

セルファイン フォスフェイトを用いたT7 RNA ポリメラーゼの精製

セルファインは真球状の多孔性セルロース粒子の表面に様々なリガンド（官能基）を修飾したクロマトグラフィー充填剤です。抗体医薬、ワクチン、タンパク質製剤などバイオ医薬品の製造に使用されています。

T7 RNAポリメラーゼは、T7ファージ由来のRNA合成酵素です。鋳型となるDNAからmRNAを産生する際に用いられます。近年の新型コロナウイルス感染症（COVID-19）のワクチンとして注目されたmRNAワクチンの製造過程において、T7 RNAポリメラーゼが用いられています。

セルファイン フォスフェイトは核酸結合タンパク質と親和性を持つアフィニティークロマトグラフィー担体です。T7 RNAポリメラーゼは核酸結合タンパク質のためセルファイン フォスフェイトで効率的な精製を行うことができます。このレポートではT7 RNAポリメラーゼを発現した大腸菌（pAR1219）の発酵液を硫酸沈殿後、セルファインMAX DEAE（弱アニオン交換担体）、セルファイン フォスフェイトおよびセルファイン ET Clean Lで高純度に精製した事例を紹介します。セルファイン フォスフェイトを用いることで不純物を除去し高純度の酵素が精製できます。更に残存する大腸菌由来のエンドトキシンをセルファイン ET Clean Lにより高度に除去することが出来ます。

1. セルファイン MAX DEAE による粗精製

T7 RNAポリメラーゼ（T7 RNAP）を発現する組換え大腸菌（pAR1219 由来）を培養し、IPTG による発現誘導により T7 RNAP を含む培養液を得た。菌体を PBS で洗浄後、リゾチーム 0.2 mg/mL を加えて凍結融解を 3 回繰り返すことで破碎して、ライセートを得た。ライセートに 35 % (w/v) になるように硫酸アンモニウムを加え、4°C で一時間攪拌した後、遠心分離して沈殿物を回収した。

この沈殿物を平衡化バッファー（組成は図 1 を参照のこと）で懸濁し、導電率を 10.0 mS/cm 以下に調整したサンプルをロードサンプルとした。陰イオン交換担体のセルファイン MAX DEAE をカラムに充填し、サンプルをロードした。溶

出は塩化ナトリウムによるグラジエント溶出を行った（図 1）。溶出液を回収し、SDS-PAGE および酵素活性測定で各フラクションのタンパク質と DNA の溶出量及び T7 RNAP の活性を測定した（図 2）。酵素活性は市販のキット（T7 RNA polymerase assay kit, ProFoldin）により測定した。1 unit は、37°C、1 時間で、1 nmol ATP を酸性不溶物に取り込むことができる酵素量と定義されている。夾雑物となる DNA は負に帯電しているため、陰イオン交換基（DEAE 基）と強く相互作用する。このため溶出フラクションの後半で溶出しており、大半のタンパク質と分離されていた。

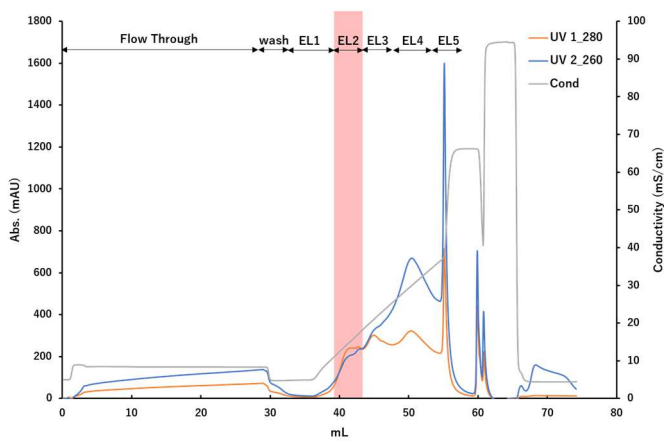


図 1 セルファイン MAX DEAE による T7 RNAP の粗精製
赤色で表示された EL2 フラクシオンが T7 RNAP の分画となる。

T7 RNAP の活性は溶出フラクシオン EL2 で最も高い。EL4-5 にも活性が認められるが、これは測定原理上非特異的に核酸を検出してしまいうためであり、タンパク質が少ないことから T7 RNAP と DNA を分離できていると考えられる。

