロットした。このプロットの変化点より、臨界会合濃度 cac を見積もることができる。結果の一例として、CnTAB 系でのグラフを Fig. 2 に示した。図から明らかなように、どの系でも低濃度領域ではほぼ吸光度比は 1 であったが、ある濃度に達すると急激に減少し、ゼロ付近まで低下し

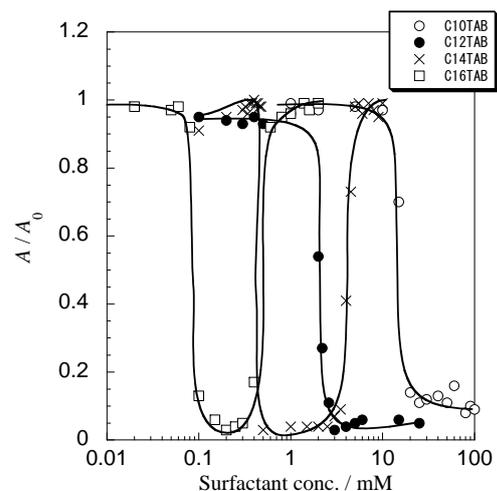


Fig.2 CnTAB-tRNA 系における吸光度比の界面活性剤濃度変化。[tRNA] = 40 μ M

ていることがわかった。この急激な吸光度比の低下濃度を cac と定めて、以降の検討に使用した。なおこの cac 前後のサンプルをゲル電気泳動にて RNA のバンドパターンを確認したところ、 cac の濃度以降では RNA バンドが消失することが確認できた。また cac 付近で RNA の表面電位がほぼゼロとなったことから、RNA とカチオン界面活性剤が静電的に相互作用を行い、結果として複合体を形成したものと解釈できる。またこの cac は臨界ミセル濃度 (cmc) と同様に、アルキル鎖長の増加とともに減少することから、RNA と界面活性剤との複合体形成は、静電相互作用に加え疎水性相互作用も大きな寄与をしていること判断できる。一方、アルキル鎖長の大きな C14TAB, C16TAB 系では、 cac で一度減少した吸光度が、更に界面活性剤濃度を上昇させると再び増加する挙動が観測された。この急激に吸光度が上昇する濃度を $cac2$ と定義した。この濃度以降では、RNA の電気泳動パターンが回復したこと、ならびにゼータ電位測定の結果、界面活性剤が存在しない場合には負に帯電している RNA の表面電位が正に転じたことなどから、過剰なカチオン界面活性剤が複合体上に吸着し、複合体の再分散現象が起こったものと推察できる。この場合 cac で RNA 上に吸着した界面活性剤の第一層の上に、アルキル基間の分子間力によって更に第二層目の界面活性剤が吸着しているが、鎖長の短い界面活性剤では $cac2$ が観測されなかったことから、第二層が吸着するにはある程度の大きさのアルキル鎖長が必要であることが示唆される。なお顕微鏡観察により、 cac および $cac2$ 前後での複合体の形状やサイズの検討を行ったところ、 cac を超える濃度領域では $1\mu\text{m}$ を越える巨大な複合体が観察されたが、 $cac2$ を越える濃度では、そのサイズが減少する様子が観測できた。しかしながら形状については明確な議論ができるような結果を得ることはできなかった。

次にこの界面活性剤による RNA 複合体形成と、再分散現象を利用して、RNA の放出制御を試みた。この目的のために、ジスルフィド連結鎖を有する Gemini 型界面活性剤 (C12SSC12) を利用した。C12SSC12 は Gemini 型では非常に小さな cmc を有するが、還元剤で連結鎖をチオール型に開裂させた一鎖型界面活性剤 (C12SH) は、二桁ほど cmc が上昇することが分かっている。この性質を利用すると、Gemini 型で複合体を形成させ、目的の組織に輸送し、還元剤にて開裂させることで、RNA を遊離・放出させることが可能となるため、遺伝子輸送への応用も期待される。そこで、まずは Gemini 型の C12SSC12 と一鎖型の C12SH を単独で用いた場合の、RNA の吸光度を測定し、臨界会合濃度の決定を行った。その結果を Fig. 3 に示した。なお一鎖型の C12SH

