

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22560746

研究課題名（和文） アフィニティ膜濾過による遺伝子治療用プラスミドDNA精製プロセスの開発

研究課題名（英文） Development of Purification Process of Plasmid DNA for Gene Therapy Using Affinity Membrane Filtration

研究代表者

片桐 誠之 (KATAGITI NOBUYUKI)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：00345919

研究成果の概要（和文）：近年、先天性疾患の治療法としてプラスミドDNAを用いる遺伝子治療や遺伝子ワクチンが注目され、医療品純度のプラスミドDNAの精製プロセスの開発が希求されている。本研究では、リガンドの探索を行い、これを用いるアフィニティ膜濾過法の適用可能性を検討した。本システムにおける、リガンドに対するプラスミドDNAの吸・脱着特性および膜ファウリングを明らかにした。回収液のアガロース電気泳動分析により、プラスミドDNAを精製できることがわかり、本手法の有用性が確認された。

研究成果の概要（英文）：Recently, the use of plasmid DNA as vector for gene therapy or DNA vaccination has become increasingly popular as novel ways of dealing with disease. For such clinical applications, there is a growing need for purification processes to produce pharmaceutical-grade plasmid DNA. In the present study, the application of affinity membrane filtration to plasmid DNA purification and the search of ligand are examined. In addition to the selectivity behaviors in the binding process of plasmid DNA to ligand and the elution process of the bound plasmid DNA, the flux decline behaviors caused by the membrane fouling are also investigated in this system. The agarose gel analysis confirmed usefulness of this method for plasmid DNA purification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：プラスミドDNA, アフィニティ, 膜濾過, リガンド, 吸着, 脱着, 精製, 透過

1. 研究開始当初の背景

近年、先天性疾患等の治療を目的として、必要なタンパク質を遺伝子という形で患者に投与する遺伝子治療や遺伝子ワクチンの開発が活発に行われるようになり、特定の遺伝子を細胞内に導入するのに用いられるプラスミドDNA (pDNA) の大量生産法の確立が求められている。pDNAの増幅は、pDNAを微

生物体内に導入し、培養することで可能となるが、その精製には菌体や菌体内の多種多様な成分を除去する工程が必要となり容易ではない。既存技術のラボレベルの精製法は、操作が煩雑であることに加え、毒性のある物質の使用や精製量などの点で問題があり、医療品純度のpDNAを大量精製するのに適した産業レベルでの分離・精製法の開発が必須の

課題となっている。

最近、pDNA の大量生産に適した分離法として膜濾過法が注目されるようになり、精密濾過膜や限外濾過膜を用いて、pDNA の分離特性について様々な検討がなされている。しかしながら、pDNA は環状構造を有しており、濾過中の変形が著しいため、操作条件によって pDNA が膜を透過したり、あるいはしなかったりといった問題が生じ、タンパク質のように分子量を基準とした分離膜の選定ができないなど、多くの課題を残している。

一方、アミノ酸や乳酸のキラル分離において、分離対象物と親和性のあるリガンドを利用するアフィニティ膜濾過法が検討され、精製法として有効であることが報告されている。pDNA はポリアニオンであり、一部の金属イオンやペプチドなどと親和性を有することが確認されていることから、アフィニティ膜濾過法の導入が、効果的な分離・精製プロセスの確立に繋がる可能性がある。

本研究では、医療品純度のプラスミド DNA を大量生産するのに適した精製法として、アフィニティ膜濾過法を提案し、産業レベルでの分離・精製プロセスの開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、スケールアップが可能な pDNA の精製および濃縮法としてアフィニティ膜濾過法に着目した。pDNA と親和性のあるリガンドを探索するとともに、リガンドと分離膜とを用いて、pDNA をリガンドに吸着させて膜濾過することで不純物と分離し、その後に溶解液によりリガンドから pDNA を脱着させて高純度の pDNA を得るアフィニティ膜濾過法を開発し、その分離特性を究明する。最終的に、得られた結果を総合して、本法による遺伝子治療用 pDNA 精製プロセスの確立の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験試料

pDNA には、アンピシリン耐性遺伝子を有する pBluescript II SK(+) (3.0 kb, STRATAGENE 製) を用いた。大腸菌コンピテントセルを用いて形質転換を行い、pDNA を導入した大腸菌を得た。これをアンピシリンを添加した LB 培地にて培養し、遠心分離により培養液を除去した後、アルカリプレップ法により溶菌・変性・中和してタンパク質や染色体 DNA 等を除去した。次に、得られた溶液に所定濃度の CaCl_2 溶液を添加して沈殿を生成させ、その後、上澄液にエタノールを添加し、pDNA を含有する沈殿物を得た。10mM Tris-HCl buffer (pH 5) にて沈殿物を溶解させ、これをアフィニティ膜濾過実験の試料とした。

