

機関番号：32665

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：20590040

研究課題名 (和文) 汎用型高速向流クロマトグラフ装置の開発と極性物質分離への応用

研究課題名 (英文) Development of Universal Type of High Speed Countercurrent Chromatograph and Its Application to Separation of Polar Compounds

研究代表者

四宮 一総 (SHINOMIYA KAZUFUSA)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号：70215995

研究成果の概要 (和文)：汎用型高速向流クロマトグラフ (CCC) 装置を設計、製作し、水性二相溶媒によるタンパク質分離を行って装置の有用性を検討した。汎用型高速 CCC ではテフロンチューブをコイル状に巻き付けたカラムが惑星運動するが、公転方向に対して従来の J 型 CCC と同じ順方向の自転 ( $P_{\text{forward}}$ ) または逆方向の自転 ( $P_{\text{backward}}$ ) のいずれかを選択可能な構造とした。水性二相溶媒によるタンパク質分離を検討した結果、 $P_{\text{backward}}$  では固定相は全く保持されなかったが、 $P_{\text{forward}}$  では固定相が保持され、タンパク質分離が達成された。 $P_{\text{forward}}$  では偏心コイルの方がトロイダルコイルより高い分離効率が得られた。送液チューブの配管ラインに回転シール機構を組み入れて自転と公転の速度が互いに異なる非同同期型高速 CCC に改良した結果、 $P_{\text{forward}}$  では汎用型高速 CCC より更に高いタンパク質分離効率が得られた。

研究成果の概要 (英文)：Universal type of high-speed countercurrent chromatograph (universal HSCCC) was newly designed and fabricated in our university, and applied to protein separation using an aqueous-aqueous polymer phase system. The present apparatus can produce a synchronous planetary motion of coiled separation column by selecting the normal forward rotation ( $P_{\text{forward}}$ ) or the reversed backward rotation ( $P_{\text{backward}}$ ) against the revolution direction. No stationary phase retention was obtained in  $P_{\text{backward}}$  rotation, while sufficient protein separation was achieved in  $P_{\text{forward}}$  rotation. In this  $P_{\text{forward}}$  rotation, partition efficiency obtained by the eccentric coil assembly was better than that obtained by the toroidal coil assembly. By improving the apparatus to the nonsynchronous HSCCC, which can produce different rotation and revolution speeds independently, increased partition efficiency in  $P_{\text{forward}}$  rotation was obtained more than the original universal HSCCC. The nonsynchronous HSCCC was successfully fabricated by introducing the new rotary seal system in the distribution line of flow tube.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：分析化学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 向流クロマトグラフィー(CCC)は二液相間での物質の分配を分離原理としているため、固定相溶媒を保持しながら移動相溶媒を送液することで高い分離効率を達成する装置の開発が不可欠である。従来開発された装置の中で、J型 CCC は回転機構が簡素で、有機溶媒-水系二相溶媒の使用が可能であるが、水性二相溶媒を保持することができない。

(2) 一方、交軸型 CCC は水性二相溶媒も使用できるが、回転機構が複雑なため市販されていない。我々は、非同期型コイル・プラネット遠心機によりタンパク質分離を検討した結果、J型 CCC の自転(順方向回転:  $P_{forward}$ )とは逆方向の自転(逆方向回転:  $P_{backward}$ )により固定相溶媒が保持されることを見出した。そこで、 $P_{forward}$  と  $P_{backward}$  を行うカラムを組み合わせた小型交軸型 CCC を製作し、タンパク質分離での有用性を証明した。

## 2. 研究の目的

(1) 小型交軸型 CCC と比較して回転機構が簡素な  $P_{forward}$  と  $P_{backward}$  を行う高速 CCC を汎用型高速 CCC として考案、設計、製作する。

