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

稲木 良昭[®], 松川 賢治, 王 紅,
望月 衛子, 和田 健彦, 竹本 喜一*

(1992 年 9 月 7 日受理)

核酸成分分離用の新規な HPLC 用充てん剤としてデオキシアデノシンを固定化したシリカゲルを合成し, 得られた充てん剤を用いてオリゴヌクレオチドの塩基特異的分離を試みた. デオキシテトラヌクレオチドの分離において, 固定化リガンドと相補的な核酸塩基を含む $pd(T)_4$ が他のデオキシテトラヌクレオチドから特異的に分離された. この系においては, 測定温度の低下に伴い溶質-リガンド間の相互作用が増大し, 相補の塩基を含む溶質の分離係数に大きな変化を生じた. 又, シリカ結合相-リガンド間に親水性部位をもつスパーサーを有する充てん剤は, 親水性部位をもたない充てん剤に比べてその相補の塩基の認識性がかなり高くなるという結果を得た. 更に, 固定化リガンドの糖の保護基を脱保護した充てん剤よりも脱保護しない充てん剤のほうが比較的良好な分離特性を示した.

1 緒 言

核酸成分の分離分析は今日非常に重要であり, 一塩基の違いをも認識し得る高速分離分析のための手法開発が強く待ち望まれている. 現在一般的に用いられている主な手法としてはゲル電気泳動法 (GE), キャピラリー電気泳動法 (CE), 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などがあるが, 試料の分取, 又は操作性といった観点から HPLC が最も適していると考えられている. ヌクレオシド, オリゴヌクレオチドなどの核酸成分の HPLC による分離では, 疎水性相互作用を利用した逆相クロマトグラフィー, 静電相互作用を利用したイオン交換クロマトグラフィーなどにより行われている^{1)~3)}. このような相互作用では塩基選択性は見られないが, 核酸塩基のもつ水素結合による相補の塩基対形成 (Fig. 1) を利用すると, 核酸成分の塩基特異的分離が期待できる.

核酸成分の工業的な応用を目指して, これまでに多くの核酸塩基の合成高分子誘導体を合成し, その特異的相互作用と応用研究を行ってきた⁴⁾⁵⁾. 核酸塩基の高分子誘導体は主に官能基をもった高分子への高分子反応によ

り合成してきた. シリカゲルはシラノール基をもった無機高分子であり, これまでの高分子反応の手法によりシリカゲルへの核酸塩基の固定化を行うことができた⁶⁾. このような核酸塩基担持シリカゲルを用いた HPLC によるヌクレオシドやヌクレオチドの分離では, 有機溶媒中では塩基特異的な分離が見られたが, 水溶液中では疎水性相互作用が優先し, 塩基特異的分離が見られなかった^{7)~11)}.

本研究では, 親水性 HPLC 用充てん剤としてデオキシアデノシンを固定化したシリカゲルを合成し, オリゴヌクレオチドの塩基特異的分離について検討を行った.

Fig. 1 Base pairs 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

測定温度の違いによる保持時間の変化や、スパーサーの影響及びリガンドの保護基の有無による差異も見られたが、塩基特異的な分離結果が得られたのでまとめて報告する。

2 実験

2.1 充てん剤の合成

デオキシアデノシンのシリカゲルへの固定化は、Scheme 1 に示す合成経路に従い行った。まずデオキシアデノシン (1) の 6-アミノ基をジメチルアミノメチレン基で保護 (2) し¹²⁾、更に 5'-水酸基をジメトキシトリチル基で保護 (3) した後、*N,N'*-カルボニルジイミダゾールを用いてイミダゾリド化 (4) による活性化を行った。このイミダゾリド誘導体 (4) に親水性スパーサーとして 2-アミノエトキシエタノールを反応させて末端に水酸基を有するデオキシアデノシン誘導体 [(AEE)-3'-d(MeO)₂TrAdo^{dmm}] (5) とした。更に再びイミダゾリド化により水酸基を活性化して [Im-O-(AEE)-3'-d(MeO)₂TrAdo^{dmm}] (6) とし、次いで 3-アミノプロピルトリエトキシシランと反応させることによりトリエトキシシラン誘導体 (7) を合成した。

