

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19360354
 研究課題名（和文） 抽出操作における分子集合素子という新しい概念の創出
 研究課題名（英文） Novel concept for creating molecular assembly-assisted extraction
 研究代表者
 後藤 雅宏（GOTO MASAHIRO）
 九州大学・工学研究院・教授
 研究者番号：10211921

研究成果の概要：我々は、これまで金属イオンをはじめアミノ酸や核酸さらにはタンパク質などの抽出分離に関する研究を展開してきた。その結果、単一の分子では抽出能力がない分子（主に界面活性分子）を、特定の配列で組織化させることによって、新たな抽出能力が発現することを見いだした。本研究では、これまで抽出という単位操作において使用されてきた単一の抽出試薬とは異なり、認識ターゲットに対して高い抽出能および選択性を有するような分子集合試薬（複数の分子が集合してはじめて抽出能力を発揮するような分離素子）を開発した。その有用性を DNA の選択的抽出をモデルとして検証した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：逆ミセル 分子集合体 タンパク質抽出 DNA 溶媒抽出

1. 研究開始当初の背景

逆ミセルとは界面活性剤と水をヘキサンなどの有機溶媒中に添加した際に形成される nm スケールの分子集合体である。この逆ミセルは内側にナノスケールの水相を保持しており、タンパク質などの生理活性物質を

溶かし込むことが可能である。有機/水二相接触による物質の逆ミセル抽出は以前から様々な研究がなされてきた。その例として、タンパク質の逆ミセル抽出が挙げられる。一方 DNA や RNA などの核酸は、温度や共存物に

より変性が起きても変性因子の除去により容易に元に戻すことができる。逆に、核酸関連酵素により核酸は容易にかつ不可逆的に分解されてしまうので、核酸ハンドリングプロセスには、酵素あるいは微量に混入しうる菌類にとって過酷な条件下で行われることが望ましい。つまり逆ミセルという非水媒体は、核酸ハンドリングプロセスにとって非常に有利に働くと考えられる。これまで逆ミセルによるDNAの抽出報告例はあるが、カチオン性界面活性剤による塩基配列非特異的な抽出であり、塩基配列特異的抽出・分離に成功した例はなかった。

2. 研究の目的

本研究では逆ミセルによるDNAおよびRNAの塩基配列選択的分離システムの構築を目的とした。逆ミセル抽出は一種の溶媒抽出であるため、容易にスケールアップ可能である。つまり、逆ミセルによるDNAの塩基配列選択的抽出法が確立できれば、特定配列を有する機能性核酸の大量精製が可能になる。しかも有機溶媒という過酷な環境であるため、生物学的コンタミネーションを大幅に抑制可能と期待できる。本研究では、逆ミセル抽出の抽出駆動力にDNA界面活性剤の界面配向性を、また塩基配列選択性付与のためにDNAのハイブリダイゼーションを利用した(図1)。このDNA界面活性剤を逆ミセル系に導入すれば、DNA界面活性剤と相補的な塩基配列を有する標的DNAのみを選択的に有機相へ抽出できる。

このDNAを用いた抽出では、DNAの相補鎖認識能による高い選択性に加え、溶液の温度制御により容易に逆抽出が行えるといった利便性が期待できる。また相補鎖のみを抽出できるという利点から分析システム、たとえば一塩基多型(SNP)解析糖への応用も期待できる。

3. 研究の方法

(1) DNA 界面活性剤の調製

1 mM の N-hydroxylsuccinimide(NHS) 化オレイン酸 50 μ L に 1 mM の 5' 末端アミノ化 DNA を 5 μ L、100 mM のリン酸 buffer (pH 8.0) を 5 μ L 加え 40 $^{\circ}$ C 恒温槽で一晩反応させた。これを HPLC によって精製した。

(2) DNA 界面活性剤を用いた標的 DNA の逆ミセル抽出

MgCl₂ (10 mM) を含む Tris-EDTA Buffer (10 mM、pH8.0) に FITC 蛍光ラベル化した標的 DNA (22 mer、25 nM) および標的 DNA に相補的な DNA 界面活性剤 (20 mer、25 nM) を加えて水相とした。Dilauroyl phosphatidylcholine (DLPC、10 mM) および 1-hexanol (3 vol%) を含むイソオクタン (2,2,4-Trimethylpentane) と先ほど調製した水相を等量接触させ、3 時間水相を静かに攪拌した。DLPC は 1-hexanol を補界面活性剤として加えることにより安定な逆ミセルを形成することが知られている。攪拌後、有機相の蛍光強度を測定し抽出率を求めた。

