

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2005～2008

課題番号：17360375

研究課題名（和文）生体認識機構と移動現象を考慮したクロマトグラフィープロセスの構築

研究課題名（英文）Development of chromatography processes considering biorecognition and transport phenomena

研究代表者

山本 修一 (SHUICHI YAMAMOTO)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80144921

研究成果の概要：クロマトグラフィー分離プロセスにおける生体認識機構と移動現象を同時に解析した。尿素やポリエチレングリコール(PEG)を移動相に添加することにより、溶出位置は変化したが結合サイト数はほぼ一定であった。イオン交換モノリス disk を固定化した 96 穴マイクロプレートによりハイスループットシステムを構築することができた。カラム実験と併用することにより、希望する分離性能が達成できる移動相組成を迅速かつ容易に決定できることを明らかとした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	8,100,000	0	8,100,000
2006 年度	3,000,000	0	3,000,000
2007 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	15,600,000	1,350,000	16,950,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学 化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：クロマトグラフィー、組換タンパク質医薬品、ハイスループット、モノリス、生体認識、DNA、PEG、化学工学

## 1. 研究開始当初の背景

(1)2006 年時点での、組換タンパク質医薬品の世界市場規模は約 500 億ドルと推定されており、抗体医薬品の開発とともに生産量も増大していくと予想されている。抗体医薬品は投与量が多いのでクロマトグラフィー分離プロセスについても処理量が急増していくことになる。この結果、従来それほど重視されなかったプロセスの経済性評価が必要とされているが、バイオ分離におけるクロマトグラフィーは依然として経験に基づいた設計と操作が中心である。

(2)クロマト分離の特徴 クロマトグラフィーは非常に精密な分離が可能であり、1 アミノ酸の違いを認識して分離するプロセスもある。クロマトグラフィーでは多孔性充填剤に官能基(リガンド)が導入されており、リガンドと目的物質あるいは不純物との相互作用を制御することにより分離する(下図参照)。カラム内部を移動する間に、溶質は細孔内に拡散しゾーンが広がり分離を悪化させる。このような拡散物質移動による分離性能の低下は特に分子量が 15 万を越える巨大なタンパク質(抗体)や DNA で顕著となる。

(3)クロマト分離プロセス研究の現状 クロマトグラフィーは生体(分子)認識に基づく移動速度差分離法であるが分子認識とゾーン分散(物質移動)は独立ではなくリガンド結合力やその分布は溶質の吸脱着(拡散)速度に大きく影響する。リガンド、溶質、細孔の(相対的)大きさや方向(立体的配置)も重要であるが未だ研究は不十分である。さらに、複数の相互作用が協調的に働いたり、構造変化が生じると分離挙動は一層複雑となる。細孔内でのリガンドと目的物質の生体認識機構に関してマイクロな相互作用解析は、精密な装置の開発とともに研究が活発になってきているが、これらの相互作用解析の結果を反映させたクロマトグラフィーモデルは開発されていない。

## 2. 研究の目的

化学工学ではモデル実験は一般的であるが、抗体タンパク質や修飾タンパク質の場合は良くキャラクタライズされたタンパク質を使用しなければ現実の問題点は明らかにならない。本研究では、生体認識機構と移動現象(ゾーン分散機構)を同時に解析し、その結果を反映するクロマトグラフィーモデルを開発するとともに最適分離プロセスを設計するためのデータを迅速に大量に取得できる方法 (high throughput screening technology) を開発する。モデルには相互作用解析結果を反映させる。

これらのモデルから最適な format (充填剤形状・構造カラム形状・構造など)、新規な高性能クロマトグラフィー充填剤の設計も可能になる(リガンドの種類と固定化方法、充填剤細孔構造等)。

化学プロセスにおける蒸留やガス吸収のような単位操作と比較するとバイオプロセスにおけるクロマトグラフィーは単位操作として十分に確立されていない。バイオ産業の発展にともないクロマトグラフィー分離は重要な単位操作となると考えられ、そのためにも本研究の取り組みは重要である。