したがって、セルファイン MAX DEAE の工程では T7 RNAP が含まれるフラクシオンから DNA を明確に分離し、DNA コンタミネーションを低減することができた。

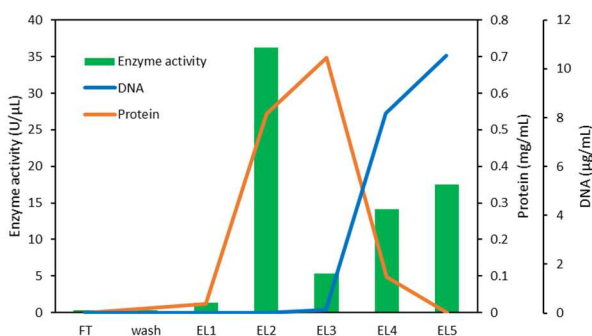


図 2 セルファイン MAX DEAE による DNA の除去

カラム条件

ロード量: 28.5CV (培養液硫酸沈殿物を 10.0 mS/cm になるように平衡化バッファーで溶解)

カラム: 1 mL ミニカラム (6.7 mm ID x 30 mm L, JNC 製)

流速: 0.5 mL/min (85 cm/h、滞留時間 2 分)

平衡化バッファー (Eq.):

10 mM Tris-HCl pH7.5, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 10 % glycerol, protease inhibitor (PMSF 10 μg/mL, benzamidine 100 μM, bacitracin 10 μM)

溶出バッファー: Eq. + 1 M NaCl

2. セルファイン フォスフェイトによる精製

セルファイン MAX DEAE 工程によって回収した溶出フラクシオン EL2 を平衡化バッファー (図 3 を参照のこと) で 3 倍希釈した溶液をロードサンプルとして、セルファイン フォスフェイトを用いたカラム精製を行った (図 3)。塩化ナトリウムによるグラジエント溶出を実施した結果、溶出フラクシオン 2 (以下 P-EL2) に明確なピークが得られた。各フラクシオンについて酵素活性値 (酵素活性/タンパク量) を測定した結果を図 3 中に重ねて表示した。P-EL2 で最も酵素活性値が高く、夾雑タンパク質は Flow through (FT) 画分で除かれていた。

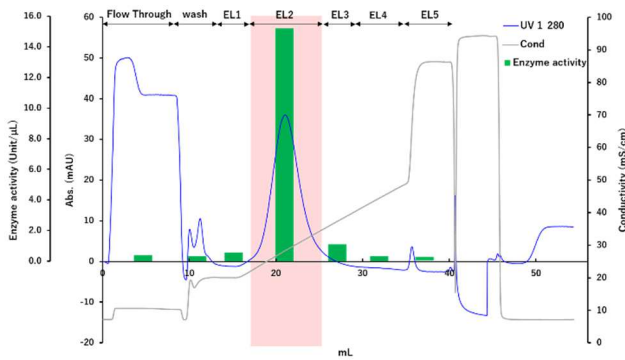


図3 セルファイン フォスフェイトによる T7 RNAP の精製
赤色で表示された EL2 フラクシオンに T7 RNAP が蓄積された。

カラム条件

ロード量: 8 CV (平衡化バッファーによる 3 倍希釈)

カラム: 1 mL ミニカラム (6.7mm ID x 30 mm L, JNC 製)

流速: 0.5 mL/min (85 cm/h、滞留時間 2 分)

平衡化バッファー (Eq.):

10 mM potassium phosphate pH7.5, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, protease inhibitor

溶出バッファー: Eq + 1 M NaCl

表1 各分画における T7 RNAP の回収率

Fr.	酵素活性 (Unit/protein)	酵素活性 回収率 (%)	タンパク質 回収率 (%)
ロード液	94043	100	100
素通り (FT)	2763	1.8	59.8
P-EL2	267034	70.2	24.7

セルファイン フォスフェイトによるカラム精製後の酵素活性・回収率とタンパク質回収率を表1に示す。溶出フラクション P-EL2 における T7 RNAP の活性は 70.2% と高い回収率であることが分かった。タンパク質量は 24.7% まで減少したことから夾雑物が効率的に除去されていることが分かった。またサンプルロード前と比較して P-EL2 の酵素活性値が高くなっていることから、セルファイン フォスフェイトにより T7 RNAP が高純度に精製できていることを確認した。

3. カラム精製後の純度

セルファイン MAX DEAE およびセルファイン フォスフェイトの各精製プロセスから得られたフラクションを用いて SDS-PAGE で精製度を評価した (図4)。クロマトグラフィーの各工程を経るごとに夾雑物が除かれ、セルファイン フォスフェイトの段階では、ほぼシングルバンドになるまで高純度の T7 RNAP が精製された。ウェスタンブロットングにおいてもこのシングルバンドが T7 RNAP であることが分かる。

酵素活性値はクロマトグラフィー工程が進むごとに上昇した。このことから夾雑タンパク質が除かれ T7 RNAP が高純度に精製されていることが分かった (表2)。セルファイン フォスフェイトによるカラム精製で得られた最終的なフラクションサンプルは、市販コントロールよりも高い酵素活性値を示した。以上より、セルファインを用いた 2 ステップのプロセスによって、T7 RNAP を高純度に精製することが可能であることを示した。

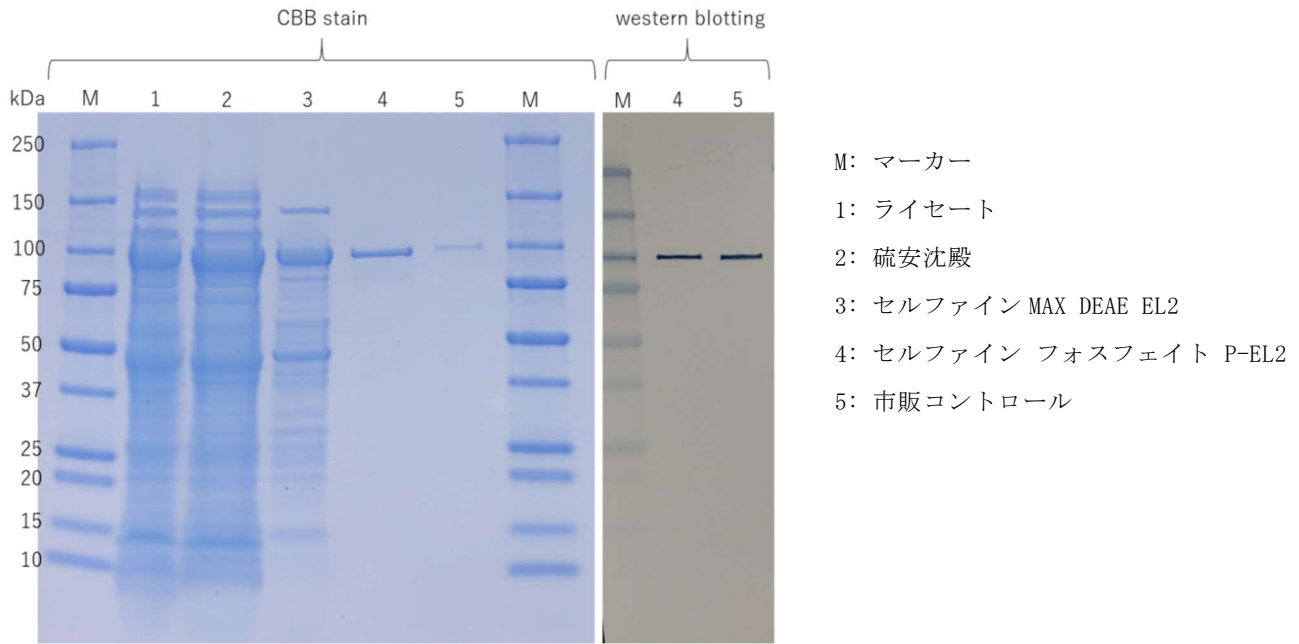


図 4 クロマトグラフィー精製後の T7 RNAP の SDS-PAGE 純度確認

表 2 各工程における T7 RNAP 酵素活性

Fr.	酵素活性 (Unit/protein)
ライセート	24,011
硫安沈殿	34,296
MAX DEAE	66,741
フォスフェイト	267,034
市販コントロール	208,535

4. プロテアーゼ、ヌクレアーゼの除去性

T7 RNAP 精製において、タンパク質を分解するプロテアーゼ、核酸を分解するヌクレアーゼ (RNase, DNase) は除去すべき不純物である。セルファイン フォスフェイト精製後の溶出画分を分析して各酵素の活性を評価した。

まずセルファイン フォスフェイト精製前後のプロテアーゼ活性の経時変化を測定した結果を図 5 に示す。活性はキット (Amplite Universal Fluorimetric Protease Activity Assay Kit Green, AAT Bioquest) を用いて測定した。精製前 (Load) では経時と共に活性が上がってくるのに対し、精製後 (Elution) ではほぼ一定の値で推移しておりプロテアーゼが除去されたことが分かる。

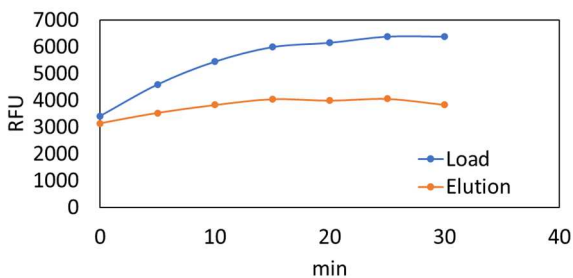


図 5 セルファイン フォスフェイト精製前後のプロテアーゼ活性

セルファイン フォスフェイト精製前後の RNase 活性の経時変化を測定した結果を図 6 に示す。活性はキット (RNaseAlert Lab Test Kit, Applied Biosystems) を用いて測定した。プロテアーゼと同様に精製前後で活性比

較した結果、精製後の酵素活性の経時変化がほとんどなくなっており、ネガティブコントロールである RNase フリー水と同等であることから RNase を除去できていると判断した。

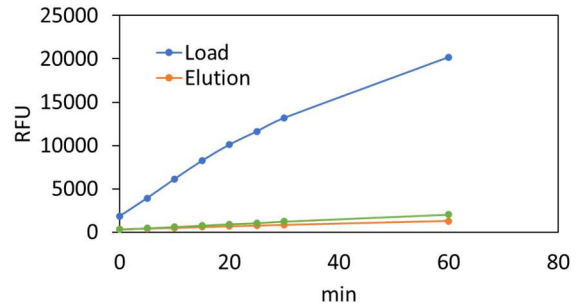


図 6 セルファイン フォスフェイト精製前後の RNase 活性

セルファイン フォスフェイト精製前後の DNase 活性は下記手順で評価した。T7 RNAP 250U と λ DNA 10 μ g が含まれるよう 500 μ L に調製した。ネガティブコントロール (NC) として λ DNA のみのサンプル、ポジティブコントロール (PC) として DNase I を 0.2 U/ μ L になるよう加えたサンプルを用意した。調整した溶液を 37°C で 16 時間インキュベートした。このように処理したサンプルをアガロースゲル電気泳動により DNA を検出した。その結果を図 7 に示す。DNase が含まれるサンプルは λ DNA が分解を受けるので PC のようにバンドが消失する。精製前 (Load) は PC と同様に λ DNA のバンドが消失しているのに対し、精製後 (Elution) は NC や市販品と同様にバンドが残っていることから、DNase も除去できていると判断した。

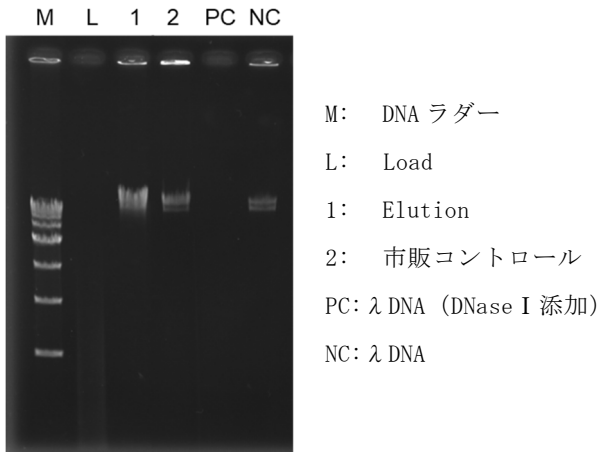


図7 セルファイン フォスフェイト精製前後の DNase 活性

5. セルファイン ET Clean L によるエンドトキシンの除去検討

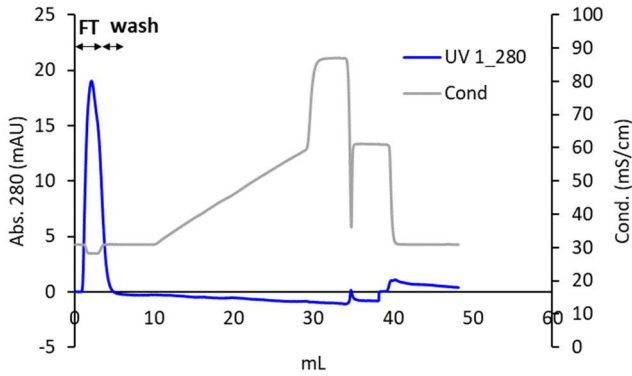
T7 RNAP は組換え大腸菌により産生されることから、抽出した菌液中にエンドトキシンが含まれるのは避けられない。セルファイン フォスフェイト精製前後のエンドトキシン量を測定した結果、97%近いエンドトキシンを除去できるものの、一定量は残存していることが分かった（表3）。エンドトキシン量は Endosafe nexgen-PTS (Charles River) により測定した。そこで、エンドトキシンを選択的に吸着するセルファイン ET Clean L を用いて除去検討を実施した。

表3 セルファイン フォスフェイト精製前後のエンドトキシン量

Fr.	エンドトキシン量 (EU/mL)
ロード	7691
溶出	222

まず、セルファイン フォスフェイト精製後の溶出液をそのまま用いて、T7 RNAP をフロースルーで回収し、エンドトキシンを吸着させることで除去するフロースルーモードによる精製を試みた（図8）。UV ピークの挙動から、フロースルー画分で T7 RNAP が溶出していると考えられる。エンドトキシンの除去性及び T7 RNAP の活性を測定した結果を表4に示した。UV ピークが見られたフラクション FT と wash では酵素活性から算出した T7 RNAP の回収率が合計 74.6% となり、フロースルーで目的物を回収できておりクロマトグラムの結果を反映していることが分かる。エンドトキシン量は濃度 (EU/mL)、単体量 (EU)、酵素活性当り量 (mEU/unit) 及びブラッドフォード法により測定したタンパク質当り量

(EU/μg) の値を示している。フラクション FT と wash 中に含まれるエンドトキシン量はいずれの定量値においても精製前と比較して顕著に低下しており、本工程で 96.4% のエンドトキシンを吸着して除去することが出来た（表4）。



カラム条件

ロードサンプル: 2 CV (セルファイン フォスフェイト溶出)

カラム: 1mL ミニカラム (6.7mm ID x 30 mm L, JNC 製)

流速: 0.5 mL/min (85 cm/h、滞留時間 2分)

平衡化バッファー (Eq.):

10 mM potassium phosphate pH7.5, 300 mM NaCl, 0.1 mM

EDTA, 0.1 mM DTT

溶出バッファー: Eq + 1 M NaCl

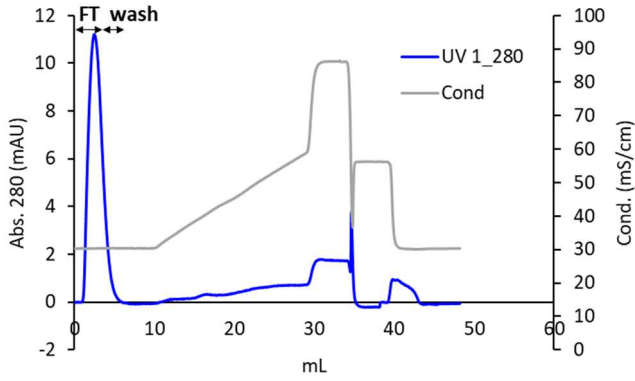
図 8 セルファイン ET Clean L による T7 RNAP からのエンドトキシン除去 (リン酸バッファー系)

表 4 セルファイン ET Clean L 精製前後のエンドトキシン量 (リン酸バッファー系)

	エンドトキシン					T7 RNAP
	EU/mL	EU	除去率 (%)	mEU/unit	EU/μg	回収率 (%)
Load	151	302	-	5.14	2.14	-
FT	2.89	7.23	-	0.32	0.10	40.7
wash	1.75	3.50	-	0.19	0.05	33.9
Total (FT+wash)	2.38	10.7	96.4	0.26	0.07	74.6

次にセルファイン ET Clean L による精製時のバッファー種の影響を検証する目的で、セルファイン フォスフェイト精製後の溶出フラクションを Tris バッファーで透析により置換して精製を試みた (図 9)。透析は透過限界分子量 3000MW の透析膜を用いて、100 倍量の平衡化バッファーで 4℃1 時間を 2 回、最後に終夜で置換してから回収してロード液とした。図 8 の結果と同様に、図 9 のフロースルー画分に UV ピークが得られている。表 5 に示したエンドトキシンの除去性及び T7 RNAP の活性測定結果からも、酵素回収率はフラクション FT と wash で合計 99.3% という良好な結果であ

った。エンドトキシンの除去性についてはいずれの定量値においてもリン酸バッファー系よりも高く、99%以上の除去性を示した。バッファー種でこのような差異が生じた理由は、セルファイン ET Clean L のイオン交換基と逆の電荷を持つリン酸イオンバッファーでは、リン酸イオンによるエンドトキシンの吸着阻害やイオン交換によって生じる pH の乱れの影響が出ているのではないかと考えられる。それでも 96.4% という除去率を示しており、前工程の溶出液をそのまま用いることが出来るのは利点である。



カラム条件

ロードサンプル: 2 CV (平衡化バッファーにより透析後)

カラム: 1mL ミニカラム (6.7mm ID x 30 mm L, JNC 製)

流速: 0.5 mL/min (85 cm/h、滞留時間 2 分)

平衡化バッファー(Eq.):

10 mM Tris-HCl pH7.5, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA,

0.1 mM DTT

溶出バッファー: Eq + 1 M NaCl

図 9 セルファイン ET Clean L による T7 RNAP からのエンドトキシン除去 (Tris バッファー系)

表 5 セルファイン ET Clean L 精製前後のエンドトキシン量 (Tris バッファー系)

	エンドトキシン					T7 RNAP
	EU/mL	EU	除去率 (%)	mEU/unit	EU/μg	回収率 (%)
Load	134	268	-	11.0	3.46	85.8*
FT	0.30	0.75	-	0.07	0.02	46.5
wash	0.15	0.30	-	0.02	0.01	52.8
Total (FT+wash)	0.23	1.05	99.6	0.04	0.01	99.3

*透析時の回収率

以上の結果から、セルファイン ET Clean L によりセルファインフォスフェイト溶出液をフロースルーモードで精製することで、最大 99.6%のエンドトキシンを除去可能なことが示された。溶出液をそのまま用いて同様のバッファー系で精製することでも一定程度の除去は可能であり、更に高度な除去が必要であれば Tris バッファーへの置換を推奨する。

まとめ

COVID-19 によるパンデミック以降、mRNA 医薬がワクチンの新規モダリティとして急速に進展した。mRNA 医薬は一般的なバイオ医薬品とは異なり、インビトロ転写合成で原薬を製造する。このため抗体医薬で見られるような内在ウイルスのコンタミネーションの懸念が無いなど、品質管理の観点で従来のバイオ医薬品にはない優位性がある。このため COVID-19 ワクチンの製造によって、mRNA 医薬の製造技術は急速に進展が見られた。一方で製造コストは依然として高く、製造方法には改善の余地がある。

T7 RNA ポリメラーゼはインビトロ転写合成において、鋳型 DNA から mRNA を合成するために使用される極めて重要な RNA 合成酵素である。T7 RNA ポリメラーゼは一般的に大腸菌を宿主とした発酵生産で製造されている。このため大腸菌由来のエンドトキシン、宿主およびベクター由来の DNA、宿主由来タンパク質など多くの夾雑物から T7 RNA ポリメラーゼを高純度に精製する必要がある。

セルファインのラインナップには核酸結合タンパク質を高純度で精製することができるアフィニティークロマトグラフィー担体としてセルファイン フォスフェイトを販売してきた。セルファイン フォスフェイトはセルロースの 6 位の水酸基にリン酸基がエステル結合されている構造を持っている（図 10）。この構造が核酸に近似した構造となるため、T7 RNA ポリメラーゼのような核酸結合タンパク質を好適に吸着させる。またリン酸基は負に帯電した陽イオン交換担体としての働きをするため、エンドトキシンの様に負に帯電した夾雑物質を吸着させることが無い。この様な合理的な化学構造によって大腸菌を宿主とした発酵液から、効率的なタンパク質の精製を実現することができる。

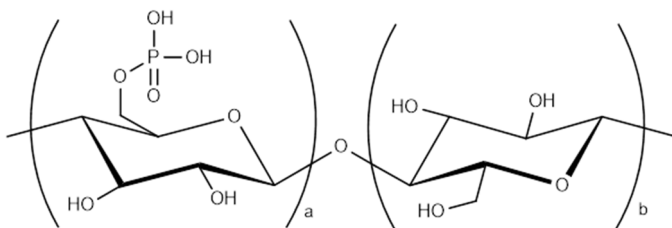


図 10 セルファイン フォスフェイトの化学構造

6 位の 1 級水酸基がリン酸エステル基に置換されている。核酸を模倣した構造のため、核酸結合タンパク質にアフィニティー活性が見られる。

今回の事例では最初にセルファイン MAX DEAE による粗精製を行った後に、セルファイン フォスフェイトによるアフィニティー精製を行い、更にセルファイン ET Clean L でエンドトキシンを除去するという 3 段階のクロマトグラフィー工程で、高純度な T7 RNA ポリメラーゼを精製した。大腸菌による発酵生産では宿主やベクター由来の DNA が夾雑物として存在している。DNA は負に帯電しているため陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製が必要となる。このため今回の検討では高吸着で高流速の通液が可能なセルファイン MAX DEAE を第一段階の精製工程で用いた。セルファイン フォスフェイトを用いたクロマトグラフィー工程後に酵素活性を評価したところ、市販品の T7 RNA ポリメラーゼよりも高純度に精製されていることが分かった。またプロテアーゼやヌクレアーゼといった酵素類の活性を低減できていることを確認した。宿主である大腸菌由来のエンドトキシンも 97% 近く除去できていたが、セルファイン ET Clean L を用いることで更に高度に除去できることを示した。これらの結果はセルファイン MAX DEAE とセルファイン フォスフェイト、およびセルファイン ET Clean L による 3 段階精製は T7 RNA ポリメラーゼの高純度な精製に極めて有効であると示している。

mRNA のインビトロ転写合成には T7 RNA ポリメラーゼ以外にもピロホスファターゼ、2-O-メチルトランスフェラーゼ、ポリ A ポリメラーゼなど複数種類の核酸結合タンパク質を使用する (図 11)。これらの酵素においても今回紹介した 2 段階の精製は好適に使用できると思われる。mRNA 医薬の合成に重要なこれらの酵素群の堅牢性の高い精製プロセスは、製造コストの低減、開発リードタイムの短縮や安定生産に貢献するだろう。

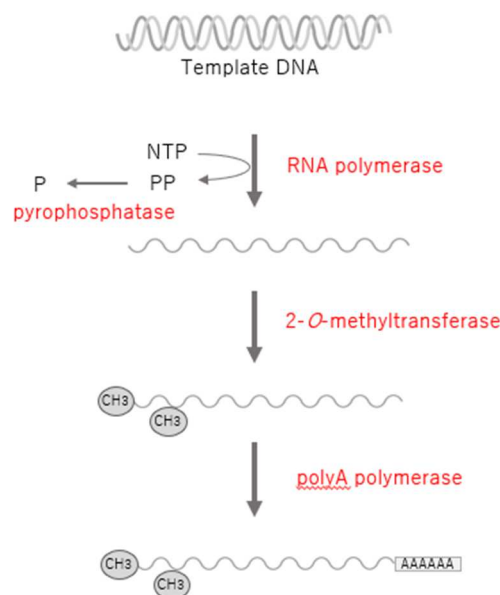


図 11 mRNA のインビトロ転写合成

製品に関する情報案内 製品の詳細な情報はホームページを閲覧下さい。

セルファイン フォスフェイト

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/grade/grade-1-phosphate/>

セルファイン MAX DEAE

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/grade/grade-6/>

セルファイン ET クリーン L

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/grade/grade-1-etclean/>

取扱説明書および技術資料は以下のホームページから pdf でダウンロードできます。

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/guide/>

ご注文の案内

製品名	パックサイズ	カタログ No.
セルファイン フォスフェイト	1ml x 5 (Mini-Column)	19551
	5ml x 1 (Mini-Column)	19515
	10ml	19524
	50ml	19545
	500ml	19546
	5 L	684 987 330
	10 L	684 987 335
セルファイン MAX DEAE	1ml x 5 (Mini-Column)	21000-51
	5ml x 5 (Mini-Column)	21000-55
	100ml	21000
	500ml	21001
	5 L	21002
	10 L	21003
セルファイン ET クリーン L	1ml x 5 (Mini-Column)	20051
	5ml x 1 (Mini-Column)	20015
	10ml	681 984 324
	50ml	681 984 326
	500ml	681 984 328

各種お問い合わせ、技術に関するご案内

(北米 & ヨーロッパ)

JNC America, Inc.
555 Theodore Fremd Ave,
Rye, NY 10580

Tel: 914-921-5400

Fax: 914-921-8822

Email: cellufine@jncamericany.com

(日本、アジア、その他)

JNC 株式会社
ライフケミカル事業部
〒100-8105
東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号
新大手町ビル 9 階

Tel: 03 3243 6150

Fax: 03 3243 6219

Email: cellufine@jnc-corp.co.jp