シラン誘導体 (7) にシリカゲル (ナカライテスク製 Cosmosil 5SL, 粒径 5 µm, 細孔径 120 Å, 表面積 330 m²/g) を加えて加熱することにより、デオキシアデノシンの親水性のスパーサーを介して固定化した誘導体 [Si-(AEE)-3'-d(MeO)₂TrAdo^{dmm}] (8) を得た。アデニンの 6-アミノ基の保護基を 0.5% 酢酸水溶液にて除去し、充てん剤 [Si-(AEE)-3'-d(MeO)₂TrAdo] (9) を得た。又、誘導体 (8) を 80% 酢酸水溶液で処理することにより、アミノ基及び糖の二つの保護基が脱離した充てん剤 [Si-(AEE)-3'-dAdo] (10) を得た。

スパーサーに親水性部位を含まない充てん剤の合成は、(4) を直接 3-アミノプロピルトリエトキシシランと反応させて誘導体 (11) とし、シリカゲルへの固定化 (12)、酢酸水溶液による脱保護を経て充てん剤 [Si-3'-d(MeO)₂TrAdo] (13) とすることにより行った。デオキシアデノシンのシリカゲルへの固定化率は元素分析による窒素含量から算出し、充てん剤 (9) と (10) では約 0.30 mmol/g (silica gel) であり、充てん剤 (13) では約 0.11 mmol/g (silica gel) であると求められた。なお、固定化後も残存するシラノール基はヘキサメチルジシランによりエンドキャッピングを行った。

2.2 カラムへの充てん

合成した充てん剤は、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た。ケムコ CPP-085 型を用いて二状態圧力法により行い、充てん後水-メタノール混合溶媒により洗浄した。

2.3 装置及び試料

HPLC システムは東ソー CCP & 8000 シリーズを使用した。検出には紫外光検出器を用い、254 nm あるいは 260 nm の波長で測定した。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、カラム温度を 5~30°C の範囲で変化させた。試料としてはヌクレオシド、5'-モノヌクレオチド (以上淀川製薬製)、及びデオキシテトラヌクレオチド (Pharmacia 製) を用い、それぞれを精製水に溶かしてマイクロシリンジによりカラムへ注入した。移動相にはメタノール (10 v/v%) を含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を用い、流量は 1 ml/min⁻¹ で測定を行った。

3 結果及び考察

3.1 核酸成分の塩基特異的分離

デオキシアデノシンの親水性スパーサーを介してシリカゲルに固定化した充てん剤 (9) を用いて、オリゴヌクレオチドの HPLC による分離を行い、25°C 及び 10°C における分離結果を Fig. 2 に示した。この場合の試料としては同一の塩基組成から成るデオキシテトラヌクレオチド {pd(C)₄, pd(T)₄, pd(G)₄, pd(A)₄} の混合物を用いた。カラム温度が 25°C の結果では、シリカゲルに固定化したアデノシンと相補的塩基対を形成するチミジンの四量体である pd(T)₄ の溶出が最も遅れている (Fig. 2a)。カラム温度を 10°C にすると、pd(T)₄ の溶出は更に遅れ、他のテトラヌクレオチドから完全に分離している (Fig. 2b)。

四量体の分離結果から、その容量比 *k'* 及び分離係数 α を求め、その温度依存性を Fig. 3a 及び Fig. 3b に示した。固定化したアデノシンと相補的な pd(T)₄ の *k'* 並びに α 値の温度変化が顕著に見られ、一般の逆相系、あるいはイオン交換系カラムでは見られない現象であることにより、この系による分離は相補的塩基対形成によって行われていることが示唆される。一方、核酸の相互作用での温度依存性はよく知られており、融解温度 (*T*_m) 以上では水素結合による相互作用は見られなくなる。このことから、ここで見られた相補的テトラヌクレオチドの特異的分離は相補的塩基対形成によることを支持している。

保持時間とカラム温度の van't Hoff プロットは直線

Scheme 1

Scheme 2

となり (Fig. 4), これからリガンド-溶質間の錯体形成に伴う安定化エンタルピー (ΔH) 及びエントロピー (ΔS) を算出した (Table 1)¹³⁾¹⁴⁾. 明らかに, 固定相中のアデニンと相補的なチミンを有する $\text{pd}(\text{T})_4$ との錯体形成に伴う ΔH の変化が他の溶質より大きいことが分かる. $\text{pd}(\text{T})_4$ のエンタルピー値からチミン一塩基当たりのエンタルピー変化は約 4 kcal/mol となり, よく知られているアデニン-チミンの水素結合エネルギーにほぼ等しい¹⁵⁾¹⁶⁾.

