

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20760515
 研究課題名 (和文) ナノ分子集合体を用いた液液抽出による機能性核酸の塩基配列特異的分離法の開発
 研究課題名 (英文) Sequence-specific separation of functional nucleic acids by liquid-liquid extraction using molecular nano-selfassembly
 研究代表者
 丸山 達生 (MARUYAMA TATSUO)
 神戸大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号：30346811

研究成果の概要 (和文)：本研究では、スケールアップの容易な液液抽出法の応用として、液液抽出法による機能性 DNA の塩基配列特異的分離精製技術の開発を行った。ここでは水溶性生体分子である DNA 類を有機溶媒に抽出するために、有機溶媒中に形成されるナノ分子集合体を、また抽出における塩基配列選択性を付与するために DNA 界面活性剤を用いた。この DNA 界面活性剤を逆ミセルに導入することで、DNA 界面活性剤と相補的な DNA のみを逆ミセルに取り込み、対象 DNA を有機相へ抽出することに成功した。

研究成果の概要 (英文)：We developed DNA-surfactant as an extractant for sequence-specific DNA extraction in a reverse-micellar system. The DNA-surfactant is a short DNA oligonucleotide conjugated with a hydrophobic oleoyl group. A DNA-surfactant is selectively hybridized to a complementary target DNA to form a double helix. The helix is transferred into a water-pool of a reverse micelle, resulting in the DNA extraction to an organic phase. As a result, we achieved sequence-selective DNA extraction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：化学工学

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：抽出、核酸、選択性、生産、非水系

1. 研究開始当初の背景

液液抽出法は古くから研究がなされ、有機合成物や生理活性物質の液液抽出、金属イオンの溶媒抽出は工業的にも重要な役割を占めている。液液抽出における分離選択性を向上させるべく、様々な分子認識化合物（抽出

剤）が提案されてきたが、正確な分離選択性を達成するのは未だに難しい。一方、ここ 20 年のバイオ産業の発展と共に、生体分子の大量生産・精製が求められるようになってきた。タンパク質に代表される生体分子の分離精製には、これまでクロマトグラフィーが用い

られてきたが、より大量処理可能な方法論の一つとして液液抽出が期待されている。1980年代半ばから、液液抽出による生体分子の分離精製が試みられ、タンパク質を有機溶媒中に抽出する手法が精力的に研究されている。この生体分子の分離では、混在する生体分子から、いかに目的の生体分子のみを生理活性を維持した状態のまま分離精製するかが重要となる。しかしながらタンパク質は液液界面（有機溶媒/水）により変性しやすく、一度変性したタンパク質を元に戻すのは難しい。またタンパク質の幅広い多様性に対応しうる、分子認識化合物の作成は困難であった。

一方 DNA や RNA に代表される核酸は生化学的には不安定だが、物理的・化学的には比較的安定である（液液界面で変性しない）。また一度変性しても、温度制御により元に戻すことができる。しかも近年、核酸に遺伝情報保存・翻訳媒体以外の機能が見つかり、医薬分野（RNA 創薬や核酸アプタマー創薬）やナノテク分野への応用が期待されている。特に、100 塩基以下の短い DNA や RNA に特定の分子特異的な結合能あるいは触媒能が次々と見つかっており、高価な抗体に変わりうる次世代材料として期待されている。今後これら短鎖 DNA や RNA の医薬・分析分野での実用化のためには、その正確かつ大量処理が可能な分離精製技術が必要となってくる。

2. 研究の目的

本研究では、スケールアップの容易な液液抽出法のアプリケーションとして核酸を標的とし、液液抽出法による機能性 DNA や RNA の塩基配列特異的分離精製技術の確立を目的とする。

本研究では核酸の選択的液液抽出を達成するため次の2つの工夫を取り入れる。まず、水溶性生体分子である DNA 類を有機溶媒に抽出するために、有機溶媒中に形成されるナノ分子集合体（逆ミセル、図1左）を用いる。また抽出における塩基配列選択性を付与するために DNA 界面活性剤（図1右）を用いる。この DNA 界面活性剤はごく最近申請者が開発したもので、液液界面やミセル表面に配向することが既に明らかになっている。この DNA 界面活性剤を、逆ミセルに導入することで、DNA 界面活性剤と相補的な DNA のみを逆ミセルに取り込み、結果的に対象 DNA を有機相へ抽出するという仕組みである（図2）。ここでは DNA 界面活性剤と抽出対象 DNA のハイブリダイゼーションを抽出の分子認識に利用しているので、DNA 界面活性剤の塩基配列に応じた抽出選択性が期待できる。

