

平成24年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「微生物培養による窒素安定同位体元素で標識  
した有用化学物質の製造技術の開発」

# 研究開発成果等報告書

平成25年3月

委託者 関東経済産業局

委託先 一般財団法人金属系材料研究開発センター

## 目次

第1章 研究開発の概要	-----	1
1.1 事業の背景・研究目的および目標		
1.1.1 研究の目的		
1.1.2 研究の概要		
1.1.3 実施内容		
1.2 研究体制		
1.2.1 研究体制および管理体制		
1.2.2 研究員およびプロジェクト管理員		
1.2.3 他からの指導・協力者		
1.3 成果概要		
1.3.1 高密度培養による微生物を用いた有用化学物質の製造技術の開発		
1.3.2 窒素安定同位体標識された核酸誘導体の製造技術の開発		
1.3.3 窒素安定同位体で標識された抗体の製造技術の開発		
1.4 当該プロジェクト連絡窓口		
第2章 本論	-----	10
2.1 高密度培養による微生物を用いた有用化学物質の製造技術の開発		
2.1.1 はじめに(㈱ネモト・サイエンス)		
2.1.2 実験装置・試料および実験方法		
2.1.3 結果および考察		
2.1.4 おわりに		
2.2 窒素安定同位体標識された核酸誘導体の製造技術の開発		
2.2.1 はじめに(㈱ネモト・サイエンス)		
2.2.2 実験方法		
2.2.3 結果および考察		
2.2.4 おわりに		
2.2.5 はじめに(東北大学)		
2.2.6 調査内容および実験方法		
2.2.7 結果および考察		
2.2.8 おわりに		
2.3 窒素安定同位体で標識された抗体の製造技術の開発		
2.3.1 はじめに		
2.3.2 実験装置・試料および実験方法		
2.3.3 結果および考察		

2.3.4 おわりに		
第3章 外部成果	-----	33
3.1 口頭発表・論文発表		
第4章 全体総括	-----	35
4.1 平成22～24年度の開発成果の総括		
4.1.1 高密度培養による微生物を用いた有用化学物質の製造技術の開発		
4.1.2 窒素安定同位体標識された核酸誘導体の製造技術の開発		
4.1.3 窒素安定同位体で標識された抗体の製造技術の開発		
4.2 研究開発後の課題・事業化展開		
4.2.1 高密度培養による微生物を用いた有用化学物質の製造技術の開発		
4.2.2 窒素安定同位体標識された核酸誘導体の製造技術の開発		
4.2.3 窒素安定同位体で標識された抗体の製造技術の開発		

以上

## 第1章 研究開発の概要

### 1.1 研究開発の背景・研究目的及び目標

#### 1.1.1 研究の目的

ライフサイエンス分野では核酸、タンパク質、アミノ酸が注目を浴びており、その構造や機能の解明が精力的に行われ、診断薬開発・遺伝子治療の実現に向けた技術確立への取り組みがなされている。その手段としての<sup>15</sup>N利用は有効である。また、創薬研究では効率的な薬剤開発のために(ドラッグスクリーニング)の<sup>15</sup>N需要増加が期待される。

さらに、画期的な医薬品開発への寄与が期待されている機能性 RNA(核酸)=遺伝子治療薬について、その作用メカニズムを解析するうえで<sup>15</sup>Nは有用である。また、遺伝子治療薬は患者細胞への薬剤輸送が問題となっており、体内動態を調べることができる遺伝子治療薬が存在すれば、遺伝子治療法の確立に資するものと考えられる。その様な目的に適した薬剤として、安定同位体で化学的に置換された薬剤(安定同位体標識タグ付き薬剤)が挙げられる。特に、アミノ基(-NH<sub>2</sub>基)は生体内の反応(プロトンの授受)の基点となることから、これを用いた<sup>15</sup>N標識は有効な手段であると考えられる。また近年発見された RNA 干渉から低分子 RNA が医薬品として病気の治療に使用できる可能性が高まってきた。この RNA 干渉の研究の活発化により遺伝子創薬の観点から RNA の合成研究が注目されている。

遺伝子治療法に関する研究や、植物生体内挙動について<sup>15</sup>N標識化合物が用いられているが、核酸、アミノ酸などの高付加価値な<sup>15</sup>N標識試薬は現在でも大半を海外の試薬メーカーからの輸入に頼っているのが現状であり、遺伝子治療を含めて肝心の<sup>15</sup>N標識試薬を海外に依存しては根幹を海外に握りこまれかねない。日本発の<sup>15</sup>N標識化合物の製造技術を開発するものである。

研究の目標として、

- ①「高密度培養による微生物を用いた有用化学物質の製造技術の開発」では、  
高密度培養による条件の最適化を確立する。(培養形態、培養の反応条件等)  
提供された窒素化合物の窒素化率の98%以上の安定同位体標識化率を達成する。
- ②「窒素安定同位体標識された核酸誘導体の製造技術の開発」では、  
窒素安定同位体標識された菌体抽出物を酵素処理あるいは化学処理により窒素安定同位体標識された核酸、または核酸誘導体などに変換する技術を確立する。  
<sup>15</sup>N標識ヌクレオチドの合成(mg~gスケールの規模)を達成する。  
<sup>15</sup>N標識ホスホアミダイトの合成(mg~gスケールの規模)を達成する
- ③「窒素安定同位体標識された抗体の製造技術の開発」では、  
窒素安定同位体標識された抗体の生産方法を開発する。  
<sup>15</sup>N標識抗体の測定方法の開発  
安定同位体標識化率3%

#### 1.1.2 研究の概要

ライフサイエンス分野では核酸、タンパク質、アミノ酸が注目をあびており、その構造や機能

の解明が精力的に行われ、診断薬開発・遺伝子治療の実現に向けた技術確立への取り組みがなされている。窒素安定同位体(重窒素)で標識した原料を用い微生物の高密度培養を行い、従来法より高生産性、高効率的に重窒素標識した核酸や抗体などの有用化学物質等、国内初の試薬を製造する技術を開発する。

遺伝子治療法に関する研究や、薬用植物生体内挙動について  $^{15}\text{N}$  標識化合物が用いられているが、核酸、アミノ酸などの高付加価値な  $^{15}\text{N}$  標識試薬は現在でも大半を海外の試薬メーカーからの輸入に頼っているのが現状であり、遺伝子治療を含めて肝心の  $^{15}\text{N}$  標識試薬を海外に依存しては根幹を海外に握りこまれかねない。 $^{15}\text{N}$  核酸、 $^{15}\text{N}$  アミノ酸、さらに高分子である抗体等の日本発の  $^{15}\text{N}$  標識化合物の開発が喫緊の課題である。

抗体生産には真核細胞等高等細胞である、ハイブリドーマ細胞や、遺伝子組み換え動物細胞等が用いられる(大腸菌では、抗体や膜タンパク等のより複雑な高次構造を持った高分子を産生することが出来ない為)。これらの高等細胞は、アミノ酸等、より栄養分を豊富にした培養液を用いて培養するため、大腸菌のような単純な組成の  $^{15}\text{N}$  標識した無機塩を用いた最少培地の使用は適さない。抗体医薬の開発に役立つと考えられる安定同位体窒素標識化抗体の製造の為に、安定同位体標識化培養液あるいは、培養手法の検討を行い、 $^{15}\text{N}$  標識化抗体の生産技術を開発する。

また現在薬物体内動態解析(動物実験)には一般に放射性同位元素が用いられているが、放射性同位元素使用者(特別健康診断、放射線被曝)および実験施設周辺環境(放射性同位元素の厳格な漏洩防止措置)への配慮の問題から、薬物動態解析の分野においては、脱放射性同位元素化が強く求められている。放射性同位元素を用いない薬物動態解析技術を世界に先駆けて開発することで、の業界における日本企業の世界シェアを挙げることも資することができるものと期待される。

### 1.1.3 実施内容

① 高密度培養による微生物を用いた有用化学物質の製造技術の開発(実施:株式会社ネモト・サイエンス、国立大学法人東北大学)

**【1-1】重窒素標識塩化アンモニウムを窒素源として添加した培地を用いて培養した菌体から同位体窒素標識された核酸などを製造する技術を確立する。**

なお、 $^{15}\text{N H}_4\text{Cl}$ のみを窒素源とする最小培地で *E. coli* を高密度培養、収菌し、菌体から RNA を抽出・酵素処理して、 $^{15}\text{N}$  標識された核酸モノマー混合物を得る。本単量体を酵素処理により、各種  $^{15}\text{N}$  標識ヌクレオチド(5'-NMP, 5'-NTP 等)へと誘導し、イオンクロマト・HPLC にて精製する。従って各種産物を得るためには、その前段階である高密度培養を行うための培養形態、培養条件、核酸などの抽出条件の最適化が必要である。

平成 23 年度は、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  は培地にかかるコストの 95%以上を占めるため、事業化のためには効率的な培地環境( $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 濃度)の制御が求められる。RNA 収量/使用  $\text{NH}_4\text{Cl}$ に最適化した培養条件を検討する必要がある。

また、RNA の抽出法についても一般的な RNA 抽出法及び全核酸回収法や界面活性剤による溶菌法・アルミナ破碎法などの方法から、核酸回収方法を選択し、より高収率な RNA 抽

出方法を検討する。

②窒素安定同位体標識された核酸誘導体の製造技術の開発(実施:株式会社ネモト・サイエンス、国立大学法人東北大学)

**【2-1】**窒素安定同位体標識された菌体抽出物を酵素処理あるいは化学処理により窒素安定同位体標識された核酸、または核酸誘導体などに変換する技術を確立する。

酵素を用いて窒素安定同位体標識された RNA 分子を作成するためには窒素安定同位体標識ヌクレオシドを酵素的あるいは化学的にリン酸化を行い 5'-rNMP 及び 5'-rNTP に変換する手法を確立することが必須である。また固相合成により化学的に RNA 分子を合成するためには窒素安定同位体標識されたホスホアミダイトを合成することが必要である。

平成 23 年度は、核酸の酵素処理による分解・精製による rNMP の調製法を確立するために、RNA からヌクレオチド/ヌクレオシド類への変換について酵素または化学処理による rNMP およびヌクレオシドへの変換を行い、回収率及び純度などを指標に変換手法を確立する。移動相やカラムなどの条件を最適化し、分取(分離精製)条件を確立する。

ヌクレオシドから化学的にトリリン酸化を行う方法を確立する。また酵素化学的手法による rNMP から rNTP への変換が文献上は可能であることが調査でわかったため、工業的/コスト的に実行可能であるかどうかについても調査検討を行う。

③窒素安定同位体標識された抗体の製造技術の開発(実施:株式会社ネモト・サイエンス、国立大学法人東北大学)

**【3-1】**窒素安定同位体標識された抗体の生産方法を開発する。

抗体医薬の開発に役立つと考えられる安定同位体窒素標識化抗体の製造の為に、安定同位体標識化培養液あるいは、培養手法の検討を行い、<sup>15</sup>N 標識化抗体の生産技術を開発する。

平成 23 年度は、抗体産生動物細胞の培養培地に添加する窒素安定同位体試薬の検討を実施し、実際に <sup>15</sup>N 標識された抗体について分析機器により <sup>15</sup>N 標識化抗体の検出を行う。

具体的には、抗体産生細胞を同位体標識アミノ酸含有培地で培養することにより、抗体の構成アミノ酸の一部を<sup>15</sup>Nアミノ酸で置換した抗体を産生させることを検討する。

細胞培養用の培地中のタンパク合成必須成分を <sup>15</sup>N 標識体に置換した培地を使って抗体産生ハイブリドーマ細胞を培養することにより、産生される抗体を <sup>15</sup>N 標識する。

## 1.2 研究体制

### 1.2.1 研究体制および管理体制

#### (1) 研究組織

図 1.2.1 に研究組織を示す。

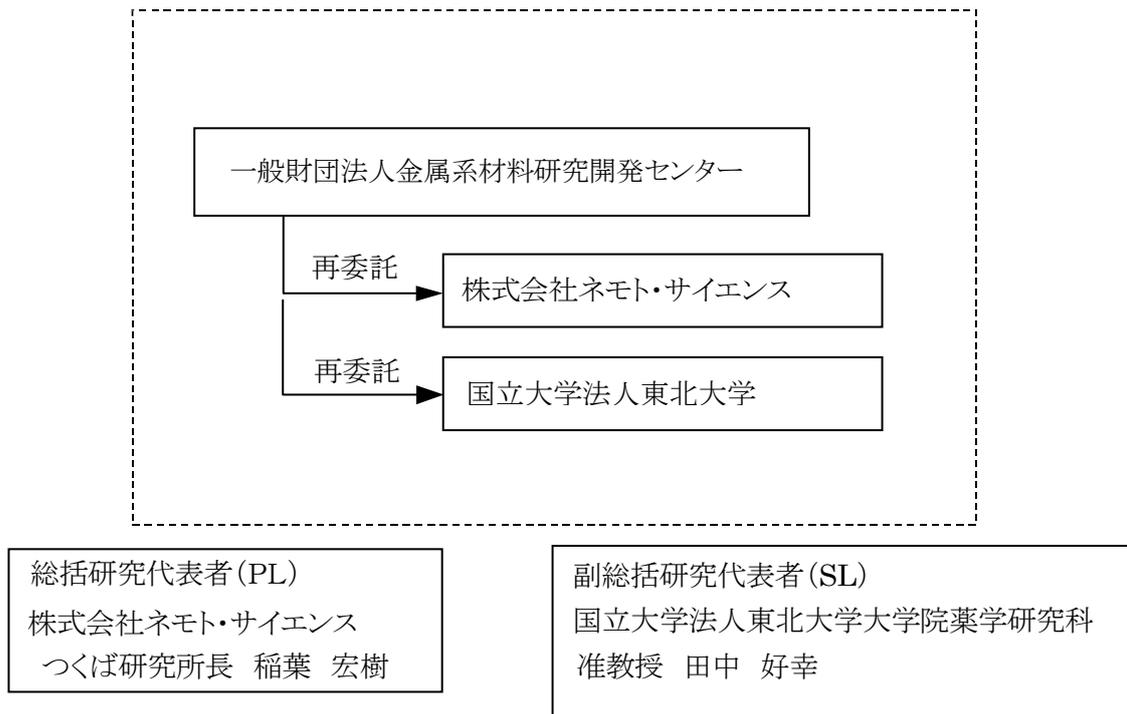


図 1.2.1 研究組織(全体)

