

核酸の効率的分離を可能とする温度応答型・
静電相互作用クロマトグラフィー

(課題番号 13680955)

平成13年度～平成15年度 科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2))
研究成果報告書

平成16年3月



研究代表者 菊池明彦
(東京女子医科大学 医学部 助教授)

はしがき

本研究成果報告書は、平成 13 年度、平成 14 年度、および平成 15 年度日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）（課題番号 13680955）により行った「核酸の効率的分離のための温度応答型・静電相互作用クロマトグラフィー」に関する研究成果をまとめたものである。

本研究の遂行に当たり、東京女子医科大学医学部 岡野光夫教授、青柳隆夫助教授（現鹿児島大学教授）、早稲田大学理工学部 酒井清孝教授、および共立薬科大学薬学部 金澤秀子助教授からの助言、ご助力を得たことを付記し、ここに感謝申し上げます。

研究組織

研究代表者：菊池明彦（東京女子医科大学医学部 助教授）

交付決定額

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	900	0	900
平成 14 年度	900	0	900
平成 15 年度	1,000	0	1,000
総計	2,800	0	2,800

研究発表

（1）学会誌等

1. Jun Kobayashi, Kiyotaka Sakai, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Aqueous chromatography utilizing pH-temperature-responsive polymer as column matrix surfaces for separation of ionic bioactive compounds", *Analytical Chemistry*, **73**(9), 2027-2033 (2001).（平成 13 年 6 月）
2. Eri Ayano, Hideko Kanazawa, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Environmental responsive chromatography", *Analytical Sciences*, **17**(Suppl.), i873-i874 (2001).（平成 13 年 12 月）
3. Hideko Kanazawa, Eri Ayano, Kenichi Chiba, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Temperature-responsive chromatography – Effects of temperature gradients –", *Analytical Sciences*, **17**(Suppl.), i875-i876 (2001).（平成 13 年 12 月）
4. Hideko Kanazawa, Tatsuo Sunamoto, Eri Ayano, Yoshikazu Matsushima, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Temperature-responsive chromatography using poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel-modified silica", *Analytical Sciences*, **18**, 45-48 (2002).（平成 14 年 6 月）
5. Jun Kobayashi, Akihiko Kikuchi, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano, "Aqueous chromatography utilizing hydrophobicity-modified temperature-responsive hydrogel for stationary phases", *Journal of Chromatography A*, **958**, 109-119 (2002).（平成 14 年 7 月）
6. Kimihiro Yoshizako, Yoshikatsu Akiyama, Hidenori Yamanaka, Yasuro Shinohara, Yukio Hasegawa, Enrique Carredano, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Regulation of protein binding toward a ligand on chromatographic matrixes by masking and forced-releasing effects using thermoresponsive polymer", *Analytical Chemistry*, **76**(16), 4160-4166 (2002).（平成 14 年 8 月）
7. 菊池明彦, 岡野光夫, "分子や細胞の接着を温度変化で制御する高分子表面", *表面*, **40**(1), 1-12 (2002).（平成 14 年 4 月）
8. Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Intelligent thermoresponsive polymeric stationary phases for aqueous chromatography for biological compounds", *Progress in Polymer Science*, **27**(6), 1165-1193 (2002).（平成 14 年 6 月）
9. 菊池明彦, "細胞の接着・脱着を制御する温度応答性表面", *日本接着学会誌*, **38**(10), 382-389 (2002).（平成 14 年 10 月）
10. Hidenori Yamanaka, Kimihiro Yoshizako, Yoshikatsu Akiyama, Hiroyuki Sota, Yukio Hasegawa, Yasuro Shinohara, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Affinity chromatography with collapsibly tethered ligands", *Analytical Chemistry*, **75**(7), 1658-1663 (2003).（平成 15 年 4 月）

- Analytical Chemistry, **75**(7), 1658-1663 (2003). (平成 15 年 4 月)
11. Jun Kobayashi, Akihiko Kikuchi, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano, "Cross-linked thermoresponsive anionic polymer-grafted surfaces to separate bioactive basic peptides", Analytical Chemistry, **75**, 3244-3249 (2003). (平成 15 年 7 月)
 12. 坂本千賀子, 岡田裕司, 金澤秀子, 菊池明彦, 岡野光夫, "温度応答性クロマトグラフィーによるカテキン類の分離", 分析化学, **52**(10), 903-906 (2003). (平成 15 年 10 月)
 13. Chikako Sakamoto, Yuji Okada, Hideko Kanazawa, Eri Ayano, T. Nishimura, M. Ando, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Temperature- and pH-responsive aminopropyl silica ion-exchange columns grafted with copolymers of N-isopropylacrylamide" Journal of Chromatography A, **1030**, 247-253 (2004) (平成 16 年 3 月)
 14. 青柳隆夫, 菊池明彦, 岡野光夫, "2. インテリジェント高分子ゲルの生医学への展開", 「先端化学シリーズ III, 糖鎖 バイオマテリアル 分子認識 バイオインフォマティクス」, 日本化学会編, 丸善株式会社, 東京, 2003, p.143-149. (平成 15 年 3 月)
 15. 菊池明彦, 岡野光夫, "水系で生理活性物質を分離するグリーンクロマトグラフィー", バイオマテリアル-生体材料-, **21**(2), 133-141 (2003). (平成 15 年 3 月)
 16. 菊池明彦, "インテリジェント表面", バイオマテリアル-生体材料-, **21**(3), 214-215 (2003). (平成 15 年 5 月)
 17. Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Temperature-responsive polymer-modified surfaces for green chromatography", Macromolecular Symposia, **207**(1), 217-228 (2004). (平成 16 年 3 月)
 18. 菊池明彦, "IV-1. 感温性クロマトグラフィーの創製", 「ナノバイオエンジニアリングマテリアル-バイオインターフェイス・ナノバイオプロセッシング・バイオコンジュゲーション・バイオマトリックス-」, 石原一彦 監修, フロンティア出版, 東京 pp.265-274 (2004). (平成 16 年 3 月)
 19. 菊池明彦, "第 3 編第 5 章 8 節 バイオセパレーション", 「高分子材料・技術総覧」, 高分子材料・技術総覧編集委員会 編, 産業技術サービスセンター, 東京 (2004). In press. (印刷中)

(2) 口頭発表

1. 化学工学会第66年会 2001.4.2-4 広島
 - 1) 小林純, 岩佐武, 山下知丈, 菊池明彦, 酒井清孝, 岡野光夫, "表面荷電密度を温度で制御するカチオン性クロマトグラフィーを用いた生理活性物質の分離", 講演要旨集CD-ROM, M101 (2001).
2. 第 50 回高分子学会年次大会 2001.5.23-25 大阪
 - 1) 小林 純・山下知丈・菊池明彦・酒井清孝・岡野光夫, "カチオン性温度応答型クロマトグラフィーによるオリゴヌクレオチドの分離", 予稿集, **50**(5), 1062 (2001).
3. 25th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques 2001.6.17-22 Mastricht (オランダ)
 - 1) Eri Ayano, Hideko Kanazawa, Yoshikazu Matsushima, Nobuharu Takai, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Separation of Oligonucleotides by temperature-responsive chromatography", Abstracts, 259
 - 2) ~~H(2001)~~ Kanazawa, Eri Ayano, Yoshikazu Matsushima, Nobuharu Takai, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Effects of temperature gradient on temperature-responsive chromatography", Abstracts, 107 (2001).
4. 第 14 回バイオメディカル分析科学シンポジウム 2001.7.11-13 松島
 - 1) 坂本千賀子・綾野絵理・金澤秀子・菊池明彦・岡野光夫, "温度応答性クロマトグラフィーによる核酸の分離", 講演要旨集, 131-132 (2001).
5. 第 8 回クロマトグラフィーシンポジウム 「21 世紀の分離検出科学と機能ゲノミクス」 2001.7
 - 1) 綾野絵理・金澤秀子・松島美一・高井信治・菊池明彦・岡野光夫, "温度応答性とクロマトグラフィーによるオリゴヌクレオチドの分離", J. Separation Detect. Sci., **22**, 19-20 (2001).
6. IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2001.8.6-10 東京
 - 1) Akihiko Kikuchi, Takeshi Iwasa, Jun Kobayashi, Kiyotaka, Sakai, Teruo Okano, "Separation of adenine nucleotide using thermoresponsive cationic polymer-modified columns", Program and Abstracts, 173 (2001).
 - 2) Eri Ayano, Hideko Kanazawa, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Environmental responsive

