

ポリカチオンの多点吸着効果を利用する
核酸選択吸着剤の開発

(研究課題番号 18550198)

平成 18 年度～平成 19 年度科学研究費補助金 (基盤研究(C))

研究成果報告書

平成 20 年 3 月

研究代表者 坂田 眞砂代

(熊本大学 大学院自然科学研究科 助教)

1. はしがき

現在、市販されている人体用および動物用ワクチンの大部分は、細菌から抽出・精製されたものである。核酸は、菌体由来のワクチンや試薬の原材料中に普遍的に存在している。核酸が注射等により体内に投与されると人体に発ガン遺伝子を増殖させる恐れがあるため、注射用タンパク質水溶液から核酸を除去することが切望されている。

核酸吸着剤の開発例としては、井田ら(1991年)はキトサン粒子が高い核酸吸着能を有することを報告している。しかしながら同吸着剤のpKaが6.2と低いため、生体環境下に近い水溶液(pH 7-8, 塩濃度 0.15M)中では、核酸吸着能が低下するという結果が得られている。申請者らは、先にポリエチレンイミン架橋体がたんぱく質水溶液に混在する核酸を選択吸着除去できることを明らかにした(Journal of Chromatography A, 1030, 117-122, 2004)。しかしながら同粒子は、調製における収率が低く、工業レベルでの大量製造までは到っていない。

ポリカチオン固定化セルロース粒子を用いる核酸選択吸着についての検討は、申請者が初めてである。吸着剤の基体であるセルロース粒子およびリガンドであるポリカチオン類は、工業レベルでの大量製造が可能で、かつ生体への安全性が高い材料を選択する。このことより、開発された粒子は、医薬・注射用タンパク質水溶液からの核酸除去剤への応用が大いに期待できる。

本研究の最大の特徴は、核酸の化学構造を十分に考慮したリガンドおよびマトリックス材料を分子設計し、アフィニティ吸着剤とすることにある。具体的には、核酸がリン酸残基をもつポリヌクレオチドであり、剛直なコンホメーションを有することを考慮する。すなわち、核酸の取り込みを可とする細孔径を有するセルロース微粒子を基体とし、また、リガンドとしてポリカチオン類を選択することにより核酸との多点吸着作用が期待でき、従来の吸着剤と比較して核酸吸着能が飛躍的に増大することが期待できる。さらにリガンドの水溶液中での解離状態(pKa)、疎水性、コンホメーションの制御はきわめて重要なファクターであり、たんぱく質やワクチン抗原などの有効成分存在下での選択吸着を左右する。

本研究では、核酸がその構造上にリン酸残基をもつ高分子物質であることに着目し、アミノ化セルロース粒子を核酸吸着剤として応用することを試みた。初年度は核酸(DNA)選択吸着能に及ぼす粒子の細孔径(M_{lim})およびリガンドの化学構造の影響について調査した。主に、種々のポリカチオン固定化セルロース粒子を調製し、得られた粒子を吸着剤として使い、バッチ法により、標準核酸およびたんぱく質に対する吸着能について評価した。最終年度には、カラムクロマトグラフィー法により、注射用粗精製タンパク質水溶液からの核酸の吸着除去を試みた。

2. 研究組織

研究代表者：坂田 眞砂代（熊本大学大学院自然科学研究科 助教）

研究分担者：佐々木 満（熊本大学大学院自然科学研究科 准教授）

3. 交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	2,500	0	2,500
平成19年度	1,300	390	1,690
総計	3,800	390	4,190

4. 研究発表

（1）学会誌等

- 1) Masayo Sakata, Minoru Nakayama, Kazuhiro Yanagi, Mitsuru Sasaki, Masashi Kunitake, C. Hirayama, "Selective removal of DNA from bioproducts by polycation-immobilized cellulose beads" *Journal of Liquid Chromatography & Related Technology*, Vol. 29, pp.2499-2512 (2006).
- 2) Masayo Sakata, Masami Todokoro, "Preparation of polycation-immobilized cellulose beads and their application to selective removal of endotoxin", *Cellulose Communications*, Vol. 14 (No.1), pp.7-11 (2007).
- 3) Shintaro Kawano, Sayaka Nishi, Masayo Sakata, Masashi Kunitake, "Preparation of nearly monodispersed polystyrene particles formed by polymerization in a surfactant-free emulsion with silica particles", *Chemistry Letters*, Vol. 36 (6), pp.766-767 (2007).
- 4) Masayo Sakata, Masashi Kunitake, "Chromatographic removal of DNA from protein solutions by cationic polymer beads", *Current Pharmaceutical Analysis*, Vol. 3, pp.170-179 (2007).
- 5) 坂田眞砂代, 戸所正美, 國武雅司 "エンドトキシン選択吸着剤としての細孔制御ポリカチオン固定化高分子微粒子の開発", *高分子論文集*, Vol. 64 (No. 12), pp. 821-829 (2007)