このように, 塩基間相互作用を利用した核酸成分の選択的分離が可能であり, 相補性のある溶質のみがより選択的に分離され, 又カラム温度が低下するにつれて選択性が増大することが明らかとなった.

3.2 保護基による影響

フラノース糖 5' 位の水酸基の保護基であるジメトキシトリチル基は合成上必要な非常にかさ高い置換基である. このジメトキシトリチル基を脱離した充てん剤 Si-(AEE)-3'-dAdo (10) を固定相として用いた場合のデオキシテトラヌクレオチドの分離について, 測定温度に対する k' の変化を表したものを Fig. 5 に示した. 明らかに $\text{pd}(\text{T})_4$ の溶出は温度の低下とともに遅れてくるが, この変化は保護基を有する充てん剤の場合 (Fig. 3a) と比較して小さい値を示している. この理由はおそらく, 非常にかさ高い置換基を 5' 位の水酸基に導入することにより, 核酸塩基部分の糖の五員環に対する配向が

Table 1 Solute $-\Delta H$ and ΔS values between the mobile phase and the stationary phase

Solute	Si-(AEE)-3'-d(MeO) ₂ TrAdo (9)	
	$-\Delta H/\text{kcal mol}^{-1}$	$\Delta S_{\text{app}}, \text{e.u.}$
$\text{pd}(\text{T})_4$	16.8	-54.2
$\text{pd}(\text{G})_4$	8.5	-28.5
$\text{pd}(\text{A})_4$	5.7	-19.1
$\text{pd}(\text{C})_4$	5.2	-18.8

アンチ配向をとりやすく (Fig. 6), その結果水素結合形成が容易となったためと考えられる.

3.3 スペーサーの影響

これまで述べてきた充てん剤 (9) と (10) はスペーサー部位に親水性のアミノエトキシエタノールを含んだものである. 比較のためスペーサーに親水性部位を持たない充てん剤 Si-3'-d(MeO)₂TrAdo (13) も合成し, デオキシテトラヌクレオチドの HPLC による分離を行った (Fig. 7).

親水性部位をもたない充てん剤 (13) を用いても, $\text{pd}(\text{T})_4$ の溶出は他のテトラヌクレオチドと比べて遅れているが, 疎水性の高い $\text{pd}(\text{A})_4$ も比較的遅れて溶出している. 従って, この系による分離は塩基相補性に加えて疎水的な効果も影響していることが推測される. スペーサー部分にアミノエトキシエタノールを用いること

Fig. 2 Chromatograms of tetranucleotides on column (9) at (a) 25°C and (b) 10°C

Eluent: 20 mM sodium phosphate buffer at pH 7 in 10% aqueous methanol; Flow rate: 1 ml/min; Detection: UV absorbance at 254 nm

Fig. 4 van't Hoff plots of $R \ln k'$ vs. $1/T$ for $\text{pd}(\text{T})_4$ with column (9)

Fig. 3 Temperature dependency of (a) capacity factor (k') and (b) separation factor (α) for tetranucleotides on column (9)

Fig. 5 Temperature dependency of capacity factor (k') for tetranucleotides on column (10)

Fig. 6 Anti and syn conformation of the protected deoxyadenosine

Fig. 7 Chromatograms of tetranucleotides on column (13) at 25°C

Eluent: 20 mM sodium phosphate buffer at pH 7 in 10% aqueous methanol; Flow rate: 1 ml/min; Detection: UV absorbance at 254 nm

により固定相表面の親水性を高め、又シリカ結合相-配位子間距離を増大することで配位子間の立体反発を緩和でき、水素結合による相補的塩基対形成を容易にして¹⁷⁾、塩基選択的な分離が行われたものと思われる。

