

核酸抽出法の歴史、原理および特徴について  
—核酸抽出法の比較と解析技術への影響—

1. はじめに

核酸（DNA および RNA）の抽出は、細菌やウイルスなどの微生物解析や遺伝子診断、DNA 鑑定など多岐にわたって使用されており、分子生物学分野の基盤技術として重要である。代表的な核酸抽出法として、フェノール・クロロホルム抽出法、シリカメンブレンを利用したスピンカラム法、磁気ビーズ法があるが、各抽出法はそれぞれの特性に応じたメリットとデメリットを有している。ここでは、各抽出法の歴史的背景や原理、特徴を解説する。また、抽出した核酸を利用するポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reaction : PCR）や次世代シーケンス（Next Generation Sequencing : NGS）などの解析技術への影響について紹介する。

2. 歴史と原理

2.1 フェノール・クロロホルム抽出法

フェノール・クロロホルム抽出法は、1956 年に Kirby によって報告されたフェノール法を起源とする古典的な核酸抽出法である<sup>1)</sup>。試料から核酸のみを抽出するためには、試料に含まれるタンパク質や細胞膜等を除去する必要があるが、フェノール法では、タンパク質を除去するためにフェノールの強力なタンパク質変性作用を利用する。タンパク質は、アミノ酸が一直線に連なったポリペプチドであり、それが様々な結合様式によって複雑に折り畳まれ、そのタンパク質特有の立体構造をとっている。特

に、水溶液中のタンパク質分子は、疎水性アミノ酸が中心に、親水性アミノ酸が表面に配置されることで構造を安定化している。試料中のタンパク質はフェノールと混ざることによって変性し、中心にあった疎水性アミノ酸はフェノール（有機）層にトラップされる。一方で、親水性アミノ酸は水層に留まろうとするため、結果的にタンパク質は有機層と水層の中間層に分離される（図 1）。核酸は、後述する理由によって水層に溶解しているため、水層から核酸を回収することが可能になる。フェノール・クロロホルム抽出法は、フェノールに対して水よりも高い溶解性を有するクロロホルムを加えることで、フェノールが水層へ分配されるのを防ぐ改良法である。フェノールが水層に残っていると後の操作に影響するため、水層と有機層の分離をよくする必要がある。最後に、核酸はエタノー

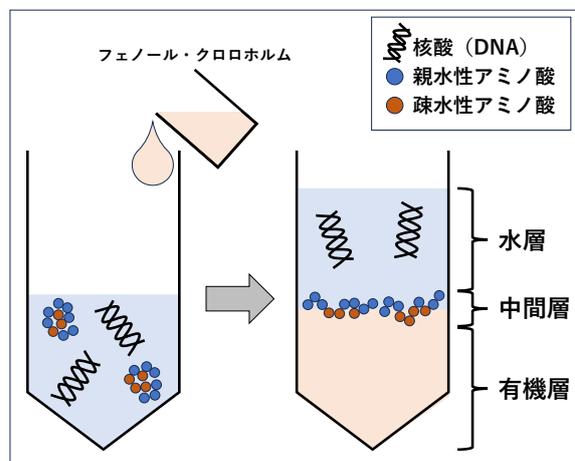


図 1 フェノール・クロロホルム抽出法の原理

ル沈殿によって水層（核酸水溶液）から回収する。エタノール沈殿は、「エタノールは水と混ざるが核酸を溶解しない」という性質を利用している。核酸は中性条件下において、リン酸基の電離によって負電荷を帯びており、水和することによって水中に溶解している。負電荷を帯びている核酸同士は静電的に反発し合っているが、ここに塩（陽イオン）が加わることでリン酸基とイオン結合が形成され、析出しやすい状態となる。核酸の糖とリン酸基はエタノールに溶けにくいので、核酸水溶液にエタノールが加わることで、核酸が析出する。

フェノール・クロロホルム抽出法の基本的な手順は、試料に等量のフェノール：クロロホルム（1：1）を加え、混合した後、遠心分離する。水層を回収した後、酢酸ナトリウム水溶液を加え、2～2.5 倍量の 100%エタノールを加える。析出した核酸は、ガラス棒で回収、又は遠心操作によって沈殿物とし、70 %エタノールで残存フェノール等を複数回洗浄する。その後、沈殿物を風乾し、TE buffer 等で溶解させる。