(2) 国際会議発表等

- 1) Masayo Sakata, Minoru Nakayama, Rie Nakamura, Seiko Sakamoto, Masashi Kunitake, “Chromatographic separation of DNA from bio-product using polycation-immobilized polymer beads” Proceeding of 31th International Symposium & Exhibit on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, p.903, Ghent, Belgium (2007.6.19).
- 2) Shintaro Kawano, Sayaka Nishi, R. Umeza, Masayo Sakata, Masashi Kunitake, “Novel preparation technique of mono-dispersed polystyrene particles based on silica particled dispersed aqueous solution without stirring and hydrophilic initiator, Proceeding of 5th International Forum of New Waves in Supramolecular Chemistry and Superstructured Materials, Kumamoto, Japan (2007.11.22).
- 3) Shintaro Kawano, Sayaka Nishi, Masayo Sakata, Masashi Kunitake, Formation of nearly monodispersed polystyrene particles by spontaneous emulsion polymerization into silica particle solutions without surfactants, Proceeding of 10th Pacific Polymer Conference (PPC 10), p.127, Kobe, Japan (2007.12.5).

(3) 国内の学会発表等

- 1) 坂田 眞砂代, LPS 選択吸着剤としてのポリカチオン固定化セルロースビーズの設計とその応用, セルロース学会西部支部シンポジウム「多糖材料とものづくり」講演予稿集, pp. 12-15 (2006. 10. 16) 熊本大学
- 2) 坂田 眞砂代、佐々木 満、國武 雅司、戸所 正美、中山 実, “注射用タンパク質水溶液からの内毒素選択除去のためのポリカチオン固定化高分子粒子の設計と応用”, 第 20 回熊本県産学官技術交流会講演論文集, pp. 188-189 (2006. 1. 24) 熊本
- 3) 坂田 眞砂代、嶋村 孝史、佐々木 満、國武 雅司、中山 実, “注射用医薬からのエンドトキシン吸着除去のためのポリリジン固定化セルロースビーズ”, 第 126 年会日本薬学会要旨集, P28[Q]pm-017 (2006. 3. 29) 仙台
- 4) 坂田 眞砂代、中村 理恵、佐々木 満、國武 雅司、中山 実, “ポリカチオン固定化セルロースビーズカラムによるタンパク質水溶液からの核酸選択除去”, 第 55 回高分子年次大会・講演要旨集, Vol. 55, No. 1, p. 1682 (2006. 5. 25) 名古屋
- 5) 後藤 理香、坂田 眞砂代、國武 雅司, “デンドリマー反応を利用した多分岐高分子修飾粒子の糖鎖分離システムの評価”, 2006 年日本化学会西日本大会・講演予稿集, p. 122

- 6) 福間 百合子、坂田 眞砂代、國武 雅司、戸所 正美, “ポリリジン固定化セルロース微粒子を用いた特異的エンドトキシン測定システムの開発”, 第 21 回熊本県産学官技術交流会講演論文集, pp. 28-29 (2007. 1. 23) 熊本
- 7) 福間 百合子、坂田 眞砂代、國武 雅司、戸所 正美, “ポリリジン固定化セルロース微粒子を用いた 選択的エンドトキシン測定システムの開発”, 第 56 回高分子年次大会, Polymer Preprints, Japan, Vol. 56, No. 1, p.1606 (2007. 5. 29) 京都
- 8) 石倉 圭, 坂田眞砂代, 國武雅司, “原子移動ラジカル重合法を用いた新規 DNA 吸着粒子のデザイン・合成”, 第 44 回化学関連支部合同九州大会 講演予稿集, p. 283 (2007. 7. 7) 北九州
- 9) 福間 百合子, 坂田 眞砂代, 戸所 正美, 國武 雅司, “ポリリジン固定化セルロース微粒子を用いた選択的エンドトキシン測定システムの開発”, 第 44 回化学関連支部合同九州大会 講演予稿集, p. 287 (2007. 7. 7) 北九州
- 10) 坂本 誓子, 坂田 眞砂代, 戸所 正美, 國武 雅司, “ポリリジン固定化セルロース微粒子充填カラムによるタンパク質溶液からの核酸選択分離”, 第 44 回化学関連支部合同九州大会 講演予稿集, p. 287 (2007. 7. 7) 北九州
- 11) 石倉 圭, 坂田 眞砂代, 國武 雅司, “原子移動ラジカル重合法を用いた新規 DNA 吸着粒子のデザイン・合成”, 2007 年日本化学会西日本大会 講演要旨集, p. 183 (2007. 11. 10) 岡山
- 12) 坂田 眞砂代, 福間 百合子, 國武 雅司, 戸所 正美, “ポリカチオン固定化セルロース微粒子を用いた選択的エンドトキシン定量システムの開発”, 2007 年日本化学会西日本大会講演要旨集, p. 183 (2007. 11. 10) 岡山
- 13) 坂本 誓子, 立中 祐希, 坂田 眞砂代, 國武 雅司, 戸所 正美, “DNA のクロマト分離のためのポリカチオン固定化セルロースの設計と応用”, 第 22 回熊本県産学官技術交流会 講演論文集, p. 62-63 (2008. 1. 22) 熊本
- 14) 甲斐 滉一、福間 百合子, 丸山 美緒, 坂田 眞砂代、國武 雅司, “日本酒原材料からのグルコアミラーゼ吸着除去を目的とした化学修飾高分子微粒子の設計, 第 22 回熊本県産学官技術交流会講演論文集, p. 64-65 (2008. 1. 22) 熊本