## 3. 研究の方法

### (1) 勾配溶出実験による認識機構と移動現象の同時解析

勾配の傾きを変化させた勾配溶出実験からピーク位置での塩濃度  $I_R$  とピーク幅を測定する(Fig1)。一連の実験を広い pH 範囲で実施し、実験結果から  $GH-I_R$  曲線を作成(Fig2)、相互作用に関与するサイト数  $B$  と平衡定数を pH の関数として決定する。また、ピーク幅から HETP を算出し、粒子内(固定相)拡散係数も算出する。タンパク質や DNA の構造に関する情報(表面電荷分布など)を考慮して生体認識機構を解析する。

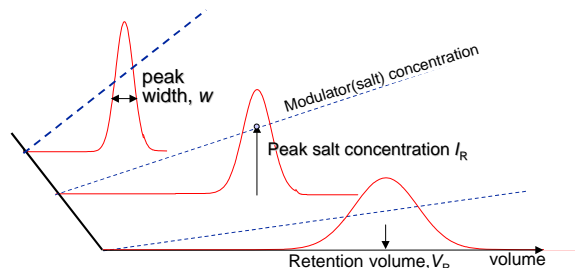


Fig.1 勾配溶出曲線の模式図

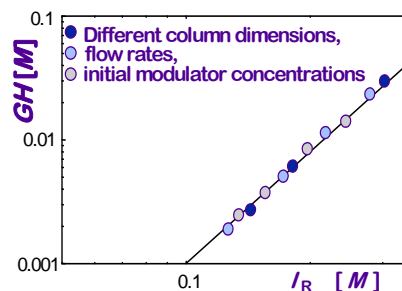


Fig.2  $GH-I_R$  曲線  $GH$ :規格化した勾配

### (2) High throughput screening 方法の開発

クロマトグラフィー分離特性は移動相組成に大きく影響される。その条件探索を通常のカラムで実施することは時間とともに溶媒あるいは試料の量が制約因子となるのでマイクロ化した high throughput technology が望まれる。クロマトグラフィー多孔性充填剤を充填(導入)した 96 穴マイクロプレートとともにイオン交換モノリス disk を固定化した 96 穴マイクロプレートによりカラム実験と同等なデータを測定した。

### (3) 構造変化をともなう生体認識と移動現象の解析

Polyethylene glycol を共有結合させた (PEGylation, PEG 化) タンパク質や尿素により構造を変化させた (unfold) タンパク質の分離挙動と生体認識機構を(1)の勾配溶出実験とサイズ排除クロマトグラフィー実験により解析した。また、活性も測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 構造変化をともなうタンパク質の分離特性

高濃度の尿素ではタンパク質は unfold 状態(ほどけた状態)となる。尿素を移動相に添加した IEC では、尿素を含まない移動相における未変性タンパク質より早く溶出された (Fig.3)。これは誘電率の上昇と電荷クラスターの消失による。しかしながら、勾配溶出実験から決定した結合サイト数  $B$  は lysozyme では 2M 程度の尿素存在下で大きく変化せず、比較的元の構造に近いことが示唆された (Fig.4)。一方、bovine serum albumin (BSA) では、尿素濃度が高いと  $B$  値は大きくなり、構造がかなり変化していると考えられる。

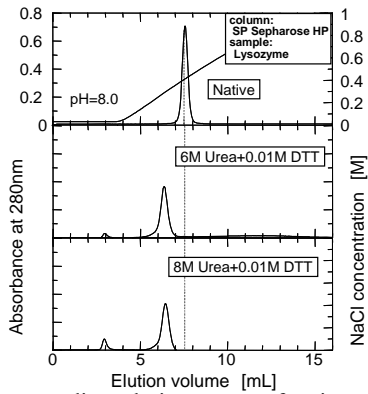


Fig. 3 Linear gradient elution curves of native and unfolded proteins. Sample: lysozyme, column :SP-Sepharose HP

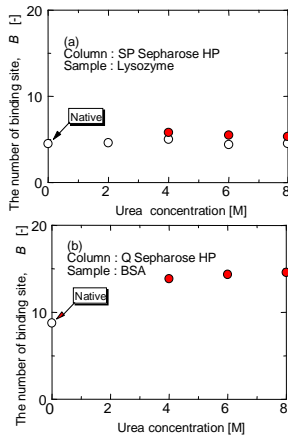


Fig.4 The number of binding sites  $B$  as a function of urea concentration. (a) sample :lysozyme, column: SP-Sepharose HP, (b)sample :BSA, column: Q-Sepharose HP, (○); samples were denatured by urea, (●); samples were denatured by urea and 0.01MDTT.