- chromatography”, Program and Abstracts, 242 (2001).
- 3) Hideko Kanazawa, Eri Ayano, Kenichi Chiba, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, “Temperature-responsive chromatography. – Effects of temperature gradient”, Program and Abstracts, 243 (2001).
 - 4) Jun Kobayashi, Akihiko Kikuchi, Kiyotaka, Sakai, Teruo Okano, “Aqueous chromatography utilizing thermoresponsive polymer - modified column matrices for separation of bioactive peptides”, Program and Abstracts, 287 (2001).
7. 第50回高分子討論会 2001.9.12-14 東京
 - 1) 小林 純・菊池明彦・酒井清孝・青柳隆夫・岡野光夫, “構造設計された新規モノマーを有する感温性ポリマー修飾界面上での生理活性物質の分離”, 高分子学会予稿集, **50**(12), 3208 (2001).
 - 2) 菊池明彦・津田行子・大和雅之・岡野光夫, “転移温度の異なる温度応答性高分子修飾表面の調製”, 高分子学会予稿集, **50**(12), 3541-3542 (2001).
 8. 日本医工学治療学会第17回学術大会 2001.9.14-15 東京
 - 1) 小林 純, 山下知丈, 菊池明彦, 酒井清孝, 岡野光夫, “オリゴヌクレオチドを分離する温度応答型カチオン性クロマトグラフィー”, 抄録集, **13**(Suppl. 2), 129 (2001).
 9. 第45回日本薬学会関東支部大会 2001.10.13 東京
 - 1) 綾野絵理・金澤秀子・松島美一・菊池明彦・岡野光夫, “環境応答性ポリマーを用いた高機能表面による新規分離法の開発”, 講演要旨集, 24 (2001).
 10. 第11回インテリジェント材料シンポジウム 2002. 03. 14 東京
 - 1) 小林 純, 菊池明彦, 酒井清孝, 岡野光夫, “温度応答性インテリジェント界面と生理活性物質との相互作用” 要旨集, 76-77 (2002).
 11. 第51回高分子学会年次会 2002. 05. 29-31 横浜
 - 1) 小林 純, 菊池明彦, 酒井清孝, 岡野光夫, “イオン性温度高分子を修飾した表面と生理活性物質との相互作用に与える温度効果とグラフト化構造の影響”, 予稿集, **51**(5), 964 (2002).
 - 2) 菊池明彦, 岡野光夫, 赤田優子, 牧野公子, 大島広行, “細胞吸・脱着に及ぼす温度応答性高分子の表面導入構造の影響”, 予稿集, **51**(5), 965 (2002).
 11. 第9回クロマトグラフィーシンポジウム 2002. 06. 14-15 豊橋
 - 1) 岡田裕司, 坂本千賀子, 綾野絵理, 金澤秀子, 菊池明彦, 岡野光夫, “感温性高分子を修飾した充填材表面の温度応答性の研究”, 予稿集, 85-86 (2002).
 - 2) 坂本千賀子, 綾野絵理, 金澤秀子, 菊池明彦, 岡野光夫, “環境応答性クロマトグラフィーにおけるカラムサイズの効果”, 予稿集, 87-88 (2002).
 12. 第51回高分子討論会 2002. 10. 02-04 九州
 - 1) 秋山義勝, 菊池明彦, 岡野光夫, 吉廻公博, 山中秀徳, 篠原康郎, 長谷川幸雄, Carredano Enrique, “熱応答性高分子を用いたアフィニティー制御型、新規クロマトグラフィー担体の開発”, 予稿集, **51**(12), 3033-3034 (2002).
 - 2) 小林 純, 菊池明彦, 酒井清孝, 岡野光夫, “固相表面上に形成したイオン性・温度応答性ゲル界面と生理活性物質との相互関係” 予稿集, **51**(12), 3318-3319 (2002).
 13. Gels, Genes, Grafts & Giants Transitioning Biomaterials in the 21st Century 2002. 12. 17-20 Hawaii
 - 1) A. Kikuchi, T. Okano, “Thermo-responsive interfaces for separation of biological compounds”, Abstract, 120 (2002).
 14. 第22回キャピラリー電気泳動シンポジウム 2002. 12. 04-06. 東京
 - 1) 岡野光夫, 菊池明彦, “インテリジェントナノ界面とバイオセパレーション”, 要旨集, 15-16 (2002).
 15. 日本薬学会 2003. 3. 27-29 長崎
 - 1) 坂本千賀子, 小野佑花, 金澤秀子, 菊池明彦, 岡野光夫, “環境応答性クロマトグラフィーによる医薬品の分離”, 要旨集 3, 39 (2003).
 - 2) 岡田裕治, 綾野絵理, 坂本千賀子, 金澤秀子, 西村哲治, 安藤正典, 菊池明彦, 岡野光夫, “温度応答性クロマトグラフィーを用いたチトクロームP450プローブ薬物およびその代謝物の分離”, 要旨集 3, 39 (2003).
 16. The First International Congress on Bio-Nanointerface 2003. 5. 19-24 Tokyo
 - 1) A. Kikuchi, J. Kobayashi, N. Idota, K. Sakai, H. Kanazawa, T. Okano, “Fabrication of thermo-responsive surface for green chromatography”, Abstracts, 42 (2003)

17. 第 52 回(2003 年)高分子学会年次大会 2003. 5. 28-30 名古屋
- 1) 井戸田直和, 小林純, 菊池明彦, 酒井清孝, 岡野光夫, “温度応答性キャピラリー表面と生理活性物質との相互作用の検討”, 高分子学会予稿集, **52(4)**, 788 (2003)
 - 2) 遠藤哲也, 小林純, 秋山義勝, 菊池明彦, 酒井清孝, 岡野光夫, “温度応答性金属アフィニティー表面の作製”, 高分子予稿集, **52(5)**, 1148 (2003)
18. 第 32 回医用高分子シンポジウム 2003.07.31-08.01 東京
- 1) 井戸田直和, 小林純, 菊池明彦, 酒井清孝, 岡野光夫, “ぬれを大きく変化させる温度応答性キャピラリーの作製と生体分子との相互作用制御”, 要旨集, 23-24 (2003)
19. 第 10 回クロマトグラフィーシンポジウム分離法と質量分析」 2003.08.02-03 東京
- 1) 坂本千賀子, 岡田裕司, 金澤秀子, 菊池明彦, 岡野光夫, “機能性高分子による高機能表面の医薬品分離への応用”, *Chromatography*, **24**. (suppl. 1) 1 (2003)
20. 第 16 回バイオメディカル分析化学シンポジウム 2003.08.03-05 静岡
- 1) 坂本千賀子, 飯塚元気, 金澤秀子, 菊池明彦, 岡野光夫, “環境応答性クロマトグラフィーを用いた生理活性物質の分離”, 要旨集, 138 (2003)
 - 2) 岡田裕司, 永野美和子, 金澤秀子, 菊池明彦, 岡野光夫, “機能性高分子を用いた温度制御型クロマトグラフィーによる医薬品の分析”, 要旨集, 140 (2003)
21. 日本分析化学会第 52 年会 2003.09.23-25 宮城
- 1) 綾野絵里, 岡田裕司, 坂本千賀子, 金澤秀子, 菊池明彦, 岡野光夫, 西村哲治, 安藤正典, “温度応答性クロマトグラフィーによるスルホニルウレア系農薬の分析”, 要旨集, 43 (2003)
 - 2) 坂本千賀子, 飯塚元気, 金澤秀子, 菊池明彦, 岡野光夫, “環境応答性高分子を用いた高機能表面による分離システムの開発と応用”, 要旨集, 36 (2003)
 - 3) 岡田裕司, 永野美和子, 金澤秀子, 菊池明彦, 岡野光夫, “温度応答性クロマトグラフィーを用いた薬物代謝酵素 (チトクローム P450) のプローブ薬およびその代謝物の分析”, 要旨集, 269 (2003)
22. 第 52 回 (2003) 高分子討論会 2003.09.24-26 山口
- 1) 遠藤哲也, 菊池明彦, 小林純, 酒井清孝, 岡野光夫, “温度応答性を付与した新規金属アフィニティークロマト担体の作製とタンパク質分離”, 予稿集, **52(14)**, 4031-4032 (2003)
 - 2) 井戸田直和, 菊池明彦, 小林純, 酒井清孝, 岡野光夫, “Microfluidics を利用した温度応答性表面と生理活性物質との相互作用の特性の評価”, 予稿集, **52(14)**, 4041-4042 (2003)
23. ISSP International Workshop 5th Gel Symposium Polymer Gels; Fundamentals and Nano-Fabrications (GelSympo 2003) 2003.11.17-21 Kashiwa
- 1) Naokazu Idota, Akihiko Kikuchi, Jun Kobayashi, Kiyotaka Sakai and Teruo Okano, “Preparation of thermoresponsive hydrogel-grafted capillary tubings for elution control of hydrophobic bioactive compounds”, Program, 122 (2003)
24. 21COE「実践的ナノ化学」国際シンポジウム 早稲田大学 2003 2003.12.10-11 東京
- 1) 井戸田直和, 菊池明彦, 小林純, 酒井清孝, 岡野光夫, “マイクロ温度応答性 LC を目指したインテリジェントキャピラリー表面の調製”, プログラム, 103 (2003)
25. 第 25 回日本バイオマテリアル学会大会 2003.12.16-17 大阪
- 1) 井戸田直和, 菊池明彦, 小林純, 酒井清孝, 岡野光夫, “水系マイクロ LC 分離を目指した温度応答性高分子修飾キャピラリーの調製”, 予稿集, 361 (2003)
26. 第 13 回インテリジェント材料/システムシンポジウム 2004.3.8 東京
- 1) 井戸田直和, 菊池明彦, 小林純, 酒井清孝, 岡野光夫, “微小空間における温度応答性インテリジェント界面と生理活性物質との相互作用解析”, 講演要旨集, 32-33 (2004)
27. 日本薬学会第 124 年会 2004. 3.29-21 大阪
- 1) 坂本千賀子, 岡田裕司, 永野美和子, 飯塚元気, 菊池明彦, 岡野光夫, 金澤秀子, “温度応答性クロマトグラフィーによる CYP 分子種プローブ薬物の分離”, 29【P1】I-229 (2004)
 - 2) 綾野絵理, 岡田裕司, 坂本千賀子, 金澤秀子, 菊池明彦, 岡野光夫, 西村哲治, 安藤正典, “温度応答性クロマトグラフィー/質量分析法を用いた親水性農薬およびその塩素処理生成物の検討”, 29【P1】II-150 (2004)

