

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

長谷川栄治* 青木 央 宮崎俊一 澤谷拓治
穂刈勝利** 今野紀一** 高本幹也** 片谷健一**

Development of the Method for Extraction of High Purity Deoxyribonucleic Acid from Salmon Sperm

Eiji Hasegawa*, Hiroshi Aoki, Syun-ichi Miyazaki,
Katsutoshi Hokari**, Kiichi Konno**, Mikiya Takamoto**,
Ken-ichi Kataya** and Takuji Sawaya

要 旨

サケ白子に含有するデオキシリボ核酸 (DNA) の抽出法と、抽出したDNAの精製法を検討した。この結果、酵素と化学的な処理とを組み合わせた緩和で簡便な抽出法を開発し、抽出したDNAはリボ核酸 (RNA) をほとんど含まず、そしてタンパク質の含有量は1%以下であり、高分子量で、かつ純度は約90%と高品質であった。

1. 諸 言

近年の水産業は、「獲る漁業」から「育てる漁業」への転換が図られている。北海道においては、サケはふ化放流事業によって、またホタテやコンブは増養殖事業によってほぼ安定した漁獲がなされている。例えば、北海道におけるサケの漁獲量は年間約10万トンである¹⁾。そして、これとほぼ同量が輸入されている²⁾。魚体や卵は食品加工用の材料として利用されているが、白子は鮮度低下が速く、冷凍にすると味が落ちることなどからそのほとんどが廃棄同然に処分されている。白子の主成分は、遺伝子であるDNAと塩基性タンパク質が結合した核タンパク質である。DNAは医薬品や化粧品等の原材料として、そ

して、塩基性タンパク質としてはプロタミンがあり抗菌剤としての利用が図られている。

本研究では、未利用資源の有効活用を図る目的で、サケ白子に含有する有用な物質の1つであるDNAを、緩和な条件下で簡単に、そして高純度に抽出する方法を検討した。

2. 実 験

DNAの抽出……………冷凍サケ白子1kgを解凍後割砕し、抽出、精製、そして乾燥してDNAの粉末を得た。

DNAの精製……………①Sephadex G25またはG50をカラム(1.5mmID×28cm)に充てんし、10%DNA溶

* 現 日本化学飼料(株)中央研究所

** 日本化学飼料(株)中央研究所

液5mlを吸着させたのち、溶出液を10ml/minの速度で流した。②DOWEX50×2陽イオン交換樹脂(100-200mesh)を2.5%NaCl溶液でナトリウムタイプに平衡化した後、カラム(1.0mmID×28cm)に充てんした。1%DNA溶液を吸着させたのち2~3ml/minの速度で2.5%NaClを流した。さらに、数%のNaOH溶液による溶出成分のタンパク質量を定量後、1mgの溶出タンパク質を6NHClで110℃,22時間加水分解し、日立アミノ酸自動分析計835によるアミノ酸分析を行った。

③限外ろ過は、日東電気工業(株)製フロー式平膜テストセル70-Fと分画分子量5万のNTU-3150の膜を使用し、200mlを1サイクルとした。

DNAの性状試験……乾燥減料は105℃で4時間加熱して求めた。ヒ素・重金属試験、総窒素量及び総リン量は衛生試験法に従って求めた³⁾。タンパク質含量は、ローリー・フォーリン法で求めた。RNAは、DNAの純度測定操作で得られたクロマトグラムの5'-CMPの値から求めた。

DNAの純度及びヌクレオチド組成⁴⁾……0.25% DNA, 20mM酢酸緩衝液(pH5.5)10mlに、1mg/mlペニシリウムヌクレアーゼP₁0.1mlと1mM ZnCl₂0.5mlを加えて70℃で4時間振とう後、ろ液をHPLCで分析した。HPLCは東ソーCCPD-UV8000に、YMC-A312(6mmID×150mm)のカラムを使用した。移動相は、0.7ml/minの流速で、6%Na₂SO₄-0.4%KH₂PO₄溶液から1.5%Na₂SO₄-0.1%KH₂PO₄-22.5%メタノール溶液へのグラジエント(25分)とし、260nmで検出した。この時ヤマサ醤油(株)のヌクレアーゼP₁と標品としてのモノヌクレオチドを用い、保持時間は次のとおりである。5'-CMP:5.0分,5'-dCMP:7.8分,5'-dGMP:14.0分,5'-dTMP:15.0分,5'-dAMP:18.8分。また、純度のみを測定する簡便な方法としてSchmidt-Thanhauser-Schneider法(STS法)⁵⁾も行った。

