

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粒子の設計と応用

○坂本 誓子, 立中 佑希, 坂田 眞砂代,
國武 雅司 (熊本大学大学院自然科学研究科) 戸所 正美 (チッソ)

1. はじめに

遺伝子工学や細胞培養技術の目覚ましい進歩により、細菌を用いた組み換え遺伝子によるワクチンの合成や、生物由来抗原および抗体の精製が近年盛んに行なわれてきている。このようにして作られた菌体由来のタンパク質やワクチン原料中には菌体由来の核酸(DNA)が普遍的に存在している。微量残存する DNA は、注射等で体内に投与されると転移や突然変異などの生物学的な活性により、発ガン遺伝子を増殖させる恐れがあることが WHO から報告されており、これらの DNA を除去することが切望されている (<10 ng/dose) [1]。これらの理由により、ワクチンや医薬品中から、タンパク質などの生体に有効な成分を損なう事なく、細菌由来の DNA を排除することが切望されている。

我々は既にポリカチオン固定化高分子粒子が DNA に対して高い選択性を持つことを明らかにしてきた(図 1)。

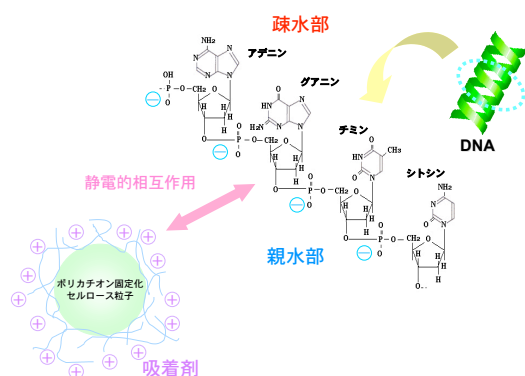


図1 DNAの吸着機構

本研究では、ポリカチオン固定化セルロース粒子に選択的に吸着させた後 DNA の回収が可能な粒子の開発を目的としている。

2. 実験

ポリカチオン固定化セルロース粒子は、スパーサー(クロロメチルオキシラン)を導入したセルロース粒子(Cell)に種々のポリカチオンを化学修飾させることにより調製した。ポリカチオンとしては、ポリεリジン(PεL) (チッソ製) poly-*N,N*-dimethylaminopropylacrylamide (polyDMPAA) 等を用いた[2]。基体のセルロース粒子としては細孔径(M_{lim})の異なる 2 種類を用いた(CPC-m ($M_{lim}10^6$), GC-15 ($M_{lim}10^3$)) (図 2、表 1)。

各粒子を樹脂製のカラム(9mmφ×50mm)に充填し、生体環境に近い実験条件(pH 7.0、 $\mu=0.2$)で、タンパク質混合溶液から DNA の選択分離を試みた。ポリカチオン架橋粒子の調製は、既存の懸濁蒸発法を用いて、DMPAA/DVB=9/1 架橋粒子を調製した[3]。タンパク質の濃度は UV 法、DNA 濃度は DAPI を用いた蛍光法により定量した。

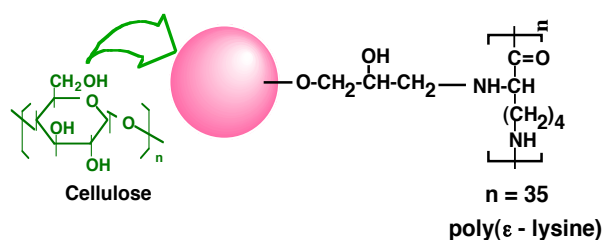


図2 ポリカチオン固定化粒子の化学構造

表1 各粒子の粒子特性

	AEC (meq / ml)	pore size M_{lim}
PeL-Cell(S)	0.32	1×10^3
PeL-Cell(L)	0.36	3×10^5
DMPAA/DVB	4.42	2×10^3

3. 結果と考察

図3にPeL-Cell(S)カラムを用いたDNA選択吸着回収実験の結果を示した。イオン強度 $\mu=0.2$ 、pH7.0の条件下でDNA/BSA混合溶液を同カラムに通液すると、DNAはカラムに選択吸着され、BSAのみが溶出された。その後、同カラムをリン酸bufferで洗浄した後、0.2Mから3MまでのNaCl溶液を同カラムにグラジェントに通液させることによりDNAのみを回収することができた。