5. 研究成果

5.1 序論

現在、市販されている人体用および動物用ワクチンの大部分は、細菌から抽出・精製されたものである。このようにして産出されたワクチン材料中には、エンドトキシンと同様に多くの核酸 (DNA および RNA) も混在している。このため、これらの材料中からワクチンとしての有効成分を分離・精製するためには、核酸を除去することも重要な課題である。すでに、キトサン粒子[1] が核酸吸着剤として商業化されている。同吸着剤は、核酸の構造中のリン酸基とイオンの相互作用を起こすカチオン基 (アミノ基) を有している。しかしながら、同吸着剤は、選択性において十分満足できる結果が得られていない。我々は、独自の懸濁重合法により調製したポリエチレンイミンやジメチルアミノプロピルアクリルアミドの架橋体が、DNA 選択性が高いことを報告してきた[2, 3]。しかしながら、両架橋体の調製法は、収率が低い、重合法のスケールアップが困難である等の問題があり、工業レベルで製造するには到っていない。

本研究では、核酸がエンドトキシンと同様に、その構造上にリン酸残基をもつ高分子物質であることに着目し、アミノ化セルロース粒子を核酸吸着剤として応用することを試みた。

5.2. 吸着剤の調製法およびその特性評価法

5.2.1 吸着剤の調製

種々のアミノ化セルロース微粒子の基体としては、細孔径の異なるセルロース粒子 (Cellufine GC-15 およびCPC, チッソ製) を選択した。同粒子に化学修飾する官能基 (リガンド) としては、ポリε-リジン (PεL) ($pK_a=7.6$, 分子量: 4,500)、ポリエチレンイミン (PEI) ($pK_a=8.7$, 分子量: 70,000)、ポリ (ジメチルアミノプロピルアクリルアミド) (poly-DMAPAA) (分子量: 400,000) 等のポリカチオン類を用いた。

種々のポリカチオン修飾セルロース粒子は、Figure 1 に示すように、エポキシ化セルロース粒子にリガンドとして種々のポリカチオンを化学修飾して調製された。得られた粒子のうち、粒径 46~106 μm の粒子を吸着剤として用いた。

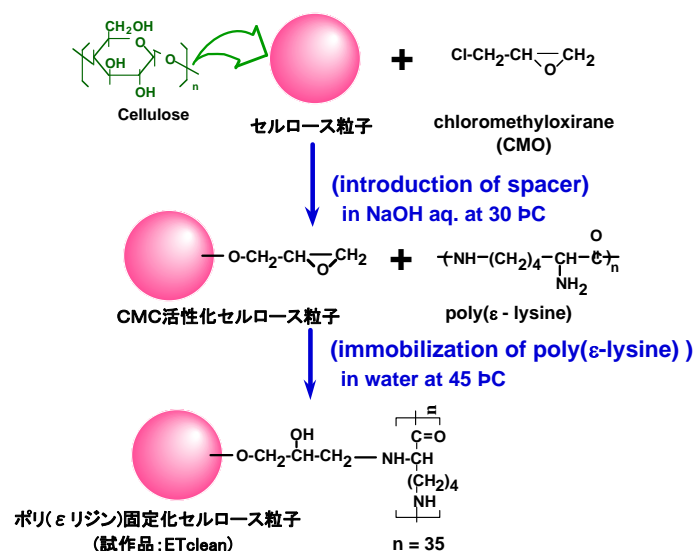


Figure 1. 核酸吸着剤の調製

5.2.2 吸着剤の特性評価法

吸着剤の細孔径は、size-exclusion chromatography による糖の排除限界分子量(M_{lim}) [4] として算出した。粒子のアミノ化の確認は、元素分析およびアミノ基含有量測定により行った。粒子表面のアミノ基含有量は、pH滴定法により定量した。吸着実験はバッチ法 (Figure 2) およびカラム法 (Figure 3) を用いて行い、吸着処理前後の試料中のDNA濃度は蛍光定量法[5]タンパク質濃度は BCAキットを用いたUV定量法[6]により定量した。