特になし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

特になし

I. 序論

国際的な研究プロジェクトの結果、ヒトゲノムの解読が終了し、今後は、遺伝子産物であるペプチド、タンパク質生成物、あるいは遺伝子治療のための種々DNA、RNA、アンチセンス化合物や細胞を分析、治療のために利用する研究が展開され始めている。これらの生理活性物質の分離には、通常、有機溶媒と水系溶媒との混合溶媒を用い、その組成を変化させながらオクタデシルシリカ(ODS)カラム中で、分離を行う、あるいは、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法などが組み合わされて用いられる。たとえば逆相クロマトグラフィーでは、分離に有機溶媒を用いるが、タンパク質や細胞など、水系で高次構造を持ってその機能を発現する成分では、有機溶媒によりその構造変化が生起し、ときには水系環境に戻しても元々の高次構造にまで戻ることがなく、失活してしまうことがある。この問題は、イオン交換クロマトグラフィーやアフィニティークロマトグラフィーでも考慮しなければならない重要な課題となっている。

一方、これらの生理活性物質の多くは体内で水系溶媒中に溶存し、存在することから、水系できわめて穏和な条件で分離・精製することが可能となると、このシステムは、生物学、生化学、分析化学などの基礎分野ばかりでなく、医薬品開発や臨床での生体試料の分析に強力なツールとなるであろう。

我々は、これまでに水溶液中で温度変化にตอบสนองして 32℃を境に水溶性を大きく変化させる温度応答性高分子のポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm)(1, 2)を用い、ナノメートルレベルの厚みで、さまざまなグラフト構造を有する表面、界面を調製し、これら表面の温度変化にตอบสนองした特性を解析してきている(3-6)。さらに、温度応答性 PIPAAm をシリカビーズ表面に修飾、この修飾ビーズをステンレス製カラムに充填し、水系で、温度のみを変化させながら PIPAAm の疎水性を変化させ、疎水性の異なる種々生理活性物質の分離を検討してきた(7)。この過程で、PIPAAm 修飾表面の疎水性と、ステロイドなどの疎水性生理活性物質との相互作用が密接な相関があり、疎水性の高いステロイドほど 32℃以上で疎水化した PIPAAm 表面と強い相互作用をすることが明らかとなった。一方、PIPAAm が水和・伸展した 32℃以下ではステロイドはほとんど相互作用しなかった。PIPAAm に疎水性ユニットとして *n*-ブチルメタクリレート(BMA)を導入し、温度応答性分子の疎水性を制御すると、より低温でも疎水性の高い生理活性物質と相互作用が発現し、温度変化に伴う保持時間の制御が可能であった(8, 9)。ところが、疎水性の高い物質では、保持時間の延長により適切な時間内に効率的な分離を行えないこともあるために、温度をステップ状に変化させ表面物性を制御して分離を行う手法を確立した。すなわち、まず高温側で疎水性の比較的小さな生理活性物質をそれぞれ分離後、直ちにカラム温度を下げ、疎水性の高い生理活性物質と PIPAAm 表面の相互作用を小さくしこれらの溶出を早めることが可能であることを実証した。すなわち、通常の逆相クロマトグラフィーで見られる溶離液組成を変化させ、溶離液の極性と試料の分配を制御して分離するグラジエント溶離と同様の、温度のステップグラジエントに基づく溶離を実現できることが明らかとなった。このことはすなわち、PIPAAm 修飾表面で、水中、温度のみの制御を通じ、PIPAAm グラフト鎖の水和状態と極性を動的に制御し、疎水性生理活性物質との疎水性相互作用を動的に制御して分離を行うことが可能となったことを示す。この手法で、分子量が 3,000 程度のポリペプチドである、インスリン A 鎖、インスリン B 鎖、 β -エンドルフィンフラグメント (アミノ酸残基 1-27) の混合物を注入すると成分毎に単一のピークとして回収できた。このとき、溶出した順序は、ペプチド鎖中の疎水性アミノ酸残基数に着目すると、疎水性アミノ酸残基数が多いほど溶出が遅延したことが判明した。すなわち、分子量が 3,000 程度のポリペプチドでは、連鎖中の疎水性アミノ酸残基数の多いほど高温で疎水性となった PIPAAm 表面と強く相互作用し、保持時間が延長し、この違いによって水中で分離を達成できることが明らかとなった(8, 9)。

一方、分離・分析対象となる生理活性物質の多くは、核酸類やペプチド、タンパク質などで代表される種々バイオ分子であり、これらは、疎水性残基ばかりでなく、正負の荷電基を併せ持つ。このような荷電基成分の分離には、温度応答性表面に、温度変化に伴い、荷電バランス、密度が制御できるような表面設計を導入することで解決可能であると考えた。すなわち、IPAAm にカルボキシル基やアミノ基のような荷電基を有するモノマーを共重合させ荷電性温度応答性高分子を調製し、温度変化のみで IPAAm 連鎖の親水性/疎水性変化に伴って荷電基の解離度が変化し、材料全体の荷電密度が変化する材料設計を意図した。

本研究では、この荷電性/温度応答性高分子を固定した表面を調製し、この表面が、温度変化に伴って示す諸種物性変化を明らかとするとともに、本表面をクロマト担体に導入し、種々荷電性生理活性物質との相互作用特性に与える影響を検討した。特に、アミノ基を導入し正荷電を有する温度応答性高分子修飾担体を用い、ヌクレオチド類の分離特性を検討した。本検討を通じ、核酸類の分離に与える荷電性温度応答性表面の特性を明らかとすることを目的とした。

II. 実験方法

1. カチオン性温度応答性水溶性高分子の調製

1-1. 温度応答性高分子の合成： *N*-イソプロピルアクリルアミド(IPAAm)とアクリル酸(AAc)、あるいは *N,N*-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド(DMAPAA)を疎水性モノマーの *t*-ブチルアクリルアミド(*t*-BAAm)、あるいは *n*-ブチルメタクリレート(BMA)の存在下、テトラヒドロフラン(THF)溶液中で、*N,N'*-アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)を開始剤として 70°Cで2時間ラジカル重合した。反応溶液を 10 倍量のジエチルエーテルに滴下し、コポリマーを再沈殿した。次に、分子量分画 500 の透析膜を用い、水中で 3 日間透析溶液を凍結乾燥機を凍結乾燥し、精製コポリマーを得た。構造式を Figure 1a に示す。

1-2. 温度応答性高分子の特性解析：上記の重合で得られた高分子の分子量はゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC：東ソー、SC-8020 システム)により、10mM LiCl を含む *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)を溶離液に用い 45°Cで解析した。あらかじめ標準ポリエチレングリコール(PEG)を用い作成した検量線を用い、数平均分子量(M_n)、重量平均分子量(M_w)、ならびに分子量分布指数(M_w/M_n)を算出した。

合成した高分子の下限臨界溶液温度(LCST)は、1.0wt%のポリマー水溶液を用い、紫外・可視分光光度計(V-530, 日本分光工業株式会社)を用い、セル内温度をペルチェ素子で 1.0°C/min で制御しながら連続的に変化させ、500nm における透過率変化を連続的にモニターした。得られた透過率変化曲線から、透過率が 90%となる温度を LCST と規定した。

コポリマー中のアミノ基の定量：1-1.で

調製した三元共重合体中のアミノ基含有量は、酸-塩基滴定により求めることができる。すなわち、コポリマー 0.1g を 0.1N 塩酸 5mL と、イオン交換蒸留水 20mL に溶解した。これによりコポリマー中のすべてのアミノ基をプロトン化させ、これを標定した 0.05N NaOH 水溶液で滴定した。滴定は 5°C、窒素気流下で空気中の炭酸ガスによる影響を減じるようにした。本滴定曲線の中和点からコポリマー中のアミノ基含有量を定量するとともに、Henderson-Hasselbalch 式から、酸解離定数指数の pK_a と酸解離度 α との相関を明らかとし、さらに、見かけの pK_a を算出した。