(2) 管理体制

a 事業管理者

図 1.2.2 に事業管理者である一般財団法人金属系材料研究開発センターの管理体制を示す。

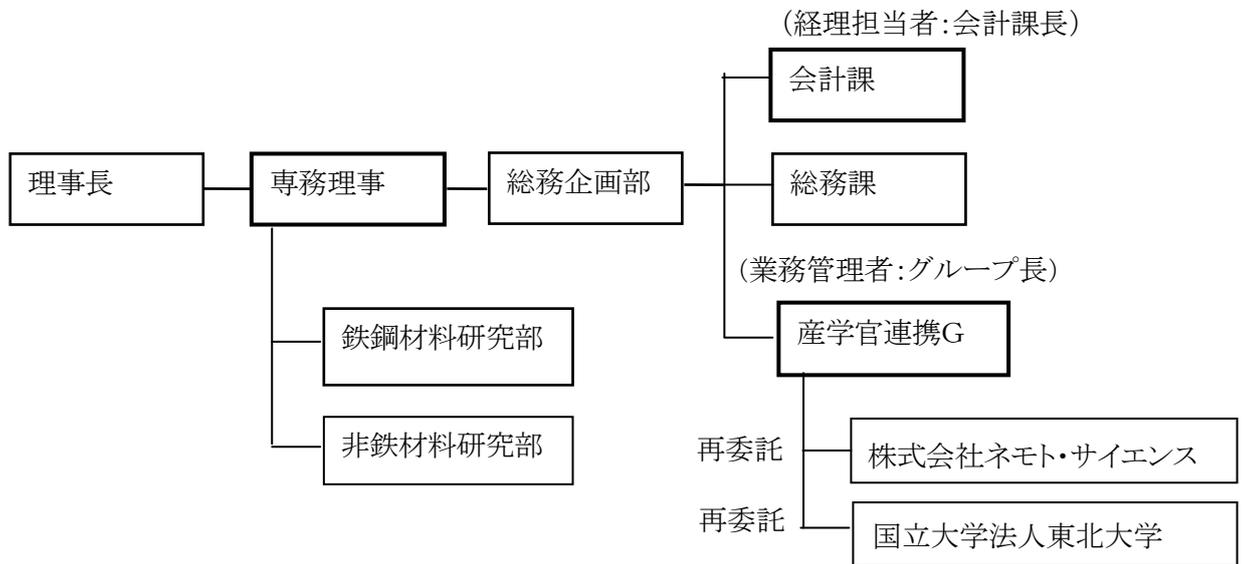
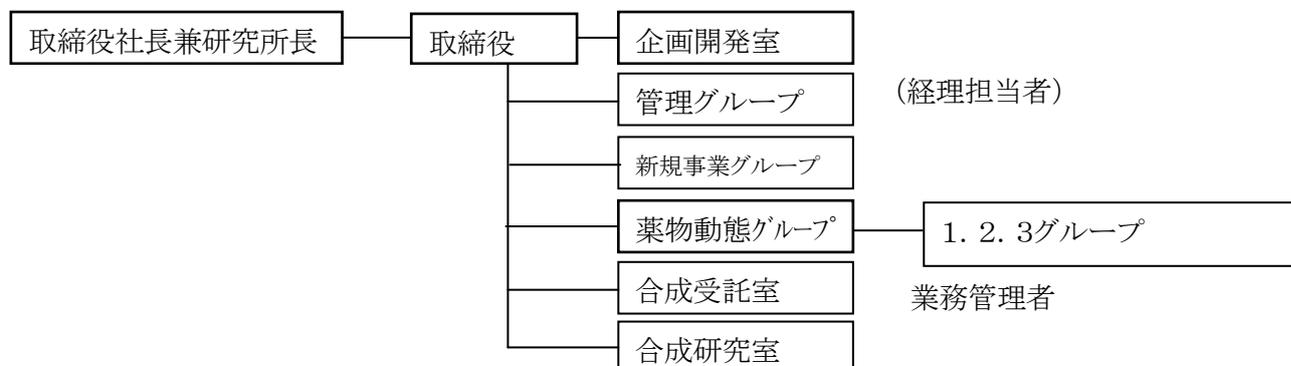


図 1.2.2 一般財団法人金属系材料開発センター管理体制

b 再委託先

図 1.2.3 に再委託先である株式会社ネモト・サイエンス、国立大学法人東北大学の管理体制を示す。

[株式会社ネモト・サイエンス]



[国立大学法人東北大学大学院]

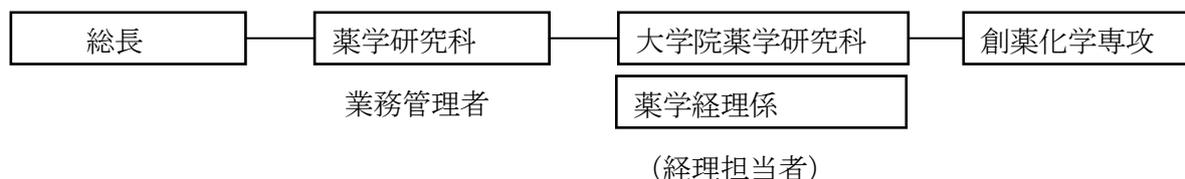


図 1.2.3 再委託先管理体制

(3) 所在地

事業管理者

一般財団法人金属系材料研究開発センター(最寄り駅:東日本旅客鉄道 東海道線、京浜東北線または山の手線 新橋駅)

〒105-0003 東京都港区西新橋1丁目5番11号

研究実施場所(主たる研究実施場所については、下線表記。)

株式会社ネモト・サイエンス つくば研究所(最寄り駅:関東鉄道常総線 水海道駅)

〒300-2521 茨城県常総市大生郷町6136番4

株式会社ネモト・サイエンス 本社(最寄り駅:井の頭線 高井戸駅)

〒168-0072 東京都杉並区高井戸東四丁目10番9号

国立大学法人東北大学大学院(最寄り駅:JR 東北新幹線 仙台駅)

〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-3

1.2.2 研究員および管理員

(1)研究員および管理員

注)実施内容①:高密度培養による微生物を用いた有用化学物質の製造技術の開発

実施内容②:窒素安定同位体標識された核酸誘導体の製造技術の開発

実施内容③:窒素安定同位体で標識された抗体の製造技術の開発

(2) 【事業管理者】一般財団法人 金属系材料研究開発センター

管理員

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
木曾 徳義	産学官連携グループ主席研究員	④

【再委託先】

研究員

株式会社ネモト・サイエンス

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
稲葉 宏樹	取締役社長兼つくば研究所長	① ② ③
畑 幹子	企画開発室室長	① ② ③
高橋 敏行	合成受託室室長	① ② ③
逆井 正夫	合成研究室	① ② ③
大谷 寛人	新規事業グループ	① ② ③
喜久川 政吾	企画開発室	① ② ③

国立大学法人東北大学

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
田中 好幸	大学院薬学研究科 准教授	① ② ③

(3) 担当者および業務管理者の所属、氏名

(事業管理者)

財団法人 金属系材料研究開発センター

(経理担当者) 総務企画部 会計課長 小紫 正樹

(業務管理者) 産学官連携グループ長 小紫 正樹

(再委託先)

株式会社ネモト・サイエンス

(経理担当者) 取締役 鶴原 謙治

(業務管理者) 合成受託室室長 高橋 敏行

(業務管理者) 取締役社長 稲葉 宏樹

国立大学法人東北大学大学院

(経理担当者) 薬学部経理係 菊池 宏隆

(業務管理者) 薬学研究科 准教授 田中 好幸

### 1.2.3 他からの指導・協力者

#### (1) 研究開発推進委員会

事業管理機関・一般財団法人金属系材料研究開発センターにおいて、本プロジェクトの管理を行った。プロジェクトの研究経緯と成果について取りまとめ、成果報告書2部、研究開発成果等報告書及び電子媒体(CD-R)一式を作成した。

本研究の実用化に向けた到達の度合いを検証するとともに、事業化に向けての課題等について研究実施者と調整を行った。

再委託先事業者が作成する証憑書類について、指導・確認を行った。

研究開発推進委員会の委員は表 1.2.4 とし、今年度は上記委員会を3回開催した。【実施者：一般財団法人金属系材料研究開発センター】

表 1.2.4 研究開発推進委員会委員

氏名	所属・役職	備考
稲葉 宏樹	株式会社ネモト・サイエンス 取締役社長	委 PL
田中 好幸	東北大学大学院 薬学研究科 准教授	SL
畑 幹子	株式会社ネモト・サイエンス 企画開発室室長	委
高橋 敏行	株式会社ネモト・サイエンス合成受託室室長	委
逆井 正夫	株式会社ネモト・サイエンス 合成研究室	委
大谷 寛人	株式会社ネモト・サイエンス 新規事業グループ	委
喜久川 政吾	株式会社ネモト・サイエンス 企画開発室	委
木曾 徳義	一般財団法人金属系材料研究開発センター主席研究員	委
桐野 豊	徳島文理大学学長	アドバイザー(謝金、旅費)
小野 晶	神奈川大学工学部物質生命科学科 教授	アドバイザー(謝金、旅費)
田川 吉彦	武田薬品工業株式会社医薬研究本部主席研究員	アドバイザー
金 雅克	住友金属鉱山株式会社課長代理	アドバイザー

### 1.3 成果概要

#### 1.3.1 高密度培養による微生物を用いた有用化学物質の製造技術の開発

平成 23 年度までの検討において、高密度培養装置（ジャーファーメンター）を用いた大腸菌の培養条件及び菌体からの RNA の回収については検討開始時と比較して大きく改善することに成功したものの、 $^{15}\text{N}$  塩化アンモニウムが高価な試薬であったため、実際に  $^{15}\text{N}$  標識した RNA は得られていなかった。

平成 24 年度は今まで検討した培養条件で  $^{15}\text{N}$  塩化アンモニウムを用いた高密度培養を実施して、1 g の  $^{15}\text{N}$  塩化アンモニウムから 130 mg の  $^{15}\text{N}$  標識 RNA を抽出することに成功した。平成 23 年度での検討結果では従前の RNA 抽出法を用いて 1 g の非標識塩化アンモニウムから

60 mg の RNA を回収できる事が示されており、また RNA 抽出法の改良により菌体からの RNA 回収率を 2 倍に引き上げられる結果が得られていたことから、130 mg RNA / 1 g NH<sub>4</sub>Cl という回収量は最適化した培養条件が標識化 RNA の生産においても適用可能であることを示している。

また、<sup>15</sup>N 標識核酸誘導体の事業化にむけて、これまで検討した培養条件で材料となる <sup>15</sup>N 標識 RNA を安定して供給できることを確認するために、定期的に培養液を交換して、回収した培養液から一定の間隔で標識された菌体を回収する半回分培養を実施した結果、1 g の使用塩化アンモニウムあたり 100 mg 以上の RNA が安定して回収できることを示し、本年度の数値目標である 1 g の塩化アンモニウムあたり 70 mg の RNA を回収できる培養条件の確立は達成された。

### 1.3.2 窒素安定同位体標識された核酸誘導体の製造技術の開発

<sup>15</sup>N-RNA のヌクレアーゼ P1 による酵素分解を行い、生じた <sup>15</sup>N-rNMP 各 4 種を分取 HPLC により精製した。前年度の検討結果より確立された分取条件を用いることで良好な回収率で目的物の精製が可能となり、目標値を達成することができた。また自動注入、分画の機能を用いることで連続精製が可能となり、分取回数の増加が分離に影響を及ぼさないことが明らかとなった。これらのことから更なるスケールアップが効率的に出来ることを立証した。

<sup>15</sup>N-rNMP の脱リン酸化反応の検討ではアルカリホスホターゼ(仔牛小腸由来)を用いることにより <sup>14</sup>N の検討時と同じく良好な収率で脱リン酸化が進行していることが確認できた。<sup>15</sup>N-adenosine 及び <sup>15</sup>N-guanosine については反応液より固体として析出することが明らかとなり、簡便な操作のみで精製できることが明らかとなった。また <sup>15</sup>N-cytidine 及び <sup>15</sup>N-uridine については反応後分取 HPLC により良好な回収率で精製できることが明らかとなった。

ホスホアミダイトの合成においては guanosine を原料としてホスホアミダイトの合成を行い、100 mg スケールでの合成を行った。核酸塩基部位をアシル基、5'位水酸基を 1, 1'-dimethoxytrytyl 基、2'位水酸基を TBDMS 基で保護し、3'位水酸基にホスホアミダイト試薬を導入し目的の <sup>15</sup>N-ホスホアミダイトを合成することが出来た。前年度の結果より他のヌクレオシドの <sup>15</sup>N-ホスホアミダイトも同様の合成手法を用いて合成が可能である。

本プロジェクトにおいて、平成 22、23 年度にヌクレオシド、ヌクレオチドの評価系を確立し、その結果を核酸化学研究のトップジャーナルである *Nucleic Acids Research* に発表した(発表論文 5 番)。また今年度は工業プロセスにより得られた産物の構造評価を行い、本プロジェクトによる工業プロセスにより重窒素 (<sup>15</sup>N) 標識ヌクレオチドおよびヌクレオシドを得ることが出来ることを証明した。

### 1.3.3 窒素安定同位体で標識された抗体の製造技術の開発

今年度は、最初に、RI 標識アミノ酸を用いて抗体の同位体アミノ酸による標識化の確認を行った。次に、平成 23 年度までに検討・確立した方法を用いて <sup>15</sup>N 標識化抗体を作製し、それを酵素消化して、<sup>15</sup>N 標識化抗体のペプチド断片を調製した。高分解能質量分析計をもちいて、<sup>15</sup>N 標識化抗体の

ペプチド断片の分析を検討し、実際に産生した抗体の  $^{15}\text{N}$  標識化を確認することに成功した。最終目標である、「構成アミノ酸のうち 3%以上の標識化」に対して、抗体の不変領域の構成アミノ酸のうち 4.8%の  $^{15}\text{N}$  標識化を確認し、数値目標を達成した。実用化に向けて、培養のリッタースケールへのスケールアップとその培養上清からの抗体精製プロセスを検討した。

#### 1.4 当該プロジェクトの連絡窓口

事業管理者、連絡担当者、総括研究代表者等及びそれぞれの連絡先を表1.4.1、表1.4.2に示す。

表 1.4.1 事業管理者

住所: 〒105-0003 東京都港区西新橋一丁目5番11号 名称: 一般財団法人金属系材料研究開発センター 代表者役職・氏名: 理事長 岩城正和 連絡先: 03-3592-1282
連絡担当者所属役職・氏名: 産学官連携グループ主席研究員 木曾 徳義 Tel: 03-3592-1282 Fax: 03-3592-1285 E-mail: nkiso@blue.ocn.ne.jp

表 1.4.2 総括研究代表者、副総括研究代表者

氏名: 稲葉 宏樹 所属組織名: (株)ネモト・サイエンス 所属役職: 取締役社長兼つくば研究所長 Tel: 0297-24-0781 Fax: 0297-24-5917	氏名: 田中 好幸 所属組織名: 東北大学大学院 所属役職: 薬学研究科准教授 Tel: 022-795-5917 Fax: 022-795-5917
--	--

## 2.1 高密度培養による微生物を用いた有用化学物質の製造技術の開発

### 2.1.1～2.1.4: 文責 株式会社ネモト・サイエンス

#### 2.1.1 はじめに

当該プロジェクトにおいて開発する重窒素 ( $^{15}\text{N}$ ) 標識化合物の製造技術は、微生物発酵を利用して重窒素化塩化アンモニウム ( $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ) を有用な  $^{15}\text{N}$  標識生体物質に変換する技術基盤を確立する。具体的には、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  のみを窒素源として添加した最小培地で菌体を培養、収菌し、菌体から RNA を抽出・酵素処理して、 $^{15}\text{N}$  標識された核酸モノマー混合物を精製し、さらに各種  $^{15}\text{N}$  標識ヌクレオチド ( $5'\text{-NMP}$  等) へ誘導する。また、 $^{15}\text{N}$  標識された抗体の製造技術の開発においては、抗体標識原料候補として菌体から得られる  $^{15}\text{N}$  標識アミノ酸、タンパク質、核酸等の標識化生体分子が利用できる。

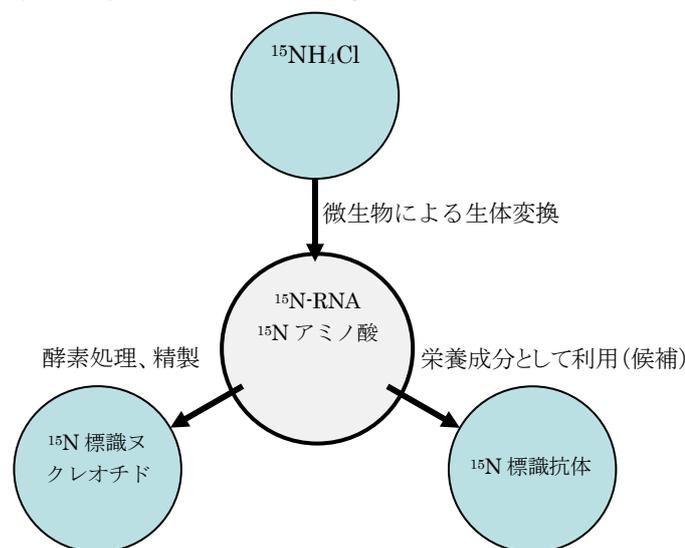


図 2.1.1(1)本プロジェクトにおける  $^{15}\text{N}$  標識分子の流れ

このように微生物培養を利用した  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  から  $^{15}\text{N}$ -RNA、 $^{15}\text{N}$ -アミノ酸等への生体変換は本プロジェクトにおける最も基盤的な技術であり、この技術の成否、すなわち  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  から各  $^{15}\text{N}$  生体分子への変換効率をどこまで引き上げることができるかが本プロジェクトの最終目的、 $^{15}\text{N}$  標識化合物製造の事業化の成否に直結する。