リガンドには、 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (公称粒子径 0.5 μm , 高純度化学研究所製) を、分離膜には、公称

孔径 0.1 μm のセルロース混合エステル製精密濾過膜 (ADVANTEC 製) を用いた。

(2) 吸・脱着実験

pDNA とリガンドとの親和性を確認するため、pDNA 精製キットにより精製した pDNA を用いて、吸・脱着実験を行った。回分吸着実験では、10mM Tris-HCl buffer (pH 7) を用いて作製した pDNA 溶液と $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 懸濁液を混合し、298 K の恒温室内で 1 時間振とうさせた後、12,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄液中の pDNA 濃度を分光光度計で測定して吸着量を求めた。回分脱着実験では、pDNA を吸着させた $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ に種々の pH の 2M Tris-HCl buffer を加え、298 K の恒温室内で 1 時間振とうさせた後、遠心分離し、上澄液中の pDNA 濃度から脱着量を求めた。

(3) アフィニティ膜濾過実験

吸着濾過実験は、(1) の手順で得た実験試料と $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 懸濁液を混合し、298 K の恒温室内で 300 rpm、1 時間攪拌した後、公称孔径 0.1 μm のセルロース混合エステル製精密濾過膜 (ADVANTEC 製) を用いて、49 kPa の一定圧力でデッドエンド濾過した。次に、pDNA が吸着した膜面上の $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ケークに 1M Tris-HCl buffer (pH 9)、続いて 2M Tris-HCl buffer (pH 10) を透過させて、pDNA の脱着を行った。濾液および透過液中の pDNA 濃度は、分光光度計を用いて 260 nm における吸光度 OD_{260} により評価した。また、アガロースゲル電気泳動により pDNA の精製度を確認した。

4. 研究成果

(1) pDNA 精製プロセス

本研究における大腸菌からの pDNA の精製フローを Fig. 1 に示す。アルカリプレップ法により菌塊、タンパク質、染色体 DNA 等が除去され、得られる溶液には、核酸やエンドトキシン等の不純物が含まれる。核酸として、pDNA の他に RNA が大量に含まれるため、 CaCl_2 添加による高分子 RNA の除去、エタノール添加による核酸の濃縮を経て、アフィニティ膜濾過法による精製を試みることにした。

Fig. 2 には、培養懸濁液の OD_{600} が 2.0 となるまで大腸菌を増殖させ、アルカリプレップ法に供する培養懸濁液量を変化させた場合の処理液の OD_{260} をプロットした。 OD_{260} は、pDNA を含む核酸濃度の指標となるため、この値が大きいくほどより多くの pDNA を大腸菌から溶出できたものと考えられる。プロットは、アルカリプレップ法で用いる単位 NaOH 量あたりの培養懸濁液量 V/W_{NaOH} の増加に伴い、はじめは増大し、やがて減少する挙動となり、pDNA の溶出に最適な培養懸濁液量が存在することがわかった。

