

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月23日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360383

研究課題名（和文）抽出操作における生体分子の高度認識分離を可能とする分子集合系の構築

研究課題名（英文） Design of Molecular Assembly for Extraction of Biomolecules

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（和文）：

分子認識を利用して物質を分離する液液抽出技術は工業上も重要な分離手法である。抽出法は、数多くの研究が行われているのも拘らず、バイオ分子の分離に関しては現在でも達成されていない重要な課題の一つである。特に分離対象が生体高分子の場合は、表面構造が複雑なため高度分離は困難となる。本研究では、逆ミセルという分子集合体を利用するDNAの高度分離を目的とした。その結果、逆ミセルに相補的なDNA鎖を有する界面活性剤を組み込むことによって、DNAの配列を認識して高効率に分離が可能なシステムの構築に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Liquid/liquid extraction is one of the useful separation techniques involving a molecular recognition event. Despite a number of studies on liquid/liquid extraction, it is still a challenge to extract a target biomolecule selectively to another phase based on the precise recognition at a liquid/liquid interface. In particular, if the target is a biomacromolecule, the presence of multifunctional groups prevents selectivity and versatility in liquid/liquid extraction. We here propose the sequence-specific liquid/liquid extraction of DNA oligonucleotides using reverse micelles with a DNA-surfactant. A reverse micelle, which is a nanoscale water pool surrounded by surfactant molecules in an organic solvent, is one of the highly useful tools for extraction of biomolecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・化工物性・移動現象・単位操作

キーワード：逆ミセル、溶媒抽出、マイクロエマルジョン、分子集合体、タンパク質、DNA

1. 研究開始当初の背景

逆ミセルを利用したタンパク質の液液抽出技術は、選択的な抽出を実現することによって、大量のタンパク質分離プロセスとしての可能性を大きく広げることになる。抽出の主たる駆動力は界面活性剤とタンパク質表面の間に働く静電的相互作用であるため、タンパク質表面の電荷分布は抽出挙動に多大な影響を与える。このような抽出の基本原理を利用した分離は早くから行われていた。しかしながら、この手法では高効率な分離ができないなどの問題点を抱えており、より高い分離能力を有する逆ミセル系の構築が望まれていた。

特に、逆ミセルを用いた核酸抽出法は核酸にとって非常に都合の良い条件下における分離を可能とするが、選択性の面において問題が残っていた。核酸は4種類の塩基から成り、その順列組み合わせにより様々な配列が考えられるが、どのような配列であっても核酸の構造上、全て負に帯電している。したがって、塩基配列の違いは抽出には無関係であり、ある特定の配列を選択的に抽出することはできなかった。この問題が解消できれば、逆ミセル抽出法はDNAハンドリングにおける有用なツールとして応用できると考えられていた。

2. 研究の目的

核酸は二本鎖形成能や二本鎖形成に伴う剛直性の増加、高い相補鎖認識能などを有している。このため、核酸は遺伝情報の担い手としてだけではなく、ボトムアップ型ナノテクノロジーにおける微細パターン形成や分子認識能を利用した分子センサー、また分析ツールへも応用が可能である。この中でも特にアプタマーと呼ばれる機能性核酸は特定の分子を認識して強く結合する能力を持ち、医薬品としての利用が期待されている。核酸を薬として利用する場合、合成した特定配列を有する核酸を大量に精製する必要がある。しかしながら、これまでの核酸分離技術では核酸の大量精製は可能でも特定配列を有する核酸を分離することは難しかった。また、配列選択的な分離が可能で、液体クロマトグラフなど大量処理の難しいプロセスがほとんどである。

そこで、本研究では有機溶媒中に生体分子を可溶化できるという利点を持つ逆ミセルを利用し、核酸の大量処理が可能で、かつ配列選択的な分離を行うことが可能な、新たな核酸分離プロセスの構築を試みた。逆ミセルを用いる液液抽出は容易にスケールアップが可能であるため、大量処理に適していると考えられる。

3. 研究の方法

【実験操作】

《正抽出》

MgCl₂ (10 mM) を含む Tris-EDTA Buffer (10 mM、pH 8.0) に蛍光ラベル化した Target DNA (22 mer、25 nM) および Target 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 n-ヘキサノール (3 vol%) を含むイソオクタン (2, 2, 4-Trimethylpentane) と先に調製した水相を等量接触させ、水相を静かに攪拌した。3 時間後、有機相の蛍光強度を測定し抽出率を求めた。

《逆抽出》

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。遠心を行い、水相を採取し、蛍光強度から逆抽出率を求めた。

4. 研究成果

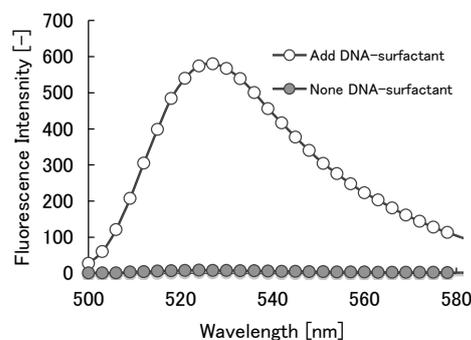


図1 逆ミセルによるDNA抽出

図1に示す通り、Target DNA に相補的な DNA 界面活性剤が存在する系でのみ、有機相に強い蛍光が観測された。蛍光強度から抽出率を計算したところ、5割程度の Target DNA が水相から有機相中へ移動していることが確認された。