本実施計画では、微生物を高密度培養することにより、大量の菌体を少ない材料（培地）で収菌し、 $^{15}\text{N}$ -RNA を大量生産する方法を確立することを目的とする。しかしながら、日本国内で  $^{15}\text{N}$ -RNA の大量生産を目的とした微生物の高密度培養について検討されたデータは現在存在しないため、 $^{15}\text{N}$  標識化合物の製造技術を確立するためにはその前段階である  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  のみを窒素源として添加した最小培地での高密度培養を行うための条件の最適化が必要であった。

平成22年度は、培養条件の中で最も重要且つ基礎的な条件である使用する微生物種の検討を実施した。増殖速度が高く菌体からの核酸の抽出も容易な大腸菌 (*Escherichia Coli*) の中からRNAの回収に適した菌株を選択するためにHB101、JM109、DH5 $\alpha$ 、BL21、B834、BLR、

BL21Stars、Mach1、K-12、B、W1485及びW3110の計12株の大腸菌株を入手し、完全培地（LB培地）と塩化アンモニウムを唯一の窒素源とする最小培地（M9培地）での菌体の増殖速度とRNA収量について検討を実施した結果、最小培地での増殖能力及びRNAの回収効率に優れたBL21株を<sup>15</sup>N-RNAを生産するための微生物として選択した。

平成 23 年度は、大腸菌 BL21 株を用いて最小培地での高密度培養方法を検討した。<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Clは材料費としてかかるコストの多くを占めるため、事業化のためには効率的な培地環境（<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl濃度）の制御が求められる。しかしながら、菌体量ではなくRNAの収量を指標とし、かつNH<sub>4</sub>Clあたりの効率を目的とした最小培地での高密度培養方法を検討したデータは存在しなかったため、RNA収量/使用NH<sub>4</sub>Clに最適化した培養条件を検討する必要がある。

そこで、培地を高速で攪拌することが出来て、かつpHや溶存酸素濃度等の培地環境が制御可能な高密度培養装置（ジャーファーマンター）を用いて培養条件の最適化を検討した。その結果、検討開始時のフラスコ培養と比較して菌体の収量をおよそ4倍、培地に使用した塩化アンモニウムあたりのRNA抽出量もおよそ7倍にまで増加させることに成功した。更に、回収した菌体からのRNAの抽出効率についても改善することを目的として東北大の田中准教授（SL）より情報提供を受けたWilliamsonらの全核酸抽出法をもとにフェノール法の工程について検討し、菌体からの核酸抽出量をさらに約2倍に増加させることに成功した。

平成24年度は今まで検討した培養条件で<sup>15</sup>N塩化アンモニウムを用いた高密度培養を実施して、実際に<sup>15</sup>N標識された核酸を抽出した。抽出した<sup>15</sup>N標識核酸は2.2項の窒素安定同位体標識された核酸誘導体の製造技術の開発に使用することとした。

また、<sup>15</sup>N標識核酸誘導体の事業化にむけて、これまで検討した培養条件で材料となる<sup>15</sup>N標識核酸を安定して供給できることを確認するために、定期的に培養液を交換して、回収した培養液から一定の間隔で標識された菌体を回収する半回分培養を実施した。

### 2.1.2 実験装置・試料及び実験方法

大腸菌の培養には種菌等の前培養として、温度、振とう速度等を制御する機能を有し、恒温槽を備えた培養装置を用いた。濁度の測定には赤外線による透過光/反射光量をOD600に換算表示する機能を備えた非接触濁度測定装置を用いた。からの<sup>15</sup>N標識RNAの抽出及びRNA量の測定については、以下の機器を使用した。

また、本培養には培養温度、水量、攪拌速度、供給ガス量、pH、溶存酸素量などを制御する機能を有し、菌体濃度、基質濃度をオンラインでモニターするためにオンラインバイオセンサーを備えた発酵装置を用いた。

培養後の集菌には、回転速度及び0.3 μm粒子にて99.9%以上を集塵する能力を備えた無菌操作装置を用いた。

## 実験試料

本年度の実験には、平成 22 年度に窒素同位体標識された核酸を製造するために適した菌体として報告した BL21 株 (Bacterial Strain BL21 (DE3) pLysS, Glycerol Stock (Promega)) を使用した。また、<sup>15</sup>N 標識を行うための窒素源として住友金属鉱山株式会社から提供を受けた <sup>15</sup>N 塩化アンモニウムを使用した。

## 実験方法

### 培地の調製

大腸菌の前培養には、液体 LB 培地 (Invitrogen) を使用した。開封後は 4°C の冷蔵庫で保存した。

冷凍保存された大腸菌株の画線播種及び培養に用いる寒天培地は、1.5% agar-LB 培地を使用した。

大腸菌の本培養に用いる最小培地には、M9 培地を基本としたそれぞれの組成の培地を調製して使用した。リン酸水素二ナトリウム十二水和物を 26.49 g、リン酸水素二カリウムを 4.5 g、塩化ナトリウムを 0.75 g、それぞれ電子天秤で秤量し、150 mL のミリ Q 水に溶解し、pH を 8.15 に調整した後オートクレーブ) 処理して 10×塩溶液を調製し、全ての最小培地の調製に用いた。金属イオン溶液として 10 mmol/L 塩化鉄 (III) 溶液を 1.5 mL、50 mmol/L 塩化マンガン溶液を 1.5 mL、1 mol/L 硫酸マグネシウム溶液を 3 mL、50 mmol/L 塩化マグネシウム溶液を 1.5 mL、0.75 mL の消泡剤 SI を 1075 mL のミリ Q 水に混合し、更に微量金属を補充の為 75 mL の水道水を加えてオートクレーブ処理した。<sup>15</sup>N 塩化アンモニウムを 3 g、D (+) -グルコースを 48 g、200 mL のミリ Q 水に溶解し、フィルターユニットとディスプレイ注射筒を用いて濾過滅菌して <sup>15</sup>N 標識体溶液を調製した。

オートクレーブ滅菌した溶液が十分常温に戻った後に、10×塩溶液、ビタミン・金属イオン溶液、<sup>15</sup>N 標識体溶液、0.1 mol/L 塩化カルシウム溶液 1 mL、80%グリセロール溶液を 1 mL 加えて M9 培地を調製した。

### 大腸菌 BL21 株の培養 (ジャーフェーマンターを用いた高密度培養)

初めに、培養中の培地をモニタリングするためのセンサのうち、溶存酸素 (Dissolved oxygen、DO) センサと pH センサについて、それぞれ 5% 亜硫酸ナトリウム水溶液と pH 標準溶液で校正を実施した。その後、M9 培地の調製時にジャーフェーマンターの培養槽に滅菌前の金属イオン溶液を入れ、培養槽に DO センサ、pH センサ、濁度センサを設置して密閉し、オートクレーブで金属イオン溶液ごと培養槽を滅菌した。半回分培養時には、交換用の培地を調製するために培養槽に入れた量の同量の金属イオン溶液を 2 L 容量の三角フラスコに入れてアルミホイルで密閉し、オートクレーブで滅菌した。培養液の pH を制御するために、100 mL の溶媒ビンに 5 mol/L の水酸化ナトリウム溶液を調製して培養

槽と同時に滅菌した。滅菌後、培養槽または三角フラスコ中の金属イオン溶液にその他の溶液を無菌的に添加して M9 培地を調製し、培養制御装置に培養槽を取り付けセンサの滅菌後校正を実施した後に培養開始まで培養条件で加温した。

-80°Cで保存しておいた大腸菌 BL21 株のグリセロールストックを氷冷下でセーフティキャビネット内に移し、半凍結状態のままディスポーザブル白金耳で掻きだして 1.5% agar-LB 培地にストリークして画線播種した。恒温振盪機内で 37°C、オーバーナイトで静置した後、画線培養したプレートから菌体コロニーを液体 LB 培地に植菌し、ウォーターバスで 37°C、160 rpm の条件で前培養を開始した。培養後、およそ 1 時間ごとに OD モニターで培養液の濁度 (660 nm の吸光度、OD<sub>660</sub>) を測定し、OD<sub>660</sub> が約 0.2~0.3 に達した時点で 3000 rpm、20°C、5 分で遠心して上清を捨て、3 mL の M9 培地で 1 回懸濁した後に再度遠心することで、前培養培地を完全に取り除いた。その後、M9 培地で希釈した菌液を培養槽に添加して本培養を開始した。

モニタリングしている濁度の上昇が停止した時点で培養槽を取り外し、培養液を 250 mL コニカルチューブに分注して 3000 rpm、4°C、20 分遠心分離した。遠心後、デカンテーションとタッピングで培地上清を除去した。半回分培養の実施時には、同じく濁度の上昇が停止、または低下した時点で培養槽を取り外し、セーフティキャビネット内で一定量の培養液を回収し、同量の培地交換用 M9 培地を培養槽に追加して培養を継続した。回収した培養液は 250 mL コニカルチューブに分注して 3000 rpm、4°C、20 分遠心分離した。遠心後、デカンテーションとタッピングで培地上清を除去した。回収した菌体は、その後 RNA の抽出をおこなうまで -80°C の冷凍庫に保存した。

#### 培養した大腸菌からの核酸の抽出

フェノールを 60°C で溶解し、150 mL の TE buffer に塩化ナトリウムを加えて調製した STE buffer と キノリノール 0.5 g を加えて飽和させ、STE 飽和フェノールを調製した。

凍結保存した大腸菌の菌体を室温で融解した後、菌体と等量の STE buffer で懸濁し、更にその後に 1% SDS で 37°C、15 分間攪拌し細胞を溶解させた。

次に、菌体懸濁液に STE 飽和フェノール：クロロホルム (1 : 1) を懸濁液の等量加えて 65°C で 30 分攪拌し、8000×g で 30 分遠心した後に RNA が含まれる上層の水相を回収した。更に、有機相に菌体懸濁液と等量の STE buffer を再度加えて室温で攪拌し、8000×g で 30 分遠心して上層の水相を回収して 1 回目の回収した水相にプールした。更にもう一度有機相に菌体懸濁液と等量の STE buffer を加えて室温で攪拌し、8000×g で 30 分遠心して上層の水相を回収して 1 回目の回収した水相にプールした。再抽出、再々抽出分をあわせてプールした水相に、0.2 倍量の 24 : 1 のクロロホルム：イソアミルアルコール加えて 8000×g で 30 分遠心し、上層を分離して夾雑物を除去した。

抽出した RNA を含む水相に 0.1 倍量の 3 mol/L 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加えて

混合し、等量の 2-プロパノールを加えて $-20^{\circ}\text{C}$ で一晩静置し、RNA を沈殿させた。次の日、 $8000\times\text{g}$  で 30 分遠心して上清を除去し、残ったペレットを 75%エタノールで 1 回洗浄した後減圧乾燥し、Milli-Q 水で溶解させて抽出 RNA 溶液を得た。

抽出した RNA 溶液の吸光度 (260 nm、280 nm) を、マイクロプレートリーダーで測定した。RNA 溶液の濃度は、260 nm の吸光度 $\times$ 希釈倍率 $\times 40 \mu\text{g}/\text{mL}$  の計算式より算出した。

### 2.1.3 結果及び考察

#### $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を窒素源として用いた大腸菌 BL21 株の高密度培養

$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  は高価であるため、平成 23 年度までの培養条件の検討は非標識塩化アンモニウムを用いて実施していた。これまでの検討において塩化アンモニウムあたりの RNA 収量に優れた高密度培養条件 (前年度結果: 1 g の塩化アンモニウムあたり 60.6 mg) 及び RNA の抽出法を見出すことには成功したものの、窒素源を  $^{15}\text{N}$  塩化アンモニウムにすることが菌体の増殖にどのような影響を与えるかは不明であった。

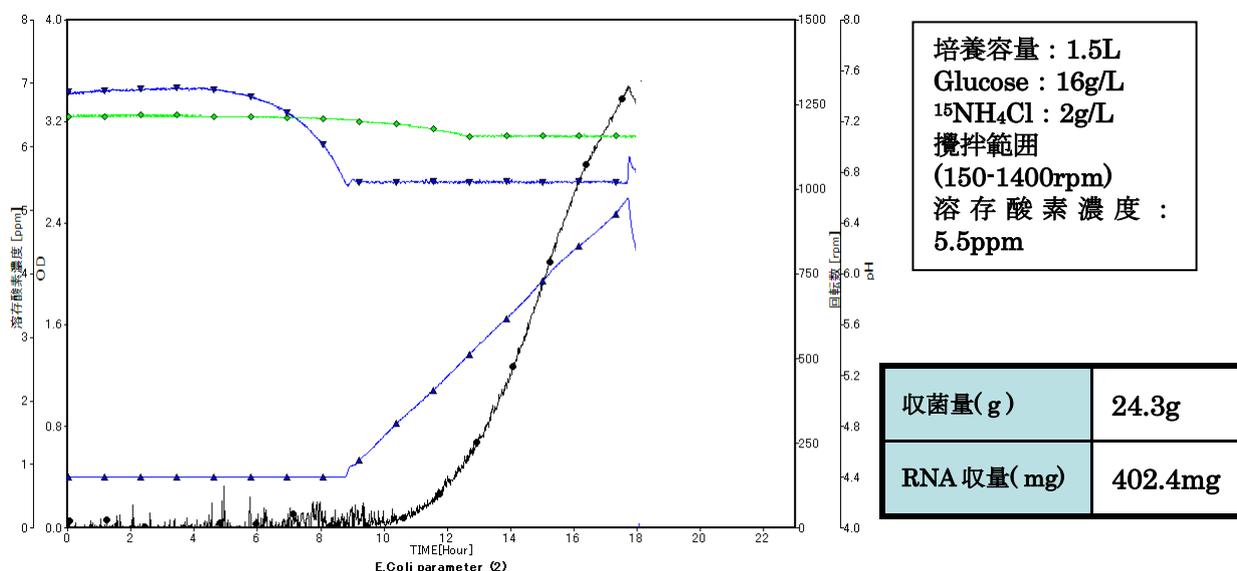


図 2.1.3(1)  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  を窒素源として用いた大腸菌 BL21 株の高密度培養

そこで、住友金属鉱山株式会社より  $^{15}\text{N}$  塩化アンモニウムの提供を受け、今まで検討した培養条件で  $^{15}\text{N}$  塩化アンモニウムを用いた高密度培養を 1.5 L スケールで実施した結果、およそ 18 時間の培養で 24.3 g の菌体を回収することが出来た。これは、平成 23 年度に実施した同条件での非標識塩化アンモニウムを用いた培養での菌体回収量 (24.5 g) とほぼ同値であった。また、回収した菌体から前年度に検討を実施した全核酸抽出法で RNA を抽出した結果、402.4 mg の RNA を回収することが出来た。培養に使用した  $^{15}\text{N}$  塩化アンモニウム量に換算すると、1 g の使用  $^{15}\text{N}$  塩化アンモニウムあたりおよそ 134.1 mg の RNA を生産出来たことになる。