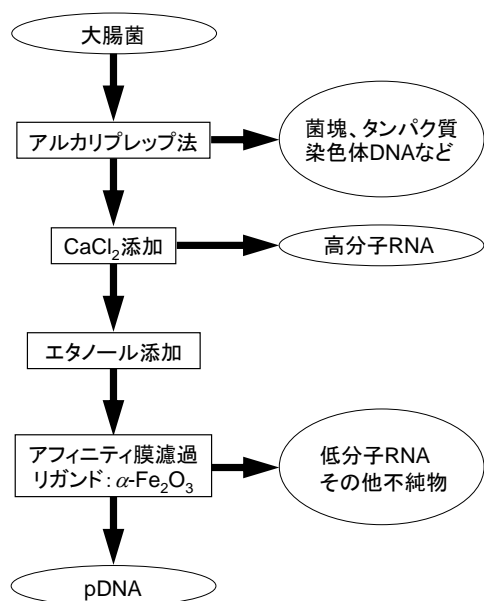


Fig. 1 pDNAの精製フロー

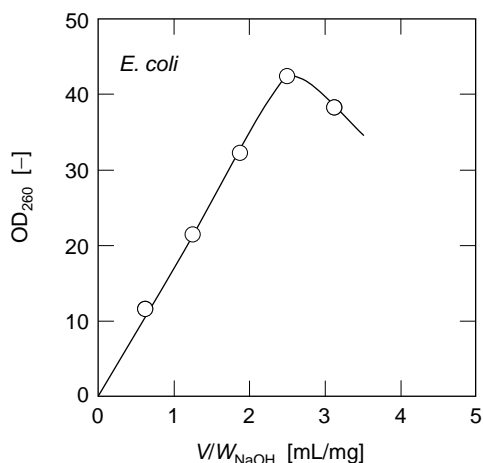


Fig. 2 培養懸濁液量と核酸溶出量の関係

(2) pDNA とリガンド ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) との親和性
 pDNA は、ポリアニオンであるため、正に帯電した物質に吸着すると推測される。 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ のゼータ電位を測定したところ、等電点が pH 8 付近にあり、pH 7 以下では正に、pH 9 以上では負に帯電することから、pDNA の劣化が生じない pH 範囲内で、吸着と脱着を行うことができるものと推察される。Fig. 3 には、キット精製 pDNA を用いた吸着実験で得た、pH 7 における $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ に対する pDNA の吸着等温線を示した。図中の C は平衡濃度、 W は $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 単位質量あたりに吸着した pDNA の質量である。pDNA の吸着挙動は、実線で示した単分子層吸着に基づく Langmuir 式(1)で近似でき、特に極低濃度においても吸着量が大き

いことから、pDNA の $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ に対する親和性が極めて大きいことがわかった。

$$W = \frac{aW_s C}{(1+aC)} \quad (1)$$

ここで、 a は吸着平衡定数、 W_s は飽和吸着量である。

研究の方法(1)の手順で得た実験試料を用いて行った pH 5, 6, 7 での吸着実験により、いずれの pH においても pDNA の吸着挙動は、Langmuir 式で近似できることを確認した。Fig. 4 には、飽和吸着量 W_s と pH の関係を示した。pH が小さい程、飽和吸着量は大きくなり、より多くの pDNA を吸着できることが明らかである。ただし、pH を小さくしすぎると pDNA の劣化が生じる恐れがあるため、アフィニティ膜濾過実験における吸着濾過は、pH 5 で行うこととした。

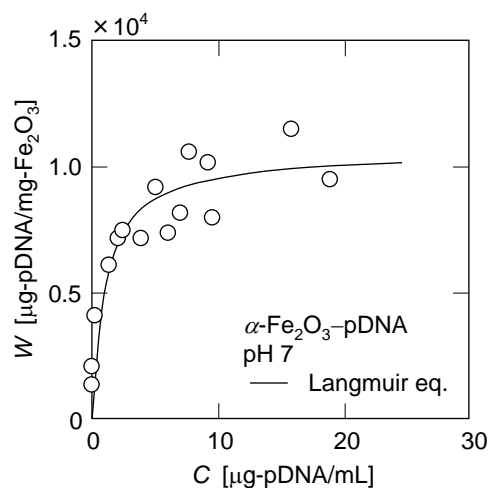


Fig. 3 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ に対する pDNA の吸着特性

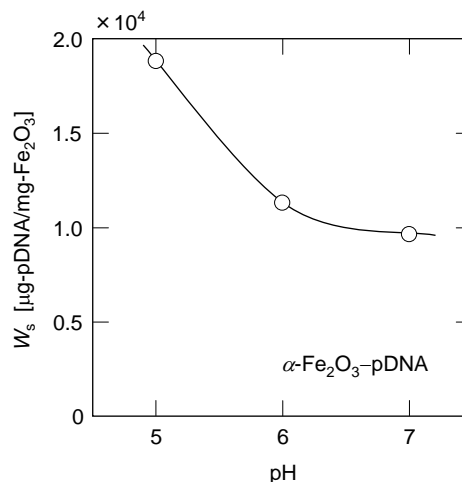


Fig. 4 pDNA の吸着特性の pH 依存性

Fig. 5 には、pDNA を吸着させた $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 懸濁液の pH を変化させた場合の各 pH における脱着率 D を示した。pH が 9 程度になると pDNA が脱着されるようになり、pH が 10 より大きくなるとほぼ 100% 脱着されることが明らかとなった。この結果から、アフィニティ膜濾過実験における脱着濾過では、最終的に pH を 10 にすることとした。