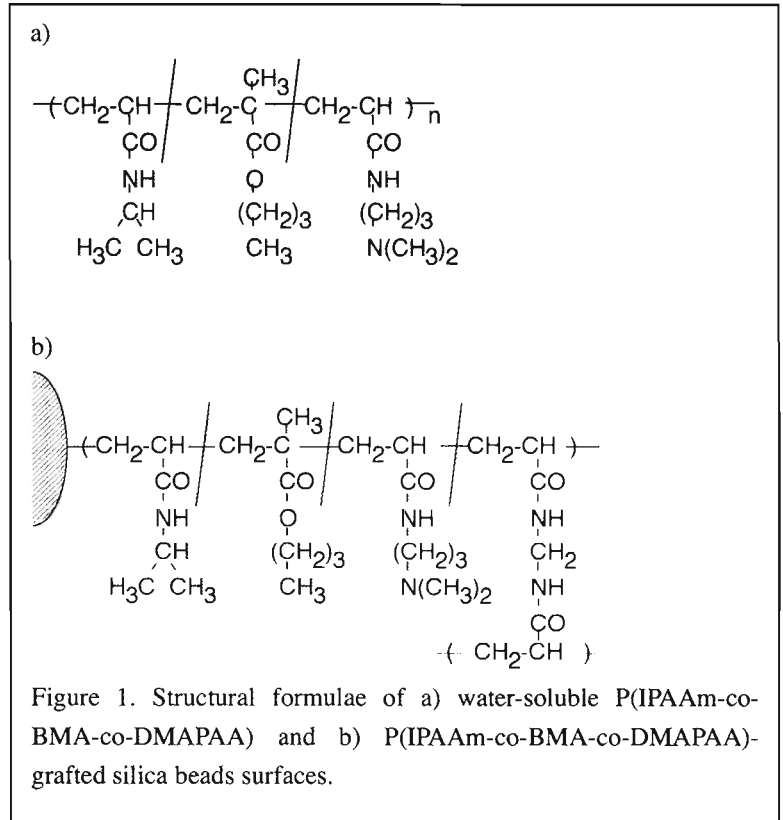
$$pH = pK_a + \log(\alpha/(1-\alpha))$$

(1)

ここで、 $\alpha=0.5$ のとき、 $pH=pK_a$ となり、見かけの pK_a が求められる。

2. カチオン性温度応答性ハイドロゲルを修飾したシリカビーズの調製

2-1. アミノシリカビーズ表面へのラジカル重合開始剤の固定(10, 11)：1級アミノ基を有するアミノプロピルシリカビーズ(平均粒径 5 μ m、細孔径 120 Å、西尾工業製)に、カルボキシル基を有するラジカル重合開始剤；4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)を固定した。すなわち、アミノプロピルシリカビーズ 5g を DMF 中に分散させ、ここに脱水縮合剤の 1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリン(EEDQ) 3.7g を溶解させた。ここに、4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸) 2.1g の DMF 溶液 50mL を滴下し、連続的に攪拌、24 時間反応させた。これによりアミド結合を介して開始剤を表面に導入したシリカビーズを調製した。開始剤の導入されなかったアミノ基を sulfo-SDTB と反応から定量し、開始剤導入率を算出した。*N*-スクシンイミジル-4-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)ブチレート(sulfo-SDTB)(12)は、1級アミノ基と特異的に反応する。ここに過塩素酸などの強酸を加えるとジメトキシトリチルカチオンが遊離し、これは $\lambda=498$ nm でのモル吸光係数 ($\epsilon=70,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) が大きいために微量でもアミノ基を定量できる手法として利用できる。そこで、シリカビーズ表面のアミノ基とアルカリ条件で反応させ、ジメトキシトリチルカチオンを遊離させ、これを定量する



ことで、残存アミノ基の定量を行った。

2-2.重合開始剤導入シリカビーズ表面上でのカチオン性温度応答性カチオン性ハイドロゲルの調製：開始剤導入シリカビーズ 2.5g をナス型フラスコに秤量し、エタノール 100mL に IPAAm、BMA、DMPAA を架橋剤のメチレンビスアクリルアミド(MBAAm)とともに溶解し、これをフラスコに加えた。この溶液を凍結-融解法により脱気し、最終的に窒素雰囲気下で 70°C、15 時間攪拌、反応させた。このとき、シリカビーズ表面に導入したラジカル開始剤により重合が開始され、きわめて薄層のカチオン性温度応答性カチオン性ハイドロゲル修飾ビーズが調製できる。対照として、IPAAm ゲルを固定した表面をあわせて調製した。ハイドロゲル修飾ビーズをメタノールで繰り返し洗浄し、未反応モノマーと未固定ポリマーを除去した。P(IPAAm-co-BMA-co-DMPAA)修飾シリカビーズの模式図を Figure 1b に示す。

2-3.カチオン性温度応答性カチオン性ハイドロゲル修飾ビーズの表面電位：2-2.で調製したカチオン性ハイドロゲル修飾ビーズの表面電位を、電気泳動光散乱光度計(ELS-8000、大塚電子株式会社)で平板セルを用い、10mMKCl 溶液中に分散させたコポリマー修飾シリカビーズを平板セル内に導入し、外部電場 E を作用させた。このとき、シリカビーズの移動度と印加電圧との関係から Smoluchowski 式を用い、表面電位(ζ ポテンシャル)を算出した。

$$U_p = v/E = \epsilon\zeta/(4\pi\eta) \quad (2)$$

ここで、 ϵ は媒体の誘電率、 ζ はゼータ電位、E は電場、 η は媒体の粘性率、をそれぞれ表す。このとき、環境温度を循環恒温水槽で制御し、温度変化に反応した表面電位変化を解析した。

3. カチオン性温度応答性カラムを用いた水系 HPLC システムによるヌクレオチド類の分離

3-1.カチオン性温度応答性ハイドロゲル修飾ビーズの充填：温度応答性カチオン性ハイドロゲル修飾ビーズのステンレスカラム(150mm x 4.6mm i.d)への充填は、湿式充填法により行った。修飾シリカビーズ約 2.2g を水/メタノール溶液(1:1(v/v))中、粘性の高いスラリー状にした。ステンレスカラム、フィルター、パッカーを接続し、カラム内を水/メタノール溶液で満たし、パッカーに充填剤スラリーを入れ、HPLC ポンプで、350kg/cm²の定圧下、50 分間で充填した。つづいて、0.5mL/min でカラム内にイオン交換蒸留水を 24 時間通液し、カラム内の溶媒を蒸留水に置換した。

3-2.カチオン性温度応答性ハイドロゲル修飾シリカビーズを充填したカラムの HPLC システムの構築：上記 3-1.で調製したカラムをウォータージャケット内に固定し、これを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)システム(日本分光)に接続した。カラム温度は、Coolnics 循環恒温水槽(CTE42A、KOMATSU-Yamato)で所定温度となった水をカラムジャケット内に向流で循環させ、制御した。カラム流出分を紫外・可視(UV/Vis)分光光度計で吸光度を測定し、クロマトグラムを得た。本実験の解析では、日本分光製の Borwin(Ver.1.1)を用いた。このとき、溶離液は KCl でイオン強度を 0.1 とした Na₂PO₄/クエン酸緩衝液を用い、流速を 0.5mL/min で HPLC システムに送液した。試料の検出は、254nm における吸光度を用いた。

3-3.カチオン性温度応答性ハイドロゲル修飾ビーズ充填カラムとヌクレオチド類の相互作用の解析：溶離液の pH を 7.0 の場合、ならびに 3.0 の場合とで、それぞれ、リン酸基数の異なる 3 種類のアデノシンヌクレオチド (アデノシン-5'-リン酸(AMP)、アデノシン-5'-二リン酸(ADP)、アデノシン-5'-三リン酸(ATP)) を溶解させ、それぞれのカチオン性温度応答性ハイドロゲル修飾ビーズ充填カラムへの保持挙動を解析した。つぎに、塩基構造の異なる 4 種類のモノヌクレオチド類 (AMP、TMP、UMP、GMP、CMP) をそれぞれの溶離液に溶解させ、カラムに注入後の保持挙動を温度を変化させながら解析した。さらに、繰り返し数を 2 から 5 で変化させたアデノシンオリゴヌクレオチド(p(dA)n)、チミジンオリゴヌクレオチド(p(dT)n)を用い、これらのカチオン性温度応答性ハイドロゲル修飾ビーズ充填カラムへの保持挙動を解析した。以上より、温度変化に伴う、荷電密度変化が表面物性に与える効果を検証するとともに、より効率的な分離手法の構築概念を議論した。

III. 結果と考察

1. P(IPAAm-co-BMA-co-DMPAA)の合成と特性解析

1-1.P(IPAAm-co-BMA-co-DMPAA)の合成：まず、シリカビーズ担体に修飾するカチオン性温度応答性高分子の特性解析を行うために、水溶性高分子をラジカル重合により調製した。合成結果を Table 1 に示す。

Table 1. Preparation of P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA) and P(IPAAm-co-DMAPAA).^{a)}

Sample	Feed Composition				Yield (%)
	IPAAm (g)	BMA (g)	DMAPAA (g)	DMAPAA (mol%)	
IBD10 ^{b)}	2.41896	0.1600	0.3903	10	16.8
IBD20 ^{b)}	2.1501	0.1422	0.7815	20	22.1
ID20 ^{c)}	2.2632	0.00	0.7812	20	24.6

a) Solvent: THF 17.5mL, Initiator: AIBN 0.0058g (20mM)

b) IPAAm/BMA = 95/5(mol/mol), c) BMA 0 mol%

いずれにおいても収率が 20%程度であり、仕込み組成に従って高分子がラジカル重合により合成されたと考えた。

1-2.P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)の分子量測定：ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)装置を用い、1-1.で合成した高分子の分子量を測定した(Table 2)。

Table 2. Molecular weights of the prepared P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA) and P(IPAAm-co-DMAPAA) determined by GPC.