次に lysozyme と分子量 5000 の活性化 polyethyleneglycol (PEG) による random PEGylation 反応を行なった。反応生成物の IEC 分離結果の一例を Fig.5 に示す。

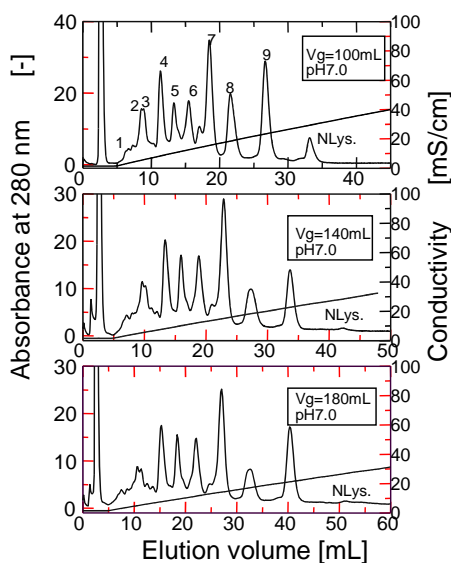


Fig.5 Linear gradient elution curves of PEGylated proteins. sample :lysozyme, column:SP-Sepharose HP

複数のピークが観察されるが、溶出が早いものは PEG が複数結合されていることが SEC 分析より確認された。Peak 8,9 は PEG が単鎖で結合された(mono-PEGylated)lysozyme であるが、結合部位が異なると考えられる。IEC においては電荷分布を認識して分離されるので、このような精密分離が可能となる。結合サイト数  $B$  については Fig.6 のような結果が得られた。mono-PEGylated lysozyme については、 $B$  の値はわずかに減少している。

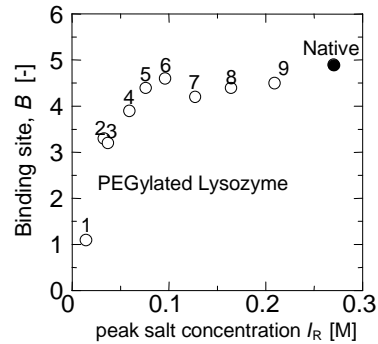


Fig.6 Relationship between the number of binding site  $B$  and the peak salt concentration  $I_R$  for PEGylated proteins. The numbers in the figure correspond to those in Fig.5

結合サイト数には大きな変化がないこと、また PEG 化タンパク質の SEC 分析ではサイズが大きくなっていることから、溶出位置が前方にシフトする理由はイオン交換基と PEG 化タンパク質の距離が立体障害により増加するためではないかと考えられる。

## (2)モノリス disk 96 穴プレートによる high throughput system

標準 deep-well 96 穴プレートの well の底にモノリス disk(直径 7 mm 厚さ 2 mm, 体積 0.076 mL)が固定化されたプレートを使用し、吸引過により液を供給した。UV 対応マイクロプレートで回収し、マイクロプレート分光光度計で 280nm の吸光度を測定した。

