



高塩耐性Endonuclease酵素：NucleoGone™ Endonuclease, Cold- and Salt-activeのAAV製造への応用

High-Salt Tolerant Endonuclease: Application of NucleoGone™ Endonuclease, Cold- and Salt-Active, in AAV Manufacturing.

上田 紗百里、今井 智司、小島 嶺、田中 佳典、松本 裕之、岡本 幸子
タカラバイオ株式会社

Abstract

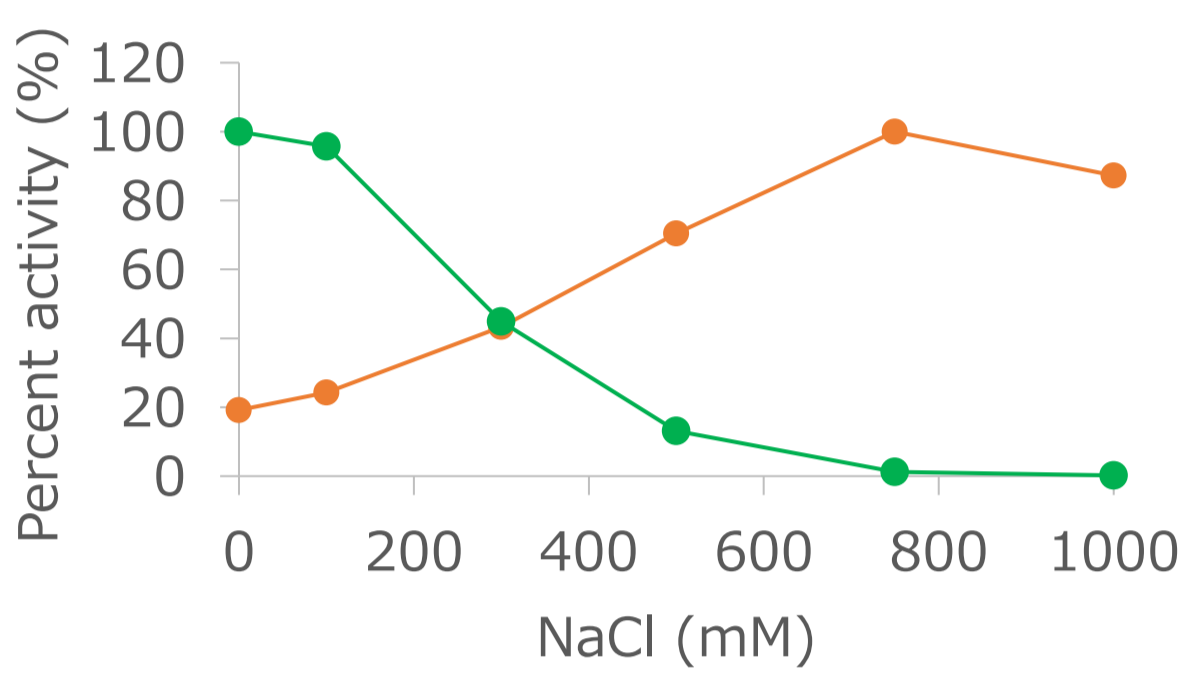
アデノ随伴ウイルス (AAV) 製造において、宿主由来核酸の分解は製品の安全性向上に寄与する。しかし、AAVの抽出工程ではウイルスの安定性と回収率を確保するため、高塩濃度の溶媒を用いることが一般的であり、この条件下で活性を維持できる核酸分解酵素が求められる。そこで、高塩濃度下で活性を維持するエンドヌクレアーゼ NucleoGone™ Endonuclease, Cold- and Salt-active (NucleoGone_CS) を開発し、その特性を評価した。NucleoGone_CSは、NaCl 500~1000 mMの高塩濃度条件下で高い活性を維持し、さらに4~37℃の比較的低温条件下においても良好な活性を示した。AAV製造への適用可能性を評価するため、AAV抽出液にNucleoGone_CSを処理した結果、AAVの収量および感染能に影響を与えず、産生細胞由来ゲノムDNAを検出限界以下まで分解できた。以上の結果より、本製品は広範な塩濃度条件および低温環境下で活性を維持することから、AAV製造のみならず、多様なバイオ医薬品の製造に有用であると考えられる。

