

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420800

研究課題名(和文) アフィニティ膜濾過法を導入した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 by Introducing Affinity Membrane Filtration

研究代表者

片桐 誠之 (KATAGIRI, Nobuyuki)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00345919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アフィニティ膜濾過による医療品純度のプラスミドDNAの精製プロセスの開発を行った。菌体内からプラスミドDNAを溶出する方法を検討し、スラリーの粒度分布、顕微鏡写真、膜濾過特性および液中の核酸の電気泳動分析からエレクトロポレーションの導入が有用であることを示した。プラスミドDNAと親和性のあるリガンドとして酸化鉄粒子を選択し、二段階のアフィニティ膜濾過法を検討した。溶液のpHを5に調製して吸着濾過を行い、不純物を除去した後、pH 9, 10, 12の溶液を順に透過させ、プラスミドDNAをリガンドから脱着させた。回収液の分析の結果、核酸の精製度は高く、本手法の有用性が確認された。

研究成果の概要(英文)：The development of a purification process of medical products purity plasmid DNA by affinity membrane filtration was examined. From the results of particle size distribution, photomicrograph, membrane filtration of slurry, and electrophoretic analysis of nucleic acids, it was found that the introduction of electroporation was useful for elution of plasmid DNA from bacterial cells. The iron oxide particle was selected as a ligand for two-stage affinity microfiltration of plasmid DNA. In the first stage microfiltration, the experiment was conducted under the condition of pH 5, and the cake of iron oxide particle with plasmid DNA bound was obtained and the impurities were removed. Next, water (pH 9 10 and 12) permeations through the cake were performed to desorb the bound plasmid DNA. It is revealed that the degree of purification of nucleic acid is high from the analysis of the recovery solution, the usefulness of this method has been confirmed.

研究分野：工学・プロセス工学

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

1. 研究開始当初の背景

先天性疾患等の治療を目的として、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¹⁾。pDNA の増幅は、pDNA を大腸菌などの微生物細胞内に導入し、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。既に確立された精製法が提案されているが、操作が煩雑であることに加え、毒性のある物質を使用することから、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²⁾。

近年、分離膜を用いる膜濾過法が pDNA の大量生産に適した分離法として注目され、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³⁾。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、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、アミノ酸や乳酸のキラル分離において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、アフィニティ膜濾過法の導入を検討し、医療品純度の pDNA を大量生産するのに適した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、pDNA をリガンドに吸着させた後、膜濾過することで不純物と分離し、その後溶離液によりリガンドから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。また、微生物細胞内からの pDNA の溶出法を確立し、最終的に、得られた結果を総合して、菌体の破碎から医療品純度の pDNA を得るまでの一連の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、pBluescript II SK(+) (3.0 kb, STRATAGENE 製) を用いた。pDNA を導入した大腸菌を LB 培地にて培養し、遠心分離により培養液を除去した後、純水に懸濁させ、

Gene Pulser Xcell (BIO-RAD 製) によるエレクトロポレーション、超音波ホモジナイザー (UP200s, Dr. Hielscher 製) による超音波照射、ジルコニアビーズによるビーズ破碎を行った。その後、公称孔径 0.1 μm のセルロース混合エステル膜 (ADVANTEC 製) を用いて、49 kPa の一定圧力でデッドエンド濾過し、pDNA を含む核酸溶液を得た。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) を用いた。

(2) 吸・脱着実験

pDNA 及び RNA とリガンドとの親和性を確認するため、キットにより精製した pDNA と RNA を用いて、吸・脱着実験を行った。回分吸着実験では、種々の pH にて作製した 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 及び RNA 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 及び RNA 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 および 12) 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) プラスミド DNA の溶出