Sample	Mn	Mw	Mw/Mn
IBD10	7.08×10^4	1.07×10^5	1.52
IBD20	7.25×10^4	1.07×10^5	1.47
ID20	6.03×10^4	1.03×10^5	1.72

いずれの組成のコポリマーもほぼ同じ分子量、分子量分布で得られた。

1-3.P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)の温度変化に応答した溶解挙動と下限臨界溶液温度(LCST)の測定：上記で合成したコポリマーの 1.0wt%水溶液を用い、ペルチェ素子によるセル温度の制御を行いながら、溶液に対する 500nm の可視光の透過度を測定した。結果を Figure 2 に示す。いずれの高分子も低温で透過率は 100% を示し、完全に水溶性であることがわかる。この溶液を加温していくといずれの高分子でも狭い温度範囲できわめて大きな透過率変化を示した。IPAAm とアミノ基含有モノマーとの共重合体では、10mol%で共重合しただけで PIPAAm の 32°C から 40°C 近くまで上昇した。アミノ基含有モノマーの含有量が 20mol%と倍増すると透過率が大きく変化する温度は 45°C にまで上がった。一方、この共重合体に疎水性の BMA を共重合で導入すると、透過率変化を生起する温度は 10mol%では PIPAAm よりわずかに減少し、20mol%の共重合でもアミノ基含有モノマーのみを共重合させた場合に比して転移温度の増加は抑制された。すなわち、疎水性の BMA の導入によって高分子全体の水和が抑制された結果、転移温度が低下したものと考えられた。DMAPAA20mol%導入すると、BMA による疎水性相互作用とアミノ基近傍のイオン性水和とのバランスで転移温度が PIPAAm よりも上昇したものの、DMAPAA10mol%のみを共重合した高分子よりも低温側で相転移変化を示したと考えた。Figure 2 の各透

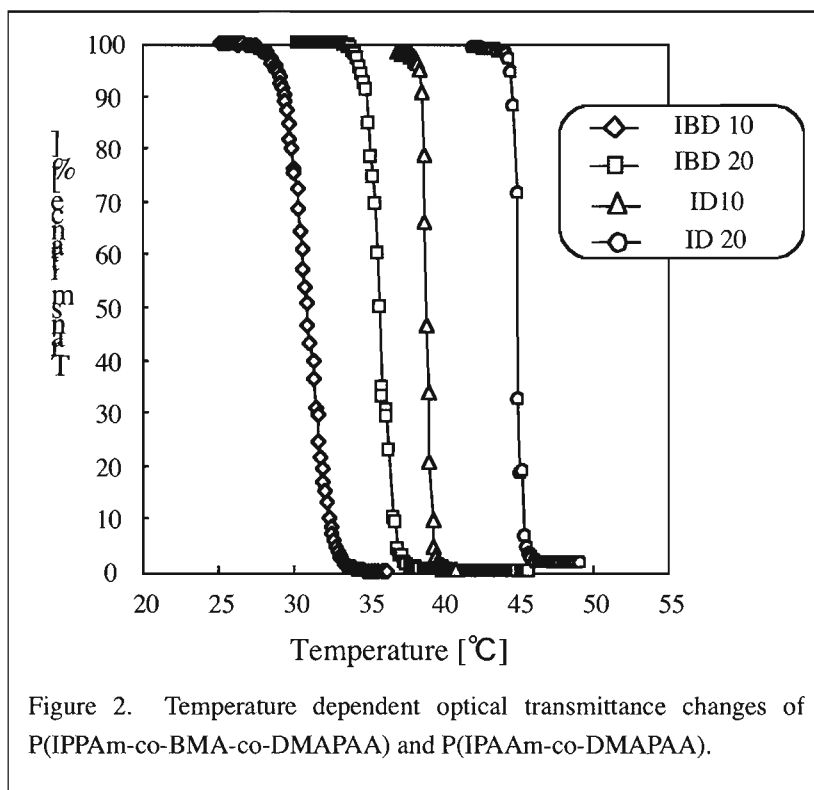


Figure 2. Temperature dependent optical transmittance changes of P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA) and P(IPAAm-co-DMAPAA).

過率曲線で、透過率が 90%となる温度を調べ、これを各高分子の LCST とした (Table 3)。

Table 3. Lower critical solution temperature (LCST) values of the prepared copolymers determined at 90% of transmittance.

Sample code	LCST (°C) ¹⁾
ID10	29.5
ID20	35.1
IBD10	38.7
IBD20	44.7

Table 3 より明らかなように、BMA の添加によってカチオン性のアミノ基を含有する高分子でもその転移温度を 10°C 近く低く抑えられることが示された。

1-4.P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)の組成解析とアミノ基の pKa 値の決定：¹H-NMR と中和滴定により、三元共重合体である P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)の組成を決定した。まず、DMAPAA 由来のアミノ基含有量を滴定曲線から決定した。続いて、¹H-NMR スペクトルから IPAAm 側鎖のイソプロピル基に存在するメチンプロトン(4.0ppm)と BMA 主鎖のメチルプロトン(1.0ppm)とのピークの比較をして、IPAAm に対する BMA の組成比を決定した。これらをもとに、共重合組成を決定した。結果を Table 4 に示す。

Table 4. Composition of P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA) copolymers and their apparent pKa values.

Sample code	IPAAm:BMA:DMAPAA (mol ratio)		Apparent pKa ²⁾
	In feed	Obtained ¹⁾	
IBD10	85.5:4.5:10.0	86.8:4.3:8.9	9.12
IBD20	76.0:4.0:20.0	82.3:3.0:14.7	9.13
DMAPAA	-	-	10.35

1) Determined by acid-base titration and ¹H-NMR measurements.

2) Determined by acid-base titration at 5°C.

共重合体では、仕込み組成よりもアミノ基が多少少なめになっているものの、組成の異なる共重合体が調製されたことが明らかである。さらに、滴定曲線からアミノ基の見かけの pKa を決定すると、モノマーの DMAPAA では、塩基性が高かったのに対し、共重合体にすることで、その組成によらず、pKa 値は 1 単位低下した。本測定は 5°C 溶液中で行ったので共重合体は完全に溶解状態にあるにもかかわらず pKa 値の低下が観察されたのは、共重合によって DMAPAA アミノ基の周囲環境がモノマーの場合と比して疎水性側に变化したことを示唆する。すなわち、疎水性モノマーである BMA や、低温で疎水性水和する IPAAm 側鎖がアミノ基近傍に存在するために、アミノ基周囲の疎水性が増大したと考えられた。

2. P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)ゲルを表面固定したシリカビーズの調製とその特性解析

2-1.シリカビーズ表面へのラジカル重合開始剤の導入：シリカビーズ表面への P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)ゲルの固定に先立ち、ラジカル重合開始剤を、表面アミノ基とアミド結合を介して導入した。反応前後のシリカビーズ表面アミノ基を sulfo-SDTB 法で定量したところ、アミノシリカビーズ表面にあった 370μmol/g が、開始剤導入後に 54.0μmol/g に減少した。この結果からアミノ基の 85.4%が反応で消費されたと計算され、開始剤が十分量導入されたと考え、以下の実験を進めた。

2-2.PIPAAm および、P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)ゲルを固定したシリカビーズの調製：シリカビーズ表面に導入した開始剤から、IPAAm モノマー、あるいは BMA、DMAPAA を共重合させた薄層ゲルで被覆されたシリカビーズを調製した。仕込み組成を Table 5 に示す。

Table 5. Preparation of PIPAAm hydrogel, and/or P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA) hydrogel grafted silica

beads. Sample code	Feed composition					Solvent: ethanol (mL)
	Silica beads (g)	IPAAm (g)	BMA (g)	DMAPAA (g)	MBAAm (g)	
IBD7.5G ^{a)}	2.50	8.55	0.45	1.00	0.10	100
ID20G ^{b)}	5.00	14.9	0.0	5.13	0.252	200
PIPAAmG	5.00	20.0	0.0	0.0	0.136	200

a) DMAPAA 7.5mol%, IPAAm/BMA = 96/4 (mol/mol)

b) DMAPAA 20mol%, IPAAm/BMA = 95/5 (mol/mol)

作製したいずれの系においても溶液中に重合した高分子が確認できたことから、ゲル表面でも重合が生じたと考え、表面電位変化測定から、表面物性を明らかとした。

2-3. 作製した温度応答性高分子ゲル修飾シリカビーズの表面電位(ζ -potential)測定：電気泳動光散乱装置を用い、作製したカチオン性温度応答性高分子ゲル修飾シリカビーズの、温度変化に応答した表面電位変化を測定セル内の温度を循環恒温水槽で変化させながら測定し、解析した。その結果を Figure 3 に示す。PIPAAm