さらに、有機相に抽出された Target DNA を再び水相へ回収する逆抽出を行った。逆抽出操作後、水相において強い蛍光が観察され、蛍光強度からおおよそ 80% の DNA 鎖が有機相から水相へ回収された。

配列選択性を確認するため、塩基配列の異なる 3 種類の Target DNA の混合溶液から 1 種類の DNA 界面活性剤を用い、相補的な Target DNA のみの抽出を試みた。その結果、相補鎖の抽出は観察されたが非相補鎖はほとんど抽出されなかった (図2)。

この結果は、以下のように考えられる。DNA 界面活性剤における DNA 部分は Target DNA

と相補的であり、Target DNA とのみハイブリダイゼーションが可能となる。DNA 界面活性剤と Target DNA の複合体は油水界面における逆ミセル形成に伴い、界面活性剤の一つとして逆ミセルに取り込まれる。しかしこの時、非相補鎖は DNA 界面活性剤と結合しないため逆ミセルには取り込まれない。このようにして、DNA 界面活性剤に結合できる相補的な Target DNA だけが有機相へ移動できると考えられる。本抽出系は高い配列選択性を有することが示された。

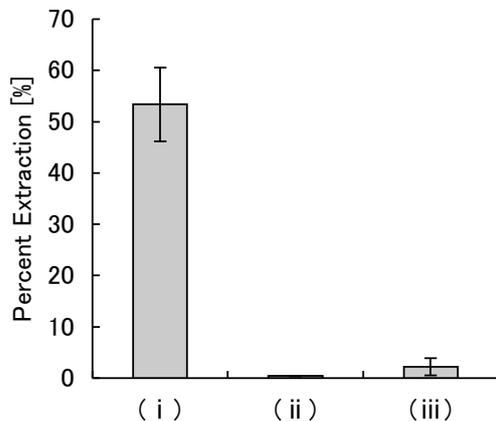


図2 逆ミセルによる DNA の配列選択性の検討

本研究では、さらに高い選択性を得るため、DNA 界面活性剤の DNA 部位にヘアピン型 DNA を用いることにした。また、Target DNA として完全相補鎖、1 塩基ミスマッチ、3 塩基ミスマッチをそれぞれ用いて抽出を行い、配列選択性を評価した。

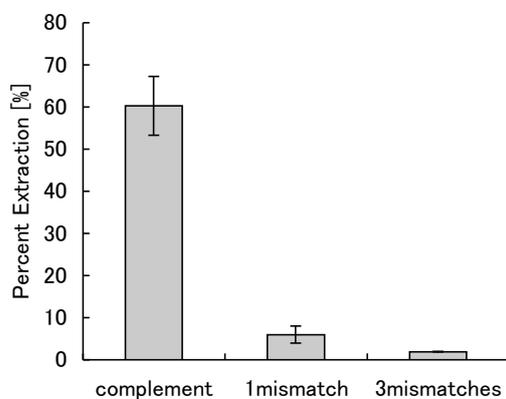


図3 1 塩基および 3 塩基にミスマッチを有する DNA の高度認識

その結果、3 塩基ミスマッチはほとんど抽出されず、また 1 塩基ミスマッチであっても完

全相補鎖に対して 10 分の 1 程度しか抽出されないことが分かった(図 3)。したがって、本抽出系は非常に高い配列選択性を有しており、遺伝子変異検出への応用も可能であると考えられる。DNA にオレイル基を結合させた DNA 界面活性剤を抽出剤として用いることにより、目的とする DNA を配列選択的に有機相中へ抽出することが可能であった。本手法は特定配列を有する DNA の大量精製等に利用できると考えられる。また、水溶液中に存在する特定配列の DNA 鎖を確認できるため抽出系への応用も期待できる。

成果のまとめ

Dilauroylphosphatidylcholine を界面活性剤として用い、核酸の選択的抽出分離を検討した。FITC ラベル化 DNA の抽出率を算出したところ、およそ 50%であった。また、抽出の温度依存性を検討したところ、抽出率が著しく低下する温度と用いた DNA 鎖の融解温度 (T_m) がよく一致していることから、本抽出系では DNA 鎖の持つ温度特性がそのまま保持されていることが明らかとなった。

さらに、選択性の検討で 3 種類の異なる配列を有する標的 DNA の混合溶液に対し、3 つの内のいずれかに相補的な DNA 界面活性剤を用いることで相補的な標的 DNA のみを選択的に抽出できるという結果が得られた。したがって、本研究の目的である配列選択的核酸の抽出が可能であることが確認できたといえる。

