

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21750075

研究課題名(和文) イオン液体とポリイオンとの特異的相互作用を利用した二重鎖DNAの液液抽出系の創製

研究課題名(英文) Discovery of novel liquid-liquid extraction system for double-stranded DNA utilizing specific interaction between ionic liquid and polyion.

研究代表者

西直哉 (NISHI NAOYA)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：10372567

研究成果の概要(和文)：イオン液体-水二相系における電気化学的概念の導入およびイオン液体構成カチオンの設計により、二重鎖DNAの新規液液抽出系が構築可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have illustrated that it is possible to create a novel liquid-liquid extraction system for double stranded DNA by applying the electrochemical concept to the ionic liquid-water two phase system and design the molecular structure of the ionic liquid-constituting cation that specifically interacts with the double stranded DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：電気分析化学、界面分光分析化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：イオン液体、液液抽出、界面イオン移動、促進イオン移動、イオン対、液液界面、DNA、インターカレーション

## 1. 研究開始当初の背景

疎水性イオンから構成されるイオン液体は水と混じりあわず二相系を形成する。このイオン液体-水二相系を溶媒抽出に応用するための基礎研究が、ここ十年、盛んに行われてきている。イオン液体を用いる溶媒抽出では、これまで、金属カチオンや低分子量の有機分子がターゲットとなっており、DNAの抽出は最近まで報告されてこなかった。DNAは分子性有機溶媒へは溶解しないため、従来のDNA分離技術には、液液二相系による溶媒抽出は用いられず、タンパク質を変性させるフェノール変性や、DNAを沈殿させるエタノール沈澱等が用いられてきた。しか

し、DNAは帯電官能基を持つポリイオンであることから、分子性溶媒とは異なるイオン液体の特異性が強く発現される可能性がある。

最近、Wang (Northeastern University) らによりDNAのイオン液体への抽出が報告された。彼らは二重鎖DNAをイオン液体に抽出し、水中のタンパク質や金属カチオンからDNAを分離している。しかし、水相への逆抽出を試みた結果、最良の条件で30%しか逆抽出できていない。これは、彼らが、DNAを含むイオンの液液分配には相間電位差が非常に大きな影響を及ぼすことを看過しているためと考えられる。

## 2. 研究の目的

疎水性のイオン液体 (IL) と水 (W) の二相系を用いる液液抽出に関する研究が、金属イオンを主なターゲットとして行われている。DNA も IL に抽出可能であることが報告されているが、逆抽出効率は最大 30%にとどまっており、またその抽出機構は明らかになっていない。筆者らが行っている IL-W 二相系におけるイオン移動ボルタモグラムおよび相間電位差を考慮した液液抽出により、効率の向上および抽出機構の解明ができるのではないかと考えた。

筆者らはこれまでに、IL の構成カチオンにイソキノリニウム系カチオンを用いると、水中親水性アニオンや親水性ポリアニオンである DNA の IL への移動が熱力学的に促進されることを見出している。これは IL を構成するイソキノリニウム系カチオンが IL 中で親水性アニオンや DNA を安定化しているためと考えられる。本研究では、他のカチオンを構成イオンとする IL を用いて、水中 DNA の IL への促進イオン移動ボルタモグラムを記録し、IL 構成カチオンの構造が IL 中における DNA の安定化に及ぼす影響を検討した。

## 3. 研究の方法

マイクロペットの先端 (内径 15-30  $\mu\text{m}$ ) に形成させた微小 IL|W 界面を横切るイオン移動ボルタンメトリーを二電極式セルにより行った。セルの構成は以下のとおりである。 $\text{Ag}/\text{AgCl}|20\text{ mM LiCl}, 2\text{ mM H}[\text{C}_4\text{C}_4\text{N}^-]$  (Wref)|(IL)|  $x\text{ g L}^{-1}$  DNA, 20 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl (W, pH 8)| $\text{Ag}/\text{AgCl}$   
ここで、 $\text{C}_4\text{C}_4\text{N}^-$  は bis(nonafluorobutanesulfonyl)amide を、Wref は参照電極側の水相を表わす。DNA にはニシン精子由来のものを用いた。