NucleoGone Endonuclease, Cold- and Salt-active (NucleoGone_CS) の活性特性

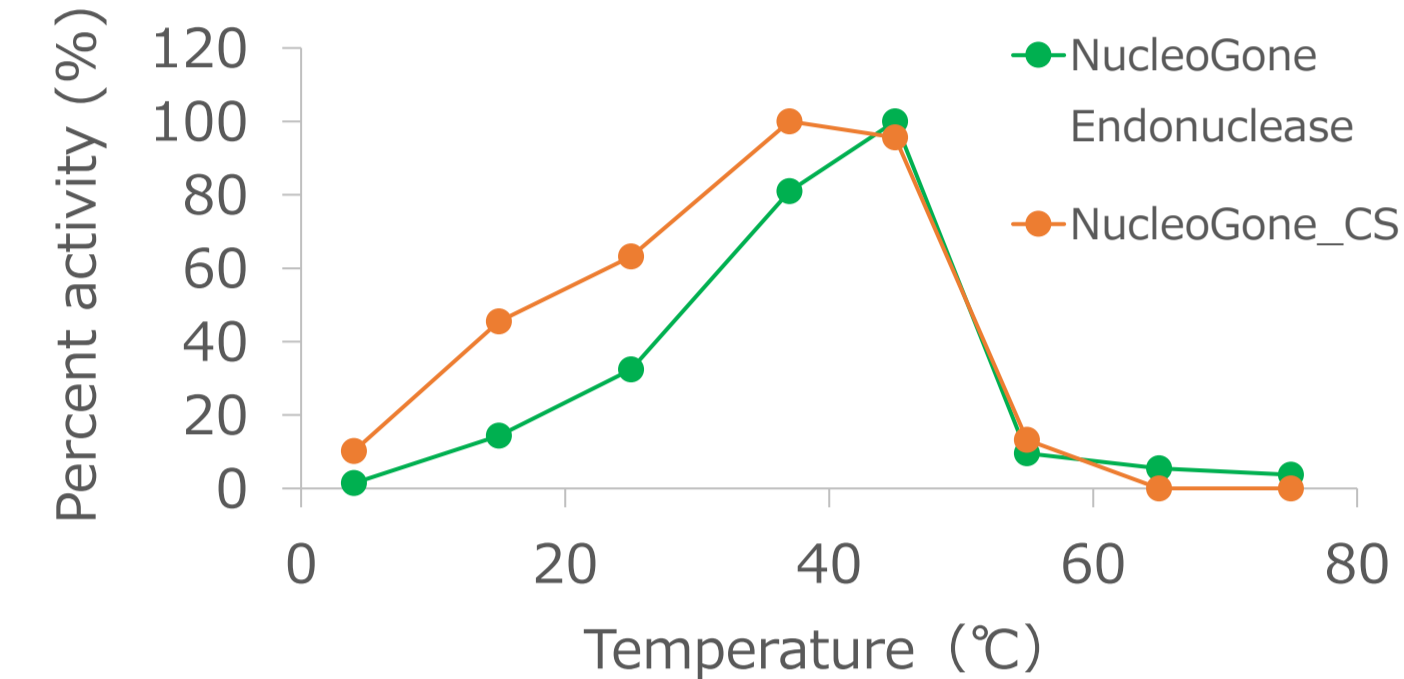
本製品と従来品である NucleoGone™ Endonuclease (NucleoGone) の活性を、基本反応系 (Table 1) で評価。NaCl濃度または温度を変更し、基質として仔ウシ胸腺DNAを37℃で30分反応させた後、260 nmにおける吸光度を指標として核酸分解活性を測定。最大活性値を100%として相対活性を算出した。

Table 1. 基本反応系	
Tris-HCl	25 mM
pH	8.5
NaCl	500 mM
MgCl ₂	5 mM
Calf-thymus DNA	0.5 mg/ml
37℃ 30minインキュベート	