ゲル表面では、低温側でわずかに負に荷電している。PIPAAm 自体は非イオン性的高分子であるため表面電位は 0 となると考えられるが、表面電位測定で用いる溶媒に 10mMNaCl を添加するために、溶液からの Cl⁻イオンの吸着が起こり、表面電位はわずかに負を示したと考えられる。この PIPAAm ゲルで温度を上昇させながら表面電位を測定すると、PIPAAm の転移温度である 32°C 付近から電位が負に大きく変化することが観察された。この温度を境に PIPAAm は水和・膨潤した状態から、脱水和・凝集状態へと変化する。この変化に伴い、低温で観察されたすべり面が強く圧縮され、負電荷が大きい表面電位を示したものと考えた。一方、DMAPAA を 7.5mol%、BMA をあわせて共重合させた共重合体ゲル修飾シリカビーズでは、カチオン性のアミノ基の存在によって表面電位は正 (約 5mV) を示した。この場合も同様に温度を上昇させるとある温度を境に表面電位は負に大きく変化した。このことは、IPAAm 連鎖の脱水和・凝集だけで説明することができない。すなわち、IPAAm 連鎖の脱水和に伴い、PIPAAm

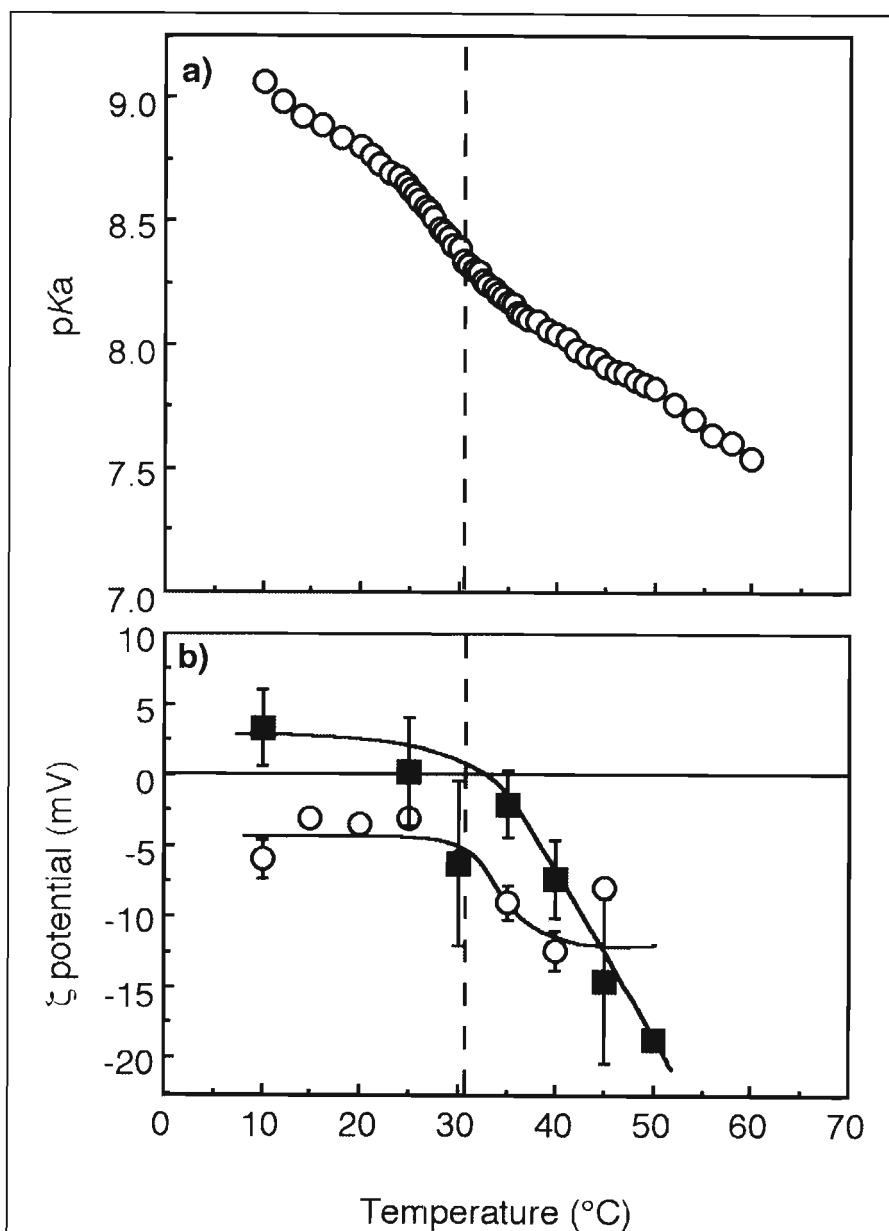


Figure 3. Temperature dependent a) pKa changes of DMAPAA amino groups in P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA) and b) surface potential changes of PIPAAm-, and P(IPAAm-co-BMA-DMAPAA) (IBD7,5)-grafted surfaces.

鎖は疎水性となる。このため、プロトン化したアミノ基の近傍の誘電率が低下し、アミノ基はプロトン化した状態であるよりも脱プロトン化したほうがエントロピー的に安定となる。そのため脱水和によって疎水性が増大しすべり面の圧縮が生起するとともに、アミノ基の脱プロトン化が促進されるために、表面電位は負に大きく変化したと考えられた。実際、水溶性の三元共重合体で、温度を変化させながら pK_a 値の変化を測定したところ、Figure 3a に示すように温度上昇に伴って pK_a が小さくなり、低温で pK_a9 程度であったアミノ基が転移温度を挟んだ高温側で $pK_a7.5$ 程度まで低下することが確認された。このような現象は、疎水性ペプチド連鎖中のカルボキシル基の pK_a が疎水性度の増大にしたがって中性側に変化する現象を報告した Urry(13)の研究、あるいは水溶性が温度で変化しないアミノ化ポリアクリルアミドに比して、アミノ化 PIPAAm のアミノ基の pK_a が温度上昇に伴い、相転移温度を境に大きく低下する現象を Feil ら(14-16)が報告していることから、温度変化に伴う疎水性変化に対応してアミノ基の pK_a が低下するのは普遍的な現象と考えられた。

以上の結果から、pH 一定のもとで、溶液温度を制御して、表面の疎水性の変化と同時に荷電密度をも制御しうる新規な温度応答性カチオン性表面を調製できることが明らかとなった。

3. アミノ基含有温度応答性高分子ゲル修飾表面とヌクレオチド類の相互作用の解析

3-1.PIPAAm、および P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)ゲル修飾シリカ表面とアデノシンヌクレオチドとの相互作用：PIPAAm ゲルシリカカラム、あるいは P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)ゲル修飾シリカカラムを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)装置内に接続し、生体内で、エネルギー代謝に重要な役割を果たすアデノシンヌクレオチドをカラム内に導入したときの相互作用変化をクロマトグラムから解析した。まず、PIPAAm ゲル修飾シリカカラムを用い、pH7.0 のリン酸/クエン酸緩衝液を溶離液としたとき、Table 6 に示すような物性を有するアデノシンヌクレオチドの AMP、ADP、ATP の保持時間変化を調べた。Figure 4 にその結果を示す。このとき、溶離液の流速を 0.5mL/min で 254nm の吸光度変化をクロマトグラムとして得た。図より明らかなように、非イオン性の PIPAAm 表面では、アデノシンヌクレオチド類はほとんど相互作用せず溶出することが示された。pH7.0 の条件ではアデノシンヌクレオチドのリン酸基は解離してアニオン性となり、水溶性が高い。このアデノシンヌクレオチドは非イオン性の PIPAAm 表面と相互作用することなく溶出したと、考えられた。