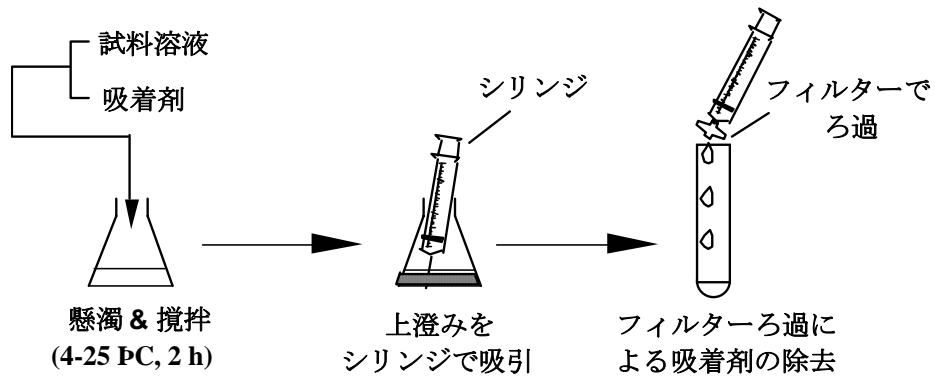


Figure 2. バッチ法による LPS および DNA 吸着処理法

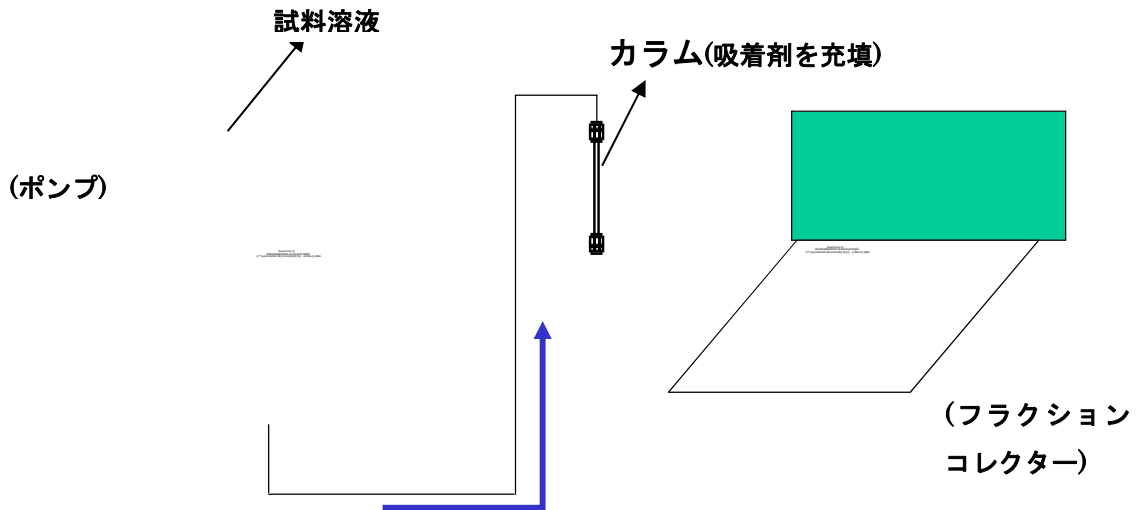


Figure 3. カラム法による LPS および DNA 吸着処理法

5.3 結果と考察

5.3.1 吸着剤のクロマト特性と DNA 吸着能

(1) 吸着剤のクロマト特性

得られた3種のアミノ化セルロース粒子のリガンドの構造を Figure 4 に、得られた粒子の特性を Table 1 に示す。

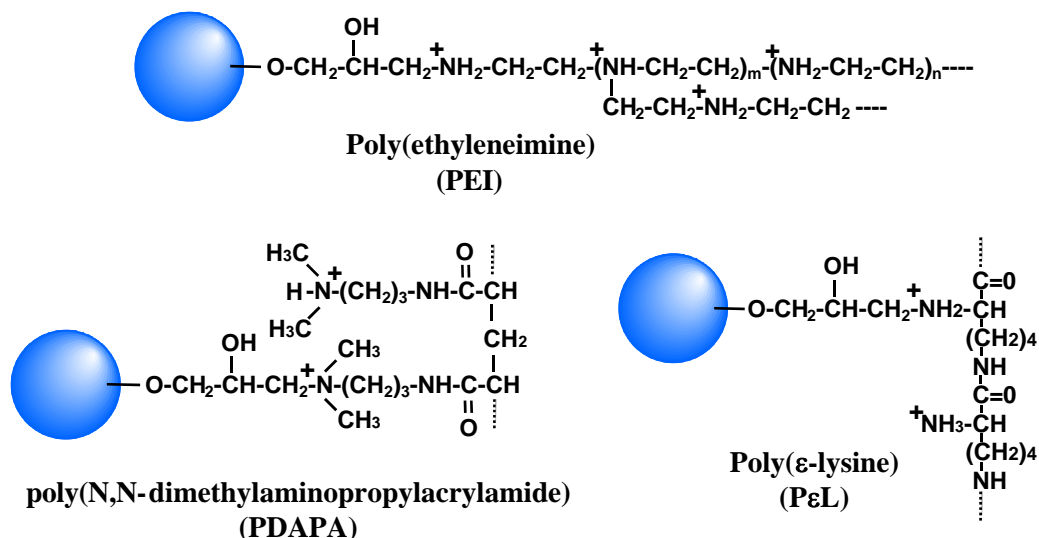


Figure 4. アミノ化セルロース粒子の調製法

Table 1. Characteristics of polymer beads

Polymer beads	Ligand	Matrix	Pore size of matrix (M_{lim}^a)	pK_a^b	Amino-group content ($\mu\text{eq wet-mL}^{-1}$)	Degree of swelling in water (wet-mL dry-g^{-1})
PEI-cellulose(S)	Poly(ethylenimine)	Cellufine-GC15 ^c	1×10^3	8.6	350	6.0
PEI-cellulose(L)		Cellufine-CPC ^d	3.0×10^4	8.6	1200	5.9
Poly(DAPA)-cellulose (S)	Poly(dimethylamino-propylacrylamide)	Cellufine-GC15	1×10^3	8.1	120	2.5
Poly(DAPA)-cellulose (L)		Cellufine-CPC	3.5×10^4	8.1	100	7.0
PεL-cellulose(S)	Poly(ε-lysine)	Cellufine-GC15	1×10^3	7.4	410	3.2
PεL-cellulose(L)		Cellufine-CPC	5×10^4	7.5	340	11.5
DMP/CMO copolymer ^e	Dimethylamino-propylacrylamide	DMP/CMO	2×10^3	8.4	1200	5.8
