DNA の単離技術

—新機能材料としての DNA 大量分離精製技術の開発—

梅 原 泰 男

近年、DNA を利用した光デバイスなどの新機能材料の開発研究が盛んになされている。しかしながら、新機能材料の開発に用いる高分子 DNA は高価な試薬としてしか販売されておらず、新機能材料の実用化のためには、高分子 DNA を安価かつ大量に供給する手法の確立が急務である。われわれは、世界でも例のない、高分子 DNA の大量精製技術を確立することに成功した。

1. はじめに

養殖事業の進展に伴い、北海道においてサケはホタテガイに次ぐ第2位の漁獲量があり、有用かつ安定的な水産資源となっている。魚肉および卵巣は食品加工原料として利用されているが、精巢・骨・皮および頭部などの大部分は利用されておらず、廃棄されている。

サケの精巢、いわゆる白子には、アルギニンを豊富に含む抗菌性を有するタンパク質であるプロタミンや、健康食品や化粧品および医薬品原料として利用されている DNA (デオキシリボ核酸) が多量に含まれている。当社では、サケの白子から簡単に、効率よく、かつ高純度で低分子量 DNA を抽出精製する技術を開発し、製造・販売している。近年、光デバイスなどの研究分野において、さまざまな化合物と二重らせん構造を有する DNA とが結合あるいは相互作用することによって機能性を発現する特性を利用し、光学素子、イオン伝導性膜、分離膜、難燃剤、エレクトロニクス素子などの新機能材料を開発する研究が盛んに行われ、注目を浴びている。しかし、二重らせん構造を保持した高分子 DNA (分子量数百万) は工業的規模での生産が行われていないため、非常に高価である。

本稿では、従来の低分子量 DNA 用途とは異なる、新機能材料の開発に適した高分子 DNA の大量分離精製技術に関して当社が行ったピーカースケールからベンチスケール、さらにパイロットスケールでの研究開発の結果および工業化の可能性について紹介したい。

2. 実験方法

2.1 原料、処理、および試薬

原料の白子は、その年の秋に北海道東部で漁獲されたサケから採取し、直ちに -20°C で凍結保存した。

DNA の抽出は、凍結白子を解凍後ホモジナイズし、ピーカースケール (1~2 L)、ベンチスケール (10~20 L)、そしてパイロットスケール (200, 1,000 L) で行った。

試薬類は、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩酸、酢酸、水酸化ナトリウム、市販工業用プロテアーゼ、エタノールなどの食品加工で使用できるもののほか、メタノール、塩化カリウム、SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、EDTA (エチレンジアミン四酢酸)、トリスアミノメタンなどを使用した。

2.2 DNA の新機能材料としての評価

DNA の外観や形状は、シグマ社製の試薬 DNA (SIGMA DNA-Na from Salmon Testes) を指標として行った。

純度は、DNA に酸を加えて熱分解してモノヌクレオチドとし、260 nm での吸光度を測定する STS 法 (Schmidt-Thanhauser-Schneider 法) で求めた。分子量分布は、アガロースゲル電気泳動法、タンパク質含有量はローリーフォーリン法、窒素はケルダール法、リンはモリブデン青法で求めた。無機塩は、酸加水分解し原子吸光度法で求めた。新機能材料とした場合に問題となる透明性については、DNA の 1% 水溶液を調製し、目視による濁りを判定した。

また、新機能材料としては、共同研究者である千歳科学技術大学 (緒方学長) および東京工業大学 (岡畑教授) に機能性の DNA 薄膜を試作し、評価していただいた。

UMEHARA, Yasuo

日本化学飼料(株)バイオ事業部 (040-0076 函館市浅野町 3-6)・課長。1982年 弘前大学農学部卒。同年日本化学飼料入社、現在に至る。専門は生物化学、油化学。

The Separation and Refining Technology of DNA

3. 各種精製法による DNA の抽出

当初、新機能材料に適合するためには高純度の DNA を抽出すること、および微量に含まれる重金属類を除去することを第 1 の目標とし、工業化の可能性が考えられる以下の精製法について検討した。