NaCl濃度条件による酵素活性



温度条件による酵素活性



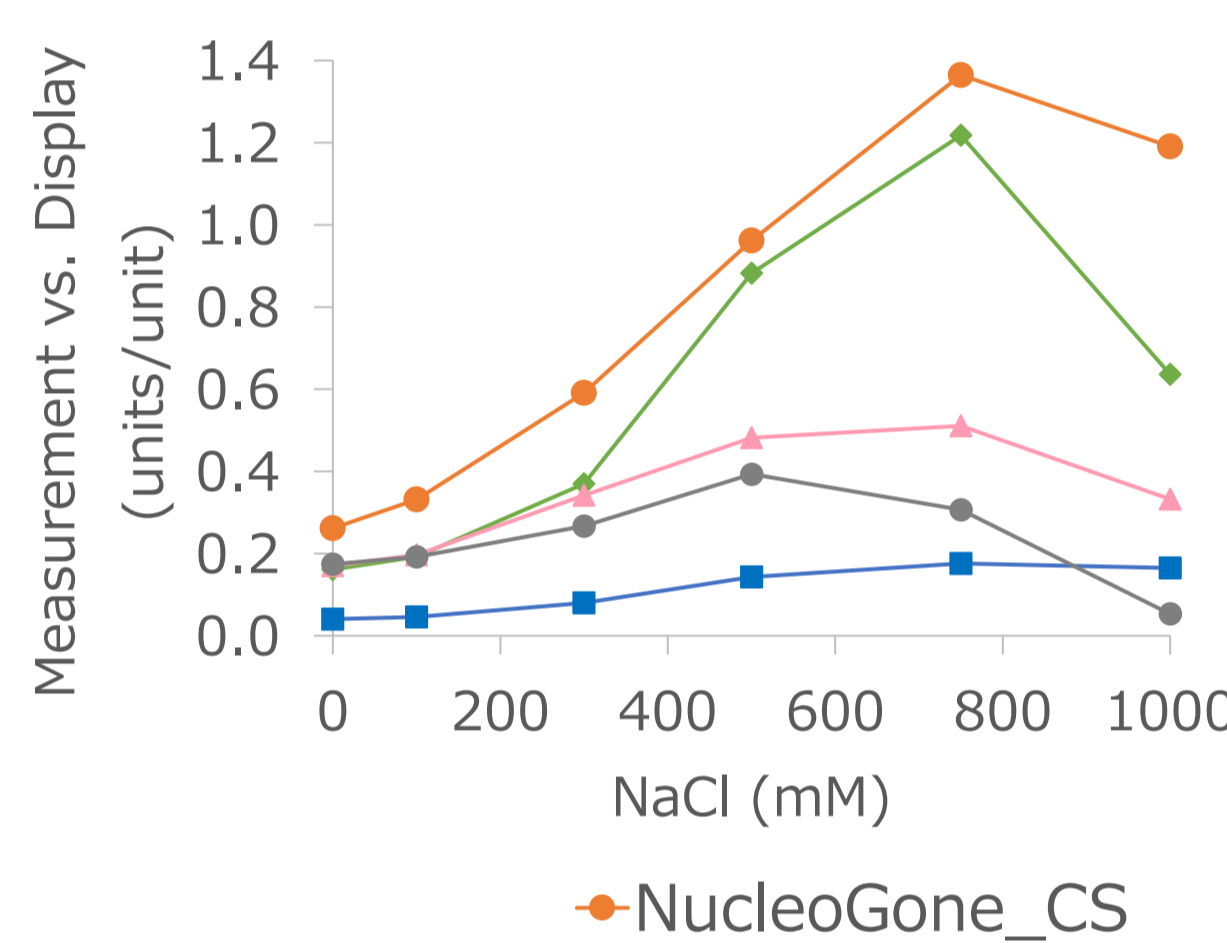
NucleoGone : NaCl濃度上昇で活性が低下
NucleoGone_CS : 濃度依存的に活性の増加 → 高塩濃度条件 (> 300 mM) 下での核酸分解に適している

各社エンドヌクレアーゼの相対活性比較

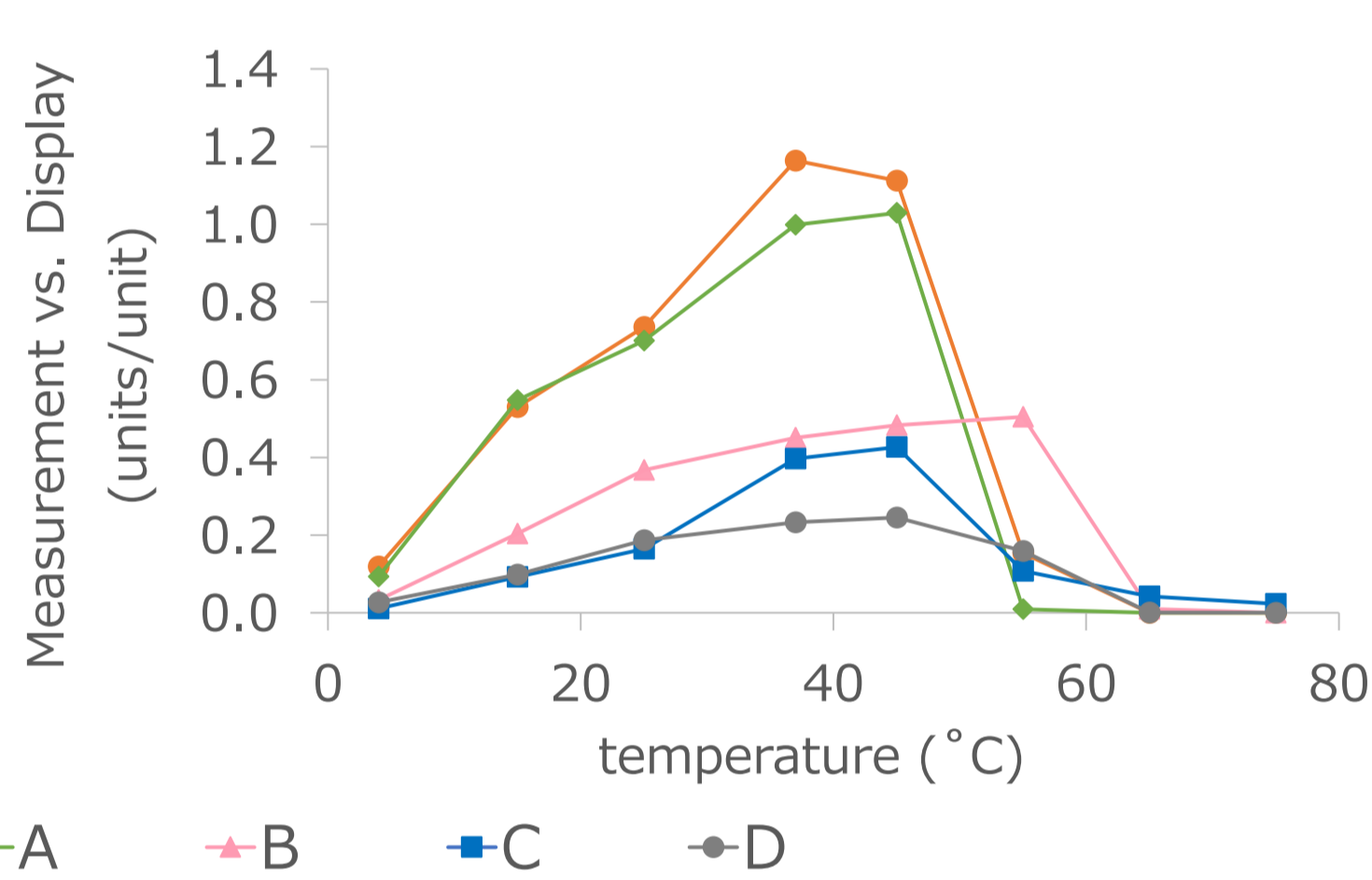
NucleoGone_CSと他社塩耐性エンドヌクレアーゼ(A-D)の活性を、基本反応系 (Table 1) を基にNaCl濃度または温度が異なる条件下で測定し、各製品の表示ユニットあたりの実測ユニット*を算出した。