この結果は、 $^{15}\text{N}$  塩化アンモニウムを用いても菌体の増殖に影響を与えないことを示唆しており、現状の培養条件が標識化 RNA の生産においても適用可能であることが明らかとなった。本条件で得られた  $^{15}\text{N}$  標識 RNA は、 $^{15}\text{N}$  標識リボヌクレオチドとリボヌクレオチド類の製造

工程の検討（2.2 項）に使用した。

### <sup>15</sup>N 標識大腸菌 BL21 株の半回分培養の検討

これまでの <sup>15</sup>N 標識 RNA を回収するための培養は、pH 調整用の水酸化ナトリウム溶液や酸素供給用の通気を除いて、培養開始時点から培地の組成を変えないバッチ培養で実施してきたが、バッチ

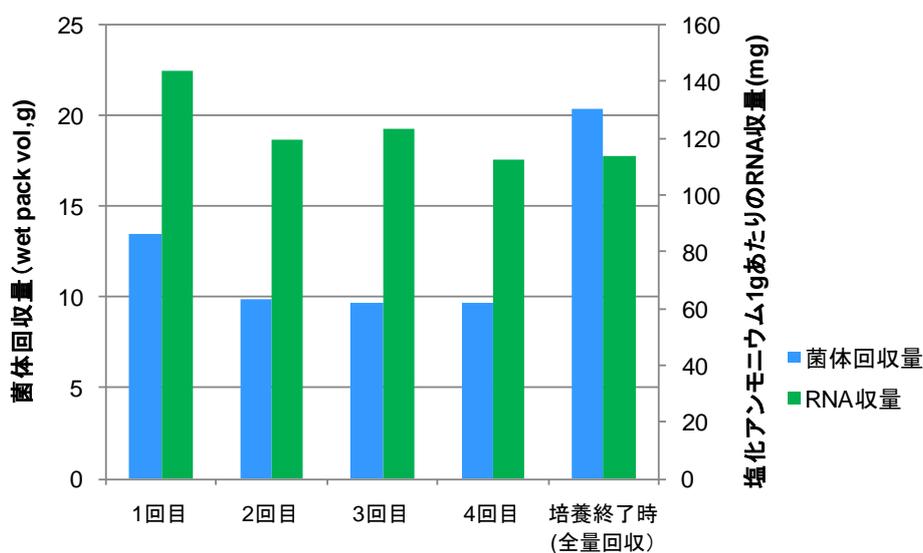


図 2.1.3(2) <sup>15</sup>N 標識大腸菌 BL21 株の半回分培養

培養では 1 回の培養毎に前培養及び増加するまでの時間がかかるため、大量の菌体を短時間で得る目的には向いていない。<sup>15</sup>N 標識核酸誘導体の事業化を考えた場合に材料としての <sup>15</sup>N 標識 RNA の供給量がボトルネックとなる可能性が考えられたため、これまで検討した培養条件で材料となる <sup>15</sup>N 標識核酸を安定して供給できることを確認するために、菌体の回収時に種菌としての培養液を残し、培地を新たに追加することにより培養を継続して行う半回分培養の検討を実施した。

3~5 時間毎に培地の半分（750 mL）を交換し、回収した培養液から菌体を継続的に回収した結果、培養開始後 21、23、29、36 及び 41 時間にそれぞれ 13.4、9.8、9.7、9.7（培地半量）及び 20.34 g（全量回収）の菌体を回収した。およそ 40 時間で得られた合計菌体量は 62 g に達し、かつ継続的な菌体の回収が可能であることが確認された。また、それぞれの回収した菌体から RNA を抽出した結果、半回分培養での使用塩化アンモニウムあたりの RNA 収量は 10% 程低下したものの、1 g の使用塩化アンモニウムあたり 100 mg 以上の RNA が安定して回収できることが示された。

#### 2.1.4 おわりに

平成 23 年度までの検討において、高密度培養装置（ジャーフェーマンター）を用いた大腸菌の培養条件及び菌体からの RNA の回収については検討開始時と比較して大きく改善するこ

とに成功したものの、 $^{15}\text{N}$  塩化アンモニウムが高価な試薬であったため、実際に  $^{15}\text{N}$  標識した RNA は得られていなかった。

平成 24 年度は今まで検討した培養条件で  $^{15}\text{N}$  塩化アンモニウムを用いた高密度培養を実施して、1 g の  $^{15}\text{N}$  塩化アンモニウムから 130 mg の  $^{15}\text{N}$  標識 RNA を抽出することに成功した。

また、 $^{15}\text{N}$  標識核酸誘導体の事業化にむけて、これまで検討した培養条件で材料となる  $^{15}\text{N}$  標識 RNA を安定して供給できることを確認するために、定期的に培養液を交換して、回収した培養液から一定の間隔で標識された菌体を回収する半回分培養を実施した結果、1 g の使用塩化アンモニウムあたり 100 mg 以上の RNA が安定して回収できることを示し、本年度の数値目標である 1 g の塩化アンモニウムあたり 70 mg の RNA を回収できる培養条件の確立は達成された。

## 2.2 窒素安定同位体標識された核酸誘導体の製造技術の開発

2.2.1～2.2.4: 文責 株式会社ネモト・サイエンス

2.2.5～2.2.8: 文責 国立大学法人東北大学大学院 薬学研究科 田中好幸准教授

### 2.2.1 はじめに

窒素安定同位体標識された核酸誘導体の製造技術の開発において平成22年度及び23年度は HPLC分析及び分取条件の確立、リボヌクレオチドとリボヌクレオチド類の製造工程についての確立を行った。すなわち培養した大腸菌から得られたRNA をヌクレアーゼP1 による酵素分解を行い、生じた5'-rNMP各4種類を分取HPLCにより精製を行った。5'-rNMPのカラムへの保持が困難であったためプレカラムを追加導入し、移動相のグラジエントパターンを最適化することで5'-rNMP 各4種類をそれぞれ良好な回収率(約70~80%)で単離することができた。また自動注入、分画の機能を用いることで効率的な精製が可能となった。さらに酵素化学的脱リン酸化反応の検討ではアルカリホスホターゼ(仔牛小腸由来)により5'-rNMPの脱リン酸化が良好な収率で進行していることが確認できた。

ホスホアミダイトの合成においては4種類のヌクレオシドを原料としてホスホアミダイトの合成を行い合成ルートの確認とgスケールでの合成を行った。Cytidine、guanosine及びadenosineについては核酸塩基部位をアシル基、5'位水酸基を1,1'-dimethoxytrytyl基、2'位水酸基をt-butyl dimethylsilyl(TBDMS)基で保護し、3'位水酸基にホスホアミダイト試薬を導入した。

これらの前年度の結果を踏まえ平成24年度は最終数値目標として各モノリン酸の精製後の回収率を安定的に70%以上回収することとし、以下の検討項目を計画した。

- ・分取 HPLC による精製を行い、各モノリン酸のそれぞれにつき安定的に 70%以上を回収する技術の確立をめざす。そのために平成 23 年度に着手した条件検討項目について最適化した条件を確立、①の高密度培養で得られた RNA を原料とし各種酵素反応条件の最適化を行い、条件確定後も精製条件の改良に取り組み、事業化時の製品製造プロセスを見越した製造方法の改善を検討する。

また平成 24 年度は大腸菌培養から製造した  $^{15}\text{N}$ -核酸類(ヌクレオシド、ヌクレオチド)を用いた以下の項目について検討実験を実施した。

- ・ヌクレアーゼ P1 による  $^{15}\text{N}$ -RNA の酵素分解物の分取 HPLC による精製のスケールアップ検討

大腸菌より抽出した  $^{15}\text{N}$ -RNA をヌクレアーゼ P1 により分解して  $^{15}\text{N}$ -5'-rNMP に変換する手法を確立する。前年度までの結果より4種のrNMPはTEAAを移動相とした溶媒を用いた系により分離することが可能であることが分かった。分取 HPLC による精製のスケールアップを行い  $^{15}\text{N}$ -rNMP の単離を行う。

- ・酵素化学的脱リン酸化反応について

分取 HPLC により精製した4種の  $^{15}\text{N}$ -rNMP のそれぞれをアルカリホスホターゼにより脱リン酸化し、対応する  $^{15}\text{N}$ -ヌクレオシドに変換する。スケールアップを目指した反応条件及び精製条件の最適化を検討する。得られた  $^{15}\text{N}$ -ヌクレオシドの精製方法を確立し、将来の事業化を視野に入れた精製方法を確立する。

- ・ $^{15}\text{N}$ -ホスホアミダイトの合成

$^{15}\text{N}$ -rNMP の脱リン酸化反応により得られた  $^{15}\text{N}$ -ヌクレオシド4種を原料として  $^{15}\text{N}$ -ホスホアミダイト

の合成を検討する。核酸塩基部位の保護基としてそれぞれ acetyl (cytidine)、benzyl (adenosine) 及び iso-butyl (guanosine) を用い、5'位水酸基は 1,1'- dimethoxytrytyl 基、2'位水酸基には TBDMS を導入しホスホアミダイトの合成を行う。

## 2.2.2 実験方法

HPLC 分取条件の検討については以下の機器を使用した。

### HPLC システム(分取)

データ解析:	Waters Empower 3
HPLC ポンプ:	Waters 2545
UV 検出器:	Waters 2489 Dual $\lambda$ UV/VIS 検出器
オートインジェクター:	Waters 2707
フラクションコレクター:	Waters WFCIII

### (1) HPLC 分取条件の検討

50 mmol/L triethylammonium acetate (TEAA) の調製について

H<sub>2</sub>O 10 L に Et<sub>3</sub>N (69.7 mL), acetic acid (28.7 mL) を加え 50 mmol/L TEAA を作製し A 液とした。A 液 500 mL に acetonitrile 500 mL を加え 1 L とし、B 液とした。

分取カラムは下記のカラムを使用した。

YMC-Pack ODS-AQ, 20 mm I.D.  $\times$  250 mm (株式会社ワイエムシイ)

HPLC の分析及び分取条件は以下の条件で測定した。

流速: 1.0 mL/min (分析: 4.6  $\times$  250 mm)

18 mL/min (分取: 20  $\times$  250 mm)

検出波長: UV 260 nm

カラム温度: 25 °C

### (2) RNA の酵素分解反応検討

RNA のヌクレアーゼ P1 による酵素分解のプロトコールは共同研究者の東北大学薬学研究科田中准教授から開示された方法で行った。RNA は大腸菌 (BL21) より抽出した 0.2 mg/mL 溶液を用いた。ヌクレアーゼ P1 は 500 unit の凍結乾燥品 (和光純薬製) に超純水 1 mL を加え 0.5 unit/ $\mu$ L の溶液を調製し冷蔵保存した。反応は 1.5 mL エッペンチューブに RNA 20  $\mu$ g (100  $\mu$ L, 0.2 mg/mL)、1 mol/L NH<sub>4</sub>OAc 2  $\mu$ L、ヌクレアーゼ P1 2  $\mu$ L を加え 37 °C、14 時間恒温槽で加温し、反応後の溶液を HPLC で分析した。

### (3) 5'-rNMP の脱リン酸化反応検討

酵素はアルカリホスホターゼ: ニッポンジーン社製 (10 unit/ $\mu$ L) を用いた。緩衝液は以下の組成のものを反応液に対し 10 v/v % 用いた。10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2)、50 mmol/L KCl、1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.1 mmol/L ZnCl<sub>2</sub>、50% glycerol

### 2.2.3 結果および考察

#### (1) ヌクレアーゼ P1 による RNA の酵素分解物の分取 HPLC 検討

精製対象として  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を原料とし大腸菌培養で得られた RNA 約 1 g を含む溶液(約 30 mL)を用い、ヌクレアーゼ P1 による RNA の酵素分解の最適化と後処理方法の検討を行った。

RNA の保存状態の違い(凍結乾燥及び溶液の凍結保存品)を検討した結果、凍結乾燥した RNA を用いる場合と溶液状態で凍結保存した場合でも反応後のクロマトグラムには変化が見られなかった。また RNA 溶液を凍結保存したものはヌクレアーゼ P1 を添加後、恒温槽にて  $38^\circ\text{C}$  で一晩反応した後でも粘性が高いため反応溶液中の攪拌が不十分となり反応がほとんど進行しなかった。さらにヌクレアーゼ P1 を追加し 14 時間反応したところ粘性が無くなり反応は完結した。

次に NMP 標準物質(CMP、UMP、GMP 各 5 mg 及び AMP 5 mg/mL)及び大腸菌培養で得られた RNA の酵素分解物(13 mg/mL)を用い試料注入量を検討した。

50  $\mu\text{L}$  注入した場合では大腸菌培養による RNA の酵素分解物も rNMP 標準物質と同様の良好な分離パターンを示した(図 2.2.3 (1))。

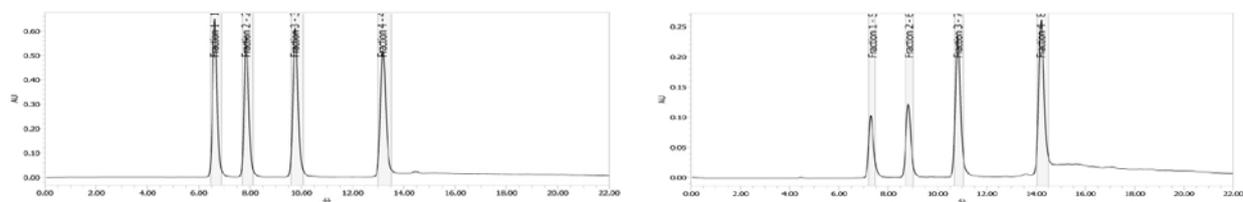


図 2.2.3 (1) RNA 標準品及び RNA 分解物の分取 HPLC クロマトグラム(50  $\mu\text{L}$  注入)

注入量を増加したところ、ピークが広がり、CMP 及び UMP の分離が悪くなる傾向が見られた(図 2.2.3 (2))。

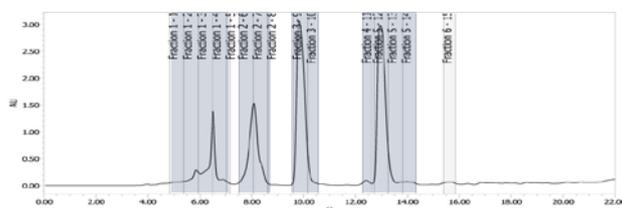


図 2.2.3 (2) RNA 分解物の分取 HPLC クロマトグラム(1000  $\mu\text{L}$  注入)

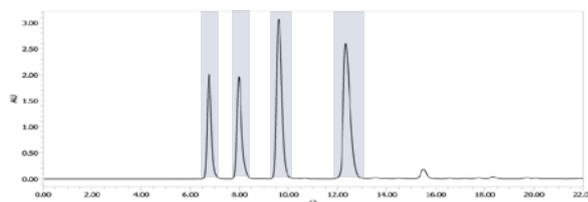


図 2.2.3 (3) RNA 分解物の分取 HPLC クロマトグラム(1000  $\mu\text{L}$  注入)

溶媒を 1 mol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$  から 0.1 mol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$  に変更し、さらに酵素量を 10 分の 1 まで減らし反応を行ったところ、反応は条件変更前と同様に進行した。注入量を 1000  $\mu\text{L}$  まで増やして分取 HPLC で精製を行ったところ、ピーク形状の劣化は見られず良好な分離が得られた(図 2.2.3 (3))。

分取 HPLC 条件が最適化できたため反応のスケールアップと連続分取を行い、 $^{15}\text{N}$ -rNMP を分離・精製した。RNA 約 500 mg を含む溶液 50 mL に 1 mol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$  5 mL 及びヌクレアーゼ P1 50  $\mu\text{L}$  を加え  $38^\circ\text{C}$  で 2 日間反応を行った。インジェクション量を増加してもピーク形状の劣化やテーリ