大腸菌からの pDNA の溶出について、薬品を用いない溶出法の候補となるエレクトロポレーション、超音波照射、ビーズミル破碎を検討したところ、図 1~3 に示すように、いずれの方法においても処理後の懸濁液中に pDNA が溶出されることが確認できた。しかしながら、溶出量を多くする目的で超音波照射を長く続けると、図 2 のように pDNA の位置のバンドが薄くなっていくことから、溶出された pDNA が超音波により分解されるものと推察され、回収量の増加が困難であることが明らかとなった。ビーズミル破碎では、菌体の破碎が容易で多くの pDNA が溶出されたが、図 3 からわかるようにゲノム DNA が切断され、その後の精製が困難となった。

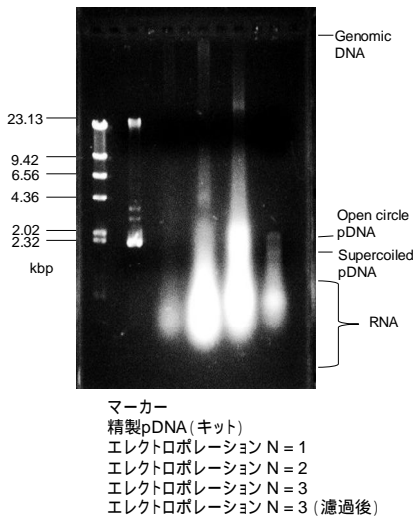


図1 エレクトロポレーションによる溶出

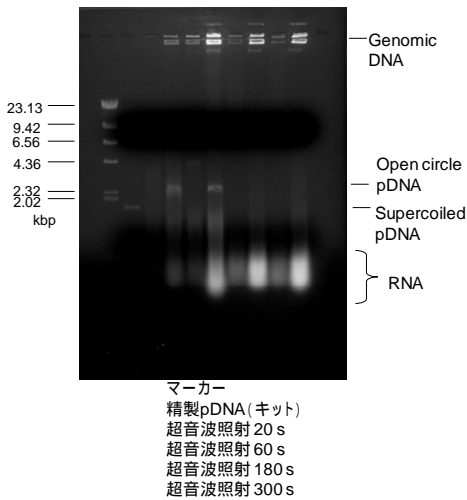


図2 超音波照射による溶出

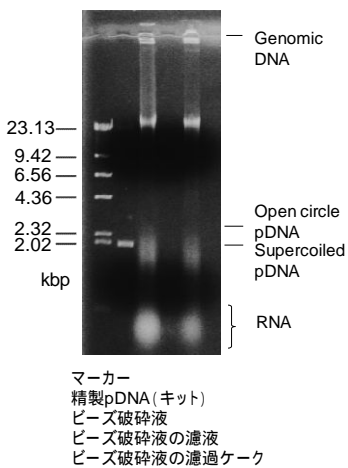


図3 ビーズミル破砕による溶出

各手法にて処理を行った大腸菌懸濁液の顕微鏡写真を図4に、粒度分布を図5に示した。未処理と比較すると、エレクトロポレーション後の変化が顕著で、大きなフロックが形成されていることが確認できる。エレクトロポレーションにより大腸菌からゲノムDNA、多糖類、タンパク質などの生体高分子も溶出され、菌体とともに凝集塊が形成されたものと推察される。図1において、エレクトロポレーションの操作回数 N を多くすると顕著となる高分子の核酸が濾過により除去されたのは、この凝集塊が膜面上で捕捉され形成する濾過ケーキによる効果が考えられる。

不純物を除去して pDNA 溶液を得るために精密濾過を行い、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 として図6にプロットした。超音波照射とビーズミル破碎の場合と比較すると凝集塊が形成されたエレクトロポレーションでは、濾過速度が極めて大きいことがわかり、分離性能においても優位性が確認できた。