*基本反応系 (Table 1) にて、37℃ 30分間で反応液の260 nmの吸光度を1.0変化させる酵素量を1 Uとして算出した。

NaCl濃度

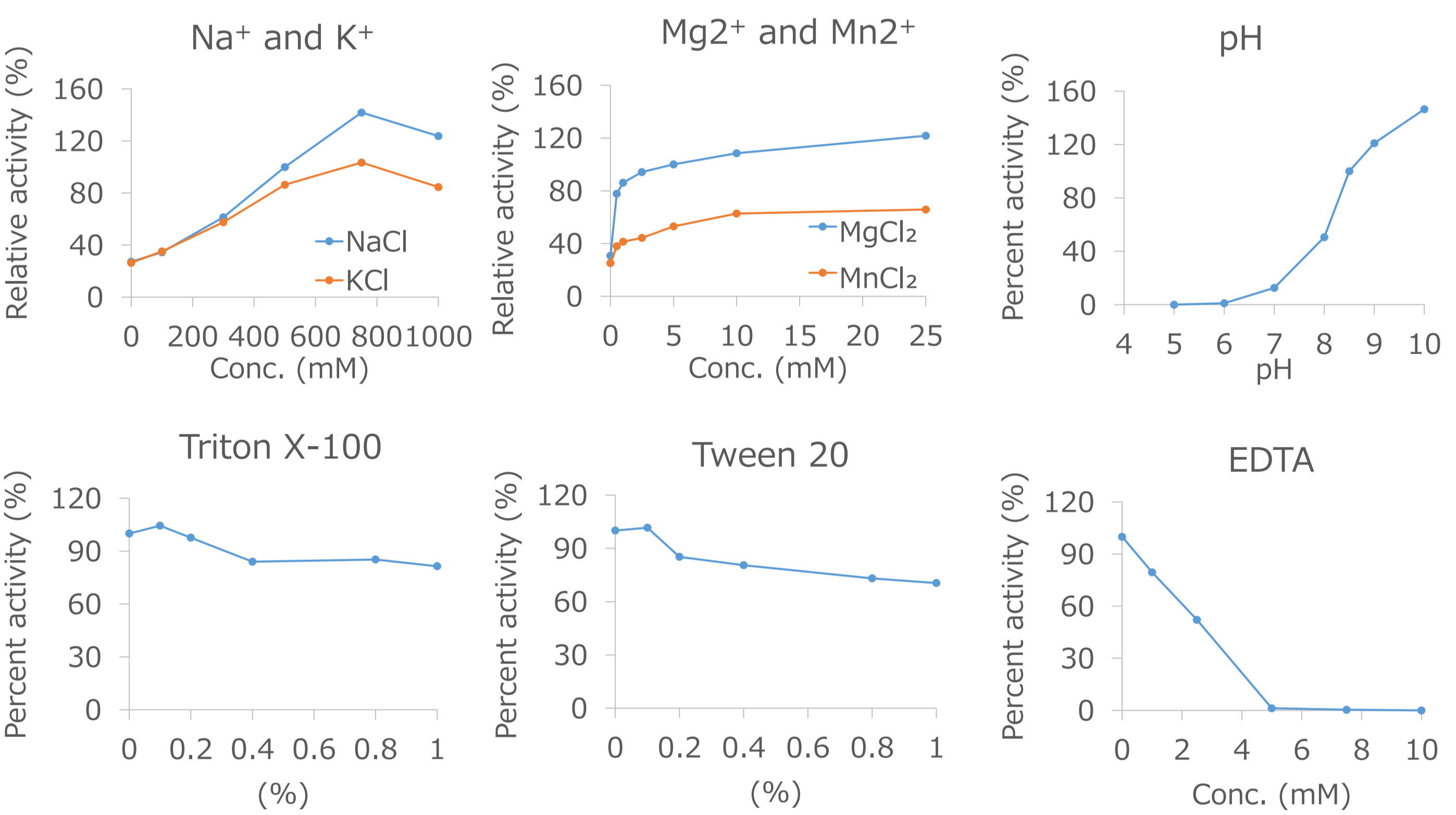


温度条件



NucleoGone_CSは各条件において他社製品より高い活性を示し、同一ユニット量でより高い核酸分解能を有する

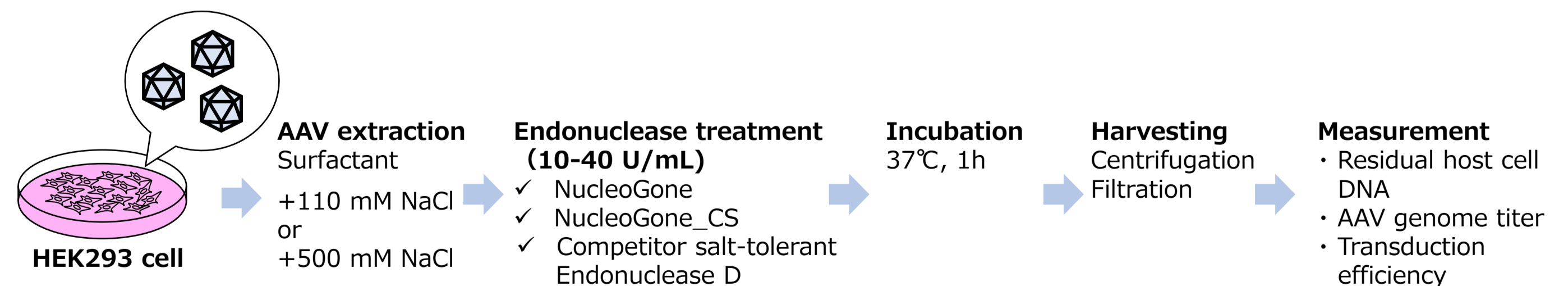