ングも見られず分離が良好であることが確認できた。

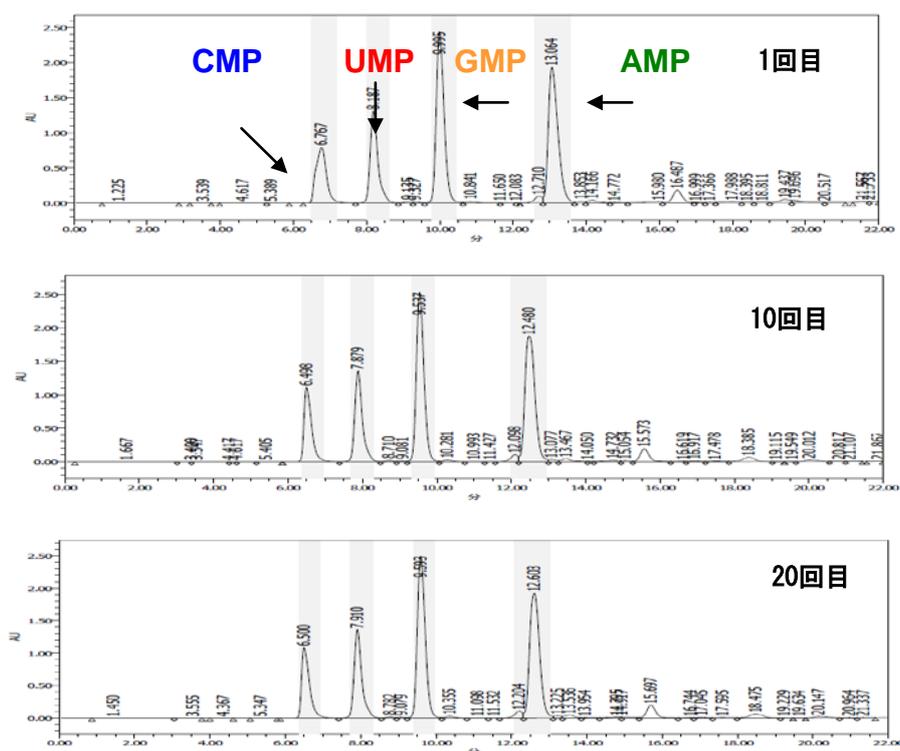


図 2.2.3 (4) 20 回連続注入時の分取 HPLC クロマトグラム

カラムの洗浄操作をすることなく連続して反応溶液を 1000  $\mu$ L (RNA として約 10 mg 含有) 注入し、20 回の連続分取を行った。連続注入による分離パターンの変化は見られず、良好な分離を示した (図 2.2.3 (4))。

4 種の  $^{15}\text{N}$ -rNMP の溶出液を濃縮後、凍結乾燥し、アモルファス状固体として合計約 700 mg の  $^{15}\text{N}$ -rNMP を単離することが出来た。

## (2) $^{15}\text{N}$ -ヌクレオシドの合成

平成 23 年度の結果より酵素化学的脱リン酸化反応の検討においてアルカリホスホターゼ (仔牛小腸由来) により 5'-rNMP の脱リン酸化が良好な収率で進行していることが確認できた。酵素 10 unit 当たりの脱リン酸化処理量が当初は 40  $\mu$ g であったが、反応条件の改善により 100 mg まで向上させることができ、UMP、GMP 及び AMP については約 4000 倍まで処理量を向上することができた。CMP の脱リン酸化反応については tris 緩衝液の添加量の増加、1 mol/L-NaOH の添加などにより他の rNMP と同等の反応効率で脱リン酸化反応が進行することが明らかとなった。

平成 24 年度は  $^{15}\text{N}$ -RNA の酵素分解により得られた  $^{15}\text{N}$ -rNMP に対し脱リン酸化を行い、 $^{15}\text{N}$ -ヌクレオシドに変換し、その精製方法の検討を行った。

$^{15}\text{N}$ -rNMP 150 mg に精製水 1 mL を加え溶解した後、0.01mol/L NaOH 水溶液を 200  $\mu$ L、Tris 緩衝液 20  $\mu$ L 及びアルカリホスファターゼ 20  $\mu$ L を加え恒温槽にて 38°C で 14 時間反応した。反応後の溶液を HPLC で分析し原料の  $^{15}\text{N}$ -rNMP の消失と  $^{15}\text{N}$ -ヌクレオシドの生成を確認した (図 2.2.3 (5))。

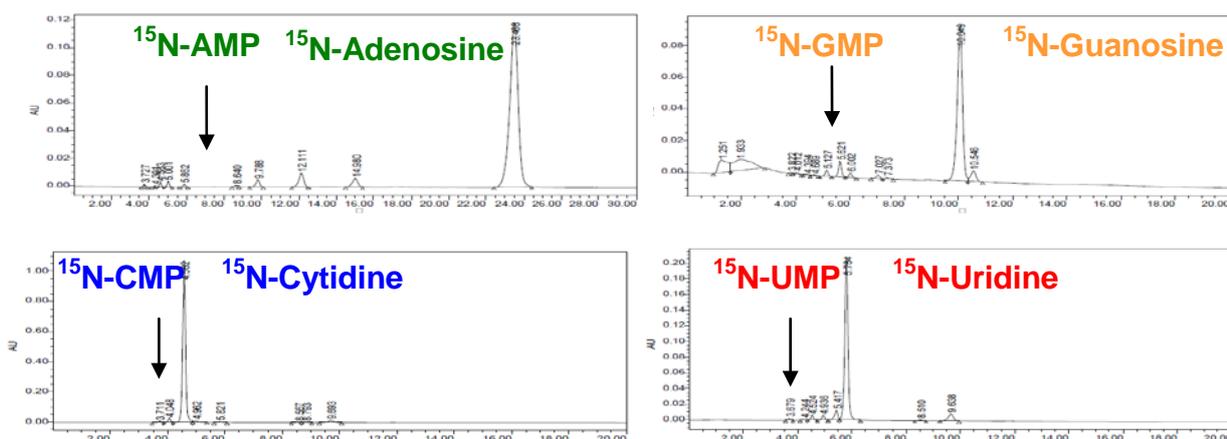


図 2.2.3 (5)  $^{15}\text{N}$ -ヌクレオシドの分取 HPLC クロマトグラム

$^{15}\text{N}$ -AMP については反応が進むにつれ  $^{15}\text{N}$ -adenosine の白色固体が反応溶液から析出した。遠心分離により固体部分を沈殿させた後、上澄み液を除き水で洗浄し固体部分を凍結乾燥することで目的物の  $^{15}\text{N}$ -adenosine を得た。

$^{15}\text{N}$ -GMP についてはヌクレオシドの析出は見られなかったため凍結乾燥を行い乾固したところ、白色の固体が得られた。水で洗浄した後、固体部分を凍結乾燥することで、 $^{15}\text{N}$ -guanosine を得た。

$^{15}\text{N}$ -CMP 及び  $^{15}\text{N}$ -UMP については  $^{15}\text{N}$ -GMP と同様の操作を行ったが固化しなかったため分取 HPLC による精製を行った。分取条件は  $5'$ -rNMP と同じ条件を用い精製したところ、良好な分離を示した。溶出液を濃縮後凍結乾燥することで無色のアモルファス状固体として  $^{15}\text{N}$ -cytidine 及び  $^{15}\text{N}$ -uridine を単離した(図 2.2.3 (6))。

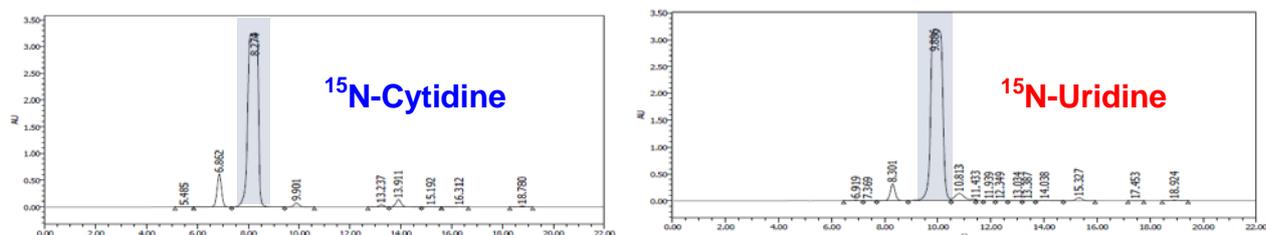


図 2.2.3 (6)  $^{15}\text{N}$ -Cytidine 及び  $^{15}\text{N}$ -Uridine の分取時のクロマトグラム

### (3) ホスホアミダイトの合成

原料として  $^{15}\text{N}$ -guanosine を用い平成 23 年度に検討した方法でホスホアミダイトの合成を行った。核酸塩基部位の保護基として iso-butyl 基を選択した。ピリジン溶媒中トリメチルシリルクロリドを過剰量用い水酸基を保護した後、引き続き核酸塩基部位をアセチル化した。水を加えトリメチルシリル基を除去後、反応液に水を加え濃縮し目的物の粗精製物を得た。さらに脱水を行う目的で無水ピリジンを加え濃縮する操作を 3 回繰り返し行い、そのまま次の反応に用いた(図 2.2.3 (7))。

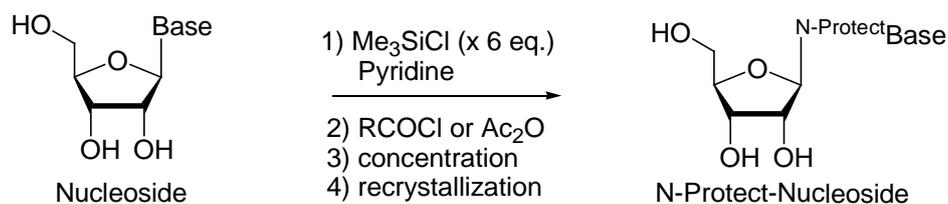


図 2.2.3 (7) ホスホアミダイト核酸塩基の保護

次にピリジン溶媒中ジメチルアミノピリジン(DMAP)を用い 1,1'-dimethoxytrityl chloride により 5' 位の水酸基に 1,1'-dimethoxytrityl (DMTr) 基を導入した(図 2.2.3 (8))。

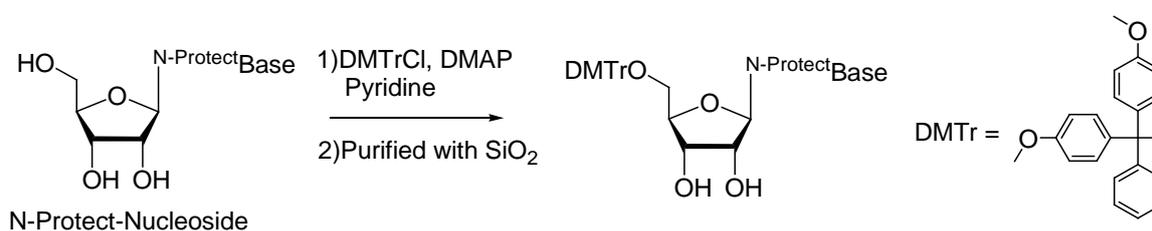


図 2.2.3 (8) ホスホアミダイト 5'位水酸基の保護

2' 位水酸基の保護については触媒量の硝酸銀を用い THF 中ピリジン存在下 *t*-butyldimethylsilyl chloride で選択的に保護基を導入した(図 2.2.3 (9))。

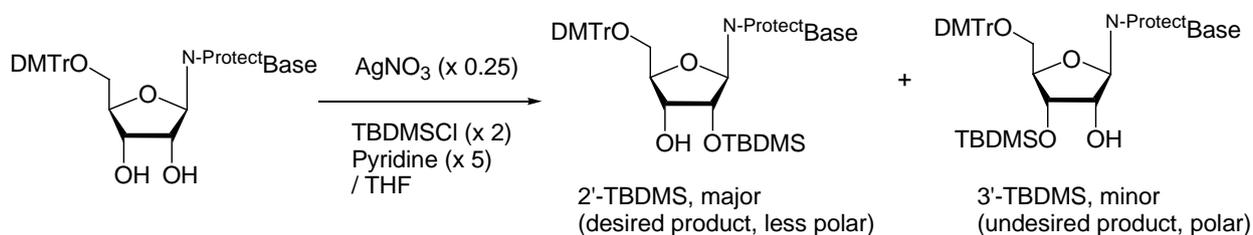


図 2.2.3 (9) ホスホアミダイト 2'位水酸基の保護

次にアミダイト化試薬として 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropyl chlorophosphoramidite を用いて 3' 位水酸基のホスホアミダイト化を行った(図 2.2.3 (10))。

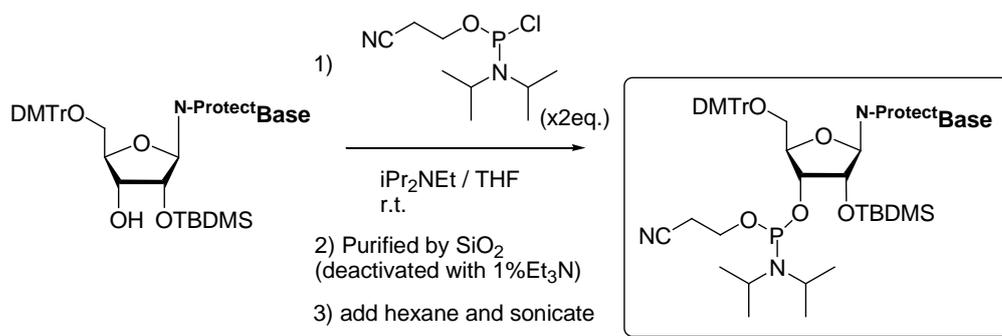


図 2.2.3 (10) ホスホアミダイトの合成

## 2.2.4 おわりに

<sup>15</sup>N-RNA のスクレアーゼ P1 による酵素分解を行い、生じた <sup>15</sup>N-rNMP 各 4 種を分取 HPLC により精製した。前年度の検討結果より確立された分取条件を用いることで良好な回収率で目的物の精製が可能となり、目標値を達成することができた。また自動注入、分画の機能を用いることで連続精製が可能となり、分取回数の増加が分離に影響を及ぼさないことが明らかとなった。これらのことから更なるスケールアップが効率的に出来ることを立証した。

<sup>15</sup>N-rNMP の脱リン酸化反応の検討ではアルカリホスホターゼを用いることにより <sup>14</sup>N の検討時と同じく良好な収率で脱リン酸化が進行していることが確認できた。<sup>15</sup>N-adenosine 及び <sup>15</sup>N-guanosine については反応液より固体として析出することが明らかとなり、簡便な操作のみで精製できることが明らかとなった。また <sup>15</sup>N-cytidine 及び <sup>15</sup>N-uridine については反応後分取 HPLC により良好な回収率で精製できることが明らかとなった。

ホスホアミダイトの合成においては guanosine を原料としてホスホアミダイトの合成を行い、100 mg スケールでの合成を行った。核酸塩基部位をアシル基、5'位水酸基を 1, 1'-dimethoxytrytyl 基、2'位水酸基を TBDMS 基で保護し、3'位水酸基にホスホアミダイト試薬を導入し目的の <sup>15</sup>N-ホスホアミダイトを合成することが出来た。前年度の結果より他のヌクレオシドの <sup>15</sup>N-ホスホアミダイトも同様の合成手法を用いて合成が可能である。

## 2.2.5 はじめに(東北大学)

現在商業的に市場で販売されているヌクレオチド・ヌクレオシドとしては以下の化合物が重窒素標識化合物として販売されている。

リボヌクレオシド:

シチジン(cytidine)、ウリジン(uridine)、グアノシン(guanosine)、アデノシン(adenosine)

リボヌクレオチド類

●ヌクレオシド 5'-一リン酸 (5'-NMP: nucleoside 5'-monophosphate):

シチジン 5'-一リン酸 (5'-CMP: cytidine 5'-monophosphate)

ウリジン 5'-一リン酸 (5'-UMP: uridine 5'-monophosphate)

