デオキシアデノシンを固定化したシリカゲルを固定相に 用いる高速液体クロマトグラフィーによるオリゴヌクレ オチドの分離

——デオキシアデノシン固定化量の影響——

稲木 良昭[®], 大崎 幸彦, 王 紅,
松川 賢治, 望月 衛子, 和田 健彦*

(1993 年 6 月 21 日受理)

デオキシアデノシンを固定化したシリカゲルを固定化量を変えて合成し, これらを固定相に用いた HPLC により, オリゴヌクレオチドの塩基特異的分離に及ぼす固定化量の効果を検討した. シリカゲル-リガンド間に親水性スパーサーを有する充てん剤を用いた場合, 溶質である相補的な核酸塩基を含むチミジル酸のオリゴマーの溶出は遅れたが, その容量比 (k') はリガンドの固定化量に依存しなかった. このことより, 固定化リガンドは協同的ではなく単独で溶質のオリゴヌクレオチドと相互作用していることが明らかとなった. 一方, スパーサーを含まない充てん剤を用いた場合, リガンド固定化量の増加に伴い固定相との相互作用が増大したが, これは, 疎水性が高まったためと思われる.

1 緒 言

核酸はアデニン-チミン (ウラシル), 及びシトシン-グアニン間で水素結合による相補的塩基対を形成している (Fig. 1). このような核酸の特異的な相互作用を利用した分離システムの開発を目指して, 著者らはこれまでに核酸塩基, あるいはヌクレオシドを固定化したシリカゲルを合成し, それらを HPLC 用固定相として用いたオリゴヌクレオチドの選択的分離について種々検討を行ってきた^{1)~11)}.

核酸塩基を固定した系においても, 固定相中のリガンドと相補的な核酸塩基を含む溶質が塩基対を形成し, その溶出が他の溶質と比べて遅れることが明らかとなった. 水素結合による相互作用は有機溶媒中においては顕著に見られるが, 水溶液中では疎水性やイオン性などの他の因子が大きくなるために, 水溶液中で水素結合を利用した分離は困難であった^{12)~14)}. 一方, ヌクレオシドを固定化した系においては, 相補的塩基間の水素結合形成能が十分大きいので, 水溶液中においても相補的な溶質の分離が可能であり, 有機溶媒に不溶なオリゴヌクレ

オチドの分離に有用である.

核酸における核酸塩基の相互作用は協同的に起こることが知られている. 例えば, DNA が Fig. 1 のような二重らせん構造を形成する場合, 一つの塩基対ができると次の塩基対は容易に生成し, 塩基対が次々と生成していく. このような効果は, 高分子化学では高分子効果と呼ばれ, 金属錯体の分野ではキレート効果と言われている.

Fig. 1 Specific interaction between complementary hydrogen bonding in DNA

* 大阪大学工学部応用精密化学科: 565 大阪府吹田市山田丘 2-1

シリカゲルに固定化したヌクレオシドと溶質であるオリゴヌクレオチドの相互作用におけるこのような協同効果の存在は、核酸の相互作用及び固定相表面における溶質-リガンド間の相互作用の形態に関連して非常に興味ある問題である。

デオキシアデノシンを固定化したシリカゲルを固定相に用いたオリゴヌクレオチドの分離では、固定相中のリガンドと相補的なチミジンを含むオリゴマーが他の溶質と比べてその溶出が著しく遅れるという結果を既報¹⁵⁾¹⁶⁾において報告した。本研究では、固定相中のリガンド固定化量を種々変化させて分離挙動の差異について検討を行い、シリカゲル上のヌクレオシド濃度と協同的相互作用の関連について考察する。

2 実 験

2・1 充てん剤の合成

デオキシアデノシン固定化シリカゲルの合成は、既報¹⁶⁾に従い、デオキシアデノシンの活性トリエトキシシラン誘導体をシリカゲル[Daisogel SP-120, 粒径 5 μm , 細孔径 120 $\text{\AA}$, 表面積 300 m^2/g , ダイソー]と反応させて行った。合成した充てん剤の構造と略号を Fig. 2 に示す。リガンド固定化量の制御はデオキシアデノシン誘導体の仕込み量を変化して行い、実際の固定化量は元素分析による窒素含量からそれぞれ算出した。合成した種々のデオキシアデノシン固定化シリカゲルの固定化理

Table 1 Contents of deoxyadenosine immobilized on silica gel (mmol/g)