様々な条件下におけるNucleoGone_CSの活性



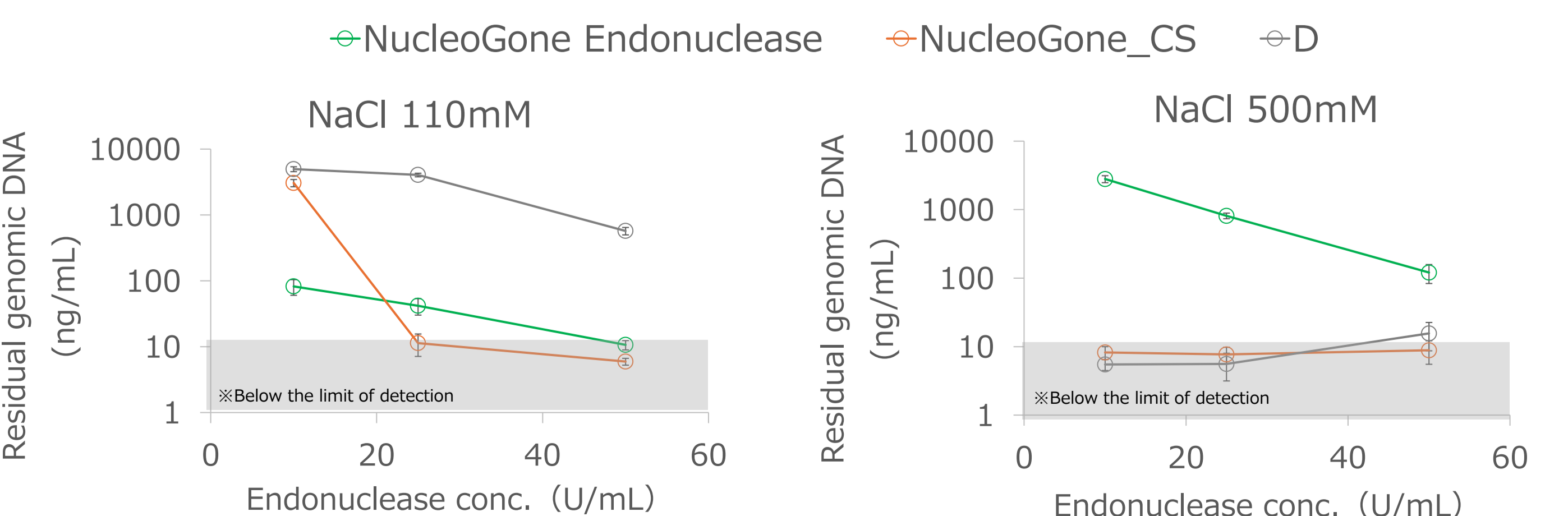
NucleoGone_CSの活性を各種条件下で評価した結果、イオン濃度およびpHの上昇に伴い活性が増加した界面活性剤 (Triton-X、Tween 20) は活性にほとんど影響せず、EDTA添加 (>5mM) で活性は完全に阻害された