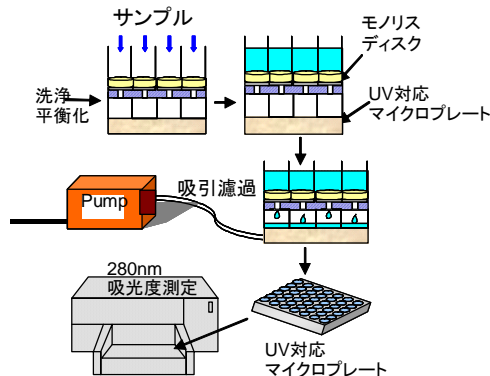


Fig.7 Experimental setup for HTS

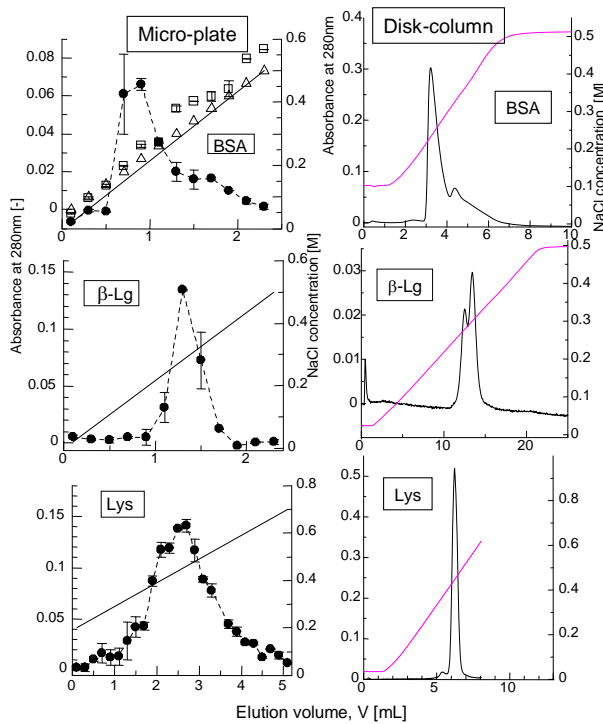


Fig.8 Linear gradient elution curves of several proteins with micro-plate based high throughput system (HTS) and a disk column HPLC system. BSA= bovine serum albumin,  $\beta$ -Lg=  $\beta$ -lactoglobulin, Lys=lysozyme

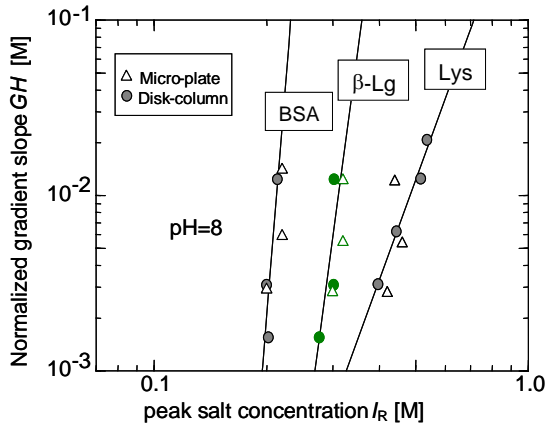


Fig.9  $GH-I_R$  curves for several proteins with HTS and HPLC system. The symbols are the same in Fig.8.

HTS システムのデータと通常の HPLC 装置でモノリス disk(直径 12 mm 厚さ 3 mm, 体積 0.34 mL)カラムを使用して得られたデータを Fig.8 に示す。HTS では、塩濃度勾配は 0.2mL ごとの不連続増加であるが、HPLC とほぼ同様な溶出曲線が得られている。ピーク位置の塩濃度  $I_R$  と規格化した勾配  $GH$  の関係は Fig.9 でも明らかなように HTS と HPLC はほぼ一致した。これらの結果から本研究で開発した HTS により HPLC カラムデータと本質的に同じデータを得ることができることが示された。

(3) DNA のイオン交換クロマトグラフィーにおける保持機構 (結合様式)  
タンパク質のイオン交換クロマトグラフィー

における吸着サイト数  $B$  と移動相 pH の関係について、さまざまなイオン交換クロマトグラフィー(IEC)担体とタンパク質について調査してきている。当然のことながらすべての電荷が関与しているわけではなく、等電点近傍ではごくわずかなサイト数 (2-4 程度) であることも多い。比較的大きなタンパク質である抗体でも 10 以下である。

DNA は組換えタンパク質医薬品製造においては、完全に除去しなければいけない不純物であり、IEC が使用される。一方、遺伝子治療のベクターとして super-coiled plasmid DNA が期待されており、その IEC による精製プロセスの効率化も重要である。DNA の保持機構はタンパク質にくらべて十分理解されていない。