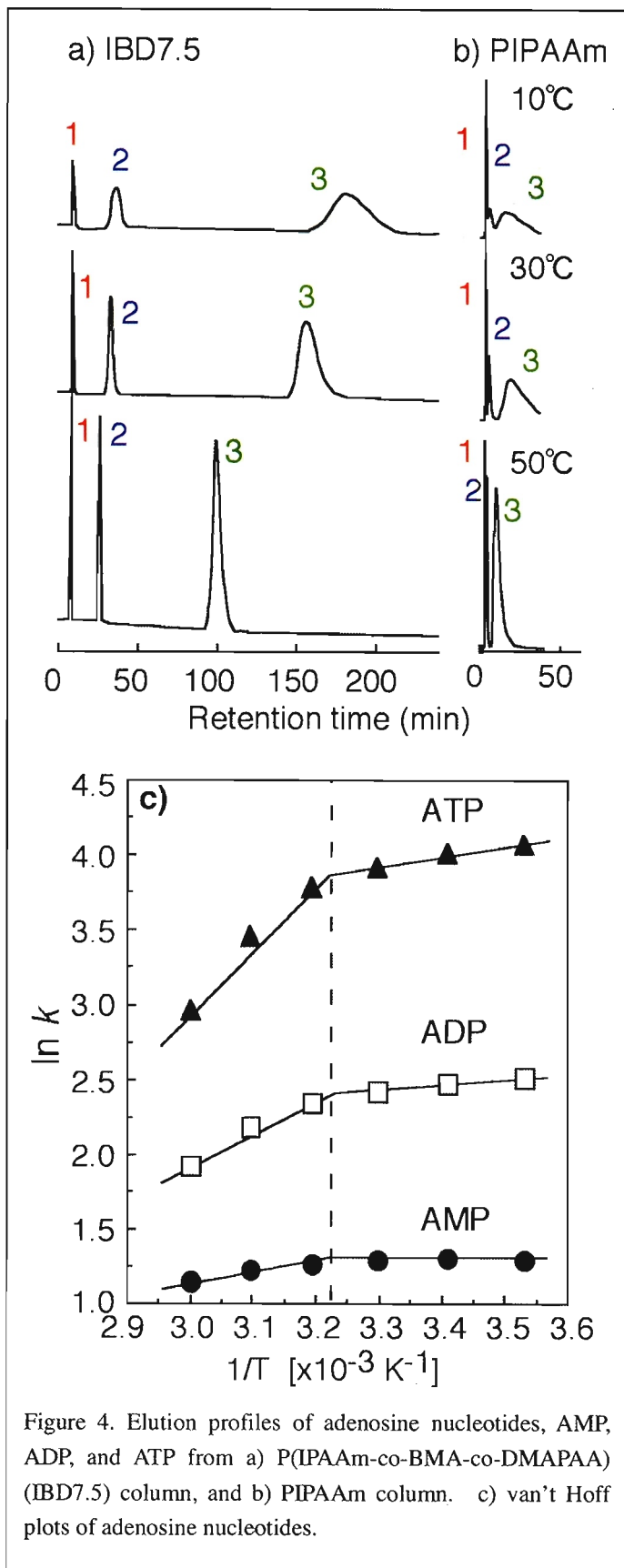


Figure 4. Elution profiles of adenosine nucleotides, AMP, ADP, and ATP from a) P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA) (IBD7.5) column, and b) PIPAAm column. c) van't Hoff plots of adenosine nucleotides.

Table 6. Properties of adenosine nucleotides.

Sample name	Molecular weight	pKa	LogP ¹⁾
Adenosine-5'-monophosphate (AMP)	347.2	3.80	-3.52
Adenosine-5'-diphosphate (ADP)	427.2	3.90	-4.00
Adenosine-5'-triphosphate (ATP)	551.1	4.06	-4.60

1) P: partition coefficient in n-octanol/water system.

一方、P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)ゲル修飾シリカカラムでは、pH7.0 の条件下で、温度によらず3つのピークが確認できた。さらにいずれの温度でも、PIPAAm に比して高い保持時間を示した。加えて、温度上昇に伴って、アデノシンヌクレオチドの保持時間が短縮した。この変化は特に ATP において顕著であった。各アデノシンヌクレオチドの保持係数を温度の逆数に対して log プロットすると、保持係数変化に屈曲点のように傾きが変化する点が認められた(Figure 4c)。このときの温度は、P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)が水溶性から不溶性に変化する転移温度に対応しており、この温度以上の範囲で保持係数の低下度が大きくなった。すなわち、Figure 3 で見られたように、転移温度以上で P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)修飾シリカビーズ表面の表面電位が大きく低下することに対応し、疎水性の増大に伴ってアミノ基の脱プロトン化が進行し、アニオン性のアデノシンヌクレオチドとの相互作用が低下したものと考えられた。

3-2.P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)ゲル修飾シリカカラムと塩基構造の異なるモノリン酸ヌクレオチドとの相互作用の解析：続いて核酸(DNA、RNA)の構成ユニットである5種類のモノリン酸ヌクレオチドとカチオン性温度応答性表面との相互作用を解析した。Table 7 にそれぞれのモノリン酸ヌクレオチドの物性をまとめた。いずれのモノリン酸ヌクレオチドも、親水性（水溶性）の高い分子である。

Table 7. Properties of nucleotides.

Sample name	Molecular weight	pKa	LogP ¹⁾
AMP	347.22	3.8, 6.1	-3.520
GMP	363.22	2.4, 6.1, 9.4	-4.439
CMP	323.20	4.5, 6.3	-3.741
TMP	322.21	10.0	-3.204
UMP	324.18	6.4, 9.5	-3.645

1) Partition coefficient of the n-octanol/water system.

温度応答性非イオン性高分子の PIPAAm ゲル修飾シリカカラムと、疎水性モノマーの BMA を IPAAm と共重合させた、同じく非イオン性高分子の P(IPAAm-co-BMA)ゲル修飾シリカカラムとを用い、これら表面とモノリン酸ヌクレオチドとの相互作用をクロマトグラムから解析した。このとき、溶離液の流速は 0.5mL/min に設定し、254nm における吸光度変化をクロマトグラムとして得た。溶離液の pH が 7.0 のとき、いずれのモノリン酸ヌクレオチドも、温度変化によらず 3 分で溶出した。この溶出はカラム担体表面の疎水性の違いによらなかった。アニオン性で水溶性も高いため、モノリン酸ヌクレオチドはこれらの非イオン性表面と相互作用しないと結論された。

次に、カチオン性のアミノ基を含む DMAPAA を含有する温度応答性高分子ゲル修飾シリカカラム、IBD7.5G を用い、これらモノリン酸ヌクレオチドの相互作用を温度を変化させながら解析した。結果を Figure 5 に示す。pH7.0 のもと、非イオン性カラムの場合に比していずれのモノリン酸ヌクレオチドの保持時間も延長した。モノリン酸ヌクレオチドの中では、CMP、UMP がほとんど保持時間が同じでもっとも弱い相互作用を示したのに対し、TMP では、これら2つのモノリン酸ヌクレオチドに比べ 1-1.5 分の保持時間の延長が見られた。さらに、AMP、GMP ではこれらのモノリン酸ヌクレオチドの中でもっとも保持時間が長く、かつ、温度変化に伴う保持時間の低下が大きかった。以上の結果は、pH7.0 の条件下ポリマーマトリックス中の DMAPAA ユニットのアミノ基がプロトン化して正荷電を有することに起因していると考えられる。すなわち、カチオン性のシリカ担体表面とアニオン性のモノリン酸ヌクレオチドとが静電相互作用を生起して相互作用したものである。このとき、リン酸基の解離度、ならびに塩基部分の疎水性度の違いによって相互作用力が変化し、リン酸基の酸性度が高い GMP、AMP で保持時間がもっとも長くなったものと考えた。

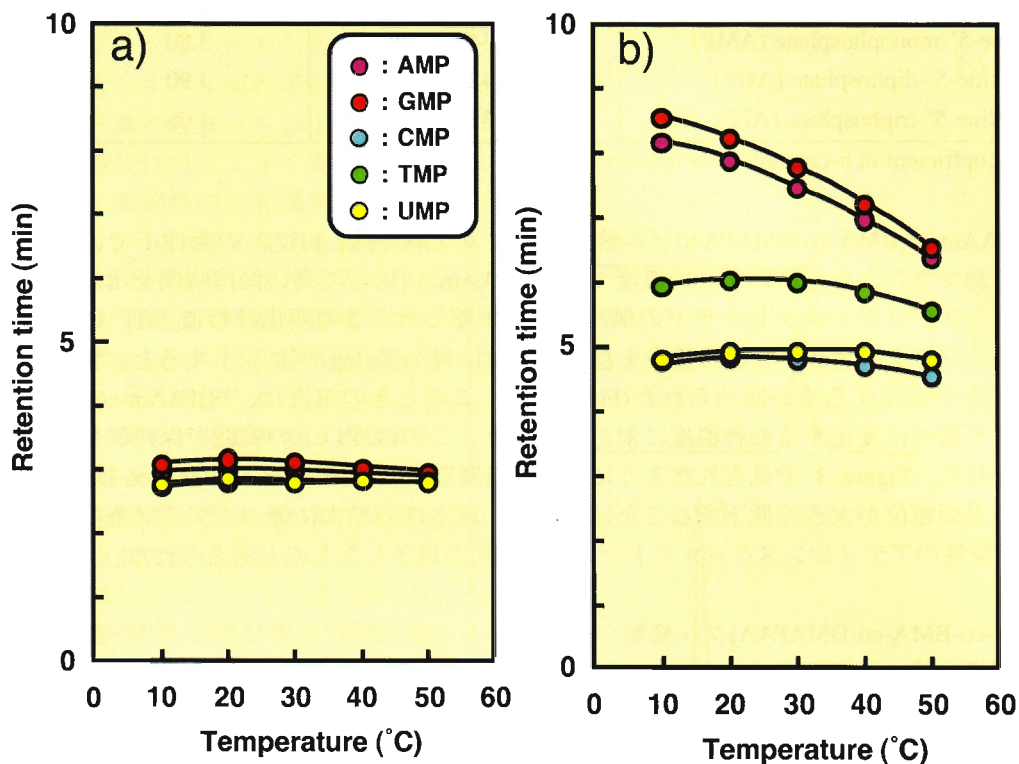


Figure 5. Retention behavior of monophosphate nucleotides on a) nonionic P(IPAAm-co-BMA)-grafted and b) P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)-grafted columns.