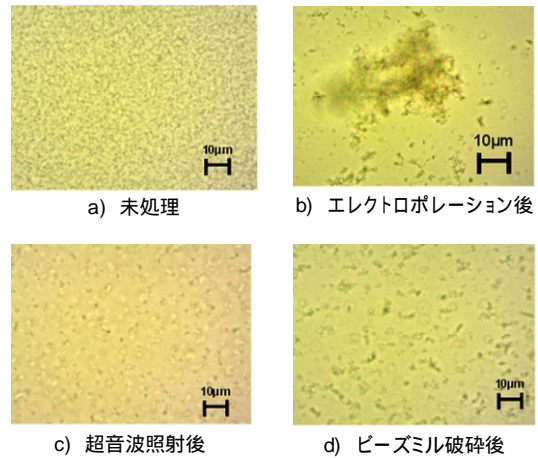


図4 顕微鏡写真

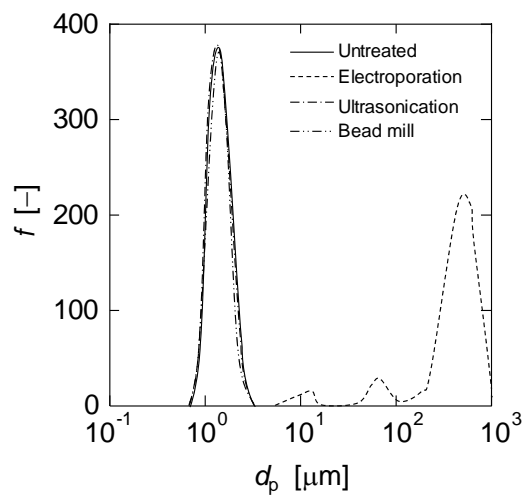


図5 粒度分布

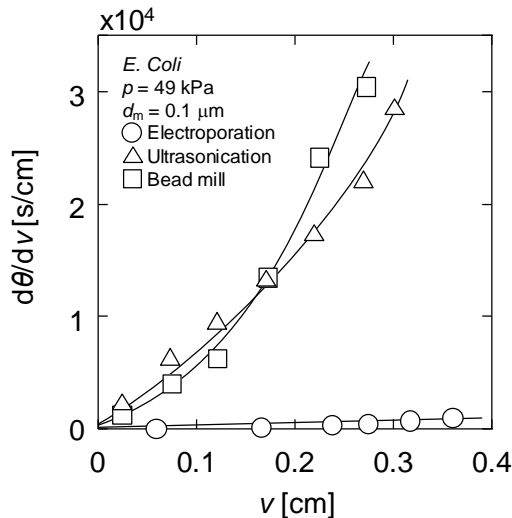


図6 濾過挙動

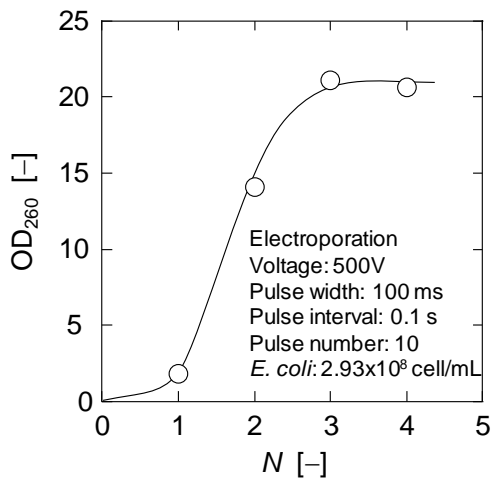


図7 核酸溶出量の変化

以上の結果から、エレクトロポレーションが pDNA の溶出法として最適であると結論づけ、本法の操作条件の最適化を検討した。操作時の設定項目である電圧、パルス幅、パルス間隔、パルス数を種々に変化させて pDNA の溶出を試みたところ、電圧、パルス幅、パルス数は大きな値に、一方パルス間隔は小さな値に設定するほど溶出量が大きくなり、最終的に電圧 500 V、パルス幅 100 ms、パルス間隔 0.1 s、パルス数 10 で pDNA を含む核酸の溶出量が最大となることがわかった。図 7 は、この最適操作条件での結果であり、核酸溶出量の指標となる OD_{260} 値をエレクトロポレーションの操作回数 N に対してプロットした。回数を多くするほど OD_{260} 値が大きくなり、多量の pDNA を溶出できたが、3 回目以降はほぼ同じ値となり、溶出限界があることも確認された。