## 4. 研究成果

2009 年度の成果は以下のとおりである。

サケ精子やウシ胸腺の高分子量二本鎖 DNA がイオン液体|水界面を横切る移動をイオン移動サイクリックボルタンメトリー (CV) により確認した。イオン液体の構成カチオンとして親水性アニオンと相互作用することが分かっている octadecylisoquinolinium を用い、親水性の多価アニオンである二本鎖 DNA との特異的な相互作用を期待した。イオン移動 CV には二本鎖 DNA 由来のイオン液体|水界面を横切るイオン移動電流が確認された。また、界面イオン移動に先だって、二本鎖 DNA がイオン液体|水界面に吸着することによる電流も見られた。イオン液体構成カチオンに、バルキールで親水性アニオンと相互作用しない trihexyltetradecylphosphonium を用いた場合に

はこれらの電流は観測されず、二本鎖 DNA は水から IL に移動しなかった。

上記の電気化学測定結果を踏まえて、octadecylisoquinolinium 系のイオン液体を用いて二本鎖 DNA の液液抽出実験を行った。イオン液体構成イオンの液液分配により界面電位差を制御することで、水中の二本鎖 DNA をイオン液体に定量的に抽出できること、さらに、イオン液体に抽出された二本鎖 DNA を水相に定量的に逆抽出できることを見出した。イオン液体-水二相系における電気化学的概念の導入およびイオン液体構成カチオンの設計により、二本鎖 DNA の新規液液抽出系が構築可能であることが明らかとなった。

2010 年度は、以下の研究を行った。

- (1). トリオクチルメチルアンモニウムイオン ( $\text{TOMA}^+$ ) による dsDNA の促進イオン移動サイクリックボルタンメトリー (CV)
- (2). エチジウムイオン ( $\text{Et}^+$ ) による dsDNA の促進イオン移動 CV
- (3). 蛍光測定による二本鎖 DNA (dsDNA) とイオン液体構成カチオンの相互作用の評価

(1)では、前年度に dsDNA の促進イオン移動を起こすことを見出した octadecylisoquinolinium( $\text{C18Iq}^+$ ) の特異性の、無を明らかにすべく、アニオンとイオン対を形成しやすく相間移動触媒として用いられる  $\text{TOMA}^+$  を構成イオンとするイオン液体 (IL) を用いて、前年度と同様に、IL|水 (W) 界面を横切るイオン移動 CV を記録した。W 相中に dsDNA が存在しても CV に変化がないことから、 $\text{TOMA}^+$  と dsDNA の相互作用は  $\text{C18Iq}^+$  と dsDNA のそれよりも弱いことが示唆された。

(2)では、インターカレーターであり dsDNA と強く相互作用する  $\text{Et}^+$  を構成イオンとする IL の調製を試みた。常温で固体の Et 塩が得られたため、他の IL に Et 塩を溶解して IL|W 界面におけるイオン移動 CV を記録した。促進イオン移動電流が観測されたが、Et の疎水性が大きくないため、IL 中の  $\text{Et}^+$  の W への移動が dsDNA に促進されている可能性が示唆された。

(3)の蛍光測定では、 $\text{C18Iq}^+$  の疎水性が大きく水にほとんど溶解しないため、疎水性が小さく、 $\text{C18Iq}^+$  と同じ芳香環部位を持つ butylisoquinolinium( $\text{C4Iq}^+$ ) を用いた。 $\text{C4Iq}^+$  からの蛍光強度の dsDNA 濃度依存性より、 $\text{C4Iq}^+$  ひとつあたり相互作用する平均 dsDNA 塩基数およびその平衡定数を見積もった。isoquinolinium の dsDNA との相互作用は  $\text{Et}^+$  より弱く、 $\text{TOMA}^+$  より強いことが明らかとなった。

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 6 件)