3-3.オリゴヌクレオチドと P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)ゲル修飾シリカカラム表面との相互作用の解析: p(dA)_n、あるいは p(dT)_n (いずれも n = 2-5) を用い、非イオン性の P(IPAAm-co-BMA)カラム表面と、P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)表面との相互作用をそれぞれ測定、比較した。溶離液 pH を 7.0 とし、流速 0.5mL/min、検出は 254nm の吸光度を測定した。P(IPAAm-co-BMA)表面でのオリゴヌクレオチドの保持時間変化は、アデニンオリゴヌクレオチド、チミジンオリゴヌクレオチドのいずれも、非イオン性の P(IPAAm-co-BMA)表面で n=2 のヌクレオチドでもっとも保持時間が長かったが、ヌクレオチドの保持時間は 3.5-4 分以内で非常に短かった。このとき、温度変化による影響はほとんど見られなかった。一方、カチオン性のアミノ基を 5.0mol%含有する P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)(IBD5G)表面では、n 数の増加に伴って保持時間が延長した(Figure 6)。さらに、n 数の大きいものほど温度上昇に伴って保持時間が上昇する傾向が確認された。一方、P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA)の転移温度以上の温度になると保持時間の延長は見られず一定かわずかに減少傾向にあった。この変化はアデニンオリゴヌクレオチド、チミジンオリゴヌクレオチドのいずれにおいても同様に観察されたが、同じ n 数の p(dA)_n と p(dT)_n とで比較すると p(dT)_n で保持時間が延長していることがわかった。塩基 1 ユニットあたりの logP 値からチミジンがアデニンよりもわずかに疎水性度が高いことを考えると、静電相互作用し見かけの荷電が消失したオリゴヌクレオチドの疎水性度が p(dT)_n で大きくなった結果、このような差が生じたものと考えられた。

以上の結果、カチオン性温度応答性高分子ゲル修飾表面を用い、温度で高分子の疎水性と同時に荷電密度とを制御することで、アニオン性の核酸分子との相互作用を制御できる可能性が示唆された。より精密な分子設計を通じ、核酸を 1 つのカラムで効率的に分離することが可能なカラム担体の設計と調製が可能になると考えられる。

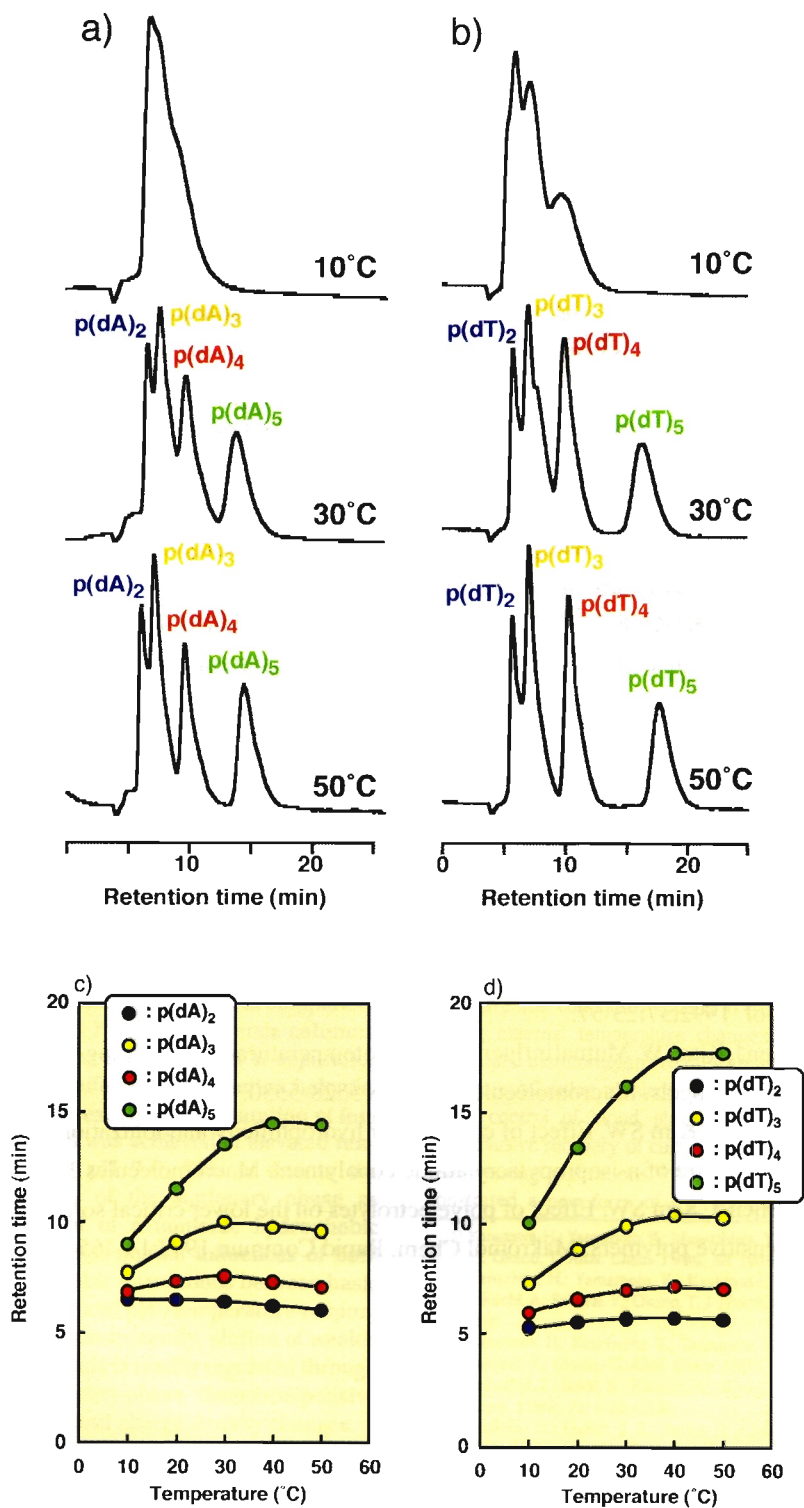


Figure 6. Temperature dependent elution profiles and retention time changes of a), c) p(dA)_n, and b), d) p(dT)_n from P(IPAAm-co-BMA-co-DMAPAA) (IBD5G) column.

References

1. Heskins M, Guillet JE, James E. Solution properties of poly(n-isopropylacrylamide). *J Macromol Sci, Chem A* 1968;2:1441-1445.
2. Okano T, Bae YH, Jacobs H, Kim SW. Thermally on-off switching polymers for drug permeation and release. *J Control Rel* 1990;11:255-265.

3. Takei YG, Aoki T, Sanui K, Ogata N, Sakurai Y, Okano T. Dynamic contact angle measurement of temperature-responsive surface properties for poly(n-isopropylacrylamide) grafted surfaces. *Macromolecules* 1994;27(21):6163-6166.
4. Yakushiji T, Sakai K, Kikuchi A, Aoyagi T, Sakurai Y, Okano T. Graft architectural effects on thermo-responsive wettability changes of poly(N-isopropylacrylamide)-modified surfaces. *Langmuir* 1998;14(16):4657-4662.
5. Yakushiji T, Sakai K, Kikuchi A, Aoyagi T, Sakurai Y, Okano T. Effects of cross-linked structure on temperature-responsive hydrophobic interaction of ppaam hydrogel modified surfaces with steroids. *Anal Chem* 1999;71(6):1125-1130.
6. Kikuchi A, Okuhara M, Karikusa F, Sakurai Y, Okano T. Two-dimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly(n-isopropylacrylamide)-grafted surfaces. *J Biomater Sci, Polym Ed* 1998;9(12):1331-1348.
7. Kanazawa H, Yamamoto K, Matsushima Y, Takai N, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T. Temperature-responsive chromatography using poly(n-isopropylacrylamide)-modified silica. *Anal Chem* 1996;68(1):100-105.
8. Kanazawa H, Kashiwase Y, Yamamoto K, Matsushima Y, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T. Temperature-responsive liquid chromatography. 2. Effect of hydrophobic groups in N-isopropylacrylamide copolymer-modified silica. *Anal Chem* 1997;69(5):823-830.
9. Kanazawa H, Yamamoto K, Kashiwase Y, Matsushima Y, Takai N, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T. Analysis of peptides and proteins by temperature-responsive chromatographic system using N-isopropylacrylamide polymer-modified columns. *J Pharmaceut Biomed Anal* 1997;15:1545-1550.
10. Kobayashi J, Kikuchi A, Sakai K, Okano T. Aqueous chromatography utilizing hydrophobicity-modified anionic temperature-responsive hydrogel for stationary phase. *J Chromatogr A* 2002;958:109-119.
11. Kobayashi J, Kikuchi A, Sakai K, Okano T. Aqueous chromatography utilizing ph-/temperature-responsive polymer stationary phases to separate ionic bioactive compounds. *Anal Chem* 2003;73:2027-2033.
12. Gaur RK, Gupta KC. A spectrophotometric method for the estimation of amino groups on polymer supports. *Anal Biochem* 1989;180:253-258.
13. Urry DW. Free energy transduction in polypeptides and proteins based on inverse temperature transitions. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 1992;57:23-57.
14. Feil H, Bae YH, Feijen J, Kim SW. Mutual influence of pH and temperature on the swelling of ionizable and thermosensitive hydrogels. *Macromolecules* 1992;25:5528-5530.
15. Feil H, Bae YH, Feijen J, Kim SW. Effect of comonomer hydrophilicity and ionization on the lower critical solution temperature of n-isopropylacrylamide copolymers. *Macromolecules* 1993;26(10):2496-2500.
16. Feil H, Bae YH, Feijen J, Kim SW. Effect of polyelectrolytes on the lower critical solution temperature of ionizable, thermosensitive polymers. *Makromol Chem, Rapid Commun* 1993;14:465-470.