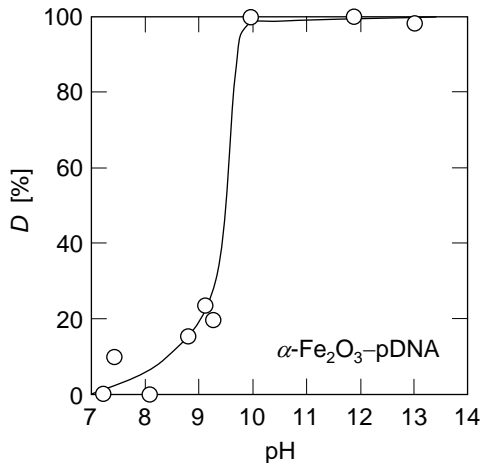


Fig. 5 pDNA の脱着特性の pH 依存性

(3) アフィニティ膜濾過

pDNA は精密濾過膜を透過するが、リガンドとなる $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ は $0.1 \mu\text{m}$ の精密濾過膜で阻止できることから、pDNA を $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ に吸着させて精密濾過することで膜面上に保持でき、その後 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ から脱着させるという二段階の濾過により pDNA を精製できるものと考えた。吸着実験の結果に基づき、培養液中の pDNA をほぼ 100% 吸着させるのに必要となる $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 量を算出して、吸着濾過実験を行った。Fig. 6 には、結果を濾過速度の逆数 $d\theta/dv$ 対単位濾過面積あたりの濾液量 v としてプロットした。pDNA を吸着させていない $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ のみのスラリーでは、プロットが直線関係となりケーキ濾過の挙動となるのに対して、pDNA が吸着した $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ スラリーでは、沈降を伴う濾過挙動となった。正電荷をもつ $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ がポリアニオンの pDNA により荷電中和され、フロックを形成し粒子が粗大化したことによる影響と考えられる。

Fig. 7 には、吸着濾過後に生成した $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ケーキに $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ の等電点よりも大きな pH 9 および 10 の buffer を透過させた時の透過液速度の逆数 $d\theta/dv$ と透過液の OD_{260} の経時変化を示した。Buffer の pH を 9 から 10 へ変化させることで $d\theta/dv$ 値は 400 s/cm から 600 s/cm 程度に変わり、ケーキ構造が変化することがわかる。透過液の OD_{260} は、pH 10 の buffer の透過初期に正の値が得られ、この時に pDNA

が脱着されたものと推察される。

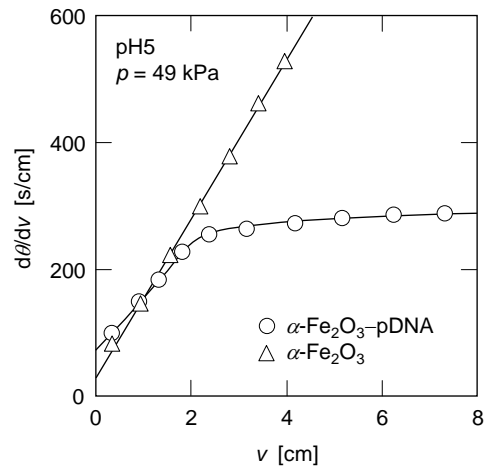


Fig. 6 pDNA の吸着濾過挙動

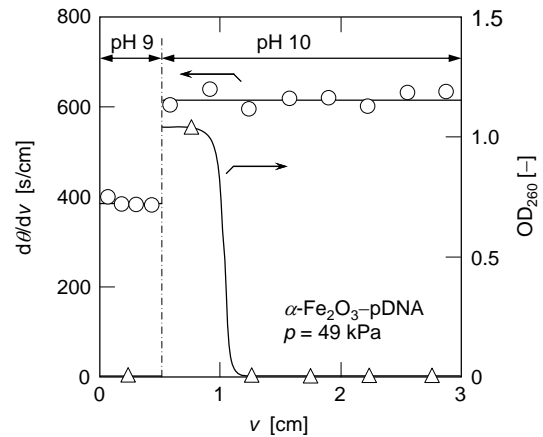


Fig. 7 pDNA の脱着挙動

Fig. 8 には、各処理後に得られる溶液のアガロースゲル電気泳動の結果を示した。アルカリプレップ法③、 CaCl_2 添加④、⑤を経て吸着濾過に供した溶液⑥は、キットで精製した pDNA ②と比較すると、pDNA と低分子 RNA が含まれていることがわかる。吸着濾過の濾液⑦ (pH 5) には、pDNA、RNA とも確認できないことから、両核酸が $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ に吸着し、膜面上のケーキ内に存在するものと推察される。pDNA の脱着では、pH 9 の buffer の透過液⑧でわずかな量の低分子 RNA が確認され、続いて pH 10 の初期透過液⑨で、pDNA と低分子 RNA が、その後⑩では pDNA のみが確認され、アフィニティ膜濾過を用いる一連の精製法により大腸菌から高精製度の pDNA を得ることができた。