AAV産生プロセスへのNucleoGone Endonuclease, Cold- and Salt-active (NucleoGone_CS) の適応評価

Protocol 1

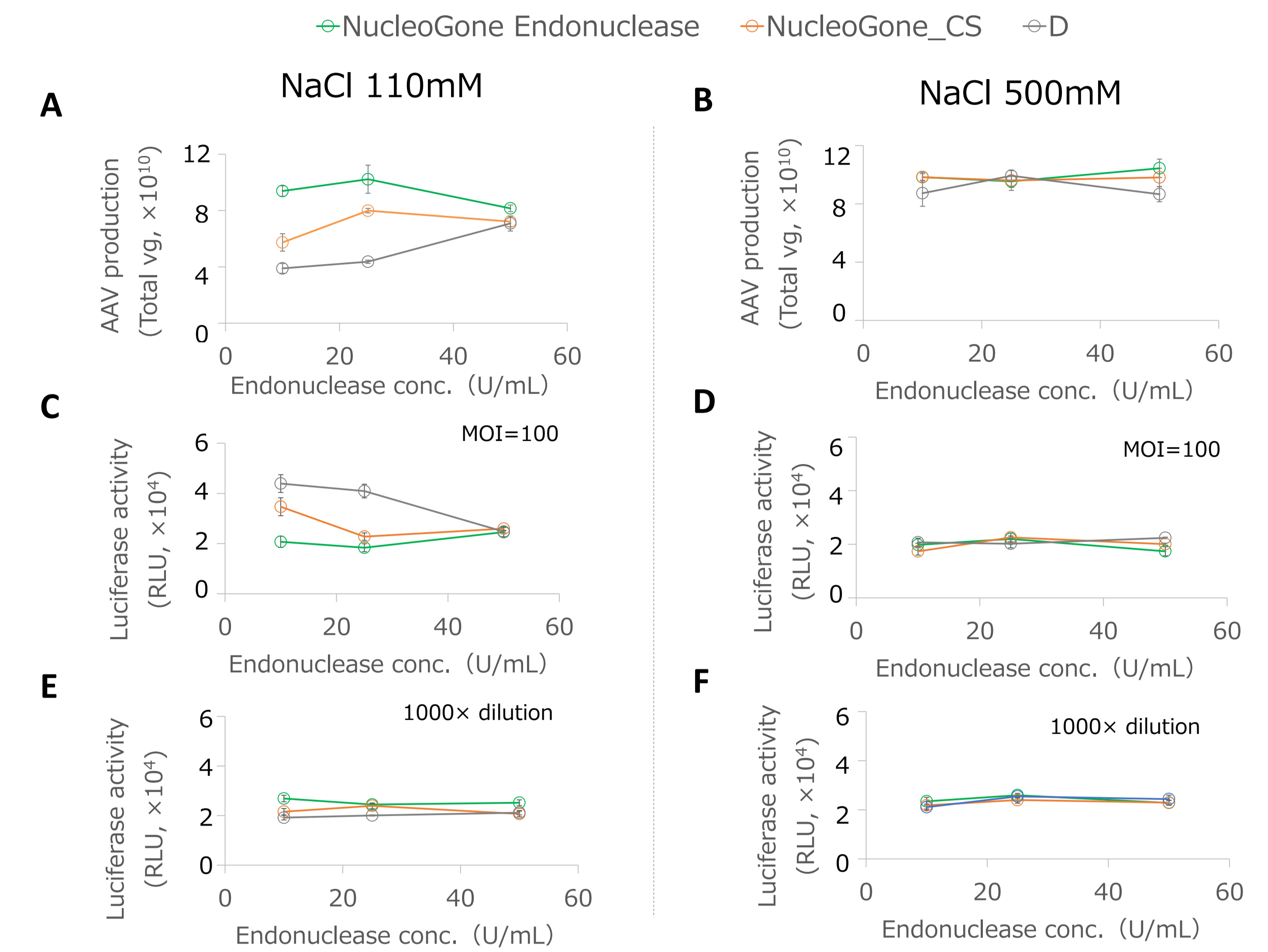


AAVベクター抽出液中に残留する産生細胞由来ゲノムDNAの分解効率



低塩濃度条件(110 mM NaCl)ではNucleoGone Endonucleaseが最も高いDNA分解効率を示し、NucleoGone_CSは他社酵素Dよりも高い効率を保持
高塩濃度条件(500 mM NaCl)ではNucleoGone_CSは他社酵素Dと同様にゲノムDNAを検出限界以下まで分解した