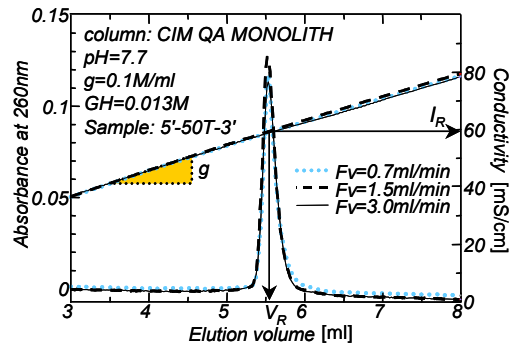


Fig.10 Typical elution curves of 50-mer poly (T) DNA in linear gradient elution monolithic IEC

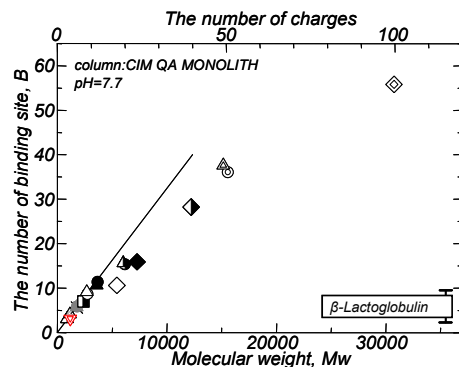


Fig.11 The number of binding site  $B$  as a function of the number of charges or the molecular weight of DNA

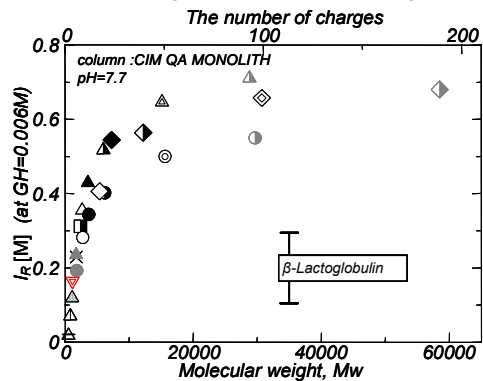


Fig.12 The peak salt concentration  $I_R$  as a function of the number of charges or the molecular weight of DNA



Fig.10 は典型的な塩濃度直線勾配溶出曲線 (IEC)である。巨大分子である 50mer-DNA の溶出曲線が流速に依存しておらずモノリス IEC の特徴が明らかである。塩濃度勾配  $g$  の傾きを変えた実験を行い、溶出塩濃度  $I_R$  を求め充填剤体積で規格化した勾配  $GH$  に対してプロットすると  $GH-I_R$  曲線が得られ、この直線の傾きから吸着サイト数  $B$  が決定できる。

決定された  $B$  値と DNA の分子量と電荷数 (リン酸基数) の関係を Fig11 に示す。  $B$  値と分子量とはよい相関がみられ、短鎖 DNA (塩基数 2~12) では  $B$  値と電荷数の値がほぼ一致していた。モノリス以外の通常の粒子充填剤 IEC においてもほぼ同様の結果が得られた。

一方、ピーク溶出塩濃度  $I_R$  も電荷数とともに増加するが、電荷数が 20 を超えると  $I_R$  の増加もゆるやかとなり、最後にはあまり変化しなくなった (Fig.12)。また、一般的なタンパク質 ( $\beta$ -lactoglobulin) と DNA を比較しても、DNA の  $B$  や  $I_R$  値が非常に大きいことが分かる。