DEAE-Sepharose CL-6B	Diethylamino-ethanol	Sepharose CL-6B	3×10^4	8.7	10	21.5

^a Value deduced from the molecular weight of the polysaccharide by size-exclusion chromatography [11]

^b Apparent pK_a of the bead's surface

^c Cellulose beads (M_{lim} : 1×10^3 , diameter: 44-105 μm) (Chisso, Japan)

^d Cellulose beads (M_{lim} : 1×10^6 , diameter: 44-105 μm) (Chisso, Japan)

^e Copolymer prepared with dimethylaminopropylacrylamide (PDAPA) and chloromethyloxirane (CMO)

(2) バッチ法による吸着剤の DNA 選択吸着能

Figure 5 に、種々のポリカチオン固定化 cellulose 吸着剤の DNA およびタンパク質に対する吸着能に及ぼす緩衝液のイオン強度の影響を調べた結果を示す。どの吸着剤も幅広いイオン強度域 ($\mu = 0.05 \sim 0.8$) で高い DNA 吸着率 (98%以上) を示した。ポリカチオン固定化 cellulose の DNA に対する高い吸着活性は、ポリカチオンと DNA とのマルチアタッチメント効果により生じるものと考えられる。

牛血清アルブミン (BSA) は、低い強度域 ($\mu = 0.05 \sim 0.1$) で、大きい細孔径をもつ poly(DAPA)-cellulose(L) 吸着剤に対して高い吸着率を示したが、イオン強度の増大とともに著しくその吸着率は低下した。このようなイオン強度に依存する吸着は、主にイオン性相互作用が示唆される。一方、 γ -グロブリンは、緩衝液のイオン強度にあまり依存せず、どの吸着剤とも、4~20%程度の吸着率を示した。このようなイオン強度に依存しない吸着は、主に疎水的吸着が示唆される。

結果として、細孔径の小さい poly(DAPA)-cellulose(S) が最も DNA 選択性が高かった。同吸着剤は、イオン強度 $\mu = 0.2 \sim 0.8$ の条件下で、両タンパク質を吸着することなく (4%以下)、高い DNA 吸着率を示した。