(2) アフィニティ膜濾過

pDNA 溶出後のアフィニティ膜濾過には、リガンドとして $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ を用いた。図 8 に示すように、 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ の等電点は 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、pH 変化によりポリアニオンである pDNA の吸着と脱着を行うことができるものと推察された。キット精製した pDNA を用いて $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ への吸着特性を検討したところ、pH が小さいほど吸着量が大きくなり、その吸着挙動は Langmuir 式で近似された。pDNA の劣化が生じない pH 5 で吸着させ、その後 pH 変化により脱着させた時の結果を図 9 に示した。図には大腸菌からの溶出液に多量に含まれ、pDNA との分離が困難な RNA の結果も併せて示しており、RNA の方がより小さな pH で脱着率 D が大きくなっていることから、pH を段階的に変化させることで両核酸の分離が可能となることが期待される。

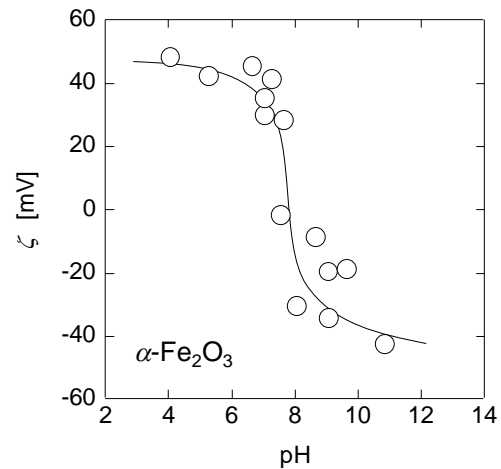


図8 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ のゼータ電位

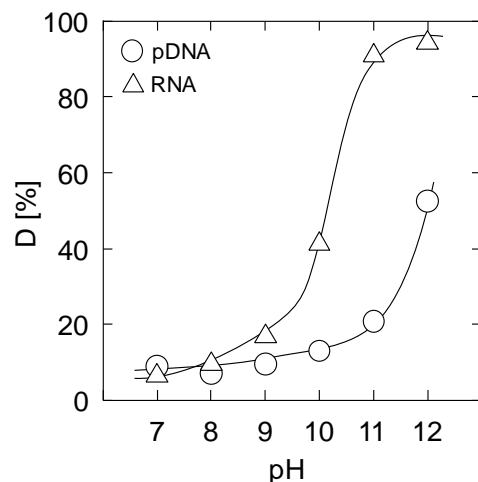


図9 pDNA および RNA の脱着特性

キット精製した pDNA と RNA を混合して調製した溶液を用いて、単成分系での吸・脱着特性に基づいて pH 5 で両核酸を $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ に吸着させた後、pH を 9, 10, 12 と段階的に変化させて脱着させ、電気泳動分析した。図 9 で得られた結果からの想定とは異なり、図 10 に示す写真では、レーン、のいずれの pH においても pDNA と RNA の両バンドが確認され、RNA は pH 12 で最も多く脱着された。pDNA と RNA の混合時における脱着特性について、更なる検討が必要となることが明らかとなった。なお、環状 DNA である pDNA については、pH によってスーパーコイル状とオープンサークルの比率が異なっている様子が観えた。

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。図 11 には、エレクトロポレーションと精密濾過により得た pDNA を含む核酸溶液を用いて、 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ をリガンドとするアフィニティ膜濾過を行った際の電気泳動の結果を示した。pDNA は一旦リガンドに吸着した後（レーン）、溶液環境の変化により脱着され（レーン）、吸光度比から求まる精製度も高いことから、本法による精製が可能であることが確認された。ただし、回収液には依然として RNA が含有されているため、pDNA と RNA との分離が今後の課題となる。