グアノシン 5'-一リン酸 (5'-GMP: guanosine 5'-monophosphate)

アデノシン 5'-一リン酸 (5'-AMP: adenosine 5'-monophosphate)

●ヌクレオシド 5'-三リン酸 (5'-NTP: nucleoside 5'-triphosphate):

シチジン 5'-三リン酸 (5'-CTP: cytidine 5'-triphosphate)

ウリジン 5'-三リン酸 (5'-UTP: uridine 5'-triphosphate)

グアノシン 5'-三リン酸 (5'-GTP: guanosine 5'-triphosphate)

アデノシン 5'-三リン酸 (5'-ATP: adenosine 5'-triphosphate)

デオキシリボヌクレオシド及びデオキシリボヌクレオチド類の標識体

この中でリボヌクレオシドとリボヌクレオチドは RNA を単量体に分解したもの、或は、それをさらに酵素的／化学的に変換することで得ることができる。リボヌクレオシド・リボヌクレオチドの重窒素標識体は生理機能を有した機能性 RNA 分子を調整するための原料として用いられる。作成された重窒素標識機能性 RNA 分子は機能解明を目指した構造研究用途に用いられる。なお将来的には、遺伝子治療薬 RNA 分子自体を重窒素標識することで生体内の動態解析に利用可能なトレーサータグ付き遺伝子治療薬の作成等への応用が期待される。

このような背景から東北大学では、1) 回収 RNA のヌクレオチド(5'-NMP、5'-NTP)、さらにはヌクレオシドへの変換方法についての情報提供／収集、2) 本プロジェクトで得られた製品(ヌクレオチド、ヌクレオシド)の構造決定&品質評価・評価法確立、及び、3) RNA 化学合成原料(アミダイト体)調製法の情報収集を行っている。このうち平成 22 年度には回収 RNA の Nuclease P1 による酵素分解による 5'-NMP 調製法と液体クロマトグラフィー用各種緩衝液調製法のプロトコール提供、ヌクレオチド／ヌクレオシドへの各種変換酵素に関する情報収集、グアノシンおよびそのヌクレオチド体の品質評価法(group I intron 使用)の確立を行った。

さらに東北大学の平成 23 年度の実験として、製造された製品(5'-NTP)について、品質評価系(RNA polymerase 使用)を立ち上げた。なお平成 24 年度は、最終産物であるヌクレオシド、ヌクレオチド(5'-NMP 等)および RNA 化学合成原料(アミダイト体)が生産物として出来上がるため、各生産物の構造決定を行った。

## 2.2.6 調査内容および実験方法

最終産物(リボヌクレオシドとリボヌクレオチド類)の構造決定を行う目的で、NMR 測定および質量分析を行った。

NMR 測定では一次元  $^1\text{H}$  NMR スペクトル、一次元  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにより化学構造の決定をおこない、一次元  $^{15}\text{N}$  NMR スペクトルによりサンプル内の全窒素原子に重窒素( $^{15}\text{N}$ )が導入されたかどうかを確認した。またヌクレオチド類ではリン原子を有しているため、一次元  $^{31}\text{P}$  NMR スペクトルを測定した。全ての NMR 測定は日本電子 ECA600 を使用した。

質量分析においては、分子イオンピークの分子量(m/z)から、重窒素( $^{15}\text{N}$ )標識されたサンプルが得られているかどうかを確認した。全ての質量分析を日本電子 JMS-700 にて行った。なお本測定は、東北大学大学院薬学研究科の中央機器室職員によって行われたものであり、プロジェクト関係者以外の第三者による客観的データである。

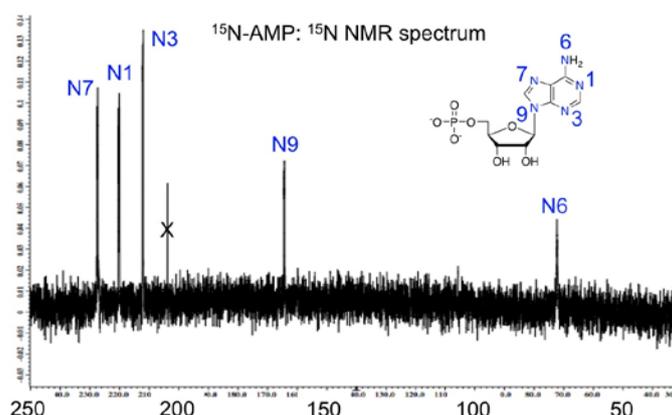
## 2.2.7 結果および考察

まず最初にヌクレオシド 5'-リン酸(rNMP: rAMP, rGMP, rCMP, rUMP)の NMR 測定結果について述べる。

得られた rNMP の化学構造の確認を行うために一次元  $^1\text{H}$  NMR スペクトル、一次元  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル、一次元  $^{31}\text{P}$  NMR スペクトルを測定した。まず rAMP の構造決定について述べる。

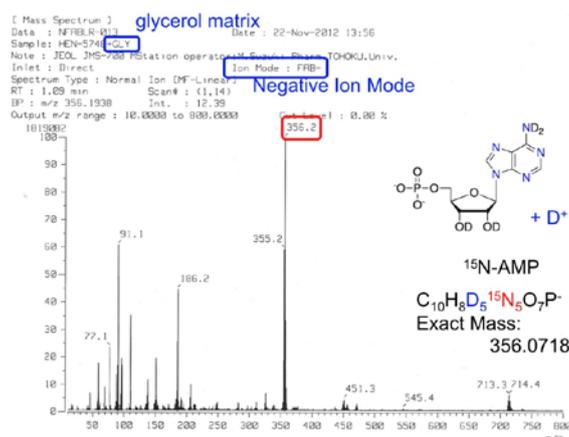
rAMP の一次元  $^1\text{H}$  NMR スペクトル、一次元  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル、一次元  $^{31}\text{P}$  NMR スペクトルについて、標準サンプルのスペクトルと一致することが示され、化学構造が正しいことが証明された。一次元  $^1\text{H}$  NMR スペクトルには各シグナルの帰属(シグナルと当該シグナルを出した水素原子の位置の関連づけ)を記載した。

次に rAMP に重窒素 ( $^{15}\text{N}$ ) が全ての窒素に導入されているかどうかを確認するために、一次元  $^{15}\text{N}$  NMR スペクトルを測定した。



rAMP には5つの窒素原子が含まれているが、一次元  $^{15}\text{N}$  NMR スペクトルで確かに5本のシグナルを観測することができた。即ち、rAMP 内の全窒素原子が重窒素 ( $^{15}\text{N}$ ) で標識されていることを確認できた。また、標準サンプルの一次元  $^{15}\text{N}$  NMR スペクトルとも完全に一致しており、得られたサンプルの化学構造の正しさがここでも証明された。

最後に本サンプルの質量分析を行った結果をまとめる。



重窒素 ( $^{15}\text{N}$ ) 標識された rAMP に対応する分子量 ( $m/z$ ) のところに分子イオンピーク(赤線で囲んだ  $M/Z$  値のピーク)が観測された。このことより、質量分析からも全ての窒素が重窒素 ( $^{15}\text{N}$ ) 標識されていることが確認された。これらのスペクトルを総合して、得られたサンプルは重窒素 ( $^{15}\text{N}$ ) 標識 rAMP であると、有機化学的に結論づけられた。なおその他のサンプル (rNMP: rGMP, rCMP, rUMP、ヌクレオシド: アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン) についても行い、各 rNMP、ヌクレオシドの重窒素 ( $^{15}\text{N}$ ) 標識体であると結論づけられた。

このように本プロジェクトによる工業プロセスにより重窒素 ( $^{15}\text{N}$ ) 標識ヌクレオチドおよびヌクレオシドを得ることができることを証明した。

#### 2.2.8 おわりに

本プロジェクトにおいて、平成 22、23 年度にヌクレオシド、ヌクレオチドの評価系を確立し、その結果を核酸化学研究のトップジャーナルである *Nucleic Acids Research* に発表した(発表論文 5 番)。また今年度は工業プロセスにより得られた産物の構造評価を行い、本プロジェクトによる工業プロセスにより重窒素 ( $^{15}\text{N}$ ) 標識ヌクレオチドおよびヌクレオシドを得ることができることを証明した。

## 2.3 窒素安定同位体で標識された抗体の製造技術の開発

### 2.3.1～2.3.4: 文責 株式会社ネモト・サイエンス

#### 2.3.1 はじめに

近年、抗体医薬品に代表されるバイオ医薬品の研究開発は、ますます盛んになっており、これらバイオ医薬候補品について、開発試験を実施する為の技術の整備も急務となっている。医薬品の薬物動態試験においては、従来、放射性標識された医薬候補品を動物、あるいはヒトに投与し、その薬物動態を調べる試験を実施することが必要である。しかし、放射性核種を用いた薬物動態試験は、人体への影響の懸念やその放射性核種の入手・取り扱いおよび廃棄物に関連する規制、管理体制、取り扱い施設の関係から、国内で実施されることは無く、日本の製薬企業であっても、すべて欧米においてヒト ADME 試験を実施し、申請することを余儀なくされている。安定同位体標識であれば、動物、ヒトを問わず被爆等の問題なしに試験を実施することが可能であるため、それに付随する管理体制・施設等の維持を勘案すれば、非 RI 化による恩恵は計り知れない。また、放射性核種標識特有の、放射分解の問題も解決できると考えられる。<sup>15</sup>N 標識化抗体の用途の例として、抗体医薬の開発段階の薬物動態試験用標識体としての利用が挙げられる。抗体医薬品の場合、低分子の場合のような化学合成による放射性 <sup>14</sup>C 標識は難しく、比較的標識が容易な放射性 <sup>125</sup>I 標識の場合は、目的抗体にもともと含まれていない原子(ヨウ素)を付加させることから同じ挙動を示すとは限らないこと、および放射性核種を用いることによる人体への影響や、放射分解などのデメリットがある。安定同位体窒素標識抗体であれば、これらのデメリットを払拭することが可能となる。一方、放射能を検出に使いにくくなることで、目的抗体とその代謝物の検出が困難となることが懸念されるところであるが、質量分析計を用いることで、解決が可能である。そこで、本研究サブテーマ③においては、これら抗体医薬品の開発の為のツールあるいは診断薬として有用と考えられる、安定同位体窒素標識された抗体の生産方法を開発することとした。

初年度の平成 22 年度は、標識化抗体製造の為の方法論検討を開始することを目標として掲げ、窒素安定同位体標識された抗体製造のための方法論について検討を開始した。検討の結果、動物を抗原で感作した後、抗血清からポリクローナル抗体精製する方法よりも、抗体産生細胞を安定同位体窒素標識添加物入り培養液中で培養することによって、標識された抗体を培養液中に分泌させる手法を選択した。また、窒素安定同位体標識化抗体産生に適した細胞の検討、および培地に添加する <sup>15</sup>N 標識体の探索に着手した。

平成 23 年度は、実際に抗体産生細胞株をモデルケースとして <sup>15</sup>N-抗体製造の為の添加物を検討し、抗体産生細胞の培地に <sup>15</sup>N 標識アミノ酸を添加することが有効であることが明らかとなった。<sup>15</sup>N-アミノ酸置換培地(透析済み血清使用)中にて抗体産生細胞を培養することにより、<sup>15</sup>N 標識化抗体が産生され、培養液中に分泌されることが確認された。<sup>15</sup>N 置換培地において、10×倍加時間以上の継代培養が可能であり、これにより <sup>14</sup>N-アミノ酸のほぼ 100%が排除可能となった。コントロールとして実施した <sup>14</sup>N アミノ酸培地での培養上清中抗体濃度推移と、<sup>15</sup>N アミノ酸置換培地での培養上清中抗体濃度推移に大きな差が認められないことから、リジン・アルギニンを <sup>15</sup>N に置換することによる抗体産生と分泌能には支障が無いことが示唆された。また、免疫学的手法であるサンドイッチ ELISA 法によ

て、産生抗体が  $^{14}\text{N}$  アミノ酸培地を同等濃度で検出されたことから、リジン・アルギニンの  $^{15}\text{N}$  標識体への置換によっても抗体としての立体構造は維持できていることが示された。また、複数の抗体産生細胞株において、同手法が適用可能であることも確認した。免疫学的手法による  $^{15}\text{N}$  標識化抗体の測定を検討し、抗体産生モニタリングを可能とした。

平成 22 年度および平成 23 年度の成果を踏まえて平成 24 年度は、同位体標識アミノ酸による標識化抗体産生の確認のため、RI 標識アミノ酸を用いて抗体の標識化を行った。産生した  $^{15}\text{N}$  標識化抗体を酵素消化したペプチド断片の高分解能質量分析計による分析法の検討を実施した。また、実用化に向けた培養のスケールアップとその培養上清からの抗体精製プロセスについても検討を行った。

### 2.3.2 実験装置・試料および実験方法

#### (1) RI 標識アミノ酸を用いた抗体の標識化の検討

ネモト・サイエンス所有の装置でより簡便に測定できるよう、放射能標識したアミノ酸を用いて、同様の手法にて抗体を産生させ、放射能計測により、同位体標識の確認を実施した。実験スキームを図 2.3.2(1)に示した。当初、 $^3\text{H}$ 添加培地において、細胞増殖悪化がみられた。そこで、 $^3\text{H}$ リジン水溶液の添加による培地の浸透圧の変化の可能性を回避する為に、培地に添加する前の $^3\text{H}$ リジン 2% エタノール/98%水溶液を凍結乾燥し、培地で再溶解することで、 $^3\text{H}$ リジン試薬による、培地中の浸透圧変化のリスクを回避した。予め調製しておいたリジン（-マイナス）培地に凍結乾燥粉末を溶解し、再度ろ過滅菌して、凍結乾燥 $^3\text{H}$ リジン添加  $^{14}\text{N}$ -リジン &  $^{14}\text{N}$ -アルギニン RPMI+10%Dialyzed FBS 培地を調製した。この $^3\text{H}$ リジン添加培地で IM-9 細胞を培養し、その培養上清 1 ヶ月分をプールして、精製・脱塩・濃縮し、放射能計測を行うことで、 $^3\text{H}$ リジン標識抗体の産生確認を試みた。

#### (2) $^{15}\text{N}$ 標識化抗体産生と、そのペプチド断片の作製

本プロジェクトにおいては、 $^{15}\text{N}$  標識化抗体の作製技術の開発とともに、作製した  $^{15}\text{N}$  標識化抗体の分析検討が、事業化を考えるうえで重要な課題である。 $^{15}\text{N}$  標識体の分析には、質量分析装置が適していると考えられた。そこで、 $^{15}\text{N}$  標識化抗体の質量分析の検討の為に、平成 23 年度までに検討・確立した  $^{15}\text{N}$  標識化抗体の作製方法を用いて、実際に  $^{15}\text{N}$  標識化抗体を産生し、抗体を精製した後に、消化酵素であるトリプシン処理を行って、ペプチド断片を得た。

#### < $^{15}\text{N}$ リジン・ $^{15}\text{N}$ アルギニン置換 RPMI の調製 >

通常の RPMI 培地からリジンとアルギニンを除外した置換用 RPMI 225 mL、透析済み FBS 25 mL、 $^{15}\text{N}$ -リジン 25 mg、 $^{15}\text{N}$ -アルギニン 25 mg および×100 濃縮ペニシリン・ストレプトマイシン 2.5 mL を混合し、0.22  $\mu\text{m}$  滅菌フィルターを用いてろ過滅菌を行い、 $^{15}\text{N}$  リジン・ $^{15}\text{N}$  アルギニン置換 RPMI 培地を調製した。また、比較対照として、通常の RPMI 培地からリジンとアルギニンを除外した置換用 RPMI 225 mL、透析済み FBS 25 mL、 $^{14}\text{N}$ -リジン 25 mg、 $^{14}\text{N}$ -アルギニン 25 mg および×100 濃縮ペニシリン・ストレプトマイシン 2.5 mL を混合し、0.22  $\mu\text{m}$  滅菌フィルターを用いてろ過滅菌を行い、 $^{14}\text{N}$  リジン・ $^{14}\text{N}$  アルギニン置換 RPMI 培地を調製した。