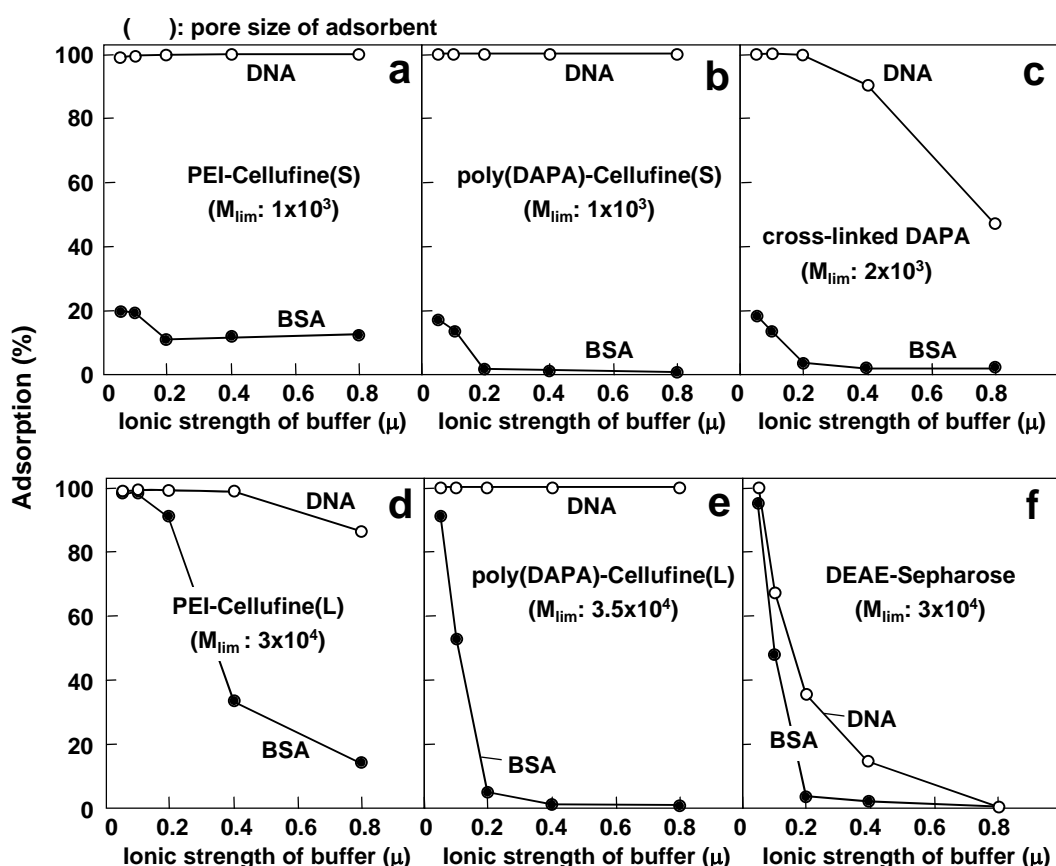


Figure 5. Effect of ionic strength of buffer on selective adsorption of DNA by various adsorbents from BSA solutions containing DNA. Adsorption of DNA was determined using a batch method with 0.2 mL of wet beads and a 2 mL sample solution (BSA: $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, DNA: $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) at pH 7.0 and ionic strength $\mu = 0.05 \sim 0.8$.

(3) カラム法による DNA 吸着能の評価

本研究では、核酸がエンドトキシンと同様に、その構造上にリン酸残基をもつ高分子物質であることに着目し、アミノ化セルロース粒子を核酸吸着剤として応用することを試みた。主に、DNA選択吸着能に及ぼす粒子の細孔径 (M_{lim}) およびリガンドの化学構造の影響について調査した。吸着処理前後の試料溶液のDNAは蛍光定量法により、タンパク質濃度は、BCAキット法により定量した。

実用化に向けての吸着実験のスケールアップの検討のため、カラム法を用いて、DNA吸着容量に及ぼすアミノ化セルロース粒子のリガンドおよび基体の細孔径の影響について調査した。その結果、Figure 6 に示すように、粒子の細孔径 (M_{lim}) が 1×10^3 (cellulose-S) から数万 (cellulose-L) に増大することにより、3種の粒子ともDNAの吸着容量は増大した。とくに、基体にcellulose-L粒子を用い、リガンドとしてポリエチレンイミン(PEI) およびポリ(ジメチルアミノプロピルアクリルアミド) (poly(DAPA))を用いた場合、両粒子のDNA吸着容量は、各々の粒子1 mL-カラム当たり 3.7mgおよび3.2mgと非常に高い値が得られた。

さらに、 γ -グロブリンとサケ精巢由来 DNA との混合液からの DNA の選択除去を試みた。その結果、Figure 7 (a) に示すように、1.7mL の poly(DAPA)-cellulose-L 吸着剤を充填したカラムは、60 mL の DNA を含む γ -グロブリン溶液から γ -グロブリンを吸着することなく(回収率 98%)、 $10 \mu\text{g/mL}$ の DNA 濃度を 10ng/mL 以下に除去することができた。また同カラムを緩衝液で洗浄後、2 mol の塩化ナトリウム水溶液を通液すると DNA のみが溶出してくることより、同粒子は DNA 精製用カラムとしても応用可能であることが分かった。一方、Figure 7 (b)に示すように、PEI-cellulose-L 充填カラムは、DNA とともに γ -グロブリンの吸着も引き起こすため、 γ -グロブリンの回収率は82%であった。

