

B316

プラスミド DNA のアフィニティ膜濾過特性

(名大院工) (正)片桐 誠之*・(学)下川 大輔・(正)入谷 英司

1. 緒言 近年、遺伝子治療や遺伝子ワクチンの開発が活発に行われており、医療品純度のプラスミド DNA (pDNA) の大量生産が求められている。これまで、pDNA の産業レベルでの分離・精製に適用可能な手法として、pDNA と親和性のあるリガンドを用いるアフィニティ膜濾過法について検討を行ってきた^{1,2)}。本報では、pDNA 導入大腸菌の培養により増幅させた pDNA の精製に、探索したリガンドと精密濾過膜を用いるアフィニティ膜濾過法を適用し、その分離特性を究明する。

2. 実験装置および方法 pDNA には、pBluescript II SK(+)(3.0 kb, STRATAGENE 製) リガンドには、 α -Fe₂O₃ (高純度化学研究所製)を用いた。pDNA を導入した大腸菌を培養し、遠心分離により培養液を除去した後、アルカリブ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 CaCl₂ 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、これを吸着濾過実験の試料とした。吸着濾過実験は、試料と α -Fe₂O₃ 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 μ m 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 α -Fe₂O₃ 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 OD₂₆₀ 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。

3. 結果および考察 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。アルカリブレップ法後の溶液には、RNA が大量に含まれるため、CaCl₂ 添加による 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行う。Fig. 2 には、pDNA の吸着濾過後に生成した α -Fe₂O₃ ケークに 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 OD₂₆₀ 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 OD₂₆₀ は、pH 10 の buffer の透過初期にのみ正の値が得られ、この時に pDNA が脱着されるものと推察される。Fig. 3 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。アルカリブレップ法、CaCl₂ 添加を経て吸着濾過に供した溶液は、キットで精製した pDNA 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 (pH 5) には、pDNA、RNA とも確認できないことから、両核酸が α -Fe₂O₃ 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。 α -Fe₂O₃ は等電点が pH 8 付近にあるため、pH 変化により α -Fe₂O₃ に吸着したポリアニオンの pDNA を脱着させることができる。pH 9 の buffer の透過液では、わずかな量の低分子 RNA が脱着され、続いて pH 10 の初期透過

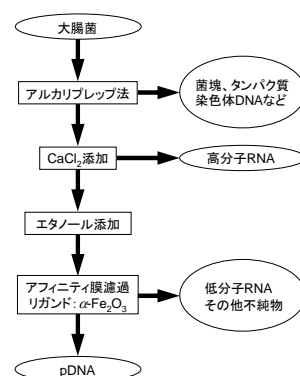


Fig. 1 pDNA の精製フロー

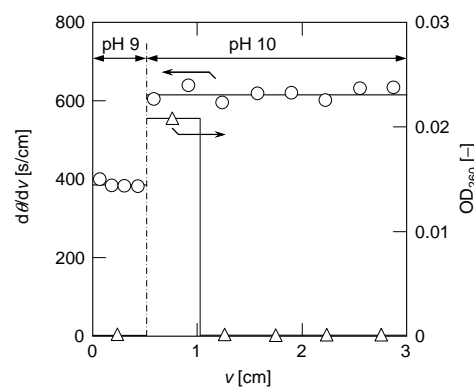


Fig. 2 pDNA の脱着挙動

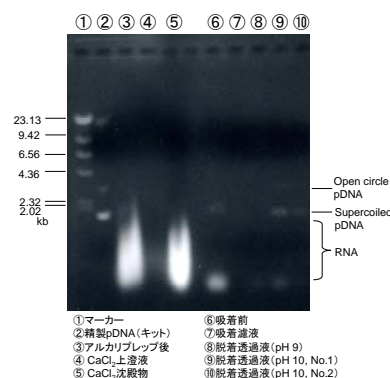


Fig. 3 電気泳動分析

液で、pDNA と低分子 RNA が、その後では 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。

4. 結言 α -Fe₂O₃ をリガンドとして用いるアフィニティ膜濾過法により大腸菌からの pDNA 精製が可能であることを示した。

【文献】1) 下川, 片桐, 入谷; 化学工学会第 40 回秋季大会研究発表講演要旨集, V122 (2008)

2) 下川, 片桐, 入谷; 化学工学会第 41 回秋季大会研究発表講演要旨集, D106 (2009)

*E-mail: katagiri@nuce.nagoya-u.ac.jp