### <IM-9 細胞の前培養>

ヒト抗体産生細胞株である IM-9 を解凍し、通常の RPMI+10%FBS 培地にて継代培養した。

### <<sup>15</sup>N アミノ酸培地あるいは <sup>14</sup>N アミノ酸培地での継代培養による <sup>15</sup>N 標識体への置換>

予備培養しておいた IM-9 細胞を回収、遠心し、<sup>15</sup>N リジン・<sup>15</sup>N アルギニン置換 RPMI および <sup>14</sup>N リジン・<sup>14</sup>N アルギニン置換 RPMI 培地に  $2 \times 10^5$  cells/mL の濃度になるように懸濁し、置換培養を開始し、以降、2-3 日毎に同培地を用いて 1/4-1/10 の希釈倍率にて継代培養を行った。細胞の倍加時間の 10 倍期間以上継代培養することにより、前培養時の <sup>14</sup>N 体は  $2^{10}$  分の 1 以下となる為、<sup>15</sup>N リジン・<sup>15</sup>N アルギニン置換 RPMI で培養開始後、2 週間程度培養し、培養上清を回収した。対照として、<sup>14</sup>N リジン・<sup>14</sup>N アルギニン置換 RPMI 培地についても、同様の継代操作を行い、培養上清を回収した。

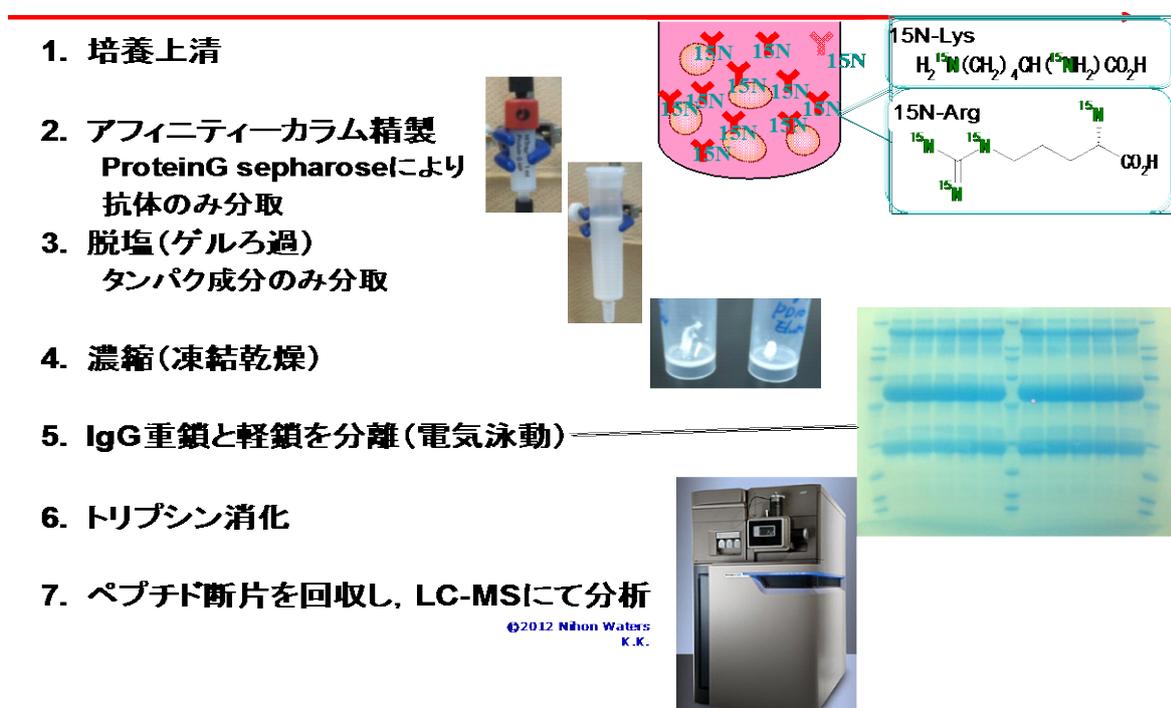


図 2.3.2(1) <sup>15</sup>N 抗体質量分析計での分析の為の前処理のスキーム

### (3) 高分解能質量分析計による <sup>15</sup>N 標識化抗体のペプチド断片の分析の検討

「ある特定のアミノ酸のみ同位体で置換した培地で動物細胞を培養することで、MS にて同位体元素分の質量数シフトが観察される」という例は、プロテオームを目的とした実験で報告がある。抗体ではそのような報告はないものの、原理は同じであるため、同様の手法が、<sup>15</sup>N 標識化抗体にも応用できる可能性は十分あると考えられた。

### (4) 実用化に向けた培養のスケールアップとその培養上清からの抗体精製プロセスについて

ネモト・サイエンスにおける事業化（標識抗体を用いた薬物動態試験用の為の標識抗体の作製）を考えた場合、<sup>15</sup>N 抗体を含む培養上清として、3~30 L 程度のスケールから抗体を精製することが想定される。（ただし、抗体産生細胞の産生能力によって、10 倍以上の違いが出てくる可能性あり）。最終的には、アフィニティーカラム自体での精製となり、HiTrap ProteinG-

セファロースなどのアフィニティーカラム樹脂の抗体をトラップするキャパシティーは非常に高い為、培養上清をそのままアフィニティーカラムにアプライして精製することも、物理的には可能と考えられる。ただし、アフィニティーカラムへのアプライ速度は、1 mL/min 以下（カラムの内径によって変わる）とかなりの低速である必要がある為、そのままでは、カラムへのアプライで2週間以上という計算になってしまい、現実的ではない。そこで、アフィニティーカラム精製の前に、ある程度濃縮し、溶液量を減らす工程をいれた後に、アフィニティーカラムへアプライするフローの方が、精製期間の短縮という意味でも、効率的と結論した。

$^{15}\text{N}$  抗体を含む培養上清として、3~30 L 程度のスケールから抗体を精製することが想定される為、アフィニティーカラム精製の前に、ある程度濃縮し、溶液量を減らす工程をいれた後に、アフィニティーカラムへアプライするフローを選択した。蛋白の濃縮工程としては、限外ろ過、透析、凍結乾燥などの選択肢のうち、透析は、今回のスタート容量が3~30L と大きいところから、限外ろ過による濃縮が、大容量への対応も可能であり、低分子の培地含有物は除けることから、今回の目的に適していると判断し、限外ろ過による濃縮を選択した。また、限外ろ過の工程では、膜の詰まりが、濃縮の limiting factor になることから、濃縮の前に、培養液中に含まれる、細胞の破片などのゴミを取り除いておくことにより、濃縮効率低下を防ぐ効果が期待できる。よって、まず、粗ろ過によって、細胞の破片などの大きな共雑物を取り除くこととした。

### 2.3.3 結果および考察

#### (1) RI 標識アミノ酸を用いた抗体の標識化の検討

$^3\text{H}$  リジン添加培地で抗体産生細胞である IM-9 細胞を培養し、その培養上清 1 ヶ月分をブールして、精製・脱塩・濃縮し、放射能計測を行うことで、 $^3\text{H}$  リジン標識抗体の産生確認を試みたところ、数万カウントもの放射能が計測された。 $^3\text{H}$  標識されていることは明らかと考えられる。添加した $^3\text{H}$  リジンは 2 回のカラム操作で取り除かれていると思われる。また、ProteinG カラムの特異性の高さからも、抗体が $^3\text{H}$  標識されていると考えられる。結果として、 $^3\text{H}$  リジン含有培地での培養上清から、有意な量の放射能を検出できたことから、 $^3\text{H}$  リジンを培地に添加することにより、 $^3\text{H}$  同位体標識化抗体が産生されたと考えられ、同位体標識アミノ酸による抗体の標識化が、確認できたと言える。

#### (2) $^{15}\text{N}$ 標識化抗体の産生と、そのペプチド断片の作製

2.3.2(2)に記載の方法にしたがって、 $^{15}\text{N}$  アミノ酸培地を用い  $^{15}\text{N}$  標識化抗体を産生した。図 2.3.3(1)に  $^{15}\text{N}$  アミノ酸培地で培養中の細胞の顕微鏡写真を示した。比較対照として  $^{14}\text{N}$  アミノ酸培地を用いて同様の培養をおこなっているが、細胞の形態は、 $^{15}\text{N}$  アミノ酸、 $^{14}\text{N}$  アミノ酸どちらも良好であり、 $^{15}\text{N}$  アミノ酸による細胞の形態変化は特に認められなかった。

#### (3) 高分解能質量分析計による $^{15}\text{N}$ 標識化抗体のペプチド断片の分析の検討

2.3.2(2)で産生し調製したペプチド断片試料について高分解能質量分析計を用いて質量分析を行った。また、得られたピーク情報について、IgG 抗体の不変領域の配列情報を用いてペプチドマッ

ピングを行い、アミノ酸配列への帰属を行った(図 2.3.3.(3)、(4)、(5))。図 2.3.3(6)に  $^{15}\text{N}$  抗体ペプチド断片の質量分析におけるカバレッジマップを示した。今回の分析において、配列が帰属できた  $^{15}\text{N}$  標識アミノ酸の数は、重鎖 330 アミノ酸中 15 アミノ酸であり、軽鎖 106 アミノ酸中 6 アミノ酸であった。あわせて構成アミノ酸 436 アミノ酸中 21 個すなわち、4.8%のアミノ酸について  $^{15}\text{N}$  での標識を確認することができた。また、この分析方法を応用することで、今後作製する  $^{15}\text{N}$  標識化抗体の薬物動態評価における分析方法として利用することができる。

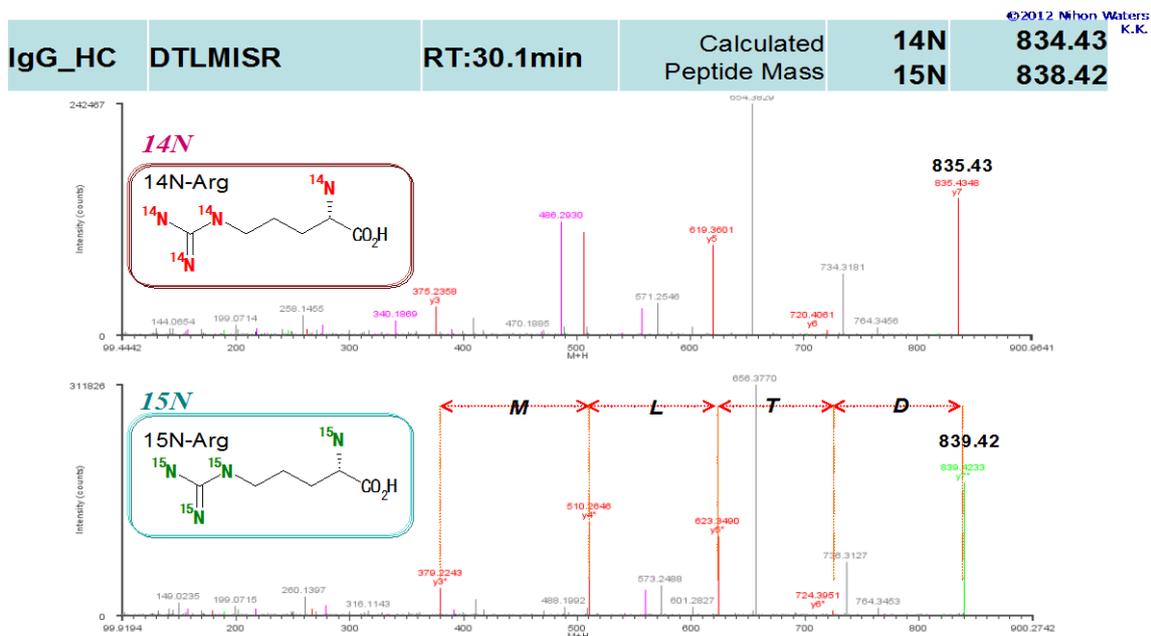


図 2.3.3(1) 質量分析計を用いた  $^{15}\text{N}$  標識化抗体の分析例1

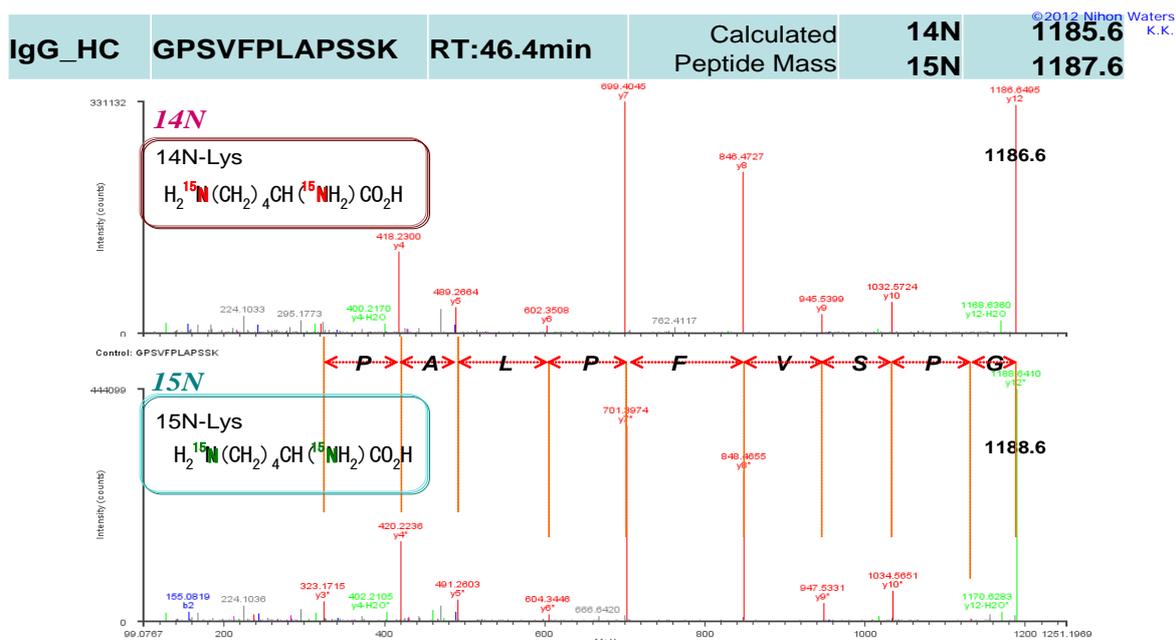


図 2.3.3(2) 質量分析計を用いた  $^{15}\text{N}$  標識化抗体の分析例 2

GCI\_HUMAN Coverage Map

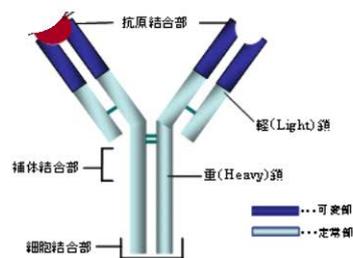
## 重鎖不変領域

1	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV
51	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVI	VPSSSLGIQT	YICNVNHKPS	NTKVDKKVEP
101	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG	PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTICVVVDVS
151	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK
201	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE	LTKNQVSLTC
251	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKITPPV	LDSGSEFFLY	SKLTVDKSRW
301	OQGNVFCSSV	MHEALHNNHYT	QKSLSLSPGK		

KAC\_HUMAN Coverage Map

## 軽鎖不変領域

1	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW	KVDNALQSGN
51	SOESVIEQDS	KDSTYLSST	LILSKADYEK	HKVYACEVTH	QGLSSPVTKS
101	FNRGEC				