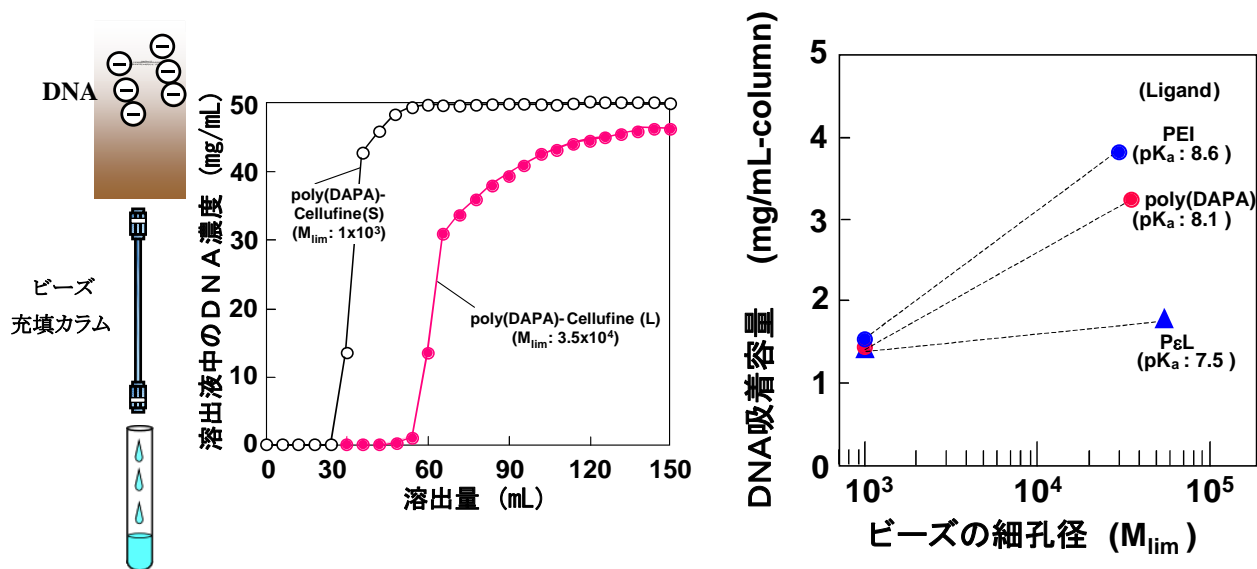


Figure 6. 種々のアミノ化セルロース粒子のDNA吸着容量と粒子の細孔径との関係

カラムサイズ: 1.7 mL (10 X 0.46 cm i.d.)

DNA溶液: 60mL (サケ精巢由来 $10 \mu\text{g/mL}$, pH: 7.0, イオン強度: $\mu = 0.17$)

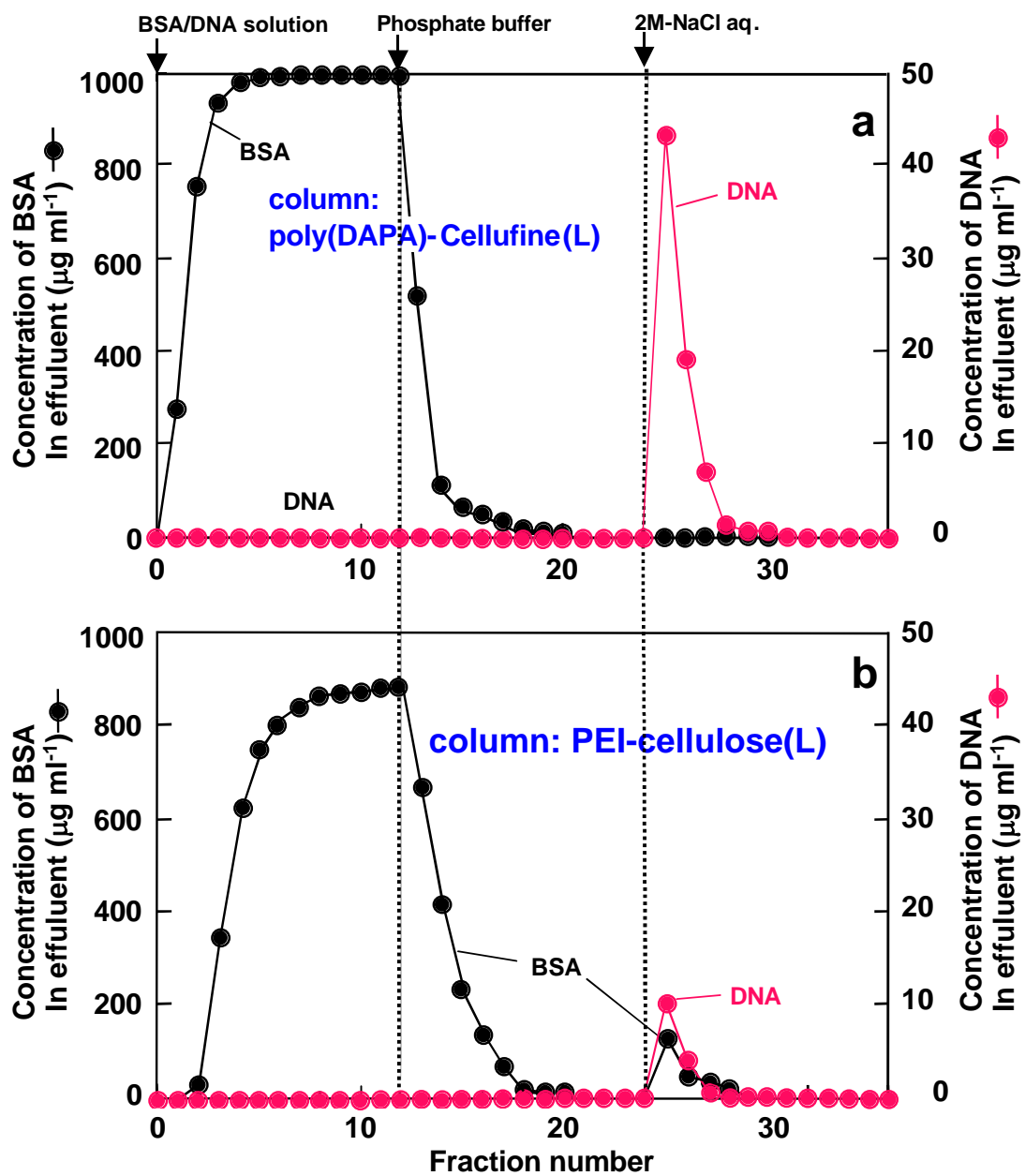


Figure 7. カラム法による γ -グロブリン水溶液からの DNA 除去
 カラムサイズ: 1 mL (10 X 0.46cm i.d., 流速: 0.2mL/min)
 サンプル溶液: 60mL (γ -グロブリン: 1000 $\mu\text{g/mL}$,
 DNA: 10 $\mu\text{g/mL}$, pH: 7.0, イオン強度: $\mu = 0.17$)