- (1) 酸・塩抽出法：サケの白子を塩酸などの強酸で処理してプロタミンを除いた後、DNA を NaCl で抽出し、再び塩酸で沈殿を生じさせる。中和して可溶化後、エタノールで沈殿させ、乾燥して DNA を得る。
- (2) アルカリ・塩抽出法：アルカリおよび NaCl で DNA を可溶化してろ過、ろ液を中和後、エタノール沈殿で DNA を得る。
- (3) 酵素処理法：プロテアーゼでタンパク質をアミノ酸に分解し、加熱してプロテアーゼを失活後ろ過する。ろ液を酸処理して DNA を沈殿させ、沈殿を水洗後アルカリで溶解し、セライトなどのろ過助剤を用いたろ過で透明な溶液とする。エタノールを加えて DNA を沈殿させ、乾燥して DNA を得る。
- (4) 酵素処理-塩化カルシウム法：(3) の酵素処理法におけるプロテアーゼ処理後、塩化カルシウムを加えて DNA を Ca 塩として沈殿させ、水洗する。次に、炭酸ナトリウムで DNA を Na 塩とし、セライトなどのろ過助剤を用いたろ過で透明な溶液とする。エタノールを加えて DNA を沈殿させ、乾燥して DNA を得る。
- (5) SDS-クロロホルム法：大量生産を目的とする工業化には適さない実験室的な手法ではあるが、NaCl 水溶液で白子に含まれる DNA を溶解し、次に SDS でタンパク質を沈降させる。その後、クロロホルムを加えて遠心分離し、タンパク質を除去する。

以上、5 種の精製法による結果をまとめると以下のとおりである。

- (1) 酸・塩抽出法：純度と分子量が低い。
- (2) アルカリ・塩抽出法：純度は低いが、分子量は比較的高い。
- (3) 酵素処理法：純度は高いが、分子量は低い。
- (4) 酵素処理-塩化カルシウム法：純度は高いが、収率および分子量は低い。
- (5) SDS-クロロホルム法：純度は低いが、分子量は高い。

以上の結果、酵素処理法は高純度の DNA を得ることができ、そしてタンパク質などの含有量が微量で、懸念されていた重金属類が検出限界以下であるなどの点で良好な結果であったが、機能性材料としては

- ・水溶液とした場合に若干の濁りがある
- ・分子量が低いため、薄膜の物理的強度が弱い
- ・2 本鎖 DNA 含有量が低いと推測される

などの問題点が指摘され、非常に厳しい評価であった。

4. 新機能材料に適合した DNA の精製法の確立

厳しい評価の後、研究員から「試薬なみの高分子の DNA を製造することは不可能ではないか」、「超遠心分離機なしでは無理ではないか」との意見もだが、検討した 5 種の精製法の中で酵素処理法は比較的よい結果であり、また、もっとも工業化の可能性が考えられた酵素処理法をさらに検討した。

この方法では、DNA の分子量が低いという問題点があったが、これは酵素処理中に白子自身が有するヌクレアーゼや酸によって DNA が低分子化したものと推測した。したがって、ヌクレアーゼを失活、あるいは活性を抑制する方法について検討した。その結果、pH を制御すること、あるいは EDTA またはクエン酸ナトリウムを添加することによって活性を抑制することができた。一方、DNA を沈殿させる方法については、ある試薬が酸とほぼ同等の効果があることを偶然見いだした。

これらの手法を用い、酵素処理でタンパク質を分解した後 DNA を沈殿させ、アミノ酸を上清みとともに除去することによって高分子の DNA を精製することができた。この方法は工業的見地からも有利であるとの知見を得た。工程のフローを図 1 に示す。収率は白子から約 5%、純度は約 92% (乾物換算) であった。また、アガロースゲル電気泳動での分子量測定では、分子量分布中心が約 10 kbp 程度であった。

5. DNA の乾燥方法についての検討

試薬などで販売されている DNA は凍結乾燥したものがほとんどであるが、工業的見地からは適当ではない。そこで、酵素処理法で得た DNA を凍結乾燥、減圧乾燥、または高温熱風乾燥し、外観および分子量を測定した。その結

図 1 高分子 DNA の調製法

果、凍結乾燥では色調および分子量にまったく問題がなかった。品温が 50~60℃ 程度での減圧乾燥では凍結乾燥の場合と同等に DNA を乾燥できたが、品温が 70℃ を超えると若干の着色（微黄色）が見られた。高温熱風乾燥では DNA の損傷が起こり、着色および低分子化が起こった。以上の結果より、品温が 50~60℃ 程度での減圧乾燥で、凍結乾燥と同等に DNA を乾燥できることから、生産コストは若干下がると考えられた。

6. ベンチスケールで得た DNA の評価

次に、前述の酵素処理法によるベンチスール (10~20 L) DNA の精製を行った。

得られた DNA の外観・形状は白色の繊維状であり、シグマ社 DNA とほぼ同等であった (図 2)。したがって、本研究で目的とする DNA の品質条件に近いものと考えられた。分析結果を表 1 に、アガロースゲル電気泳動パターンを図 3 に示す。純度は約 91% であり、夾雑物であるタンパク質含有量は 1.74% であった。元素分析の結果、主要成分である窒素が 14.77%, リンが 8.50%, ナトリウムが 7.03% であった。電気泳動での分子量測定結果では、分子量分布は 5~10 kbp のやや幅広いパターンではあったが、明らかに高分子量である事が確認された。水溶液は無色透明であり、シグマ社の DNA よりも透明性が高いことが確認できた。新機能材料としては、透明性や強度の面 (分子量) も良好であり、適合しているとの高い評価であった。