DNAの分子量……東ソーCCPM-UV-8000のHPLCとTSKgel G3000SW(7.5mmID×600mm)のカラムを使用した。0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)-0.1M NaClの移動相を流速1.0ml/minで流し、260nmで検出した。分子量算出のための標品としてファルマシア社製低分子用ゲルろ過キャリブレーションキット

(ribonuclease A, chymotrypsinogen A, ovalbumin, albumin, Blue Dextran 2000)を使用した。

3. 結果及び考察

3.1 化学的な方法によるDNAの抽出

サケの白子の主要な成分として酸性物質であるDNAと塩基性タンパクであるプロタミンが含有することから、これらの化学的な性質の違いを利用した分別抽出を試みた。すなわち、1kgの冷凍サケ白子を塩酸水溶液で処理してプロタミンを可溶化した。次に、残渣を水酸化ナトリウム溶液で処理してRNAを分解すると同時にDNAを可溶化し、中和後エタノールの添加によって47gのDNAの粉末を得た(収率4.7%)。このDNAの粉末は、淡黄色でわずかに魚臭を有し純度は76.8%であった。このことより、このDNAは医薬品や化粧品原材料として利用するには不十分な品質であり、また、大量のエタノールを使用することからコスト面からも工業化は困難であると判断した。

次に、上記のDNAを可溶化後中和した溶液に塩化カルシウムを加え、DNAをカルシウム塩として沈殿させた。これを水洗後ナトリウム塩として再び溶解し、最後にメタノールで再沈殿する方法を試みた。この結果、5.0%の収率で白色粉末が得られ、純度は85.5%に向上した。しかしながら、不純物としてのタンパク質が2.3%、そしてRNAが2.0%混在しており依然として不十分な結果であった。

3.2 DNAの精製

前項で抽出したDNAのおおよその分子量を求めするために、高速液体クロマトグラフィーを用いて260nmの測定波長で分析したところ、主な成分は分子量10万以上であった。しかしながら、測定波長を210nmとしたところ、保持時間20数分に分子量1万以下に相当する小さなピークが新たに観察された(図1-a)ことから、芳香族アミノ酸含量の低いタンパク質が混在しているものと考えた。サケの白子に含有する主なタンパク質としてプロタミンがある。プロタミンはアルギニン含量の高い塩基性のタンパク質であり、分子量は4000-8500であること⁶⁾から、DN

Aに含有する不純物はプロタミンと推定した。そこで、DNAとプロタミンの分子量や静電的な性質の違いを利用して、カラムクロマトグラフィーや限外ろ過膜による精製を試みた。

カラムクロマトグラフィーによる精製結果を表1に示した。Sephadex G25はほとんど効果がなかったが、G50を使用した時純度は65.8%から86.9%に上昇

表1 カラムクロマトグラフィーによるDNAの精製

担体	移動相	DNAの純度(%) ^{a)}
Sephadex G25	蒸留水	65.8
Sephadex G50	蒸留水	76.3
	20% NaCl	86.9
	20% NaCl+10mM EDTA	84.9
DOWEX 50	2.5% NaCl	84.3

a) : STS法, 用いたDNAの純度は65.8%

した。また、DOWEX50×2陽イオン交換樹脂では84.3%に上昇した。精製したDNAの高速液体クロマトグラムを図1-bに示したが、精製前のDNAで保持時間20分以降に認められた分子量1万以下の

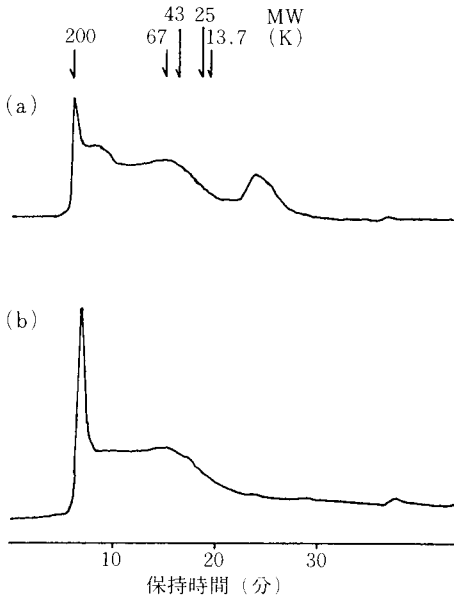


図1 陽イオン交換カラムクロマトグラフィーで精製したDNAの高速液体クロマトグラム(210nmで検出)
(a) : 精製前のDNA, (b) : 精製後のDNA

ピークが減少した。さらに、分画分子量5万の平膜を用いて限外ろ過を行った。この時の保持液と透過液の高速液体クロマトグラムは図2のようになり、保持時間20数分の低分子化合物のみが透過した。各サイクルの保持液のDNAの純度は徐々に上昇し、5サイクル目には87%となった(表2)。