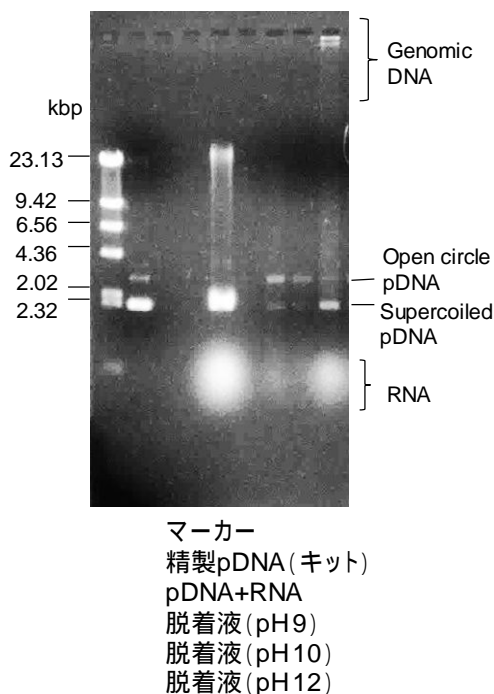


図 10 pDNA 及び RNA の脱着特性

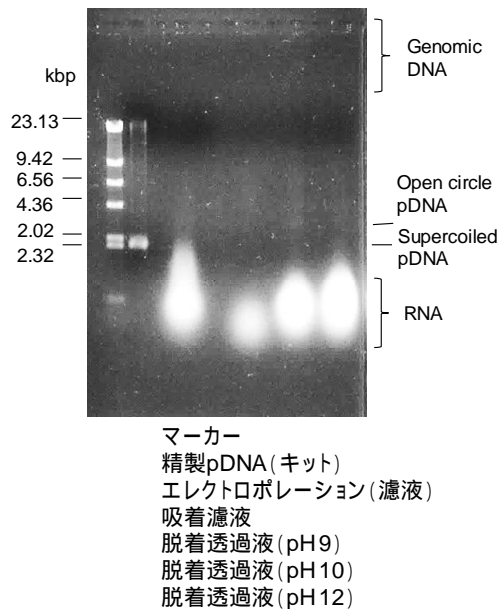


図 11 電気泳動分析(アフィニティ膜分離)

(3) まとめ

pDNA の精製プロセスにおいて、菌体からの溶出法としてエレクトロポレーション、超音波照射、ビーズミル破碎を検討し、pDNA の溶出量とその後の分離性の観点からエレクトロポレーションが有用であることを示した。また、 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 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、これを用いたアフィニティ膜分離法により、pDNA の精製が可能であることを示した。

<引用文献>

- 1) Prather, K.J., S. Sagar, J. Murphy and M. Chartrain; Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification, *Enzyme Microbiol. Technol.* **33**, 2003, 865-883
- 2) Cai, Y., S. Rodriguez, R. Rameswaran, R. Draghia-Akli, R.J. Juba and H. Hebel; Production of pharmaceutical-grade plasmids at high concentration and high supercoiled percentage, *Vaccine* **28**, 2010, 2046-2052
- 3) Higuchi, A., K. Kato, M. Hara, T. Sato, G. Ishikawa, H. Nakano, S. Satoh and S. Manabe; Rejection of Single Stranded and Double Stranded DNA by Porous Hollow Fiber Membranes, *J. Membr. Sci.*, **378**, 2011, 280-289

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Katagiri, N., H. Kawahara, Y. Arai and E. Iritani; Evaluation of Compression-Permeability Characteristics of Microbial Cake Based on Microfiltration Data, Sep. Sci. Technol., 査読有, **51**(5), 2016, 845-852, DOI:10.1080/01496395.2015.1119849

Iritani, E., N. Katagiri, R. Nakajima, K.J. Hwang and T.W. Cheng; Nanocolloid Cake Properties Determined from Step-Up Pressure Filtration with Single-Stage Reduction in Filtration Area, AIChE J., 査読有, **61**(12), 2015, 4426-4436, DOI:10.1002/aic.14967