エンドヌクレアーゼ処理がAAVベクターの収量および性能に及ぼす影響

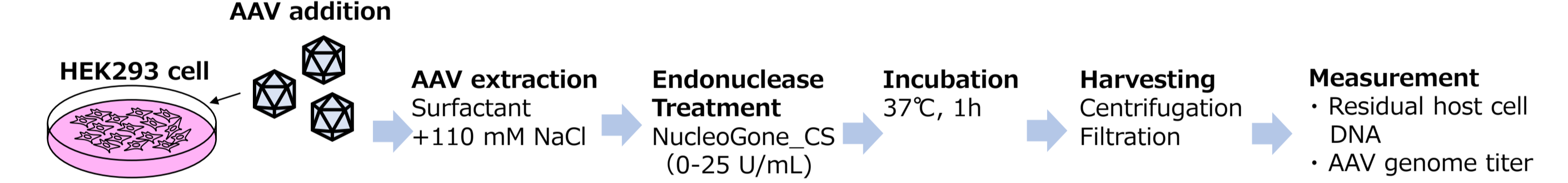


低塩濃度条件(A, C, E)では、エンドヌクレアーゼの種類・濃度によりAAVゲノム収量に差が認められた。qPCR力価に基づき、力価をそろえて感染させると(C, D)、AAV産生量と導入効率と逆相関した。一方、抽出液量を一定にした場合(E, F)、導入効率の差は消失したことから、残留ゲノムDNAがAAV力価測定に影響する可能性が示唆された。

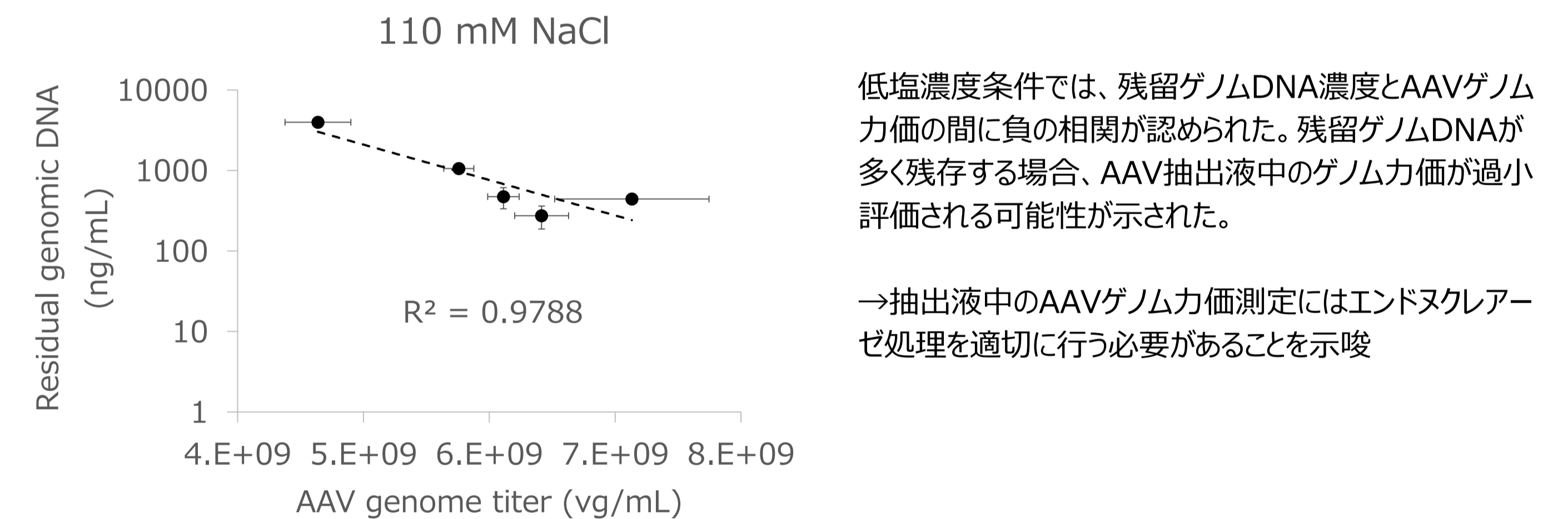
高塩濃度条件 (B, D, F) では、酵素の種類や濃度によるAAV収量・性能への影響は認められなかった

