

非対称フローFFF と MALS を使用し リポソームRNAの特性評価

一般情報

ID0051

アプリケーション：遺伝子治療、医薬品、医療

テクノロジー：AF4-UV-MALS

機器構成：AF2000 MT、PN3621 MALS、PN3211 UV-Vis

キーワード：非対称フローFFF、tRNA、RNA サブユニット、MALS

はじめに

細胞内リポソーム集合体は細胞内でタンパク質を合成し、遺伝暗号をタンパク質に変換する重要な機構です。リポソームは2つのサブユニットで構成され、これらのサブユニットが結合して完全なリポソームを形成するとタンパク質合成が起こります。タンパク質生産能力はリポソームシステムを最適化することで最大限引き上げられます。細胞あたりのリポソームの数と活性リポソームの質量分率は生産プロセスを制御する重要な要素の1つです。

リポソームとサブユニットを評価するために超遠心分離が用いられていますが、分析は非常に面倒で時間がかかります。非対称フローFFF(AF4)は超遠心分離に代わるリポソームの分離とサイズの特性評価の測定法として有効です[1,2]。AF4での分離は、サンプル成分の拡散係数の違いを利用することに基づき、サンプルの保持時間はFFF保持理論を用いて流体力学的直径に変換できます。AF4はサンプルの分子量と二乗平均平方根半径(慣性半径)の特性評価にMALSなどの特性評価手法と簡単に接続できます。

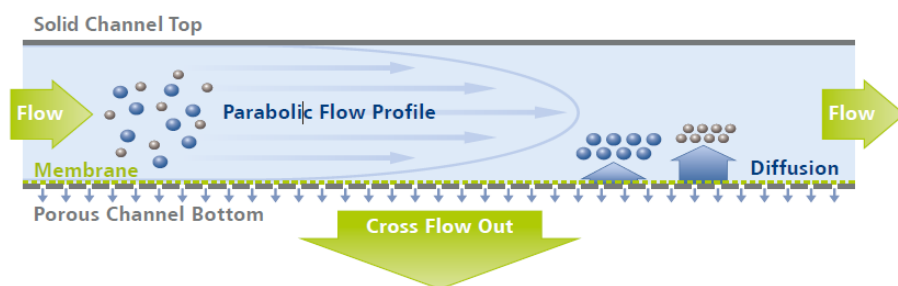


図 1:AF4 の原理

このアプリケーションノートでは、異なる培養手法から得られた2つの大腸菌リポソームサンプルをAF4-UV-MALSで分析し、コントロールサンプルと比較しました。サブユニットと比較した活性リポソームの相対量の変化は、最適な培養手法を設計するのに重要な情報となる可能性があります。

大腸菌リボソームのAF4-UV-MALS分析

大腸菌リボソームの平均分子量は2.6 MDaで、沈降係数は70Sです。サイズが異なる2つのサブユニットで構成されており、大きい方は50Sの沈降係数と分子量1.6-1.8 MDaで、小さい方は30Sの沈降係数と分子量0.7-1.0 MDaです。

大部分のリボソームがタンパク質合成プロセスに積極的に関与するように条件を設計することが重要です。活性リボソーム(70S)の相対濃度とサブユニットの相対濃度を比較することで可能となります。

図2は対象グループと2つの大腸菌リボソームサンプルのAF4-UV-MALS分析の結果を示しています。青い線はコントロールサンプルのUVのフラクトグラムを表しています。24、29、および34分で溶出する3つのピークは、それぞれ30S、50S、および70Sサブユニットとリボソームと一致します。ピークの同定はMALSで測定されたモル質量と、図3に示すFFFで取得された流体力学的粒子径分布によって確認されました。

30S、50S、70Sのピーク流体力学的直径は、それぞれ18、20、24 nmと算出されます。これらの値は、文献値とよく一致しています[1,2]。サンプル中のリボソームの質量分率はUVピークの最大値から、対象、サンプル1、およびサンプル2について、それぞれ37%、66%、および44%と推定されました。

7分で溶出するピークは平均分子量が30 kDaで流体力学的直径が5 nmのtRNAと一致します。サンプル1および2は、MALSによって検出された、ある程度のリボソーム凝集を示しました。凝集体のモル質量は、両方のサンプルで3~5 MDaと測定されました。

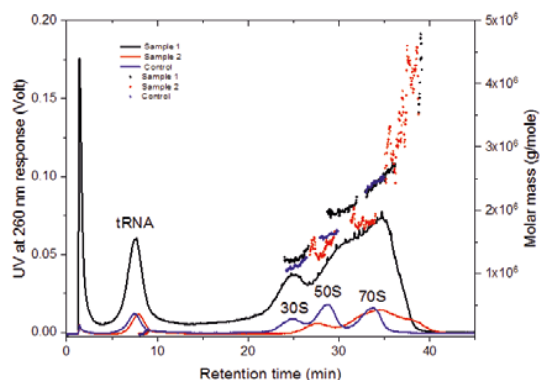


図2：対象グループの F4-UV-MALS フラクトグラムと、異なる培養手法で調製された2つの大腸菌リボソームサンプル。黒丸はMALSを使用して測定されたリボソーム成分のモル質量を表しています

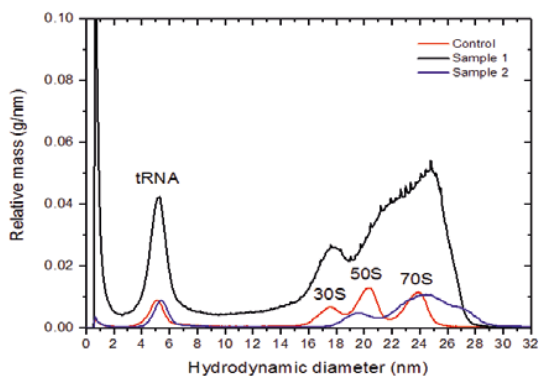


図3：コントロールサンプルと比較した2つの大腸菌リボソームサンプルの粒子サイズ分布

まとめ

非対称フローFFFは40分の分析時間でリボソームとそのサブユニットのサイズと質量の特性評価に使用できる高分解能分離が行えます。リボソームの質量分率は、UV応答の最大値から推定できます。この方法は非リボソーム成分とリボソーム凝集体の分離と特性評価も可能です。

参考文献

- [1] Mikael N., Leif B., and Wahlund K.-G., Biotechnology and Bioengineering, 1997, 54(5), 461-467.
- [2] Nilsson M., Birnbaum S., and Wahlund K.-G., Journal of Biomedical and Biophysical Methods, 1996, 33(1), 9-23.