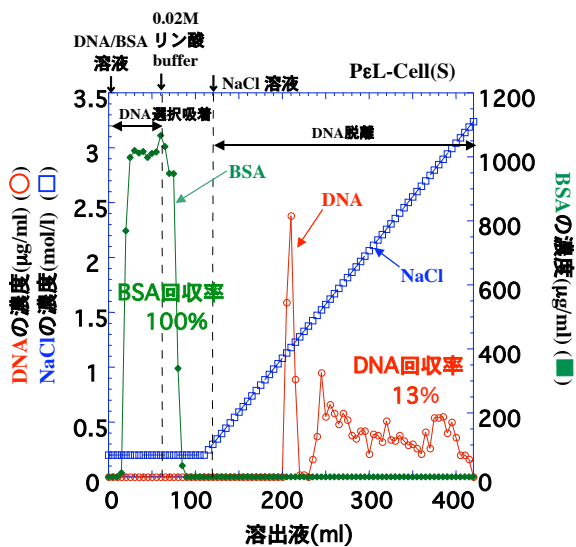


図3 DNA吸着回収実験におけるDNAとBSAの溶出挙動
カラムサイズ:0.9×5 cm(I.D.) (3.18 ml)
流速:0.1 ml/min
Buffer:0.02M-リン酸buffer, pH 7.0, $\mu=0.2$
Sample:60 ml(BSA:1000 $\mu\text{g/ml}$, DNA:10 $\mu\text{g/ml}$)

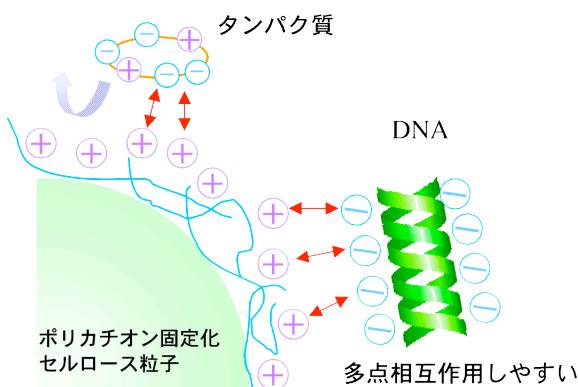


図4 DNAとタンパク質の吸着挙動の違い

表2 各粒子のDNA/BSA溶液からのDNAおよびBSAの回収

	DNA吸着buffer (0.02M PBS buffer (pH 7.0, $\mu=0.2$))		DNA溶出buffer (2M NaCl溶液)		全BSA回収率 (%)
	DNA吸着(%)	BSA吸着(%)	DNA回収(%)	BSA回収(%)	
PeL-Cell(S)	>99	8	5	7	99
PeL-Cell(L)	>99	8	8	7.5	99
DMAPAA/DVB	97	<1	34	<1	100

表2にはDNA溶出bufferとして2M NaClを用いた時の、種々のポリカチオン粒子のDNA選択吸着及び脱離特性を示した。PeL-Cell粒子のDNAの選択吸着率は、DMAPAA架橋体と比べると高かった。一方、PeL-Cell粒子のDNA回収率は、DMAPAA架橋体に比べて低かった。DNAとPeL-Cellの相互作用は、DMAPAA架橋体との相互作用よりも強いので、吸着したDNAはほとんど溶出しなかったものと考えられる。一方、DMAPAA架橋体はDNAとの相互作用が弱いために、DNAの回収率は高くなったと考えられる。よって、DNAを選択的に吸着させ、かつ溶液条件を変えることによりDNAを回収するためには、ポリカチオンとDNAの相互作用が適度に弱い粒子設計が必要となることがわかった。

4. 参考文献

- [1] Report on the WHO Expert Committee on Biological Standardization, *WHO Weekly Epidemiological*, 72, 141-145 (1997).
- [2] M. Sakata, M. Nakayama, K. Yanagi, M. Sasaki, M. Kunitake, C. Hirayama, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **29**, 2449-2512 (2006).
- [3] M. Sakata, M. Nakayama, T. Kamada, M. Kunitake, C. Hirayama, *J. Chromatogr. A*, 1030, 117-122(2004).

<謝辞>本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)の平成15年度産業技術研究助成により実施された。

[問い合わせ先]

坂田 眞砂代

熊本大学大学院自然科学研究科

TEL 096-342-3674

E-mail msakata@gpo.kumamoto-u.ac.jp