AAV抽出液中の残留ゲノムDNAがAAVゲノム力価に及ぼす影響

Protocol 2



残留ゲノムDNA濃度とAAVゲノム力価の相関関係

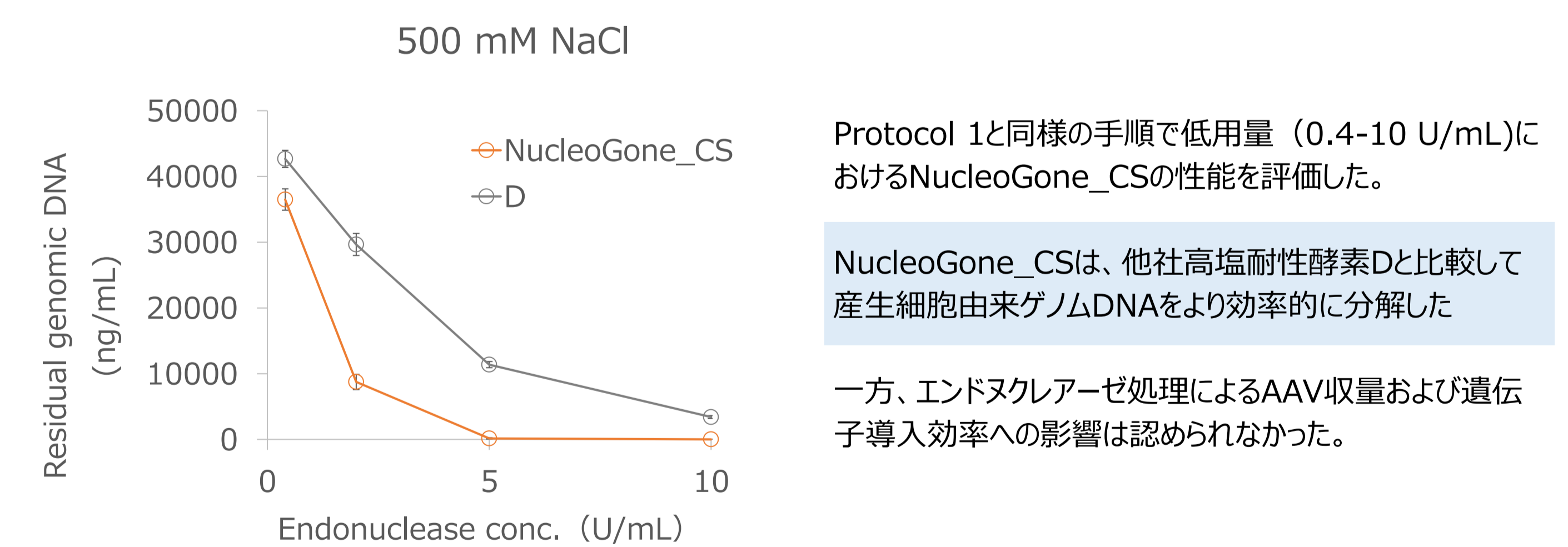


低塩濃度条件では、残留ゲノムDNA濃度とAAVゲノム力価の間に負の相関が認められた。残留ゲノムDNAが多く残存する場合、AAV抽出液中のゲノム力価が過小評価される可能性が示された。

→抽出液中のAAVゲノム力価測定にはエンドヌクレアーゼ処理を適切に行う必要があることを示唆

高塩濃度条件下における低用量NucleoGone_CSの性能評価

低用量条件下におけるNucleoGone_CSと他社高塩耐性エンドヌクレアーゼの核酸分解性能比較

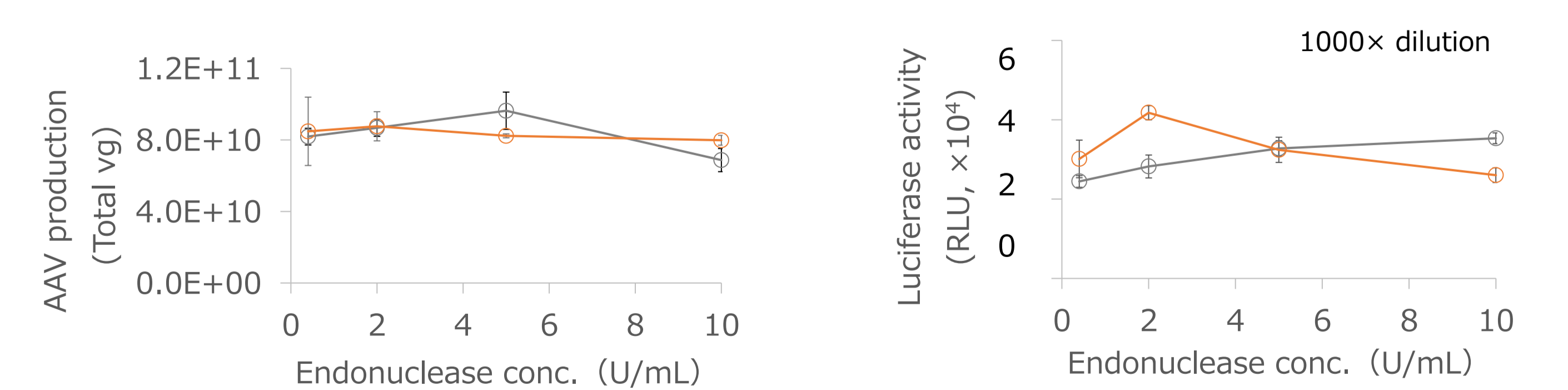


Protocol 1と同様の手順で低用量 (0.4-10 U/mL) におけるNucleoGone_CSの性能を評価した。

NucleoGone_CSは、他社高塩耐性酵素Dと比較して産生細胞由来ゲノムDNAをより効率的に分解した

一方、エンドヌクレアーゼ処理によるAAV収量および遺伝子導入効率への影響は認められなかった。

エンドヌクレアーゼ処理がAAVベクターの収量および性能に及ぼす影響



Conclusion

- NucleoGone Endonuclease, Cold- and Salt-activeは、
 - 高塩濃度条件 (≥ 300 mM NaCl) において高い核酸分解活性を示す
 - AAV産生プロセス中の高塩濃度条件 (500 mM NaCl) で、産生細胞由来ゲノムDNAを検出限界以下まで低減可能
 - 低用量でも他社酵素と比較して核酸分解効率が高い
 - AAVの収量や性能に影響を及ぼさない

COI開示

発表者は全てタカラバイオ株式会社の従業員である。