今回配列が帰属できた<sup>15</sup>N標識アミノ酸の数  
 重鎖 330アミノ酸中15個、  
 軽鎖 106アミノ酸中6個  
 $(15+6)/(330+106)=0.04816\dots$  4.8%  
 少なくとも4.8%のアミノ酸の<sup>15</sup>N標識が確認できた。

図 2.3.3(3) <sup>15</sup>N 抗体ペプチド断片の質量分析におけるカバレッジマップ(重鎖&軽鎖)

## (4) 実用化に向けた培養のスケールアップとその培養上清からの抗体精製プロセスについて

製造を視野に入れたスケールアップ培養における培養上清からの抗体生成工程を見当した結果、下記のような工程が、もっとも効率的との結論に達した

- ULTA フィルターでの荒い細胞除去、
- 500 k ホフローファイバーでの細胞破砕物除去、
- 30 k 平膜での濃縮 (上記)
- アフィニティーカラム精製

## 2.3.4 おわりに

今年度は、最初に、RI 標識アミノ酸を用いて抗体の同位体アミノ酸による標識化の確認を行った。次に、平成 23 年度までに検討・確立した方法を用いて <sup>15</sup>N 標識化抗体を作製し、それを酵素消化して、<sup>15</sup>N 標識化抗体のペプチド断片を調製した。高分解能質量分析計をもちいて、<sup>15</sup>N 標識化抗体のペプチド断片の分析を検討し、実際に産生した抗体の <sup>15</sup>N 標識化を確認することに成功した。最終目標である、「構成アミノ酸のうち 3%以上の標識化」に対して、抗体の不変領域の構成アミノ酸のうち 4.8%の <sup>15</sup>N 標識化を確認し、数値目標を達成した。実用化に向けて、培養のリッタースケールへのスケールアップとその培養上清からの抗体精製プロセスを検討した。

### 第3章 外部成果

#### 3.1 口頭発表・論文発表

(口頭発表)

2012年6月日 小胞体ストレスセンサーIre1pにより細胞質スプライシングを受けるHAC1 mRNAの構造解析

第39回生体分子科学討論会(仙台)

発表者: 田中好幸

共同研究者: 河原郁美<sup>1, 2</sup>, 芦原悠太<sup>1</sup>, 春田佳一郎<sup>1</sup>, 児嶋長次郎<sup>2</sup>(<sup>1</sup>東北大院薬, <sup>2</sup>阪大蛋白研)

2012年11月10日 高分子量機能性RNAの局所構造・状態解析のため部位特異的標識法  
第51回NMR討論会(名古屋)

発表者: 田中好幸

共同研究者: 芦原悠太<sup>1</sup>, 春田佳一郎<sup>1</sup>, 河原郁美<sup>1, 2</sup>, 児嶋長次郎<sup>2</sup>(<sup>1</sup>東北大院薬, <sup>2</sup>阪大蛋白研)

2012年11月17日 Site-specific labeling techniques of RNA molecules for structural and mechanistic studies with NMR spectroscopy

第39回国際核酸化学シンポジウム(名古屋)

発表者: 田中好幸

共同研究者: 芦原悠太<sup>1</sup>, 春田佳一郎<sup>1</sup>, 石川隼也<sup>2</sup>, 井川善也<sup>2</sup>, 河原郁美<sup>1, 3</sup>, 児嶋長次郎<sup>3</sup>(<sup>1</sup>東北大院薬, <sup>2</sup>九大院工, <sup>3</sup>阪大蛋白研)

(昨年度報告書提出後に行った口頭発表)

2012年3月22-23日 Isotope-assisted structural chemical analysis of nucleic acids

X Discussions in Structural Molecular Biology (Nové Hradý・チェコ)

田中好幸

(海外招待講演)

(論文発表)

1. Jakub Šebera, Lukáš Trantírek, Yoshiyuki Tanaka, and Vladimír Sychrovský, Pyramidalization of the Glycosidic Nitrogen Provides the Way for Efficient Cleavage of the N-glycosidic Bond of 8-OxoG with the hOGG1 DNA Repair Protein. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116, 12535–12544 (2012).
2. Ladislav Benda, Michal Straka, Vladimír Sychrovský, Petr Bouř,\* Yoshiyuki Tanaka, Detection of Mercury-TpT Dinucleotide Binding by the Raman Spectra. A

- Computational Study, *The Journal of Physical Chemistry A*, *116*, 8313-8320 (2012).
3. Hidetaka Torigoe,\* Itaru Okamoto, Takenori Dairaku, Yoshiyuki Tanaka, Akira Ono, T. Kozasa, Thermodynamic and structural properties of the specific binding between Ag<sup>+</sup> ion and C:C mismatched base pair in duplex DNA to form C-Ag-C metal-mediated base pair, *Biochimie*, *94*, 2431-2440 (2012).
  4. Hiroshi Abe,\* Naoko Abe, Aya Shibata, Keiji Ito, Yoshiyuki Tanaka, Mika Ito, Hisao Saneyoshi, Satoshi Shuto, and Yoshihiro Ito, Structure Formation and Catalytic Activity of DNA in Organic Solvents, *Angewandte Chemie International Edition*, *51*, 6475-6479 (2012). (Hot Paper に選出)

(昨年度報告書提出後にページ番号が確定した論文)

5. Tomomi Uchiyama#, Takashi Miura#, Hideo Takeuchi, Takenori Dairaku, Tomoyuki Komuro, Takuya Kawamura, Yoshinori Kondo, Ladislav Benda, Vladimír Sychrovský\*, Petr Bouř, Itaru Okamoto\*, Akira Ono and Yoshiyuki Tanaka\*, Raman spectroscopic detection of the T-Hg<sup>II</sup>-T base pair and the ionic characteristics of mercury, *Nucleic Acids Research*, *40*, 5766-5774 (2012). (Impact Factor(2010) = 7.836)

## 第4章 全体総括

### 4.1 平成22～24年度の開発成果の総括

#### 4.1.1 高密度培養による微生物を用いた有用化学物質の製造技術の開発

平成22年度は、高密度培養の条件検討に使用する微生物種を選択した。増殖速度が高く菌体からの核酸の抽出も容易な大腸菌 (*Escherichia Coli*) の中でもRNAの回収に適した菌株を選択するために複数の大腸菌株について菌体の増殖速度とRNA収量を検討した結果、最小培地での増殖能力及びRNAの回収効率に優れたBL21株を<sup>15</sup>N-RNAを生産するための微生物として選択した。

平成23年度は、最小培地での高密度培養方法を検討した。培地を高速で攪拌することにより酸素の供給量を増やすことが出来て、かつpHや溶存酸素濃度等の培地環境が制御可能な高密度培養装置(ジャーファーメンター)を用いて培養条件の最適化を検討した結果、検討開始時のフラスコ培養と比較して菌体の収量をおよそ4倍、培地に使用した塩化アンモニウムあたりのRNA抽出量もおよそ7倍にまで増加させることに成功した。菌体からのRNAの抽出効率についてもフェノール抽出法を改善することにより、菌体からの核酸抽出量を約2倍に増加させることに成功した。

平成24年度は<sup>15</sup>N塩化アンモニウムを用いた高密度培養を実施して、1gの<sup>15</sup>N塩化アンモニウムから130mgの<sup>15</sup>N標識RNAを抽出することに成功した。また、半回分培養を実施した結果、1gの使用塩化アンモニウムあたり100mg以上のRNAが継続して回収できることを示し、本項目の最終数値目標である1gの塩化アンモニウムあたり70mgのRNAを回収できる培養条件の確立が達成された。

#### 4.1.2 窒素安定同位体標識された核酸誘導体の製造技術の開発

HPLC分析条件の確立を目的とし、核酸の標準物質:ヌクレオシド4種(adenosine、cytidine、guanosine及びuridine)、5'-rNMP4種(AMP、CMP、GMP及びUMP)、5'-rNTP4種(ATP、CTP、GTP及びUTP)を用いHPLCの分析条件(カラム、移動相組成、pH、保持時間)を検討した。ODS逆相カラムを用い、リン酸緩衝液を移動相とした条件で良好なカラム保持と分離で短時間での分析を行うことが可能となった。また分取HPLC条件を検討し、揮発性緩衝溶液であるTEAAを移動相とした条件において各rNMPの分取が出来ることを確認した。

分取HPLC条件(移動相やカラムなど)を最適化することでRNAのヌクレアーゼP1による酵素分解から得られた5'-rNMP各4種を良好な回収率で精製することを可能とした。この分取条件を用いることで、ヌクレアーゼP1による<sup>15</sup>N-RNAの酵素分解から<sup>15</sup>N-5'-rNMPへの変換、および分取HPLCによる精製のスケールアップを行い<sup>15</sup>N-5'-rNMPの単離に成功した。さらに自動注入、分画の機能を用いることで<sup>15</sup>N-5'-rNMPを連続的に効率よく精製できることが明らかとなった。

酵素化学的脱リン酸化反応の検討ではアルカリホスホターゼ(仔牛小腸由来)により5'-rNMPの脱リン酸化が良好な収率で進行していることが確認できたため、<sup>15</sup>N-RNAの酵素処理に適用した。分取HPLCにより精製した4種の<sup>15</sup>N-rNMPのそれぞれをアルカリホスホターゼにより脱リン酸化後、得ら

れた<sup>15</sup>N-ヌクレオシドの精製方法を検討し、将来の事業化を視野に入れた精製方法を確立した。

ホスホアミダイトの合成においては、ヌクレオシド 4 種 (ridine、cytidine、guanosine 及び adenosine) を原料として合成ルートを確認し、g スケールでの合成について検討した。核酸塩基部位をアシル基、5'位水酸基を 1,1'-dimethoxytrytyl 基、2'位水酸基を TBDMS 基で保護し、3'位水酸基にホスホアミダイト試薬を導入した。反応を最適化することで効率よく反応が進行することが明らかとなり、収率面、スケールアップにも問題が無いことを確認した。

さらに<sup>15</sup>N-GMPの脱リン酸化反応により得られた<sup>15</sup>N-guanosineを原料としホスホアミダイトの合成を行った。

#### 4.1.3 窒素安定同位体で標識された抗体の製造技術の開発

<sup>15</sup>N アミノ酸置換培地(透析済み血清使用)中にて抗体産生細胞を培養することにより、特定のアミノ酸を<sup>15</sup>N 標識した<sup>15</sup>N 標識化抗体産生が可能となった。<sup>15</sup>N 置換培地において、10×倍加時間以上の継代培養することにより、これにより<sup>14</sup>Nアミノ酸は100%近く排除できる。複数の抗体産生細胞株において、同手法が適用可能なことを確認した。免疫学的手法による<sup>15</sup>N 抗体の測定を検討し、<sup>15</sup>N 標識化抗体の検出に成功した。リジン・アルギニン除外培地との比較により、<sup>15</sup>N 標識アミノ酸の取り込みを確認した。非標識アミノ酸培地との比較により、<sup>15</sup>N 標識化による抗体産生の著しい低下は無いことを確認した。質量分析計により、抗体の<sup>15</sup>N 標識化を確認し、安定同位体標識化率 3%以上を達成した。抗体を精製、酵素消化し、断片化したペプチドを質量分析計にて分析→<sup>15</sup>N 標識抗体の測定方法の開発を達成した。実用化に向けて、リッタースケール培養による抗体産生を実施し、その培養上清からの抗体精製プロセスを検討した。

## 4.2 研究開発後の課題・事業化展開

### 4.2.1 高密度培養による微生物を用いた有用化学物質の製造技術の開発

本プロジェクトでの検討により、ヌクレオシド・ヌクレオチド類を製造するプロトコルを確立することができた。また製品化した際の採算ラインを見越した、RNA 目標収量を越える高密度培養の培養条件を確立することができた。従って、本プロジェクトとしての目標と課題の克服は達成できたものと考えている。しかしながら、利益率の向上を考えた際に、培養菌体からの回収 RNA 量の増産については今後も検討を続けていくべき課題であると考えている。その意味からは、全核酸抽出法による RNA 回収法の確立が必要であろう。なお全核酸抽出法を用いた場合、抽出 RNA が濃縮時に不溶性となる、或は、溶液自体の粘性が非常に高くなり HPLC 精製の妨げとなるという問題がある。抽出条件の最適化の観点からも、これらの問題点を克服して、菌体抽出 RNA 量の増産に務めたい。また現時点での培養プロセスでは、菌体回収後の培地を破棄することを前提に採算の見積を行っている。菌体回収後の培地中の窒素は全て重窒素(<sup>15</sup>N)で標識されており、この培地を再利用できれば、重窒素(<sup>15</sup>N)利用率を限りなく 100%に近づけることが可能となる。培地再利用法の確立についても今後の検討課題であろう。また、本プロジェクトは RNA の加水分解を工程に含むため、材料としての取り扱いが比較的容易で長期保存が可能という利点を生かして製造管理の最適化とコストの削減をす

すめ、生産価格を低くすることを目指す。

#### 4.2.2 窒素安定同位体標識された核酸誘導体の製造技術の開発

本プロジェクトにて立ち上げた工業プロセスにより重窒素 ( $^{15}\text{N}$ )ヌクレオシドおよびヌクレオチドを製造できることが証明された。また、原料化合物の標識化率の 98%以上の標識化率を達成できた。従って、プロジェクトの目標値については達成出来たものと考えている。

本テーマにおいては、工業プロセスとしての最適化、更なる自動化をはかり、製造効率向上による利益率向上を目指したい。

$^{15}\text{N}$  標識核酸類の製造、販売については国内で合成を行うことを特徴とし、安定的かつ安価な供給を可能とし、新規有用化合物 ( $^{15}\text{N}$ -ホスホアミダイト) の提供が可能となる。

顧客は製薬メーカー、大学等の研究機関を想定し、価額面については核酸類の卸価額は原価+人件費の一部であるが受託試験(受注生産)の端境期に生じる余剰人工を活用し、本プロジェクト成果であるノウハウを用いて生産することで生産価格を低くすることをめざす。

販売形態に関する構想として、自社による受託合成と代理店経由の販売を想定している。拡販方法としては、広告(雑誌、インターネットなど)、イベント(展示会、学会)における啓蒙及び供給により需要を喚起する方向で検討する。

#### 4.2.3 窒素安定同位体で標識された抗体の製造技術の開発

本サブテーマ③においては、今回の研究成果を応用し、製薬企業から抗体医薬品(開発品)の薬物動態試験を受託することで事業化が達成される。抗体医薬開発を進めている製薬企業に対し、 $^{15}\text{N}$  標識化抗体の製造とこれを用いた薬物動態試験の受託について営業を展開する予定。

##### 製薬企業にて

- ↓・標的分子(タンパク等)を選定
- ↓・抗体を作製し、探索的試験を実施
- ↓ **最初は動物による抗体産生→産生細胞作製スタート**
- ↓ **精製方法の検討・確立**
- ↓・開発(候補)抗体決定
- ・開発試験の為の抗体産生細胞選定
- ・開発試験用抗体製造の為の大量培養・抗体精製方法決定
- ・開発(候補)抗体の分析試験法決定(断片化ペプチドの分析等)
- ↓・標識体合成依頼(開発抗体合成も)

##### 受託合成・試験機関

- ↓・委託者より抗体産生細胞を委託者より譲渡
- ↓・大量培養し $^{15}\text{N}$ 標識化抗体産生
- ↓・抗体を精製し、分析後
- ↓・委託者に(一部)納品
- ↓・ $^{15}\text{N}$ 標識化抗体用いて薬物動態試験実施

この細胞および  
情報を利用

以上

「この報告書には、委託業務の成果として、産業財産権等の対象となる技術情報、ノウハウ等の秘匿情報が含まれているので、通例の取扱において非公開とする。ただし、行政機関の保有する情報の公開に関する法律(平成11年法律第42号)に基づく情報開示請求の対象の文書となります。」

**リサイクル適性** (A)

この印刷物は、印刷用の紙へ  
リサイクルできます。