Iritani, E., N. Katagiri, T. Takenaka and Y. Yamashita; Membrane Pore Blocking during Cake Formation in Constant Pressure and Constant Flux Dead-End Microfiltration of Very Dilute Colloids, Chem. Eng. Sci., 査読有, **122**, 2015, 465-473, DOI: 10.1016/j.ces.2014.09.052

Iritani, E., N. Katagiri, R. Nakajima, K.J. Hwang and T.W. Cheng; Cake Properties of Nanocolloid Evaluated by Variable Pressure Filtration Associated with Reduction in Cake Surface Area, AIChE J., 査読有, **60**(11), 2014, DOI:3869-3877, 10.1002/aic.14601

Iritani, E., N. Katagiri, M. Tsukamoto and K.J. Hwang; Determination of Cake Properties in Ultrafiltration of Nano-colloids Based on Single Step-up Pressure Filtration Test, AIChE J., 査読有, **60**(1), 289-299 (2014), DOI: 10.1002/aic.14262

〔学会発表〕(計 32 件)

片桐誠之、笹川崇光、入谷英司、微生物代謝物の膜ファウリング特性に及ぼす多糖とタンパク質の相互作用の影響、化学工学会第 81 年会、2016 年 3 月 14 日、関西大学(大阪府)

片桐誠之、藤井岳、入谷英司、酵母懸濁液の膜濾過における細胞破碎処理の影響、化学工学会第 81 年会、2016 年 3 月 14 日、関西大学(大阪府)

桑島侑也、片桐誠之、入谷英司、高圧による微生物細胞の破壊が定速濾過挙動に及ぼす影響、化学工学会第 47 回秋季大会、2015 年 9 月 9 日、北海道大学(北海道)

香西真仁、片桐誠之、入谷英司、プラスミド DNA のアフィニティ膜濾過・精製における菌体からの溶出法の検討、化学工学会第 47 回秋季大会、2015 年 9 月 9 日、北海道大学(北海道)

片桐誠之、活性汚泥法におけるフロック形成と分離特性(招待講演) 土・水・生命環境とコロイド界面現象 2015、2015 年 7 月 31 日、筑波大学(茨城県)

Iritani, E., N. Katagiri, R. Nakajima and M. Tsukamoto; Cake Properties of Nano-Colloids in Variable Pressure Filtration, European Conference on Fluid-Particle Separation (FPS) 2014, 2014 年 10 月 15 日, Lyon (France)

笹川崇光、片桐誠之、入谷英司、微生物代謝多糖およびタンパク質の精密濾過特性の評価、化学工学会第 46 回秋季大会、2014 年 9 月 18 日、九州大学(福岡県)

香西真仁、片桐誠之、入谷英司、エレクトロポレーションシステムを導入したプラスミド DNA のアフィニティ分離法の開発、化学工学会第 46 回秋季大会、2014 年 9 月 17 日、九州大学(福岡県)

片桐誠之、膜ファウリング現象の解析 ケーク濾過・閉塞濾過挙動の解析法(招待講演) 先端膜工学研究推進機構平成 25 年度春季講演会、2014 年 3 月 7 日、神戸大学(兵庫県)

Katagiri, N., D. Shimokawa, T. Suzuki and E. Iritani; Purification of Plasmid DNA Using Affinity Membrane Filtration, 3rd International Conference on Biotechnology Engineering (ICBioE 2013), 2013 年 7 月 2 日, Kuala Lumpur (Malaysia)

〔図書〕(計 2 件)

片桐誠之、技術情報協会、吸着・分離材料の設計、性能評価と新しい応用(膜閉塞・ケーク濾過挙動の解析(第 5 章 シミュレーションによる吸着, 分離挙動の把握, 性能予測, 6 節))、2015、524(300-304)

〔その他〕

ホームページ等

分離プロセス工学研究グループ

<http://www.nuce.nagoya-u.ac.jp/L5/>

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