Calcd. ^{b)}	Found ^{a)} /mmol g ⁻¹			
	Si-(AEE)-3'-d(MeO) ₂ TrAdo	Si-(AEE)-3'-dAdo	Si-3'-d(MeO) ₂ TrAdo	Si-3'-dAdo
0.012	0.01	0.01	0.01	0.01
0.036	0.042	0.03	—	—
0.06	0.051	0.038	0.061	0.056
0.09	0.058	0.049	—	—
0.12	0.080	0.069	0.10	0.099
0.24	0.11	0.086	—	—
excess ^{c)}	—	—	0.371	0.398

a) calculated from elementary analysis (N%); b)

calculated from molar ratio in the reaction mixture;

c) reaction with excess adenosine derivatives

論量及び実測値を Table 1 に示す。

固定化理論量 0.012 mmol/g の場合には窒素理論含量が小さく、測定値の誤差は大きい。スパーサーを有する誘導体の場合、例えば、Si-(AEE)-3'-d(MeO)₂TrAdo では反応性が比較的低く、又、ヌクレオシドのトリチル保護基を除去する際に部分的に脱離が起きているようである。一方、スパーサーを含まない誘導体の場合、例えば、Si-3'-d(MeO)₂TrAdo では反応性が高く、ほぼ仕込み量のアデノシン誘導体が固定化されている。又、過

Fig. 2 Structures of deoxyadenosine-bonded silica gels as stationary phases for HPLC

剰のデオキシアデノシン誘導体を用いた場合, 最高約 0.38 mmol/g の固定化量となった。

得られた充てん剤は, 市販の充てん機 (ケムコエコノパッカー CPP-085 型) を用いてクロロホルムスラリー法により内径 4.6 mm, 長さ 150 mm のステンレス製カラムに充てんし, 充てん後水-メタノール混合溶媒により洗浄した。

2・2 装置及び試料

HPLC システムには東ソー CCP & 8000 シリーズを使用し, 検出は 260 nm の紫外吸収により行った。測定温度は恒温槽に接続したウォータージャケットにより, 5~30°C の範囲で変化させた。試料としては一〜五量体のオリゴヌクレオチド (各 10 units) をそれぞれ精製水 (1 ml) に溶かした溶液を用いた。オリゴヌクレオチドについては市販の DNA シンセサイザー (Gene Assembler Plus, Pharmacia LKB Biotechnology) を用いて合成したものを常法により精製して用いた。試料 (1 μ l) はマイクロシリッジによりカラムに注入した。移動相としてはメタノール (20 v/v%) を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を用い, 流量は 1 ml/min で測定を行った。

3 結果及び考察

3・1 親水性スぺーサーを含む固定相

デオキシアデノシンを親水性スぺーサーを介して固定化した Si-(AEE)-3'-dAdo (2) を用いた場合のクロマトグラムを Fig. 3 に示した。固定化されたアデノシンと相補的なチミジンを含むオリゴマーであるトリチミジル酸 [d(T)₃] の溶出が他のオリゴヌクレオチドの溶出に比較して最も遅れている。Si-(AEE)-3'-d(MeO)₂TrAdo (1) について, 保持時間をオリゴヌクレオチドの塩基数 (重合度) に対してプロットすると Fig. 4 となり, 相補的なチミジル酸のオリゴマーの溶出が重合度とともに遅くなっているのに対し, 他のオリゴヌクレオチドの溶出は重合度に依存しないという結果を示している。これらの結果より, 核酸塩基の相補的塩基対によって分離されていることは明らかである。

トリヌクレオチド及びテトラヌクレオチドの Si-(AEE)-3'-d(MeO)₂TrAdo (1) を用いた 25°C での分離結果について, 容量比 (*k'*) を固定化リガンドの固定化量に対してプロットすると, Fig. 5 が得られた。いずれもリガンド固定化量にかかわらず容量比はほぼ一定の値となっている。

固定相中のリガンドと溶質オリゴヌクレオチドとの相

Fig. 3 Chromatogram of trinucleotides on Si-(AEE)-3'-dAdo (2)

Eluent: 50 mM sodium phosphate buffer with 20% methanol, pH 7.0; Flow rate: 1 ml/min; Detection: UV absorbance at 260 nm; Temperature: 25°C

Fig. 4 Retention time vs. length of oligonucleotides
Column: Si-(AEE)-3'-d(MeO)₂TrAdo (1) at 25°C

互作用について考えた場合, 固定化リガンドが単独で溶質オリゴヌクレオチドと相互作用する様式と, 複数の固定化リガンドが協同的に溶質と相互作用する様式の 2 種類が考えられる。核酸のように相互作用が協同的に起こることが予想されたが, 上で述べた本研究の結果では, 固定化リガンドの固定化量は溶質の保持挙動にほとんど影響を与えず, 固定化リガンドは協同的ではなく単独で溶質オリゴヌクレオチドと相互作用していることを示唆している。又, 相補的なチミジル酸オリゴマーの重合度の増加に従い保持時間は増大しているが (Fig. 4), これは相互作用の作用点が増したためだけであり, 協同効果があれば保持時間も加速的に増大するはずである。