(2) 製作した汎用型高速 CCC を用いて水性二相溶媒によるタンパク質分離を行い、その分離効率を検討して装置の有用性を証明する。

## 3. 研究の方法

(1) 日本大学理工学部理工学研究所工作技術センターで汎用型高速 CCC を設計、製作した。

(2) テフロンチューブをコイル状に巻き付けて作製した3種類のカラムをタンパク質分離に使用した。各コイル状カラムの作製法は以下の通りである。

① 多層コイル: テフロンチューブ(内径 1.0 mm, 外径 2.0 mm)を装置の円筒状ホルダー(直径 3 cm×高さ 5 cm)に左巻きに巻き付けて作製した(1層当たり 25 巻, 8層、総容量 56 mL)。

② 偏心コイル: ポリエチレンチューブ(外径 5 mm×長さ 5 cm)に左巻きに 20 巻テフロンチューブ(内径 1.0 mm, 外径 2.0 mm)を巻き付けて1ユニットとし、計 30 ユニットの直列に連結した後、円筒状ホルダーの周囲に各ユニットが並列になるように左巻きに巻き付けて作製した(第1層: 12 ユニットの、第2層: 18 ユニットの、総容量 29.5 mL)。

③ トロイダルコイル: ポリエチレンチューブ(外径 5 mm)にテフロンチューブ(内径 1.0 mm, 外径 2.0 mm)を左巻きに巻き付け、更

に円筒状ホルダー(直径 3 cm×高さ 5 cm)に左巻きに巻き付けて作製した(第1層: 59 cm, 266 巻, 第2層: 89 cm, 402 巻、総容量 29.8 mL)。

同種類のコイル状カラム 2 つを装置の同方向の回転位置に装着し、送液チューブで直列に連結した。

(3) 水性二相溶媒には、12.5% (w/w) ポリエチレングリコール 1000-12.5% (w/w) リン酸-水素二カリウム水溶液を使用した。

(4) 標準タンパク質試料にはチトクロム C (Cyt)、ミオグロビン(Myo)及びリゾチーム(Lys)を使用し、水性二相溶媒の上層溶液を固定相、下層溶液を移動相とする場合には、Cyt 2 mg、Myo 8 mg、Lys 10 mg を上層溶液 1 mL、下層溶液 1 mL の混合溶液に溶解して試料溶液とした。一方、水性二相溶媒の下層溶液を固定相、上層溶液を移動相とする場合には、Myo 8 mg、Lys 10 mg を上層溶液 1 mL、下層溶液 1 mL の混合溶液に溶解して試料溶液とした。

(5) 汎用型高速 CCC による分離操作は、予め水性二相溶媒の固定相溶媒をカラムに充填してから行った。試料溶液を送液チューブに導入し、カラムを 1000 rpm で回転させた後、移動相溶媒を送液すると、分離開始当初は固定相溶媒がカラムから溶出したが、カラム内で固定相と移動相間で定常状態が形成されると、固定相溶媒に代わって移動相溶媒が溶出した(溶媒先端)。タンパク質試料は、下層溶液が移動相の場合には、Cyt、Myo、Lys の順で移動相溶媒と共に分離、溶出し、一方、上層溶液が移動相の場合には、Lys、Myo の順に分離、溶出した。移動相流速は、多層コイルでは 0.4 mL/分、偏心コイルとトロイダルコイルでは 0.2 mL/分とした。また、下層溶液を移動相に用いる場合には、移動相溶媒を装置上端から下端の方向に下降法によって送液し、上層溶液を移動相に用いる場合には装置下端から上端の方向に上昇法によって送液した。更に、カラムの公転方向は、装置上方から見て、下層溶液を移動相とする場合には時計廻り、上層溶液を移動相とする場合には反時計廻りとした。

(6) 本装置の移動相導入用送液チューブは移動相送液ポンプに接続し、排出用送液チューブはフラクションコレクターに接続した。溶出した移動相画分は、一定量の水で希釈した後、紫外可視分光光度計により、波長 280 nm で試料タンパク質の吸光度を測定した。また、Myo については更に波長 540 nm での吸光度も測定した。

(7)カラムの分離効率、得られたクロマトグラムを用い、分離度  $R_s$  及び理論段数  $N$  を算出して評価した。分離度及び理論段数の計算式は以下の通りである。