4. 研究成果

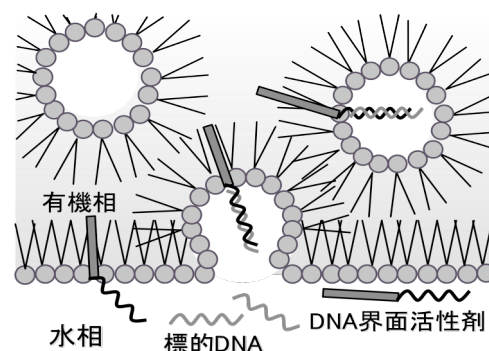


図 1. 配列選択的抽出の原理

図 1 に本研究における分子集合体逆ミセルを用いたDNA抽出の原理を示す。実際、DNAの抽出実験の結果、抽出操作後の有機相において蛍光強度が著しく増大していることが確認

された。このことから、標的DNAがDNA界面活性剤により水相から有機相へ抽出されたことが明らかとなった。また、この蛍光強度から標的DNAの抽出率はおよそ50%であることがわかった。さらに、DNA界面活性剤濃度を標的DNAに対して過剰量加えてみたが、抽出率は60%程度に留まった。標的DNAに対してDNA界面活性剤を8等量まで加えているため標的DNAはほぼ全てDNA界面活性剤と結合していると考えられる。標的DNAが60%程度しか抽出されない理由として、オレイル基だけでは抽出に必要な疎水性が足りない、または逆ミセルサイズが小さいために立体障害をある程度受けていることなどが考えられる。

また、標的DNAの塩基長を伸ばしてゆくと抽出率が低下してしまうことが明らかとなった。これは、標的DNAが長くなりDNA界面活性剤-標的DNA複合体のサイズが増大したことによる立体障害、あるいは親水部であるDNA部分が大きくなったことによる疎水性の低下などにより逆ミセルへ取り込まれにくくなったことが理由として考えられる。さらに、同様の実験条件で配列の異なる3種類の標的DNAの混合溶液から目的配列のみを抽出する実験を行い、本抽出系が配列選択性を有するかどうかを確認した。3種類の標的DNAにはそれぞれ異なる蛍光基が修飾されている。3種類の標的DNAのうちDNA界面活性剤に相補的な標的DNAのみ高い抽出率が得られた(図2)。この結果により、本抽出系における配列選択性が確認できた。

・DNAの回収の可能性

有機相へ抽出された標的DNAを水相へ回収するために、正抽出操作後の有機相を1mlとり、新たな水相(Tris-EDTA buffer 100 mM、pH 8.0)1 mlと接触させ、有機相に50 vol%の2-butanolを添加し、激しく攪拌した。遠心分離した後、水相を採取し、蛍光強度から

逆抽出率を求めた。その結果、抽出後の水相において蛍光の増大が見られた。蛍光強度から求めた逆抽出率はおよそ86%であった。逆抽出操作後、有機相の動的光散乱(DLS)測定を行ったところ、逆ミセル(10 nm前後)が観察できなかったことから逆ミセルは2-butanolの添加により完全に破壊されていると考えられる。したがって、逆抽出の駆動力は逆ミセル破壊によるものであると考えられる。

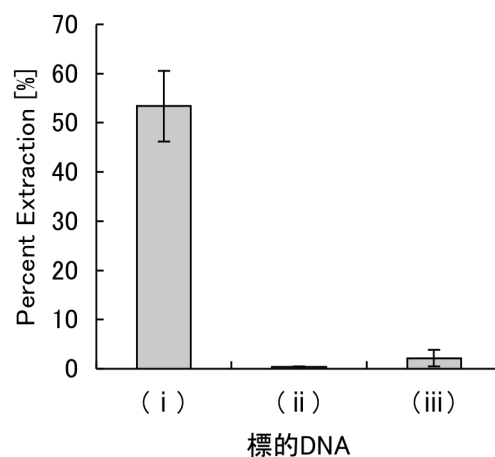


図2. 抽出の配列選択性

まとめ

本研究では、リン脂質逆ミセルおよびDNA界面活性剤を用い、DNAのハイブリダイゼーションを駆動力とすることで標的DNAを塩基配列選択的に有機溶媒中へ抽出することに初めて成功した。また、正抽出したDNAを容易に水溶液中へ逆抽出可能であることも判明した。