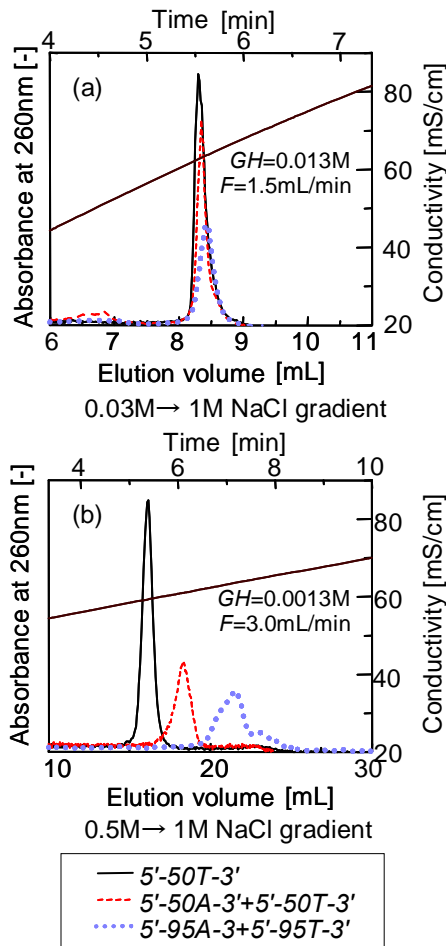


Fig.13 Linear gradient elution of DNAs (a) base case (b) optimized separation

これらの結果から DNA はタンパク質にくらべると多くの電荷で IEC と吸着すること、溶出には非常に高い NaCl 濃度が必要であることが明らかとなった。この結果、初期塩濃度  $I_0$  を高くしても十分に強く保持されるので、 $I_0$  を高く設定し緩い勾配で操作すれば難

しい分離も可能となると予想される。またモノリスでは流速は分離性能に影響しないので高流速で運転すれば分離時間も短縮できる。その一例を Fig.13 に示す。最初の条件では、まったく分離できなかった長鎖 DNA が完全に分離されている。

#### (4)まとめ

high-throughput system については、monolith-disk-plate の有効性が実証されたが、通常の多孔性粒子を用いた回分実験による静的吸着量の決定方法についても検討しており、この方法を併用すると、さらに時間の短縮と溶媒・試料量の削減が可能になる。

PEG 化タンパク質の分離機構については、SH 基に PEG 修飾することにより bovine serum albumin (BSA) の monoPEG 化を行い、その分離挙動について解析している。吸着サイト数の変化と溶出位置のシフトは PEG 化 lysozyme とほぼ同様であった。

モノリスについてはその溶出曲線の幅をモデル解析し、吸着サイト数が非常に大きい ( $B>20$ ) ことにより、シャープな溶出曲線が得られることを明らかにした。

移動相へ PEG を添加すると溶出位置は後ろへシフトし、分子量が大きくなるほど顕著となる。この効果は凝集体の分離等で効果的であると考えられる。

移動相へアルギニンを添加すると溶出位置は前方へシフトした。これはアルギニンが疎水相互作用を抑制するためと考えられるが、さらなる検討が必要である。

移動相の添加剤による分離特性の制御は非常に有望な方法である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

- 1) Shuichi Yamamoto, Noriko Yoshimoto, Christina Tarmann, Alois Jungbauer, Binding site and elution behavior of DNA and other large biomolecules in monolithic anion exchange chromatography, *J. Chromatogr. A*, Vol. 1216, 2616-2620 (2009) 査読有
- 2) S. Yamamoto, N. Yoshimoto, Y. Nishizumi, Theoretical background of monolithic short layer ion-exchange chromatography for separation of charged large biomolecules or bioparticles, *J. Chromatogr. A*, Vol. 1216, 2612-2615 (2009) 査読有
- 3) N. Yoshimoto, Y. Nishijima, P. Akbarzadehlaleh, S. Fujii, M. Abe, S. Yamamoto, Micro-plate based monolithic ion-exchange chromatography for high throughput protein purification process design, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, Vol. 41, pp. 200-205 (2008) 査読有