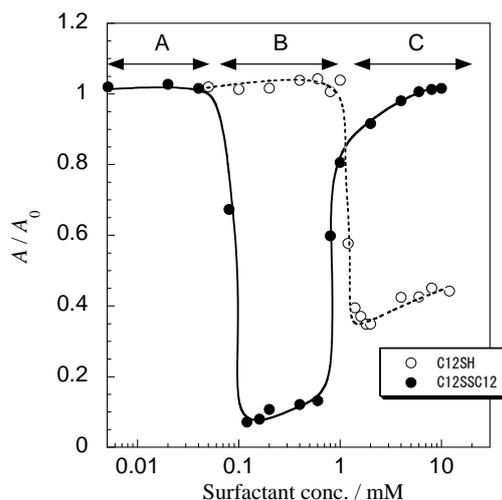


Fig.3 C12SSC12-tRNA 系における吸光度比の界面活性剤濃度変化。[tRNA] = 50 μM

系は、大気中の酸素によって容易に酸化され、Gemini 型の C12SSC12 に再結合するため、5倍量の還元剤、ジチオスレイトール (DTT) を共存させている。結果を見ると、C12SSC12 系では cac が 0.1mM 付近に存在し、かつ RNA 複合体の再分散濃度である $cac2$ が存在することがわかる。一方で、一鎖型の C12SH 系では cac のみが存在し、その値は C12SSC12 の cac よりも二桁ほど大きく、かつ $cac2$ とほぼ同等であった。この結果より、グラフに示したような3つの領域を区分することができる。A 領域ではどちらの系も cac に達しておらず、B 領域では C12SSC12 のみが cac を越えている。また C 領域では、C12SH の cac を越え、更に C12SSC12 の $cac2$ をも越えている。つまり B 領域の C12SSC12 サンプルに還元剤を添加すると、界面活性剤の開裂により、RNA を放出することが可能となる。逆に C 領域にて同じく C12SSC12 サンプルに還元剤を添加する場合は、逆に遊離していた RNA を複合体へと集積させることが可能となる。そこで、B, C 領域にて、DTT の添加の前後での RNA の電気泳動パターンを観察したところ、予想通り、B 領域では複合体からの RNA の放出を、C 領域では、再分散していた RNA を再度複合体として系外に濃縮できることが確認できた。

次に pH に応答する界面活性剤、LAO を用いて、pH による RNA 複合体の形成制御について検討した。LAO の pK_a は約 4.5 であり、この pH よりも酸性側ではカチオン種が、塩基性側ではアニオン種が優勢となる。そこで 3.5 から 6.5 まで、1 刻みで pH を変化させながら、RNA との複合体形成挙動を検討した。なお pH の調整には酢酸-酢酸 Na 緩衝液を用いた。更に、この系においては、DNA との違いを明らかにするために、牛胸線由来 DNA を超音波処

理により短く切断した DNA についての会合挙動についても同時に検討した。

まずは臨界会合濃度について、吸光度測定や CD 測定により検討したところ、pH の増加に伴い cac は増加し、pH=6.5 では、複合体の形成は認められなかった。なお LAO の cmc は pH の増加によって、若干の低下が認められるため、この cac の増加は、単純に界面活性剤上のカチオン数の減少によってもたらされたものと考えられる。更に DNA と RNA との cac の違いについて比較したが、殆どその違いは認められなかった。更に DNA については、塩基長さによる違いについても検討してみたが、明確な違いは認められなかった。このことから、界面活性剤と核酸との複合体形成自体は、核酸のサイズや二次構造にあまり影響を受けず、単純に核酸上の電荷密度のみによって決定されることが結論づけられる。

そこで、界面活性剤の核酸への吸着やその会合定数を求めるために、ITC による熱測定を行った。実験は、一定量の核酸水溶液中に、微小一定量の界面活性剤の濃厚溶液を、滴定する際に発生する熱量を求める方法にて行った。臨界会合濃度については RNA, DNA 間の違いは認められなかったが、ITC 測定からは明確な違いが観測できた。特に pH=4.5 では、RNA 系では発熱であった滴定熱が、DNA 系では吸熱的であり、熱の符号自体に際が認められた。獲られた結果を解析して求めた、界面活性剤の吸着熱 Dh と核酸への結合定数 K を Table1 にまとめた。

Table1. ITC 測定から獲られた熱力学パラメータ

	pH	$\Delta h / \text{kJ mol}^{-1}$	K / mM^{-1}
RNA	3.5	-1.7	6.4
	4.5	-1.0	11
	5.5	2.3	15
DNA	3.5	-4.8	6.2
	4.5	2.3	5.0
	5.5	2.4	7.4

表から明らかなように、pH=4.5 では、RNA 系では発熱的であった吸着熱が、DNA 系では吸熱的であることが確認できる。更に結合定数も、DNA 系よりも RNA 系のほうが大きいことが分かった。この結果は、RNA, DNA における分子内水素結合の違いから考察することができる。二重らせん構造を有する DNA は RNA よりも、分子内水素結合能が高いことが予想できる。よって、負の結合熱は、その分子内水素結合の切断のためのエネルギーとして消費されるのではないかと考えられる。一方比較的分子内水素結合が緩いと思われる RNA 系では、RNA と LAO 間の静電相互作用による強い相互作用の寄与が、分子内水素結合の切断の寄与を上回っているものと考えられる。また結合定数の大きさも核酸の二次構造の