図 2 高分子 DNA の外観

表 1 高分子 DNA の性状

	ベンチ スケール	パイロット スケール
揮発分	6.10%	6.32%
STS-DNA%	91.29%	90.89%
タンパク質 (ローリーフォーリン法)	1.74%	1.69%
Na	7.03%	7.12%
全窒素	14.77%	14.58%
全リン	8.50%	8.51%
分子量分布中心	約 10 kbp (MW: 約 660 万)	約 10 kbp (MW: 約 660 万)

図 3 高分子 DNA 電気泳動写真

7. ベンチスケールでの再現性の検討

酵素処理法を用い、ベンチスケールでの再現性を検討した。その結果、ベンチスケールでも再現性は非常に良好であり、DNA の収率は平均で約 5.5%, 純度は 90.5~91.5% (平均して約 91% 〈乾物換算〉) であった。このことから、スケールアップしてもタンパク質の除去が問題なく行われたと考えられる。また、分子量測定結果では、分子量分布中心が約 10 kbp 程度であった。

8. パイロットスケールでの検討

これまで、ビーカースケールからベンチスケールでの検討を行い、再現性も含めて何ら問題点がなく、良好結果であった。次に、パイロットスケール (200 L) で検討した。

通常、工業規模で生産を行う場合に問題となるのがスケールアップの難しさであり、今回もこれに違わず、低分子量化が見られた。最大の原因と考えられる酵素処理の条件を再度検討した結果、酵素処理段階での pH の制御を微妙に変更することによって低分子量化を防ぐことができ、さらに、酵素処理での再現性も向上した。さらに、大量生産に向けて 1,000 L 規模で抽出から精製までの一連の工程を検証した。その結果、1,000 L 規模でも各工程で低分子量化は見られず、サケの白子 20 kg から高分子量の DNA を約 1 kg 得ることができた (図 4, 5)。

9. パイロットスケールで得た DNA の評価

パイロットスケールで得た DNA の外観は白色・繊維状であり、シグマ社 DNA とほぼ同等であり、目的とする品質に近いものと考えられた。

DNA の分析結果を表 1 に、アガロースゲル電気泳動パターンを図 3 に示す。純度は約 91%, タンパク質含有量は 1.69% であった。さらに元素分析の結果、窒素が 14.58%, リンが 8.51%, ナトリウムが 7.12% であった。また、分子量分布は 5~10 kbp とやや幅広いであったが、高分子量で

図4 アルコールにより析出した DNA (パイロットスケール)

図5 高分子 DNA (パイロットスケール)

あることが確認された。さらに、水溶液とした場合も無色透明であることが確認できた。

以上、酵素処理法で高純度かつ高分子量の DNA を得ることができ、この手法は工業的見地からも有利である。スケールアップの検討を行ったところ、ベンチスケールでは再現性も非常に良く、ほぼ同品質の DNA を得ることが可能となった。パイロットスケールでは、当初、酵素処理段

階での分子量の低下が見られたが、問題点を解決することによって分子量の低下を抑え、かつ再現性が向上した。1,000 L のパイロットスケール試験で、20 kg の白子から約 1 kg の DNA を得ることに成功し、ビーカースケールおよびベンチスケールで得た DNA と品質的には同等であった。

以上のことより、当初の目標であった、「高純度、高分子量であり、かつ機能性材料に適した DNA (高分子 DNA) の実生産レベルでの確立」は、ほぼ達成されたと考える。

10. おわりに

3 年間の研究により、高分子量 DNA の大量生産技術 (実生産レベル) はほぼ確立されたと考える。しかしながら、研究室のレベルで考えた場合、「もっと簡単にできるのではないか?」と思われる読者も多いと思う。だが実際に生産する上で重要なことがあるのもまた事実である。ひとつは設備投資の問題である。高額な設備を導入せず、既設あるいは簡単な設備で物を作り出すこと。高額な設備投資はコストにもはね返ってくる。また、製品の安全性を考え、可能な限り劇物などの薬品を使用しないこと、生産性などを考慮する必要がある。そしてもっとも重要なのが、その製品が会社にどれだけの利益をもたらすかということである。民間の企業では、どんなにより研究をして製品を作り出しても、会社の利益にならなければすべてが無駄になってしまう。そのためにも、多くの研究者がこの高分子 DNA を材料として研究され、数多くの新製品を世に送り出してくれることを期待している。

最後にこの研究を支援してくださった文部科学省 (地域先導研究事業)、ならびにご助言・ご指導をいただきました諸先生にこの場を借りて厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 澤谷拓治, 長谷川栄治, 穂苅勝利: サケ白子からの高純度デオキシリボ核酸抽出技術の開発, 北海道立工業技術センター研究報告, No. 1, 19-23 (1977)