1958 年、Crick によって提唱されたセントラルドグマによって、DNA からタンパク質への遺伝情報の伝達は、RNA を介して行われることが実験的に示され<sup>2)</sup>、その結果、遺伝子発現の解析対象として RNA をターゲットにした抽出法が求められるようになった。そこで改良法として使われたのが、酸性フェノール法である。核酸は酸性条件下において、リン酸基の電離平衡（図 2）が電氣的に中性となる方向に傾くため、その親水性は低下する。しかし、RNA を構成するリボースは、DNA のデオキシリボースと比べて、2 位の炭素に水酸基が 1 つ多くある（図 3）ため親水性が比較的高く、RNA は水層に、DNA は有機層に移行する。こうして水層に残った RNA をエタノール沈殿により回収する。しかし、RNA は細胞内に存在する RNA 分解酵素（RNase）によって分解されやすいため、RNA を抽出する際には RNase を速やかに失活させる必要がある。そのために強力なタンパク質変性

作用を持つカオトロピック塩（グアニジン塩酸塩など）が使用される。カオトロピック塩は、水分子と強く結合することで、水溶液中の物質の分子構造を不安定にするカオトロピック効果を引き起こす。つまりタンパク質の立体構造を安定化している要因の一つである水素結合を切断し、変性を促進する作用がある。このカオトロピック塩は、前述した酸性フェノール法と組み合わせて使うことが可能であり、1987 年に Chomczynski らが酸性グアニジン・フェノール・クロロホルム（Acid Guanidinium Phenol Chloroform : AGPC）抽出法を発表した<sup>3)</sup>。今日では、簡便な操作で実施できる AGPC 抽出法に基づいた方法が広く利用されている。

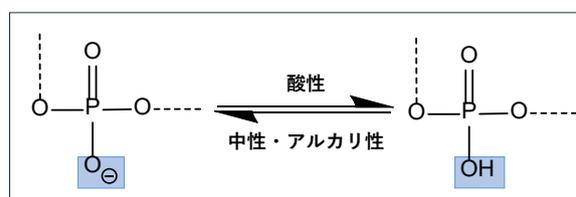


図 2 リン酸基の電離平衡

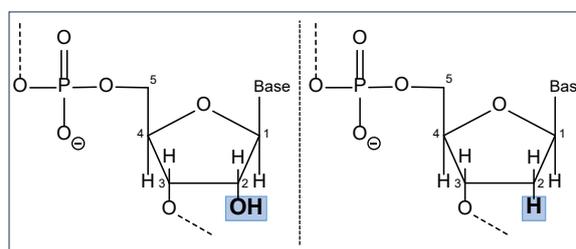


図 3 RNA（左）と DNA（右）の構造式

#### <コラム>

塩化セシウム超遠心法という核酸抽出法も存在する。この方法は塩化セシウムの密度勾配形成に伴い、浮遊密度が異なる生体高分子を分離する方法である。この方法により RNA を DNA やタンパク質等の生体高分子分離することも可能である。1979 年に Chirgwin らが RNase を失活させて RNA を効率よく回収するグアニジン・塩化セシウム超遠心法<sup>4)</sup>を発表したが、時間がかかる超遠心が必要だったため、あまり広くは普及しなかった。

## 2.2 スピнкаラム法（シリカメンブレン法）

1980年代後半になると、核酸が高濃度のカオトロピック塩存在下でシリカメンブレンに特異的に吸着する性質に注目した研究が進んだ。そして1990年、Boomらはこの性質を利用し、短時間かつ再現性の高い核酸抽出法として、シリカメンブレン法を確立した<sup>5)</sup>。核酸がシリカメンブレンに吸着する機構は完全には解明されていないが、核酸のリン酸基とシリカメンブレンの水酸基との間で、陽イオンを介したイオン結合を形成するためと考えられている。通常、核酸とシリカメンブレンはそれぞれ水和しているため、結合することはない。しかし、カオトロピック塩を加えることで、塩が水分子と強く結合し、水和していた核酸のリン酸基とシリカメンブレンの水酸基が露出する。この状態になることで、陽イオンを介したイオン結合を形成することができるため、核酸がシリカメンブレンに吸着する（図4）。

スピнкаラム法の基本的な手順は、細胞や組織をタンパク質分解酵素(Proteinase Kなど)およびカオトロピック塩で処理し、核酸を溶出することで、シリカメンブレンに結合できる状