また、抽出に影響を与える因子として DNA 界面活性剤濃度および標的 DNA の塩基長の検討を行ったところ、DNA 界面活性剤の疎水性の不足や、逆ミセルと DNA 鎖の間の立体障害が抽出率の低下に関与していることが示唆された。また、DNA だけでなく RNA の抽出も行い、同様に抽出が可能であることも明らかとなった。このとき、RNA の抽出率はおよそ 80%であり、DNA よりも抽出率が高いことが示された。また、一度有機相へ抽出された核酸を再び水相へ戻す操作、すなわち逆抽出操作が可能かどうか検討したところ、2-ブタノールを添加することで逆ミセルが破壊され、逆ミセルに内包されていた核酸が水相へ移動することが明らかとなった。逆抽出率は、DNA も RNA もおよそ 85%であった。

さらに、RNase A の分配特性を検討した結果、ほぼ全ての RNase A が水相へ分配し、有機相からは排除できることが明らかとなった。ただし、微量の水が有機相(逆ミセル相)へ溶解するため、溶解する水溶液に含まれる RNase A が有機相へ一緒に溶解してしまい、完全な分離はできないことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

1. M. Moniruzzaman, N. Kamiya, M. Goto, "Biocatalysis in Water-in-Ionic Liquid Microemulsions", *Langmuir*, 25, 977-982 (2009). 査読有

2. T. Mouri, T. Shimizu, N. Kamiya, H. Ichinose, M. Goto, "Design of a cytochrome P450BM3 reaction system linked by two-step cofactor regeneration catalyzed by a soluble transhydrogenase and glycerol dehydrogenase", *Biotechnol. Prog.*, 25, 1372-1378(2009). 査読有

3. M. Kitaoka, H. Ichinose, M. Goto, "Simultaneous visual detection of single-nucleotide variations in tuna DNA using DNA/RNA chimeric probes and ribonuclease A", *Analytical Biochem.*, 389, 6-11(2009) 査読有

4. J. Okada, T. Maruyama, K. Motomura, K. Kuroki, K. Maenaka, M. Sakono, M. Goto, "Enzyme-Mediated Protein Refolding.", *Chem. Comm.* 7197-7199 (2009) 査読有

5. M. Moniruzzaman, N. Kamiya and M. Goto, "Activation and stabilization of enzymes in ionic liquids", *Org. Biomol. Chem.*, 8, 2887-2899 (2010). 査読有

6. D. Koda, T. Maruyama, N. Minakuchi, K. Nakashima, and M. Goto, "Proteinase-mediated drastic morphological change of peptide-amphiphile to induce supramolecular hydrogelation", *Chem. Commun.* 46, 979-981 (2010). 査読有

7. T. Niide, H. Shiraki, T. Oshima, Y. Baba, N. Kamiya, M. Goto, "Quaternary ammonium bacterial cellulose for adsorption of proteins", *Solvent Extr. Res. Dev., Jpn.*, Vol. 17, 73-81 (2010) 査読有

8. Y. Okutani, S. Egusa, Y. Ogawa, T. Kitaoka, M. Goto, H. Wariishi "One-Step Lactosylation of Hydrophobic Alcohols by Nonaqueous Biocatalysis", *Chem. Cat. Chem.*, 2, 950-952(2010) 査読有

9. M. Moniruzzaman, N. Kamiya, M. Goto, Ionic liquid-in-oil microemulsion as a potential carrier of sparingly soluble drug: Characterization and cytotoxicity evaluation, *Int. J. Pharm.*, 400, 243-250 (2010). 査読有

12. M. Sakono, K. Motomura, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto, "Alpha casein micelles show

not only molecular chaperone-like aggregation inhibition properties but also protein refolding activity from the denatured state", *Biochem. Biophys. Res. Commu* 494-497 (2011). 査読有

15. Y. Mori, K. Minamihata, H. Abe, M. Goto, N. Kamiya, "Protein assemblies by site-specific avidin-biotin interactions", *Org. Biomol. Chem.*, 9, 5641-5644 (2011) 査読有

16. Y. Mori, M. Goto, N. Kamiya, "Transglutaminase-mediated protein labeling with a designed peptide loop", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 410, 829-833 (2011) 査読有

17. K. Minamihata, M. Goto, N. Kamiya, "Protein heteroconjugation by the peroxidase-catalyzed reaction", *Bioconjugate Chem.*, 22, 2332-2338 (2011) 査読有

〔学会発表〕(計 16 件)

1. M. Goto

Molecular Assembly in Ionic Liquids as a Novel Reaction Medium for Biocatalysis Reactions 14th Asia-Pacific Confederation of Chemical engineering, Singapore(2012) (招待講演)

2. 田原義朗, 神谷典穂, 新留琢郎, 片山佳樹, 後藤雅宏, 新規ダブルコーティング型キャリアによるタンパク質デリバリー, 第27回日本DDS学会, (2012) 他 14 件

〔図書〕(計 2 件)

1. 後藤 雅宏, 「逆ミセル」、酵素利用技術体系 第4章 第1節、p.323-327、NTS (2010)

2. M. Moniruzzaman, M. Goto, "Chapter 4, Molecular Assembly Assisted Biocatalytic Reactions in Ionic Liquids" *Nanoscale Biocatalysis*, Humana Press, pp.37-50 (2011)

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・教授

研究者番号：50302766

久保田 富生子 (KUBOTA FUKIKO)

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：60294899