- 4) S.-S Wang, J.Wu, S.Yamamoto, H-S.Liu, Diseases of protein aggregation and the hunt for potential pharmacological agents, *Biotechnology Journal*, Vol.3, pp. 165-192 (2008) 査読有
- 5) B K Lee, J- S Kwon, H.J. Kim, S.Yamamoto, E.K. Lee, Solid-phase pegylation of recombinant interferon  $\alpha$ -2a for site-specific modification: Process erformance, characterization, and in vitro bioactivity, *Bioconjugate Chem.*, 18, 1728-1734 (2007)査読有
- 6) S.Yamamoto, S.Fujii, N.Yoshimoto,P. Akbarzadehlaleh, Effect of protein conforma tional changes on separation performance in electrostatic interaction chromatography : Unfolded and PEGylated proteins, *Journal of Biotechnology*, Vol.132, 196-201 (2007)査読有
- 7) T.Ishihara, T. Kadoya, S.Yamamoto, Application of a chromatography model with linear gradient elution experimental data to the rapid scale-up in ion-exchange process chromatography of proteins, *J. Chromatogra. A*, Vol.1162 , 34-40 (2007) 査読有
- 8)) W-Y Chen, Z-C.Liu, L.P.Hsun,C-I.Fang, Shuichi Yamamoto, The hydrophobic interactions of the ion-exchanger resin ligands with proteins at high salt concentrations by adsorption isotherms and isothermal titration calorimetry, *Separation and Purification Technology*, Vol.54, 212-219(2007) 査読有
- 9) W-Y. Chen, M-S. Lin, P-H. Lin, P-S. Tsai, Y. Chang, S.Yamamoto, Studies of the interaction mechanism between single strand and double-strand DNA with hydroxyapatite by micro calorimetry and isotherm measurements, *Colloids and Surfaces A*, Vol.295, 274-283 (2007) 査読有
- 10) S.Yamamoto, M.Nakamura, C.Tarmann, A.Jungbauer, Retention studies of DNA on anion-exchange monolith chromatography: Binding site and elution behavior, *J.Chromatogra.A*, Vol.1144, 155-160(2007)査読有
- 11) S.Yamamoto,A.Kita, Rational design calcu lation method for stepwise elution chromato graphy of proteins,*Trans.IChemE.Part C.,Food and Bioproducts Processing*, Vol.84, C1, 72-77(2006) 査読有
- 12) T.Ishihara, T.Kadoya, N.Endo, S.Yamamoto Optimization of elution salt concentration in stepwise elution of protein chromatography using linear gradient elution data. Reducing residual protein A by cation-exchange chroma tography in monoclonal antibody purification, *J. Chromatogra. A*, Vol.1114, 97-101(2006)査読有
- 13) Shuichi Yamamoto, Electrostatic interaction chromatography process for protein separations: The impact of the engineering analysis of biorecognition mechanism on the

- process optimization. *Chemical Engineering & Technology*, Vol.28, 1387-1393 (2005)査読有
- 14)T.Ishihara, T.Kadoya, H.Yoshida, T.Tamada, S.Yamamoto, Rational methods for predicting elution conditions in protein A affinity and cation exchange chromatography from amino acid sequences of monoclonal antibodies-Structure based chromatography design for monoclonal antibodies-,*J.Chromatogra.A*,Vol.1093, 126-138(2005) 査読有
- 15) T. Ishihara, S.Yamamoto, Optimization of monoclonal antibody purification by ion exchange chromatography- Application of simple methods with linear gradient elution experimental data-, *J.Chromatogra. A*, 1069, pp 99-106(2005)査読有

[学会発表] (計 45 件)

Shuichi Yamamoto, Do chromatography models help you understand, design, operate and validate your purification process? The 21st Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology, Fukuoka, Japan, SB-5, p.71, November 27, 2008.

[図書] (計 5 件)

- 1) 村上聖, 山本修一, シーエムシー出版 抗体医薬培養精製工程のモデル化と最適化、第 23 章、抗体医薬の最前線 監修 植田充美, pp.259~271, 2007
- 2)山本修一,朝倉書店,7.7 吸着・クロマトグラフィ,食品工学ハンドブック,日本食品工学会編、pp.213-230,2006
- 3)山本修一,コロナ社,8.5 クロマトグラフィ,生物工学ハンドブック、日本生物工学会編, pp.480-493, 2005

[その他] ホームページ

[http://ds0.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~shu/index\\_j.htm](http://ds0.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~shu/index_j.htm)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 修一 (SHUICHI YAMAMOTO)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 80144921

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

Alois Jungbauer, Professor, Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Applied Life Science Vienna, Austria

Wen-Yih Chen, Professor, Chemical Engineering Department, National Central University, Taiwan,

E.K.Lee, Professor, Chemical Engineering Department., Hanyang University, Korea