態にする。この溶液を、シリカメンブレンを備えたスピнкаラムに通し、遠心操作で核酸をシリカメンブレンに吸着させる。吸着後、洗浄bufferで不純物を除去し、TE buffer等を添加することで、核酸はシリカメンブレンから解離して溶出される。

## 2.3 磁気ビーズ法

1990年代以降スピнкаラム法が普及する中で、分子生物学の進歩により、環境試料などの多検体を用いる大規模な遺伝子解析の必要性の増加や、医療現場における遺伝子検査の普及に伴い、核酸抽出の自動化や高スループット化が求められた。これを解決するために、磁気ビーズ法が開発された。磁気ビーズ法の原理は、多孔質シリカを磁性ビーズ表面にコーティングしており、スピソカラム法と同じく核酸とシリカの水酸基との相互作用を利用したものである。

磁性ビーズ法の基本的な手順は、スピнкаラム法と同様であるが、遠心操作ではなく、すべて磁力を利用して洗浄と溶出する。

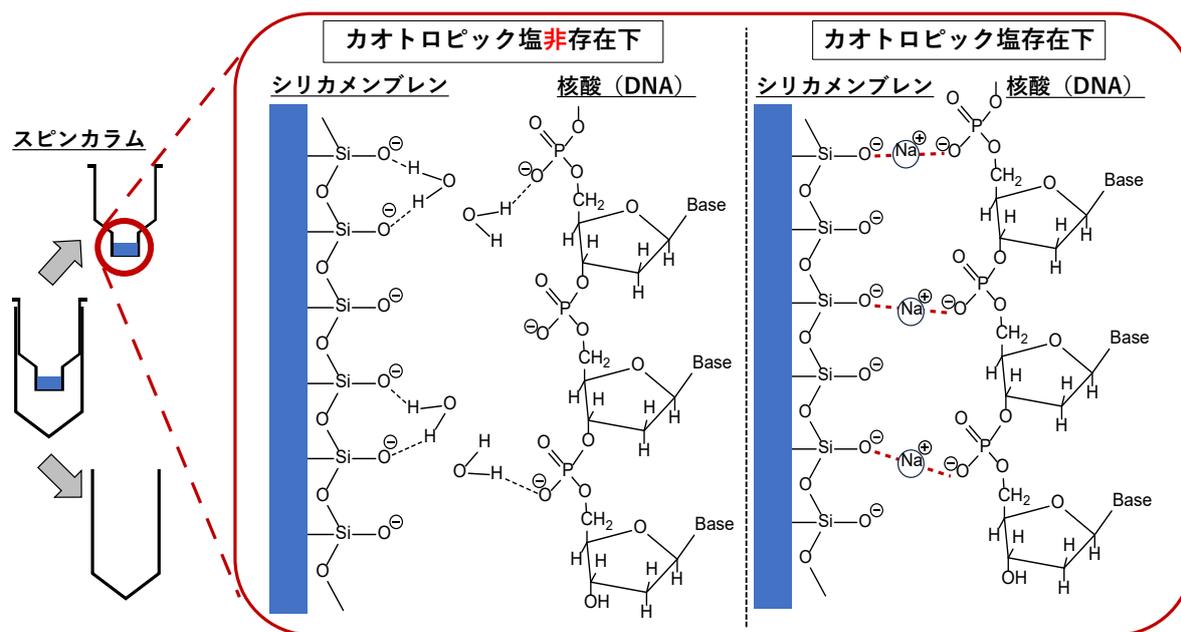


図4 シリカメンブレンと核酸の結合イメージ

### 3. 特徴

ここまで、各手法の歴史と原理を解説したが、それぞれの特徴を適応可能な試料の種類や、純

度、操作性、コスト等の観点からメリットとデメリットに分けて表1にまとめた。

表1 各手法の比較

	フェノール・クロロホルム抽出法	スピнкаラム法	磁気ビーズ法
メリット	<ul style="list-style-type: none"> <li>●難溶性試料<sup>*</sup>からも抽出可能</li> <li>●遠心操作による過がないため、核酸は断片化しにくい</li> <li>●一般的な実験室にある器具のみで抽出可能なため、低コスト</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●PCRなどの解析に直接使用可能な高純度な核酸が得られる</li> <li>●操作が簡便かつ標準化されており、再現性の高い核酸抽出が可能</li> <li>●健康有害性の高い有機溶媒を用いないため、作業環境の安全性が高い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●高粘性試料でも目詰まりしない</li> <li>●自動化により、高スループットかつ高い再現性</li> <li>●遠心操作による過がないため、核酸は断片化しにくい</li> <li>●健康有害性の高い有機溶媒を用いないため、作業環境の安全性が高い</li> </ul>
デメリット	<ul style="list-style-type: none"> <li>●タンパク質や有機溶媒の除去が不十分な場合、核酸の純度が低下する</li> <li>●操作工程も多い上、水層のみを回収するという煩雑な作業が必要 →再現性が実験者依存となる<sup>6)</sup></li> <li>●有機溶媒を用いるため、作業時の安全管理および廃棄物処理が必要</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●高粘性試料の場合、シリカメンブレンの目詰まりが発生する</li> <li>●遠心操作による過により核酸が断片化しやすい<sup>7)</sup></li> <li>●専用のスピнкаラムを用いるため、市販のキットが必要</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●磁気ビーズの混入による核酸の純度が低下する可能性がある</li> <li>●自動化には専用装置の初期投資が必要であり、高コスト</li> </ul>

※難溶性試料：脂質含有量が高い脳組織や、タンパク質が豊富な血液・細胞塊など

