

ポリカチオンをリガンドとするカチオン性高分子微粒子による タンパク質水溶液からの DNA クロマト分離

大学院自然科学研究科	前期課程	坂本 誓子
〃	前期課程	立中 佑希
〃	准教授	坂田 眞砂代
チッソ株式会社ファインケミカル部	主幹	戸所 正美
〃	教授	國武 雅司

<緒言> 菌体由来のタンパク質やワクチン原料中に微量残存する 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(10ng/dose 以下)。本研究では、ポリカチオン固定化高分子微粒子および *N,N*-dimethylaminopropylacrylamide (DMAPAA)と divinylbenzene (DVB) との共重合により調製された DMAPAA 架橋粒子をクロマト用分離剤として用い、タンパク質と DNA の分離能の評価を行った。

<実験> ポリカチオン固定化セルロース粒子の基体としては、細孔径の異なる Cellufine (GC-15: M_{im} 1000 および CPC-m: M_{im} 10⁶, チッソ製) を用いた。スパーサー(chloromethyloxirane)を導入した Cellufine (Cell)にポリエリジン(PeL)(チッソ製)等のポリカチオンを化学修飾させることにより調製した。DMAPAA 架橋粒子は既存の懸濁蒸発法¹⁾を用いて、DMAPAA/DVB=9/1 粒子を調製した。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、 μ =0.2)で、牛血清アルブミン(BSA)等のタンパク質と DNA の混合溶液から DNA の選択分離を試みた。タンパク質濃度の定量は BCA キットを用いた UV 法、DNA 濃度の定量は DAPI を用いた蛍光法により定量した。

<結果・考察> 種々の粒子を充填したカラムを用いて、BSA・DNA 混合溶液から DNA のクロマト分離を試みた(Table. 1)。各々のカラムに、イオン強度 μ

Table.1 Separation of DNA (salmon spermary) and BSA.

	AEC (meq/ml)	poresize M_{im}	BSA elution buffer (0.02M PBS buffer(pH 7.0, μ =0.2))		DNA elution buffer (2M NaCl aq)		Recovery rate of BSA (%)
			Recovery rate (%)		Recovery rate (%)		
			DNA	BSA	DNA	BSA	
PeL-Cell(S)	0.32	1×10^3	<1	92	5	7	99
PeL-Cell(L)	0.36	3×10^5	<1	92	8	7.5	99
DMAPAA/DVB	4.42	2×10^3	3	100	34	<1	100

=0.2, pH7.0 の条件下で、BSA と DNA の混合溶液を通液すると、三種のカラムは高い DNA 吸着除去能を示した(DNA 回収率 <1~3%, BSA 回収率 92%)。DNA が吸着されたカラムを緩衝液で洗浄後、2 M の塩化ナトリウム水溶液を通液させると、吸着されていた DNA の一部を溶出させることができた。その結果、DMAPAA/DVB, PeL-Cell (S)および PeL-Cell (L)の各々の DNA 回収率は 34%, 5%および 8%であった。DMAPAA/DVB の見かけの pK_a 8.5 は PeL-Cell の pK_a 7.4 に比べ高いため、DNA を主に静電的吸着しており、塩化ナトリウムによる溶出が容易であったものと考えられる。以上の結果より、タンパク質水溶液からタンパク質を吸着することなく DNA を選択的に吸着させ、その後、塩化ナトリウム等により DNA のみを分離させるためには、ポリカチオン(リガンド)と DNA の相互作用が適度に弱い構造の粒子設計に調節する必要があることが明らかとなった。

(1) M. SAKATA, et al, *J. Chromatogr. A*, 1030 (2004) 117.