(4) 文献

- [1] T. Adachi, J. Ida, M. Wakita, M. Hashimoto, H. Ihara, C. Hirayama, "Preparation of spherical and porous chitosan particles by suspension evaporation with O/W/O multiple emulsions", *Polymer Journal*, **31**, (4), 319-323 (1999).
- [2] M. Sakata, K. Matsumoto, N. Obaru, M. Kunitake, H. Mizokami, C. Hirayama, "Removal of DNA from a protein solution with cross-linked poly(ethyleneimine) spherical particles", *Journal of Liquid Chromatography & Related technologies*, **26**, (2), 231-246 (2003).
- [3] M. Sakata, M. Nakayama, T. Kamada, M. Kunitake, H. Mizokami, C. Hirayama, "Selective removal of DNA from protein solution with copolymer particles derived from *N,N*-dimethylaminopropylacrylamide", *Journal of Chromatography A*, **1030**, (1-2), 117-122 (2004).
- [4] C. Hirayama, H. Ihara, S. Nagaoka, H. Furusawa, S. Tsuruta, "Regulation of pore-size distribution of poly(γ -methyl L-glutamate) spheres as a gel permeation chromatography packings", *Polym. J.* **22**, 614-619 (1990).
- [5] C.F. Brunk, K.C. Jones, T.W. James, "Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates", *Anal. Biochem.*, **92**, 497-500 (1979).
- [6] K. J. Wiechelman, R. D. Braun, J. D. Fitzpatrick, "Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation.", *Anal. Biochem.*, **175**, 231-237 (1998).

6. 総括

本年度は、タンパク質水溶液からの DNA 選択除去のための新規吸着剤の開発を目的とし、種々のポリカチオン固定化 cellulose 球状粒子を調製した。得られた高分子吸着剤は以下のような特長を示した。

- 1) ポリ(ジメチルアミノプロピルアクリルアミド) (PDAPA) をリガンドとし、セルロース微粒子を基体とした poly(DAPA)-cellulose(S) ($M_{im}2 \times 10^3$) は、pH7.0、幅広いイオン強度域 ($\mu = 0.2 \sim 0.8$) で DNA を選択吸着できた。タンパク質回収率は、96%以上であり、DNA 吸着率は 99%であった。
- 2) poly(DAPA)-cellulose 吸着剤の基体の細孔径を $M_{im}2 \times 10^3$ から $>2 \times 10^6$ まで増大させると、吸着剤に対する DNA の吸着容量は 0.90 から 1.63 mg/ml-adsorbent) へと著しく増大した。
- 3) 細孔径の大きい poly(DAPA)-cellulose(L) ($M_{im} > 2 \times 10^6$) は、緩衝液が低イオン強度域 ($\mu = 0.05 \sim 0.2$) の条件下においては、その細孔内に DNA ばかりでなく BSA も吸着してしまい、DNA を選択吸着することはできなかった。同吸着剤はイオン強度域 $\mu = 0.4$ 以上の条件下で BSA を吸着することなく DNA を選択吸着することができた。
- 4) ポリエチレンイミン (PEI) およびポリ ϵ -リジン (P ϵ L) をリガンドとした PEI-cellulose(S) および P ϵ L-cellulose(S) 吸着剤は、幅広いイオン強度域で高い DNA 吸着能を維持できたが、タンパク質 (BSA および γ -グロブリン) も同時に吸着 (10~20%) してしまい、DNA 選択性にやや劣るといった結果が得られた。
- 5) 本技術の用途拡大のため、エンドトキシン (リポポリサッカライド) の構造中のリン酸残基とのイオン吸着が可能な官能基をセルロース粒子に化学修飾したものをエンドトキシン吸着剤として設計した。得られた種々の吸着剤を用いて、エンドトキシンを添加したタンパク質 (アルブミン, グロブリン) 水溶液からのエンドトキシン除去を試みた。その結果、種々のポリカチオンを化学修飾したセルロース粒子は、エンドトキシンに高い選択性をもつことが確認できた。とくにポリ ϵ -リジン固定化セルロース粒子は、エンドトキシンを含むタンパク質水溶液からタンパク質を吸着することなく (回収率 98%)、100ng/mL のエンドトキシン濃度を 10pg/mL 以下 (測定限界値以下) に吸着除去することができた。

以上の結果より、リガンドのカチオン性・疎水性・配向性、および基体の細孔径を制御することにより、生体環境に近い緩衝液中で、種々のタンパク質水溶液に混在する DNA およびエンドトキシンを選択吸着除去可能な吸着剤を設計できることがわかった。

今回の基礎実験に用いたリガンドである PDAPA, P ϵ L および PEI は、工業レベルで製造されている試薬であるため、試作吸着剤としての大量製造が期待できる。