### 4. 解析技術への影響

核酸抽出法は、単なる前処理工程ではなく、その後のPCRやNGSなどの解析結果に直接影響を及ぼす重要な要素である。PCRにおいて、抽出された核酸中に残る有機溶媒や高濃度の塩は、PCRにおけるDNA Polymerase活性を阻害する可能性があるため、核酸の純度が非常に重要である。またNGSのライブラリー調製においては、前述したPCRの要件に加えて、断片化されていない核酸が求められる。特にロングリードシーケンサーを用いる場合は、抽出された核酸が過度に断片化していると十分な長さのリードが得られず、解析結果に影響を及ぼす<sup>8)</sup>。一般的に、各手法で抽出される核酸のおおよそのサイズは、スピнкаラム法では60kb、フェノール・クロロホルム抽出法や磁気ビーズ法は150 kbとされている<sup>9)</sup>。

### 5. おわりに

本稿では、核酸抽出法の代表例として、フェノール・クロロホルム抽出法、スピнкаラム法、

磁気ビーズ法の各手法について、その歴史、原理、および特徴を解説した。抽出される核酸の特徴は、抽出方法によって異なるため、解析目的に応じた最適な選択が求められる。

### 6. 参考文献

- 1) Kirby KS. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem J.* 1956 Nov;64 (3) :405-408.
- 2) Crick FH. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol.* 1958;12:138-63.
- 3) Chomczynski P. et al. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162 (1) :156-159.
- 4) Chirgwin JM. et al. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.* 1979 Nov 27;18 (24) :5294-9.
- 5) Boom R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin*

- Microbiol. 1990 Mar;28 (3) :495-503.
- 6) 富士写真フイルム株式会社. 共沈剤及び核酸の抽出方法. 特願平 09-505013
- 7) 東洋紡株式会社. 核酸の分離精製方法および固相担体、デバイス. 特願 2016-552006.
- 8) Schalamun M. et al. Harnessing the MinION: An example of how to establish long-read sequencing in a laboratory using challenging plant tissue from *Eucalyptus pauciflora*. Mol Ecol Resour. 2019 Jan;19 (1) :77-89.
- 9) Daniel Branton, David Deamer. Nanopore Sequencing: An Introduction. World Scientific, 2019

(文責：生物学部 ウイルス研究室)

---

愛知衛研技術情報 第48巻第2号 令和7年(2025)年 3月 27日

照会・連絡先 愛知県衛生研究所

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流7番6号

愛知県衛生研究所のウェブサイト【 <https://www.pref.aichi.jp/eiseiken/> 】

総務課 :	052-910-5618	生物学部	052-910-5654
企画情報部		ウイルス研究室 :	052-910-5674
健康科学情報室 :	052-910-5619	細菌研究室 :	052-910-5669
		医動物研究室 :	052-910-5654
		衛生化学部	052-910-5638
		医薬食品研究室 :	052-910-5639
		生活科学研究室 :	052-910-5643

代表電話 : 052-910-5618

代表 FAX : 052-913-3641

---