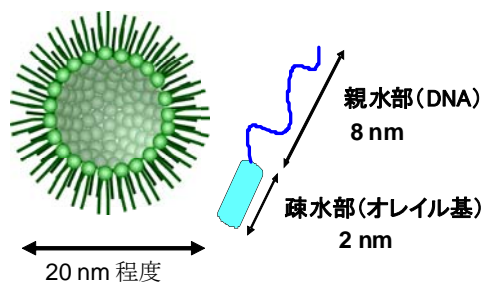


図1 逆ミセル（左）と DNA 界面活性剤（右）

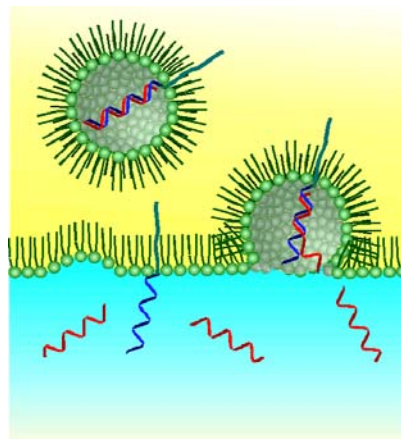


図2 DNA 界面活性剤と逆ミセルによる核酸の液液抽出

3. 研究の方法

N-hydroxysuccinimide エステル化した種々の脂肪酸に 5' 末端アミノ化 DNA (20-mer) を反応させ、その後 HPLC によって精製することで疎水性を有する DNA 界面活性剤を得た。

MgCl₂ (10 mM)、EDTA (1 mM) を含む Tris-HCl buffer (10 mM) に FITC ラベル化 DNA (22mer, 25 nM) および DNA 界面活性剤 (25 nM) を添加し、水相とした。そして、Dilauroyl phosphatidylcholine (DLPC 10 mM) および 補界面活性剤として 1-ヘキサノール (240 mM) をイソオクタンに添加し抽出用の有機相とした。両相を 1:1 で接触させ、25°C で 3 時間静かに攪拌し正抽出を行った。攪拌後、有機相の蛍光を測定し抽出率を算出した。

正抽出後、有機相を新たな水相と接触させブタノールを添加した後、激しく攪拌することでミセルを破壊した。その後、遠心分離を行い、二相に分離させることによって標的 DNA を水相へ移動させた。さらに、高温下で再び逆ミセル抽出作業を行うことにより DNA 界面活性剤を取り除き、一本鎖の標的 DNA のみを得た。

抽出操作前後の標的 DNA (トロンビンアプタマー) とセファロースに固定化したトロンビンを反応させ、トロンビン DNA アプタマーの結合活性の確認を行った。

4. 研究成果

(1) DNA 界面活性剤を用いた標的 DNA の逆ミセル抽出および配列選択性

有機相の蛍光強度を測定し抽出率を求めた。その結果、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(図 3)。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。

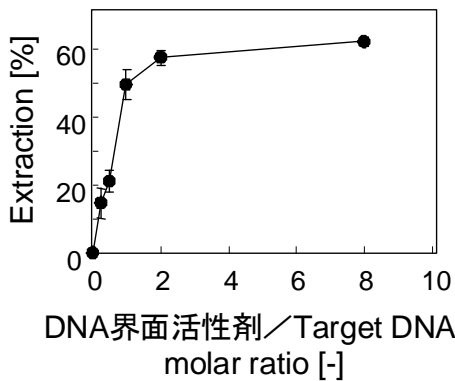


図 3 DNA 界面活性剤濃度の抽出率に及ぼす影響

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(図 4)。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

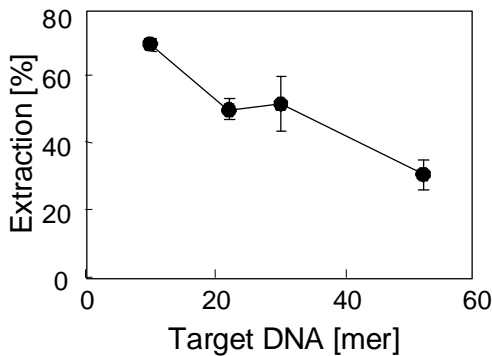


図 4 標的 DNA の塩基長が抽出率におよぼす影響

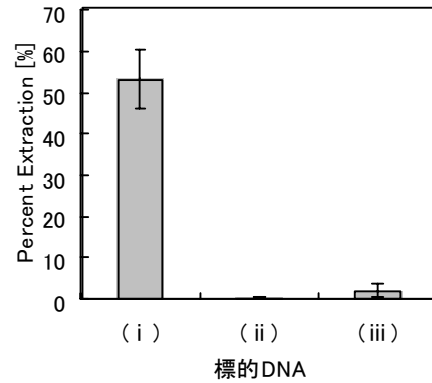


図 5 抽出の配列選択性
(標的 DNA の配列は下表)