剛直さと比例しているものと思われる。なお pH4.5 以上では、系中には核酸と相互作用できるカチオン種よりも、ノニオン種の割合の方が大きくなっている。この状況において、結合定数が大きくなることから、cac を越えると、LAO 間の相互作用によって会合体が成長しているのではないかと考えられる。一方で pH=3.5 の DNA 系や pH=5.5 の RNA 系では結合熱の符号の反転が観測されたが、これらの現象は、核酸における分子内水素結合の影響と、核酸と LAO 間の相互作用のバランスによって説明できる。

最後に、複合体形成による、RNA の分解酵素 (RNase) からの保護能の検討を試みた。tRNA は部屋ピン構造の部位において水素結合対を形成するが、この部位にインターカレートとされる臭化エチジウムは、tRNA と結合することで蛍光強度が増大する。しかしながら tRNA が分解されてしまうと臭化エチジウムは水中に放出される結果、その蛍光が大きく証拠売れる。よって、RNase 添加時からの臭化エチジウムの蛍光強度の継時変化を追う事で、複合体による RNA の保護能力について検討を行った。その結果の一例として、C14TAB 系における結果を Fig. 4 に示した。グラフは任意の時刻における臭化エチジウムの蛍光強度 I と、界面活性剤が存在しない場合の蛍光強度 I_0 の比でプロットしている。界面活性剤濃度は cac の 2 倍の濃度である 0.5mM と cac2 の 2 倍の濃度に相当する 5mM を選択した。結果から明らかなように、界面活性剤と複合体を形成することで、蛍光強度の減衰を著しく抑制できることが分かった。特に再分散が生じる cac2 以降の濃度では、殆どその蛍光強度に変化は認められなかった。再分散が生じると複合体自体のサイズ自体は大きく減少するが、RNA 上の界面活性剤層

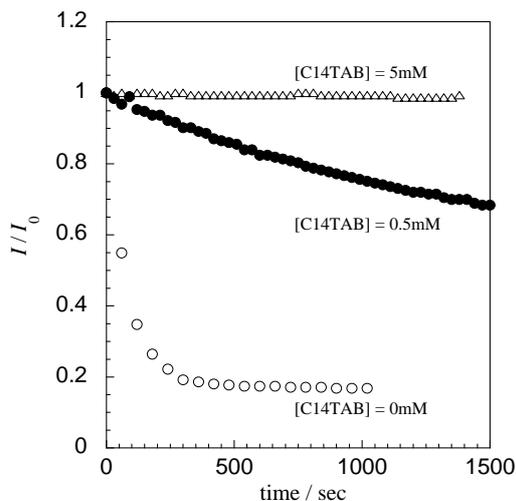


Fig.4 TTAB-tRNA 複合体における tRNA の保護能の検討

が強固になる結果、RNase からの分解からより有効に防ぐことができるようになったものと思われる。

以上の結果より、界面活性剤の種類や濃度、pH の調節により、RNA との複合体形成をある程度制御できることが分かった。更にその複合体形成によって、RNA の保護についての可能性が開かれたことは特筆すべきである。しかしながら、当初の目的であった、複合体の形状の制御については、まだ達成できていない。今後は界面活性剤間の相互作用や、RNA の塩基対に対する選択性等を有効に利用し、それらの目標の達成を目指す。

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 1 件)

- ① OHTA A, et. al (他 4 名 1 番目) Effect of Functional Groups on Incorporation Behavior of Amino Acid-Type Surfactant into Phospholipid Vesicle Membrane Journal of Oleo Science 58(2009), 607-615, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 竹本廉、太田明雄、浅川毅 カルニチン型両性界面活性剤の DNA との複合体形成 日本化学会近畿支部平成 22 年度北陸地区講演会と研究発表会 2010 年 11 月 19 日 富山大学 (富山)
- ② 嶋直人、太田明雄、浅川毅 Adsorption and Aggregation Behaviors of Nucleic Acids with pH-Sensitive Surfactant NCSS 2010 2010 年 9 月 21 日 幕張メッセ (千葉)
- ③ 嶋直人、太田明雄、浅川毅 核酸への界面活性剤の吸着と複合体形成 第 48 回日本油化学会年会 2009 年 9 月 10 日 名古屋工業大学 (愛知)
- ④ 太田明雄 リン脂質ベシクルへのアミノ酸型界面活性剤の作用 第 6 2 回コロイドおよび界面化学討論会 2009 年 9 月 18 日 岡山理科大学 (岡山)
- ⑤ 龍見岳典、桶川のどか、太田明雄、浅川毅、牧輝弥 ジェミニ型界面活性剤を用いた tRNA との会合制御 第 6 1 回コロイドおよび界面化学討論会 2008 年 9 月 9 日 九州大学 (福岡)
- ⑥ 龍見岳典、太田明雄、浅川毅、牧輝弥 四級アンモニウム塩型カチオン界面活性剤を用いた tRNA との複合体形成における添加塩効果 第 6 1 回コロイドおよび界面化学討論会 2008 年 9 月 7 日 九州大学 (福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 明雄 (OHTA AKIO)
金沢大学・物質化学系・准教授
研究者番号：10324104

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし