

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）のワクチンとして有名になった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。このレポートでは大腸菌（pAR1219）にT7 RNAポリメラーゼを発現した後、その発酵液をセルファイン フォスフェイトおよびセルファインMAX DEAE（弱アニオン交換担体）で高純度に精製した事例を紹介します。アフィニティークロマトグラフィー担体であるセルファイン フォスフェイトを用いることで極めて高純度の酵素が精製できます。

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 による発現誘導をすることで 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砕して、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 T7 RNAP の活性を確認したところ、溶出フラクション 2（EL2）で T7 RNAP が溶出していることを確認した（データは図 5 に記載）。

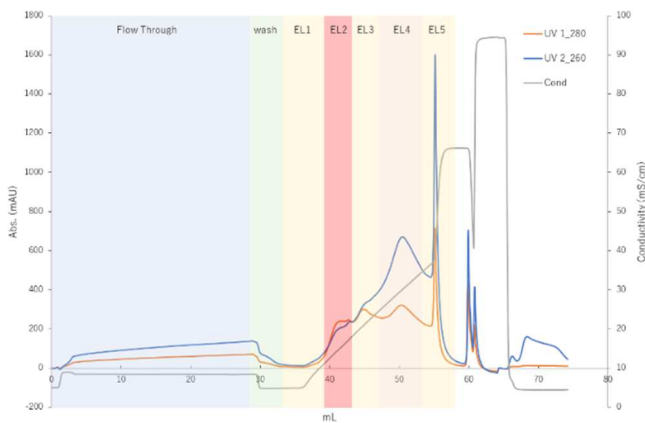


図 1 セルファイン MAX DEAE による T7 RNAP の粗精製
赤色で表示された EL2 フラクシオンが T7 RNAP の分画となる。

カラム条件

ロードサンプル: 硫安沈殿 28.5 CV

10.0 mS/cm になるように平衡化バッファーで希釈
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, 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

各溶出画分において、タンパク質と DNA の溶出量を測定した (図 2)。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。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ョンから 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。

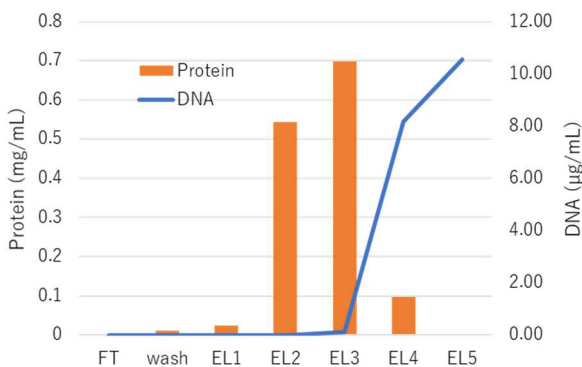
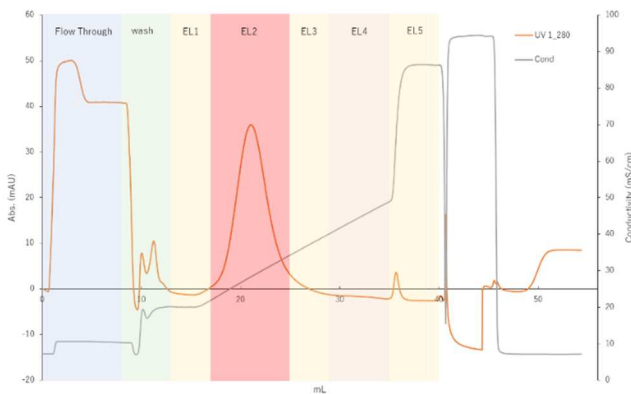


図 2 セルファイン MAX DEAE による DNA の除去

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ョン EL2 を平衡化バッファーで 3 倍希釈し、ロードサンプルとした。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、溶出フラクション 2 (以下 P-EL2) に明確なピークが得られた。各フラクションについて酵素活性値 (酵素活性/タンパク量) およびタンパク量を測定した結果を示す (図 4)。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。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。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。



カラム条件

ロードサンプル: 8 CV (平衡化バッファーによる 3 倍希釈)

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, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, protease inhibitor

溶出バッファー: Eq + 1 M NaCl

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。

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

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。

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 5)。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。ウェスタンブロッティングにおいてもこのシングルバンドが T7 RNAP であることが判る。

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

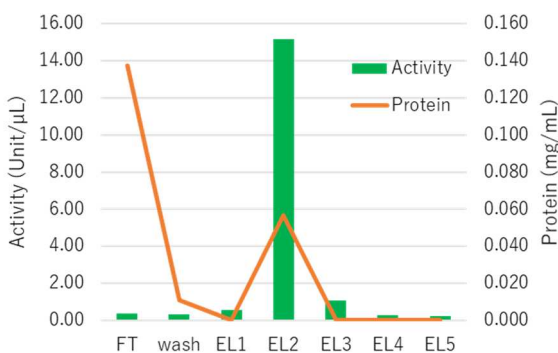


図 4 カラム精製後の酵素活性の定量

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率とタンパク質回収率を表 1

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。

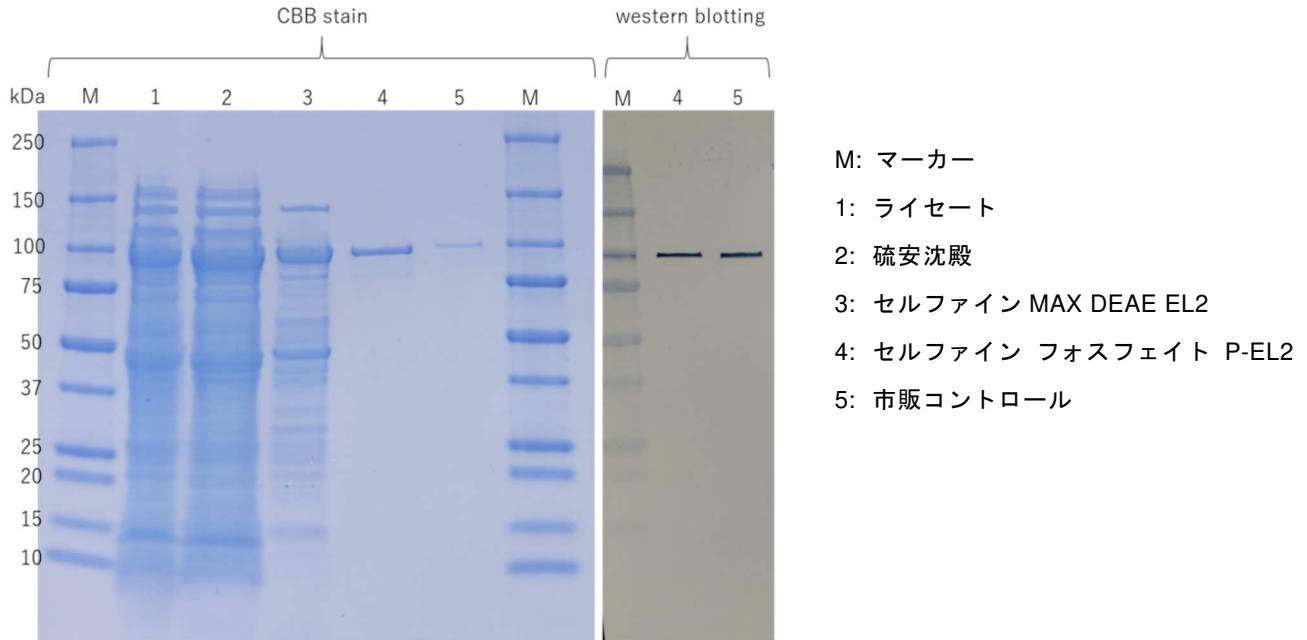


図5 クロマトグラフィー精製後の T7 RNAP の純度

表2 各工程における T7 RNAP 酵素活性

フラクション	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

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 6）。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。

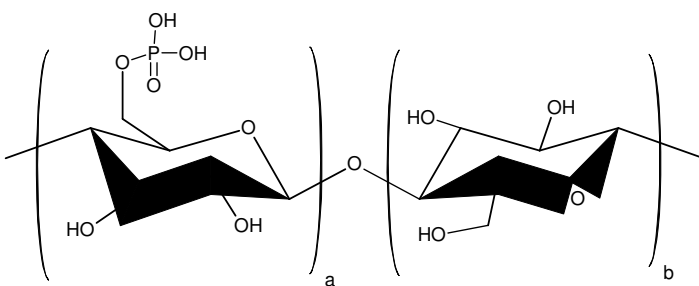


図 6 セルファイン フォスフェイトの化学構造

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う 2 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。2つの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。これらの結果からセルファイン MAX DEAE とセルファイン フォスフェイトによる 2 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。

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 7）。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。

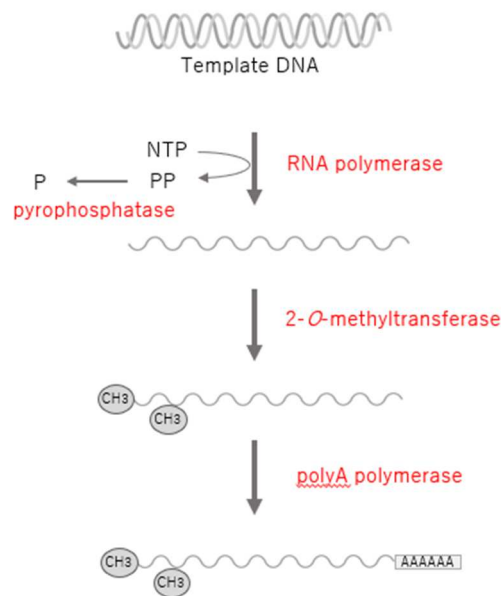


図 7 mRNA のインビトロ転写合成

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/>

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

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