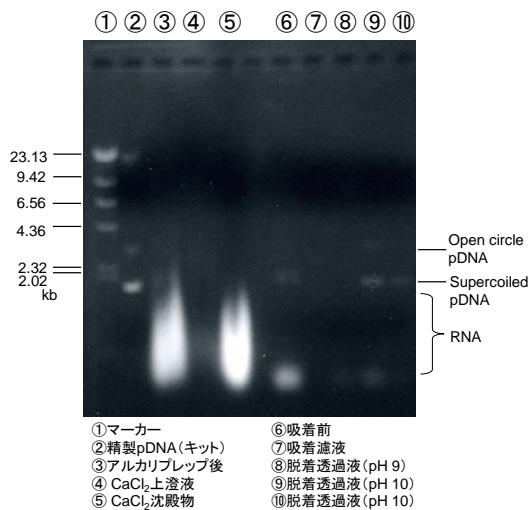


Fig. 8 電気泳動分析

(4) まとめ

α -Fe₂O₃ のサブミクロン粒子がリガンドとして有望であることを明らかにするとともに、アルカリプレップ法、CaCl₂沈殿およびアフィニティ膜濾過法による精製プロセスにより大腸菌で増幅させた pDNA の精製が可能であることを示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- (1) K. J. Hwang, P. C. Tsai, E. Iritani and N. Katagiri, "Effect of Polysaccharide Concentration on the Membrane Filtration of Microbial Cells", *J. Appl. Sci. Eng.*, **15**, 323-332, 2012, 査読有, DOI: なし
- (2) 入谷英司, 片桐誠之, 杉山悠生, "希薄コロイドの定速および定圧精密濾過における膜閉塞特性", *化学工学論文集*, **37**, 323-326, 2011, 査読有, DOI: なし
- (3) E. Iritani, N. Katagiri, T. Tadama and H. Sumi, "Analysis of Clogging Behaviors of Diatomaceous Ceramic Membranes During Membrane Filtration Based upon Specific Deposit", *AIChE J.*, **56**, 1748-1758, 2010, 査読有, DOI: 10.1002/aic.12111

[学会発表] (計 25 件)

- (1) 鈴木崇之, 片桐誠之, 入谷英司, アフィニティ膜分離法によるプラスミド DNA の精製, 膜シンポジウム 2012, 2012 年 11 月 6 日, 神戸大学(兵庫県)

- (2) 鈴木崇之, 片桐誠之, 入谷英司, プラスミド DNA のアフィニティ膜分離法の開発, 化学工学会第 44 回秋季大会, 2012 年 9 月 20 日, 東北大学(宮城県)
- (3) 高橋宏紀, 片桐誠之, 入谷英司, 微生物代謝多糖類の膜分離特性の評価, 化学工学会第 44 回秋季大会, 2012 年 9 月 19 日, 東北大学(宮城県)
- (4) 片桐誠之, 下川大輔, 鈴木崇之, 入谷英司, アフィニティ膜濾過法によるプラスミド DNA の精製, 分離技術会年会 2012, 2012 年 6 月 1 日, 関西大学(大阪府)
- (5) N. Katagiri, D. Shimokawa, T. Suzuki and E. Iritani, Purification of Plasmid DNA Using Affinity Microfiltration, 11th World Filtration Congress (WFC11), April 17, 2012, Graz (Austria)
- (6) N. Katagiri, D. Shimokawa, T. Suzuki and E. Iritani, Development of Purification Process of Plasmid DNA for Gene Therapy Using Affinity Membrane Filtration, Filtration and Separation Symposium 2011, November 18, 2011, Tokyo (Japan)
- (7) N. Katagiri, D. Shimokawa, T. Suzuki and E. Iritani, Development of Purification Process of Plasmid DNA Using Affinity Membrane Filtration, 9th International Conference on Separation Science and Technology (ICSST11), November 4, 2011, Jeju (Korea)
- (8) 鈴木崇之, 片桐誠之, 入谷英司, プラスミド DNA のアフィニティ分離・精製法の開発, 化学工学会第 43 回秋季大会, 2011 年 9 月 14 日, 名古屋工業大学(愛知県)

[図書] (計 3 件)

- (1) 入谷英司, 片桐誠之, サイエンス&テクノロジー, "水処理膜の製膜技術と材料評価", 2012, 22-47

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
片桐 誠之 (KATAGIRI NOBUYUKI)
名古屋大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 00345919
- (2) 研究分担者
入谷 英司 (IRITANI EIJI)
名古屋大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 60144119
- (3) 連携研究者なし