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

$t_{R1}$ ,  $t_{R2}$ : 物質 1、物質 2 の保持時間  
 $W_1$ ,  $W_2$ : 物質 1、物質 2 のピーク幅

$$N = \left( \frac{4t_R}{W} \right)^2$$

$t_R$ : 物質の保持時間  
 $W$ : ピーク幅

(8)固定相保持率  $S_f$  (%) はカラムの体積  $V_c$  とし、カラム内の移動相及び固定相の体積をそれぞれ  $V_m$ 、 $V_s$  とすると、

$$S_f = \frac{V_s}{V_c} \times 100 = \frac{V_c - V_m}{V_c} \times 100$$

から算出できる。 $V_m$  は溶媒先端までに溶出した固定相溶媒の体積に等しい。また、試料成分の保持体積( $V_R$ )は、

$$V_R = V_m + KV_s$$

$K$ : 試料成分の分配係数

で表されるため、得られたクロマトグラムからこの式を用いて  $K$  値を求めた。

#### 4. 研究成果

(1)汎用型高速 CCC は回転機構が簡素で、同期的な自公転は動力の伝達効率に優れたギア構成により達成された。コイル状カラムは 4 つを自転軸と公転軸が平行となるように公転軸から一定の距離の位置に設置し、隣り合うカラム同士は同じ公転方向に対して互いに逆方向の自転となるように交互に配置した。即ち、 $P_{forward}$  と  $P_{backward}$  のカラムは隣接して 2 つずつ装着されるため、J 型 CCC と同じ順方向の自転をするカラムによる分離では  $P_{forward}$  のカラム 2 つを送液チューブで直列に連結して用い (図 1)、逆方向の自転をするカラムによる分離では、 $P_{backward}$  のカラム 2 つを送液チューブで直列に連結して用いることができる構造とした (図 2)。この理由は、研究開始当初、 $P_{forward}$  は有機溶媒一

水系二相溶媒のような界面張力の差の大きい二相溶媒による分離、 $P_{backward}$  は水性二相溶媒のような界面張力の差の小さい二相溶媒による分離を 1 台の装置で実施可能とすることを目的としたためである。

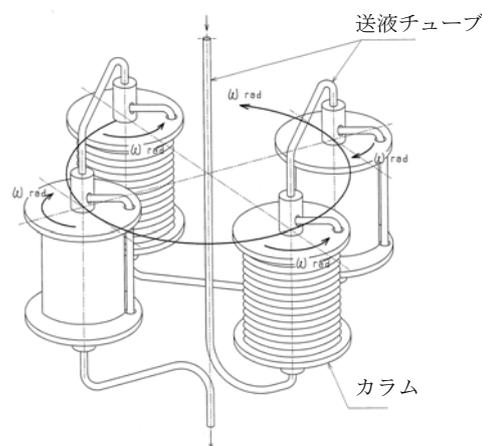


図 1 汎用型高速 CCC の  $P_{forward}$  での回転

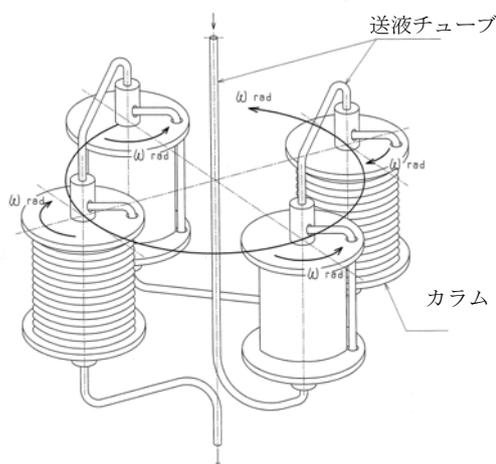


図 2 汎用型高速 CCC の  $P_{backward}$  での回転

(2)送液チューブは、カラムの同期的自公転によりねじれが解消されるシステムにより導入用と排出用の送液チューブ同士が接触して磨耗しない単一ラインで配管することとし、回転シールを必要としない構造とした。