Fig. 5 Dependency of the capacity factor (k') on the ligand contents of Si-(AEE)-3'-d(MeO)₂TrAdo (1) for tri- and tetranucleotides

Fig. 6 Chromatogram of pentadeoxynucleotides on Si-(AEE)-3'-dAdo (2)

Eluent: 50 mM sodium phosphate buffer with 20% methanol (pH 7.0); Flow rate: 1 ml/min; Temperature: 25°C

核酸の相互作用を考えた場合このような結果は意外ではあるが、ただ 1 組の相補的塩基対が形成されるだけで、他の非相補的な溶質と比べて十分に安定な錯体を形成し、塩基相補的な分離が行われ得ることを示している。Fig. 6 は、Si-(AEE)-3'-dAdo (2) を用いた場合の 3 番目の塩基組成のみが異なるペンタデオキシヌクレオチドの測定温度 25°C におけるクロマトグラムを示したものである。リガンドと相補的なチミジンを含む 5'-CGTCC-3' の溶出が、他の溶質と比べて特異的に遅れる結果が得られ、1 組の塩基対形成だけで分離は完全に行われていることになる。

シリカゲルに固定化されたヌクレオチドが、核酸のよ

Fig. 7 Schematic representation of the stationary-phase surface of Si-(AEE)-3'-d(MeO)₂TrAdo (1)
Silica gels used were totally porous sphericals with a ligand concentration of 0.10 mmol/g, 300 m²/g in surface area, and 120 Å in pore diameter.

うに協同的ではなく、単独でオリゴヌクレオチドと相互作用することは、ヌクレオチドがシリカゲル上で十分に離れていることを示唆している。デオキシアデノシンを親水性スパーサーを介して固定化した Si-(AEE)-3'-d(MeO)₂TrAdo (1) における、固定相中のリガンドの存在状態のモデルを Fig. 7 に示した。ここでは固定化量が 0.10 mmol/g の固定相について、固定化リガンドが固定相表面に均一に分散していると仮定して、固定化率と表面積及び細孔内の曲率との関係から計算を行い図に示したものである。この固定化量において、隣接した固定化リガンド間の平均距離は約 27 Å と算出され、ほとんど隣接リガンドの影響を受けない程度に十分離れていると考えられる。実際には、リガンド固定化量がここで示したモデルの 10 分の 1 程度 (0.010 mmol/g) の充てん剤を用いた場合においても、相補的なオリゴチミジル酸の容量比はほとんど変化しなかった。このことから、固定相中のリガンドと溶質との相互作用は協同的に行われるのではなく、単独で相互作用していることが支持された。

3・2 親水性スパーサーを含まない固定相

親水性スパーサーを含まない固定相である充てん剤 Si-3'-dAdo (4) を用いたトリヌクレオチド混合物のクロマトグラムを Fig. 8 に示した。又、この充てん剤 Si-3'-d(MeO)₂TrAdo (3) を用いた場合の、トリヌクレオチド及びテトラヌクレオチドの 20°C での分離結果について、保持時間と固定化量の関係を Fig. 9 に示した。スパーサーがない場合、親水性スパーサーを含む固定相の場合とは逆に、相補的な溶質である pd(T)₄ 及び pd(T)₃ の保持挙動に大きなリガンド固定化量依存性が

Fig. 8 Chromatogram of trinucleotides on Si-3'-Ado (4)

Eluent: 50 mM sodium phosphate buffer with 20% methanol, pH 7.0; Flow rate: 1 ml/min; Detection: UV absorbance at 260 nm; Temperature: 25°C

Fig. 9 Dependency of the retention times on the ligand contents of Si-3'-d(MeO)₂TrAdo (3) for tri- and tetranucleotides

見られた。リガンド固定化量の増加に伴い明らかにオリゴチミジル酸の保持時間も増大し、固定相とのより強い相互作用が観測された。この結果はおそらく、親水性スパーサーが存在しないために樹脂表面の疎水性が増大し、そのため塩基相補性による固定相への保持に加えて疎水性の寄与による効果も現れたために生じたものであると考えられる。なお、スパーサーや保護基などの効果の詳細について現在検討中である。