DNAを核酸関連の医薬品合成のための原材料と

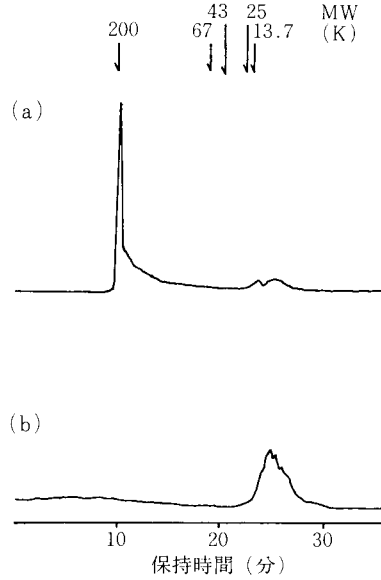


図2 限外ろ過膜で分離した保持液及び透過液の高速液体クロマトグラム(210nmで検出)
(a) : 保持液, (b) : 透過液

表2 限外ろ過膜によるDNAの精製

サイクル	DNAの純度(%) ^{a)}	透過タンパク質量(%) ^{b)}
1	80.9	3.0
2	82.2	2.4
3	84.1	1.6
4	85.5	1.3
5	87.0	1.0
計		9.3

a) : STS法, b) : 試料全体に対する割合

して利用する場合、最初にDNAを4種のモノヌクレオチドに分解し、カラムクロマト等で分離・精製する。DNAは高純度、すなわち約90%以上であることと、4種類の核酸塩基がほぼ均等であることが望まれている。そして、不純物としてのタンパク質

がカラムクロマトの充てん剤に吸着されて操作に支障をきたすことから、タンパク質含量は1%以下であることが要求される。これらのことがDNAの品質を評価する時の重要なポイントである。以上の3種の精製法によってDNAの純度は向上し、それに伴ってタンパク質含量は減少したが我々が目標としている品質、及び簡単な操作法という点でまだ不十分である。

一方、陽イオン交換樹脂によるDNA精製後のカラムに吸着されている成分を調べた。数%の水酸化ナトリウム溶液によるカラムの再生液のタンパク質を定量した後、6NHClで加水分解してアミノ酸分析を行った。この結果、構成アミノ酸としてはアルギニンが重量比で28%と最も多く、次いでリジンが20%であった。アルギニンはプロタミンの最も多い構成アミノ酸であることは既に述べたが、一方、リジンはプロタミンと共に核タンパク質を形成するヒストンの特徴的な構成アミノ酸である⁷⁾。このことから、白子の核タンパク質を構成している主な成分であるプロタミンとヒストンが不純物として混在しているものと考えられた。これらのタンパクはDNAとの結合が強く、それゆえにこれ迄試みた抽出法や精製法ではDNAとの完全な分離が困難であったものと考えられる。そこで、これらのタンパク質のDNAとの結合力を弱めるためにはタンパク質を酵素分解することが有効であろうと考えた。さらに、タンパク質の分解物は水溶性が増し、その後の分離操作も容易になるものと予想した。

3. 3 酵素処理を組み合わせた方法によるDNAの抽出

サケ白子のけん濁液を最初に酵素処理して可溶部と残渣とに分離し、次に、残渣に含有するDNAを水酸化ナトリウム溶液で可溶化した。この溶液を中和後メタノールを加えるとDNAは沈殿し、ろ取、水洗、乾燥を行ってDNA 50gを得た(収率5%)。一般的に、サケの白子には約5%のDNAが含まれているとされていることから、白子に含有するDNAをほぼ100%抽出したことになる。この抽出法の概略を図3に、そしてDNAの分析結果を表3に示した。