- ① N. Nishi, A. Suzuki, and T. Kakiuchi, "Hydrophobic Ionic Liquids Composed of Perfluoroalkyltrifluoroborates for Ionic Liquid-Water Two-Phase Systems," *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 82 (2009) 86-92.
- ② Y. Yasui, Y. Kitazumi, R. Ishimatsu, N. Nishi and T. Kakiuchi, "Ultraslow Response of Interfacial Tension to the Change in the Phase-Boundary Potential at the Interface between Water and a Room-Temperature Ionic Liquid, Trioctylmethylammonium bis(nonafluorobutanesulfonyl)amide," *J. Phys. Chem. B*, 113 (2009) 3273-3276.
- ③ G. Revillod, N. Nishi, and T. Kakiuchi, "Orientation Correlation of Sulfosuccinate-based Room Temperature Ionic Liquids Studied by Polarization Resolved Hyper Rayleigh Scattering," *J. Phys. Chem. B*, 113 (2009) 15322-15326.
- ④ Naoya Nishi, Yukinori Yasui, Tomoya Uruga, Hajime Tanida, Tasuku Yamada, Shun-ichi Nakayama, Hideki Matsuoka, and Takashi Kakiuchi, "Ionic multilayers at the free surface of an ionic liquid, trioctylmethylammonium bis(nonafluorobutanesulfonyl)amide, probed by X-ray reflectivity measurements," *J. Chem. Phys.*, 132 (2010) 164705(1-6).
- ⑤ Yuko Hirohata, Naoya Nishi and Takashi Kakiuchi, "Determination of the Activity of 1-Methyl-3-octylimidazolium Bis(trifluoromethanesulfonyl)amide in Binary Ionic Liquids from the Solubility in Water," *J. Chem. Eng. Data*, 55 (2010) 1980-1985.
- ⑥ Yukinori Yasui, Yuki Kitazumi, Naoya Nishi, and Takashi Kakiuchi, "Electrocapillarity under Ultraslow Relaxation of the Ionic Liquid Double Layer at the Interface between Trioctylmethylammonium Bis(nonafluorobutanesulfonyl)amide and Water," *J. Phys. Chem. B*, 114 (2010) 11141-11148.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 松山 嘉夫・西直哉・垣内 隆, "イオン移動ボルタンメトリーを用いて調べるイオン液体中の金属イオンと dibenzo-18-crown-6 との錯生成定数の温度依存性," 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月, 近畿大学本部キャンパ

ス.

- ② N. Nishi, "Double layer structure in ionic liquids studied by electrochemistry and spectroscopy," 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月, 近畿大学本部キャンパス.
- ③ 西直哉, 安井幸則, 宇留賀朋哉, 谷田 肇, 松岡秀樹, 垣内 隆, "X 線反射率測定による疎水性イオン液体 Trioctylmethylammonium bis(nonafluorobutanesulfonyl)amide 表面の層構造解析," 電気化学会第 77 回大会, 2010 年 3 月, 富山大学五福キャンパス.
- ④ 西直哉・白波瀬 文吾・北隅 優希・垣内 隆, "水中 DNA の疎水性イオン液体への促進イオン移動: 液液界面イオン移動ボルタンメトリーによる検討," 日本分析化学会第 59 年会, 2010 年 9 月, 東北大学川内北キャンパス.
- ⑤ N. Nishi, T. Uruga, H. Tanida, and T. Kakiuchi, "Temperature dependence of the ionic-multilayer structure formed at the free surface of ionic liquids studied by x-ray reflectivity measurements," NCSS2010, 2010-9, 千葉幕張メッセ.
- ⑥ 西直哉, "イオン液体界面の特異的構造の分光学的研究," 第 56 回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会, 2010 年 11 月, 秋田大学.
- ⑦ N. Nishi and T. Kakiuchi, "Ionic multilayers at the interface of ionic liquids probed by X-ray reflectivity measurements," The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Dec. 2010, Honolulu, USA.
- ⑧ N. Nishi, T. Motokawa, Y. Kitazumi, and T. Kakiuchi, "Ultraslow relaxation of the electrical double layer at the ionic liquid|metal interface probed by surface plasmon resonance" The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Dec. 2010, Honolulu, USA.
- ⑨ 西直哉, 内田 健太郎, 白波瀬 文吾, 北隅 優希, 垣内 隆, "DNA と相互作用するイソキノリニウム系カチオンを構成イオンとするイオン液体への水中 DNA の電気化学的移動および抽出," 電気化学会第 78 回大会, 2011 年 3 月, 横浜国立大学.
- ⑩ 西直哉, "イオン液体界面におけるイオン多層構造の X 線反射率測定による検出," 2011 年春季応用物理学関係連合講演会, 2011 年 3 月, 神奈川工科大学.
- ⑪ 西直哉・粕谷 浩二・宇留賀 朋哉・谷田 肇・垣内 隆, "イオン液体界面に形成されるイオン多層構造の X 線反射率測定による解析: イオン種依存性," 日

本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月, 神奈川大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 直哉 (NISHI NAOYA)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 10372567