(3)右巻きの多層コイルを作製し、 $P_{backward}$  によるタンパク質の分離を検討した。水性二相溶媒の下層溶液を移動相とし、回転速度 1000 rpm、移動相流速 0.6 mL/分で行った。公転方向は反時計廻りとしたため、カラムは時計廻りに自転した。その結果、Cyt は分離されたが、Myo と Lys は全く分離されず、固定相も試料タンパク質の溶出と共に全量排出され、最終的には全く保持されなかった。そこで、流速を 0.4 mL/分に低下させて実験を行ったが、0.6 mL/分の場合と同様の結果が得られ、固定相は保持されなかった。また、公

転方向を時計廻り、自転方向を反時計廻りとしても同様の結果であった。

(4)次に左巻きの多層コイルを作製し、 $P_{\text{backward}}$ によるタンパク質の分離を検討した。水性二相溶媒の下層溶液を移動相とし、回転速度 1000 rpm、移動相流速 0.4 mL/分で行った。公転方向は時計廻り、自転方向は反時計廻りとした。しかし、右巻きコイルの場合と同様に固定相は全く保持されなかった。

(5)多層コイルでは  $P_{\text{backward}}$ による分離が難しかったため、左巻き偏心コイルによる  $P_{\text{backward}}$ での分離を検討した。水性二相溶媒の下層溶液を移動相とし、回転速度 1000 rpm、移動相流速 0.2 mL/分で行った。公転方向は時計廻り、自転方向は反時計廻りとした。しかし、試料タンパク質は全く分離されずに溶出し、固定相も全く保持されなかった。また、公転方向を反時計廻り、自転方向を時計廻りとしても固定相は全く保持されなかった。

(6)そこで、 $P_{\text{forward}}$ での左巻き偏心コイルによるタンパク質分離を検討した。水性二相溶媒の下層溶液を移動相とし、回転速度 1000 rpm、移動相流速 0.2 mL/分、回転方向は自公転とも反時計廻りとした。その結果、固定相保持率  $S_f = 24.1\%$ でタンパク質の分離が達成された。各タンパク質間の分離度は、 $Rs_1(\text{Cyt/Myo}) = 1.2$ 、 $Rs_2(\text{Myo/Lys}) = 1.6$ であり、Myo ピークでの理論段数  $M(\text{Myo})$ は 446 段(TP)であった。一方、上層溶液を移動相とした場合でも分離は達成され、同じ実験条件で、 $S_f = 26.4\%$ 、 $Rs(\text{Lys/Myo}) = 1.0$ 、Lys ピークでの理論段数  $N(\text{Lys}) = 283\text{TP}$ であった。

(7)次に、回転方向を時計廻りに変更して  $P_{\text{forward}}$ での左巻き偏心コイルによるタンパク質分離を検討した。反時計廻りの場合と同様に分離は達成され、下層溶液を移動相とした場合、 $S_f = 26.8\%$ 、 $Rs_1(\text{Cyt/Myo}) = 0.9$ 、 $Rs_2(\text{Myo/Lys}) = 1.3$ 、 $N(\text{Myo}) = 438\text{TP}$ であり、上層溶液を移動相とした場合、 $S_f = 23.7\%$ 、 $Rs(\text{Lys}) = 1.1$ 、 $N(\text{Lys}) = 376\text{TP}$ であった。

これらの結果から、左巻き偏心コイルでは、 $P_{\text{forward}}$ で自公転の方向は下層溶液を移動相とした場合には反時計廻り、上層溶液を移動相とした場合には時計廻りにすると、より良好な分離が達成されることがわかった。

(8)更に  $P_{\text{forward}}$ での左巻きトロイダルコイルによるタンパク質の分離を検討した。偏心コイルでの分離と同様に、回転速度 1000 rpm、移動相流速 0.2 mL/分で行った。反時計廻りでは、下層溶液が移動相の場合、 $S_f = 28.2\%$ 、

$Rs_1(\text{Cyt/Myo}) = 1.0$ 、 $Rs_2(\text{Myo/Lys}) = 1.3$ 、 $N(\text{Myo}) = 336\text{TP}$ であり、上層溶液が移動相の場合、 $S_f = 24.6\%$ 、 $Rs(\text{Lys/Myo}) = 1.0$ 、 $N(\text{Lys}) = 243\text{TP}$ であった。