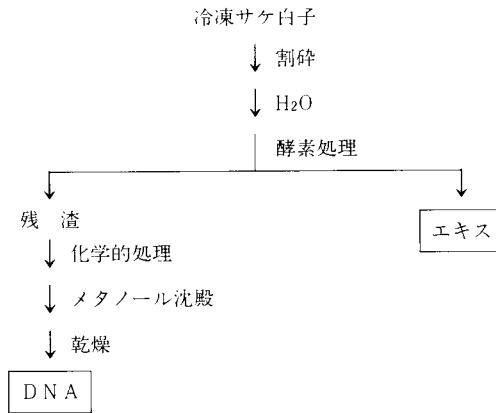


図3 サケ白子からのDNA抽出法の概略

抽出したDNAは無臭の白色粉末で、純度は89.4%、そして平均分子量は約60万であった。なお、STS法では95%と高純度であった。さらに、不純物としてのタンパク質含量は0.86%と低い値であり、また、RNAはほとんど含まれていない。そして、平均分子量は約62万であり、ヌクレオチド組成などの分析結果も非常に良好であったことからこのDNAは高品質であることが明らかとなった。

表3 サケ白子から抽出したDNAの分析結果

外 観	白色粉末、無臭
総ヌクレオチド含量 (%)	89.4
<ヌクレオチド組成>	
d-C MP	18.2
d-T MP	25.2
d-A MP	24.2
d-G MP	21.8
TOTAL	89.4
総 N 量 (%)	15.24
総 P 量 (%)	8.97
乾燥減量 (%)	1.0
R N A (%)	trace
タンパク質 (%)	0.86
無機塩 (%)	0.1
重金属	20ppm以下
ヒ素	2ppm以下
分子量 (平均)	622,500

一方、サケ白子を酵素処理した時の可溶部の濃縮液の分析結果を表4に示した。これはサケの風味が保持された褐色の溶液であり、遊離アミノ酸としてはアルギニンが最も多く全アミノ酸に占める割合は重量比で約35%である。そして、リジンも約10%含まれているなどの特徴を有していることから、サケ白子エキスとしての利用が考えられている。

表4 サケ白子エキスの性状

MOIS	(%)	58.0
総N量	(%)	5.5
アミノ態N量	(%)	1.6
NaCl	(%)	11.0
遊離アミノ酸	(mg/100ml)	12385
アスパラギン酸		228
スレオニン		465
セリン		742
グルタミン酸		732
グリシン		496
プロリン		263
アラニン		850
シスチン		118
バリン		733
メチオニン		223
イソロイシン		341
ロイシン		505
チロシン		243
フェニルアラニン		539
リジン		1089
アンモニア		174
ヒスチジン		249
アルギニン		4395

以上の結果、簡易な工程で、かつ緩和な条件下でサケの白子から高品質のDNAを抽出することが可能となった。一方、タンパク質等の成分は液化されてエキスとしての利用も可能となった。さらに、この抽出法はニシンの白子にも適用可能であることが基礎試験で確認されている。

4. 結 言

サケの白子に含有するDNAの抽出及び精製法についていくつか検討した結果をまとめると以下のようになる。

(1) 酸とアルカリを組み合わせた化学的な方法によ

って純度76.8%のDNAが抽出された。

(2) ゲルろ過や陽イオン交換樹脂のカラムクロマトグラフィー、あるいは限外ろ過膜による精製によってDNAの純度は約84~87%に上昇した。

(3) 酵素処理を組み合わせた抽出法によって純度約90%の高品質なDNAが抽出された。

(4) この抽出法は緩和で簡単な工程であり、サケの白子に含有するDNAをほぼ100%抽出できる。

(5) DNA以外の部分は可溶化されてエキスとなり、サケ白子エキスとしての有効利用が図られる。

5. お わ り に

本研究は、中小企業事業団から受託した「昭和62年度函館地域加速的技術開発支援事業」の一環、及びその延長として実施したものであり、共同研究を行った日本化学飼料(株)が企業化しDNAを生産している。

また、本研究の遂行にあたって種々の御指導を頂いた北海道大学薬学部故上田亨教授や他の諸先生、そしてDNAの分析や品質評価等に関してアドバイスを頂いたヤマサ醤油(株)藤島鉄郎情報室長らの皆様に併せて感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 北海道水産部漁政課編：昭和59-61年北海道水産現勢、札幌、1986-1988.
- 2) 水産庁水産流通課編：昭和61年水産貿易統計、東京、1987、179.
- 3) 日本薬学会編：衛生試験法・注解、東京、金原出版、1980、566、834、945.
- 4) 国中 明：蛋白質 核酸 酵素、**30** (11)、1253 (1985)
- 5) 日本食品工業学会編：食品分析法、第2版、東京、光琳、1984、563.
- 6) 日本生化学会編：生化学データブックI、第1版、東京、東京化学同人、1979、285.
- 7) 岩井浩一：タンパク質II、勝部幸輝、京極好正、崎山文夫、高木俊夫、中川八郎編、東京、東京化学同人、1988、225.