さらに、本系において、DNA界面活性剤にヘアピン型DNAを用いることで、一塩基の違いまで識別可能なほどに配列選択性の向上に成功した。このことから、本系は遺伝子変異検出などの分析システムへの応用も可能であると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. J. Tominaga, Y. Kemori, Y. Tanaka, T. Maruyama, N. Kamiya and M. Goto, "An enzymatic method for site-specific labeling of recombinant proteins with oligonucleotides. Chem. Commun., 401-403 (2007) (査読有)
2. T. Maruyama, K. Nakashima, F. Kubota, M. Goto, "Perfluorocarbon-based liquid-liquid extraction for separation of transition metal ions., Anal. Sci., 23, 763-765 (2007) (査読有)
3. K. Shimojo, T. Oshima, H. Naganawa, M. Goto, "Calixarene-Assisted Protein Refolding via Liquid-Liquid Extraction", Biomacromolecules, 8, 3061-3066 (2007) (査読有)
4. S. Egusa, T. Kitaoka, M. Goto, H. Wariishi, "Synthesis of Cellulose In Vitro by Using a Cellulase/Surfactant Complex in a Nonaqueous Medium c", Angew. Chem. Int. Edit., 46(12), 2063-2065 (2007) (査読有)
5. T. Maruyama, T. Hosogi, M. Goto, "Sequence-selective extraction of single-stranded DNA using DNA-functionalized reverse micelles. Chem. Commun. 4450-4454 (2007) (査読有)
6. T. Maruyama, T. Hosogi, M. Goto, "Sequence-selective extraction of single-stranded DNA using DNA-functionalized reverse micelles. Chem. Commun. 4450 (2007) (査読有)
7. H. Yoshiura, Y. Tahara, M. Hashida, N. Kamiya, A. Hirata, T. Fujii and M. Goto, "Design and in vivo evaluation of solid-in-oil suspension for oral delivery of human growth hormone", Biochemical Engineering Journal, 41, 106-110 (2008) (査読有)
8. H. Piao, N. Kamiya, A. Hirata, T. Fujii and M. Goto, "A Nobel Solid-in-oil Nanosuspension for Transdermal Delivery of Diclofenac Sodium", Pharmaceutical Research., 25, 896-901 (2008) (査読有)
9. T. Maruyama, H. Yamamura, M. Hiraki, Y. Kemori, H. Takata and M. Goto, "Directed aggregation and fusion of lipid vesicles induced by DNA-surfactants", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 66, 119-124 (2008) (査読有)

10. Y. Tahara, S. Honda, N. Kamiya, H. Piao, A. Hirata, E. Hayakawa, T. Fujii, M. Goto, "A solid-in-oil nanodispersion for transcutaneous protein delivery", J. Control. Release, 131, 14-18 (2008) (査読有)

11. M.M. Zaman, N. Kamiya, and M. Goto, "Biocatalysis in Water-in-Ionic Liquid Microemulsions: A Case Study with Horseradish Peroxidase", Langmuir, 25, 977-982 (2009) (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

1. M. Goto, "Sequence-Selective Extraction of DNA Using DNA Functionalized Reversed Micelles Engineering Conferences International, 2008 Jan. at Costarica (招待講演)

2. 嶋田如水、丸山達生、神谷典穂、後藤雅宏, "DNA-酵素複合体の活性制御を利用した分析システムの開発" 化学工学会第 74 回年会 2009 年 3 月 他 10 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 雅宏 (GOTO MASAHIRO)
九州大学・工学研究院・教授
研究者番号：10211921

(2) 研究分担者

神谷 典穂 (KAMIYA NORIHO)
九州大学・工学研究院・准教授
研究者番号：50302766

久保田 富生子 (FUKIKO KUBOTA)
九州大学・工学研究院・助教
研究者番号：60294899

H19 年度まで

丸山 達生 (MARUYAMA TATUO)
九州大学・工学研究院・助教
研究者番号：30346811

(3) 連携研究者

H20 年度より
丸山 達生 (MARUYAMA TATUO)
神戸大学・工学・准教授
研究者番号：30346811