4 結 論

シリカゲルにスパーサーを介してデオキシアデノシンを導入した固定相を用いた HPLC においては、各溶質

の保持は固定化リガンドの固定化量によらずほぼ一定であった。このことから、固定相中のアデノシンと溶質のチミジンとの相互作用は非協同的に行われていることが明らかとなった。又この事実はシリカゲル表面上のリガンドの存在状態を予想したモデル図からも推察された。今後は更に、相補的塩基対形成に最適な環境についてその条件を種々検討していく必要があると考えられる。

文 献

- 1) K. Takemoto, Y. Inaki: "Functional Monomers and Polymers", Edited by K. Takemoto, Y. Inaki, R. M. Ottenbrite, p. 149 (1987), (Merck Dekker, New York).
- 2) Y. Inaki, S. Nagae, T. Miyamoto, Y. Sugiura, K. Takemoto: "Applied Bioactive Polymeric System", Edited by C. G. Gebelein, C. E. Carraher, Jr., V. R. Foster, p. 185 (1988), (Plenum Publishing, New York).
- 3) 稲木良昭編著, "人工核酸", (1992), (アイピーシー).
- 4) Y. Inaki, S. Nagae, T. Miyamoto, Y. Sugiura, K. Takemoto: *Polym. Mater. Sci. Eng.*, **57**, 286 (1987).
- 5) S. Nagae, Y. Inaki, K. Takemoto: *Polymer J.*, **21**, 425 (1989).
- 6) S. Nagae, Y. Suda, Y. Inaki, K. Takemoto: *J. Polym. Sci. Part A, Polym. Chem.*, **27**, 2593 (1989).
- 7) S. Nagae, T. Miyamoto, Y. Inaki, K. Takemoto: *Polymer J.*, **21**, 19 (1989).
- 8) S. Nagae, T. Miyamoto, Y. Inaki, K. Takemoto: *Anal. Sci.*, **4**, 575 (1988).
- 9) Y. Inaki, Y. Sugiura, T. Miyamoto, H. Hojo, S. Nagae, K. Takemoto: *Nucleic Acids Res., Sym. Ser.*, **20**, 59 (1988).
- 10) Y. Inaki, H. Kawano, K. Matsukawa, K. Takemoto: *Polym. Mater. Sci. Eng.*, **66**, 441 (1992).
- 11) Y. Inaki, T. Wada, H. Kawano, T. Watanabe, K. Takemoto: *Supramolecular Chem.*, in press.
- 12) Y. Kato, T. Seita, T. Hashimoto, A. Shimizu: *J. Chromatogr.*, **134**, 204 (1977).
- 13) M. Akashi, M. Yamaguchi, H. Miyata, M. Hayashi, E. Yashima, N. Miyauchi: *Chem. Lett.*, **1988**, 1093.
- 14) B. Feibush, A. Figueroa, R. Charles, K. D. Onan, P. Feibush, B. L. Karger: *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 3310 (1986).
- 15) Y. Inaki, K. Matsukawa, K. Takemoto: "Biotechnology and Bioactive Polymers", Edited by C. G. Gebelein, C. E. Carraher, Jr., p. 207 (1993), (Plenum Publishing, New York).
- 16) 稲木良昭, 松川賢治, 王紅, 望月衛子, 和田健彦, 竹本喜一: 分析化学, **22**, 99 (1993).

High-performance liquid chromatographic separation of oligonucleotides using deoxyadenosine immobilized silica gels for the stationary phase: Effect of the deoxyadenosine ligand concentration. Yoshiaki INAKI, Yukihiro OHSAKI, Hong WANG, Kenji MATSUKAWA, Eiko MOCHIZUKI and Takehiko WADA (Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Osaka University, 2-1, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565)

Deoxyadenosine immobilized silica gels with different ligand concentrations were prepared as novel HPLC packing materials for the separation of oligonucleotides. Oligothymidylic acids, which are complementary to the immobilized ligand, were clearly separated from the other oligonucleotides by the formation of specific hydrogen bonding with immobilized deoxyadenosine. In the case of separation with deoxyadenosine immobilized silica gels containing hydrophilic spacer groups, the capacity factor (k') of complementary d(T)₃ or d(T)₄ seemed to be almost constant over a wide range of ligand concentrations from *ca.* 0.010~0.10 mmol/g. This result strongly suggests that the interaction between the immobilized ligand and the solute is non-cooperative. On the other hand, an increase in the ligand concentration caused a stronger interaction with complementary solutes, thus retarding the retention time when the separation is performed with deoxyadenosine immobilized silica gel having no hydrophilic spacer group.

(Received June 21, 1993)

Keyword phrases

adenosine-immobilized silica; HPLC; complementary hydrogen bonding; specific interaction; ligand concentration.