DNA界面活性剤	オレイル基-5'-CCAATACCACATGATCCATA-3'
(i)	3'-GGTTATGGTGTAGTAGGTATAT-5'-FITC
標的DNA (ii)	3'-GGTATTGTATGCCATTAGAATT-5'-TAMRA
(iii)	3'-AGAGTACAACCTTAGACACATTT-5'-Cy5

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。実験に用いた配列を図 5 中の表に示す。図 5 に示すとおり、3 種類の標的 DNA のうち DNA 界面活性剤に相補的な標的 DNA (i) のみ高い抽出率が得られている。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。

また、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 1 ml 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。

(3) 抽出による一塩基変異検出の検討

本抽出法は DNA 配列選択的であり、検出系への応用が期待できる。そこで、一塩基多型 (SNP) の検出への応用が可能かどうかを検討した。SNP は遺伝子多型の中で最もバリエーションが多く、病気のかかり易さや薬の副作用

用に影響するとされ、テーラーメイド医療において極めて重要な存在である。一塩基変異検出の検討を行うために完全相補鎖、1塩基ミスマッチ配列を用意し抽出率に差が生じるか調査した。また、一塩基変異を識別するための工夫として、DNA 界面活性剤にはヘアピン型の DNA を用いた。ヘアピン型 DNA は自分自身の中に相補的な部分を有しており、通常ループ構造をとっている DNA 鎖である。このヘアピン型 DNA はモレキュラービーコンに代表されるように高い相補鎖認識能を有しており、これまで様々な SNP 検出手法に利用されてきた。実験に用いた DNA 配列を図 4 中の表に示した。また、実験は(1)で述べた溶液条件と同じ条件で行った。

図 4 に示す通り、一塩基変異が存在する場合、室温付近まで温度を下げないと標的 DNA はほとんど抽出されないことが明らかとなった。これは、標的 DNA-DNA 界面活性剤複合体の熱的安定性が著しく低下したためと考えられる。また、30℃～40℃の温度範囲で最も抽出率に差が生じ、40℃において完全相補鎖の抽出率は一塩基変異の 10 倍であった。このように顕著な差が見られたことから、本手法の遺伝子変異検出への応用が期待される。

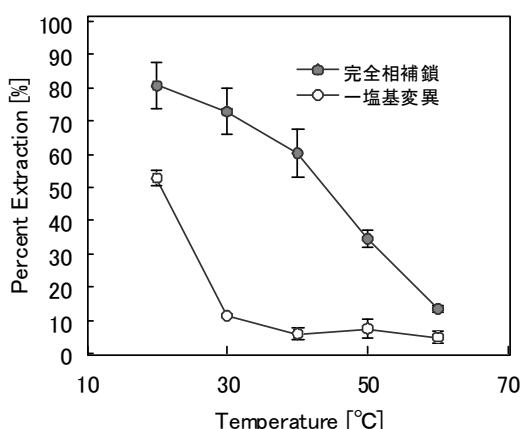


図 4 抽出を利用した一塩基変異検出における温度の影響

DNA界面活性剤	26 mer	(Oleyl)-5'-	GTGAGCATCATCCATATAGCT	CTCAC-3'
完全相補鎖	16 mer	FITC-5'-	AGCTATATGGATGATG-3'	
一塩基変異	16 mer	FITC-5'-	AGCTATAT	TGATGATG-3'

【結論】

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。詳細データは記載していないが、本システムを利用して機能性核酸（タンパク質

結合性核酸アプタマー）を抽出・逆抽出し、その機能が失われていないことも明らかになった。このことは、液液界面や温度により不可逆的な変性をしない核酸が逆ミセル抽出という分離場で効率的に分離精製可能であることを意味している。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

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

1. 丸山 達生ら、逆ミセルを用いた機能性核酸の効率的抽出プロセスの開発、化学工学会第 74 年会、2010 年 3 月 18 日 (鹿児島市)
2. Tatsuo Maruyama ら、Effect of DNA-surfactant on reverse micellar extraction of single-stranded DNA、Aseanian Membrane Society 5、2009 年 7 月 13 日 (神戸市)
3. 丸山 達生ら、逆ミセルを用いた一本鎖核酸抽出における DNA 界面活性剤の影響、化学工学会第 74 年会、2009 年 3 月 20 日 (横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 達生 (MARUYAMA TATSUO)

神戸大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30346811