以上のとおりデオキシアデノシンをシリカゲルに固定化した充てん剤によるオリゴヌクレオチドの分離は、アデニンと相補的な塩基であるチミンのオリゴマーが特異的に遅れて溶出した。更にリガンドを固定化する際に親水性のアミノエトキシエタノールを用いることにより、固定相表面の疎水性が緩和され、リガンドの運動性も上昇するためにその溶質選択性が大きく向上した。又、リガンド保護基を脱保護することによりリガンドのコンホメーションの変化を引き起こし、そのため選択性が低下することが観測された。

文 献

- 1) W. S. Hancock (Ed.): "High Performance Liquid Chromatography in Biotechnology", (1990), (John Wiley & Sons, Inc., New York).
- 2) Y. Kato, T. Kitamura, A. Mitsui, Y. Yamasaki, T. Hashimoto, T. Murotsu, S. Fukushige, K. Matsubara: *J. Chromatogr.*, **447**, 212 (1988).
- 3) K. Dohtsu, K. Ohmori, R. Fukuda, S. Takenaka, M. Takagi: *Anal. Sci.*, **4**, 371 (1988).
- 4) K. Takemoto, Y. Inaki: "Functional Monomers and Polymers", Edited by K. Takemoto, Y. Inaki, R. M. Ottenbrite, p. 149 (1987), (Mercel Dekker, New York).
- 5) 稲木良昭編著, "人工核酸", (1992), (アイピージー).
- 6) 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).
- 7) S. Nagae, Y. Inaki, K. Takemoto: *Polymer J.*, **21**, 425 (1989).
- 8) S. Nagae, Y. Suda, Y. Inaki, K. Takemoto: *J. Polym. Sci. Part A, Polym. Chem.*, **27**, 2593 (1989).
- 9) S. Nagae, T. Miyamoto, Y. Inaki, K. Takemoto: *Polymer J.*, **21**, 19 (1989).
- 10) S. Nagae, T. Miyamoto, Y. Inaki, K. Takemoto: *Anal. Sci.*, **4**, 575 (1988).
- 11) M. Akashi, M. Yamaguchi, H. Miyata, M. Hayashi, E. Yashima, N. Miyauchi: *Chem. Lett.*, **1988**, 1093.
- 12) A. Holy: "Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry", Edited by W. W. Zorbach and R. S. Tipson, p. 172 (1968), (Interscience Publisher, New York).
- 13) Y. Baba: *J. Chromatogr.*, **485**, 143 (1989).
- 14) B. Feibush, A. Figueroa, R. Charles, K. D. Onan, P. Feibush, B. L. Karger: *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 3310 (1986).
- 15) Z. G. Kudritskaya, V. I. Danilov: *J. Theor. Biol.*, **59**, 303 (1976).
- 16) Y. Kyogoku, R. C. Lord, A. Rich: *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 496 (1967).
- 17) C. R. Lowe: "An Introduction to Affinity Chromatography. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Vol. 7, Part 2 (1979), (Elsevier, Amsterdam).

High performance liquid chromatographic separation of oligonucleotides using deoxyadenosine immobilized silica gel for stationary phase. Yoshiaki INAKI, Kenji MATSUKAWA, Hong WANG, Eiko MOCHIZUKI, Takehiko WADA and Kiichi TAKEMOTO (Department of Applied Fine Chemistry, Faculty of Engineering, Osaka University, 2-1, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565)

Deoxyadenosine immobilized silica gels were prepared as the novel HPLC packing materials for the separation of nucleic acid fragments. Tetrathymidylic acid 5'-monophosphate {pd(T)₄} was clearly separated from the other tetradeoxynucleotides by the specific interaction of complementary nucleic acid bases. The separation factor (α) of pd(T)₄ increased with the decrease of column temperature from 30°C to 5°C, because the specific bondings between the immobilized ligands and the complementary solutes are stabilized with the decrease of temperature. The presence of the hydrophilic spacer group between stationary phase and the nucleoside ligand caused higher separation efficiency for the complementary solute, compared with the stationary phase having no hydrophilic spacer groups. The "trityl-on" deoxyadenosine as the ligand was preferred to the unprotected one, which may be related to the conformation of the adenosine on silica gel.

(Received September 7, 1992)

Keyword phrases

adenosine-immobilized silica; HPLC; tetradeoxynucleotide; hydrogen bonding; specific interaction.