一方、時計廻りでは、下層溶液が移動相の場合、 $S_f = 28.1\%$ 、 $Rs_1(\text{Cyt/Myo}) = 1.2$ 、 $Rs_2(\text{Myo/Lys}) = 1.3$ 、 $N(\text{Myo}) = 454\text{TP}$ であり、上層溶液が移動相の場合、 $S_f = 23.5\%$ 、 $Rs(\text{Lys/Myo}) = 1.2$ 、 $N(\text{Lys}) = 277\text{TP}$ であった。

(9)偏心コイルとトロイダルコイルを比較すると、固定相保持率はトロイダルコイルの方が高かったが、分離度、理論段数は偏心コイルの方が高い値が得られた。また、回転方向の違いが分離に及ぼす影響はトロイダルコイルの方が偏心コイルより小さかった。

(10)上述したように、 $P_{\text{backward}}$ では固定相は全く保持されなかったが、 $P_{\text{forward}}$ では固定相が保持され、タンパク質分離が達成された。 $P_{\text{backward}}$ と  $P_{\text{forward}}$ のカラムの回転を比較した結果、 $P_{\text{backward}}$ では同期的自公転により総合的な回転が相殺されており、そのことが原因で固定相が保持されないことが考えられた。

そこで、回転の相殺を解除して公転速度とは異なる自転速度でのカラムの回転を可能にするため、移動相導入送液チューブと移動相排出チューブが接続されている2つのカラムの下端に新たに考案・設計製作した回転シール機構を設置し、汎用型高速 CCC を非同期型高速 CCC に改良した。

(11)回転シール機構は送液チューブが微小な距離断絶した構造をしており、そのことで公転速度と自転速度の違いにより生じるねじれを解消することが可能となった。

(12)非同期型高速 CCC を用いて  $P_{\text{backward}}$ での右巻き偏心コイルによるタンパク質分離を検討した。水性二相溶媒の下層溶液を移動相とし、公転速度 1000 rpm、自転速度 1066 rpm、移動相流速 0.2 mL/分で行った。公転方向は反時計廻り、自転方向は時計廻りとした。しかし、固定相は全く保持されず、分離も達成されなかった。このことから、 $P_{\text{backward}}$ におけるカラムの回転は、微小な公転と自転の差では固定相の保持に大きな影響を及ぼさないことが考えられた。

(13)次に、非同期型高速 CCC を用いて  $P_{\text{forward}}$ での右巻き偏心コイルによるタンパク質分離を検討した。 $P_{\text{backward}}$ と同様に公転速度 1000 rpm、自転速度 1066 rpm、移動相流速 0.2 mL/分で行ったが、自公転方向は、下層溶液を移動相とする場合は時計廻り、上層溶液を移動相とする場合は反時計廻りとした。

その結果、下層溶液を移動相とした場合、 $Rs_1(\text{Cyt}/\text{Myo}) = 1.3$ 、 $Rs_2(\text{Myo}/\text{Lys}) = 1.7$ 、 $N(\text{Myo}) = 388\text{TP}$ 、上層溶液を移動相とした場合、 $Rs(\text{Lys}/\text{Myo}) = 1.3$ 、 $N(\text{Lys}) = 283\text{TP}$ となり、タンパク質分離が達成された。同期型である汎用型高速 CCC を用いた分離と比較すると、理論段数は減少しているが、分離度は増加しており、分離効率が改善されていることがわかった。

(14)以上、これまでの本研究の成果は次のようにまとめられる。

①汎用型高速 CCC を設計、製作し、 $P_{\text{backward}}$  及び  $P_{\text{forward}}$  での水性二相溶媒によるタンパク質分離を検討した。

② $P_{\text{backward}}$  では固定相が全く保持されなかったが、 $P_{\text{forward}}$  では固定相が保持され、タンパク質分離が達成された。

③ $P_{\text{forward}}$  でのタンパク質分離効率は、偏心コイルの方がトロイダルコイルより高く、偏心コイルによる分離では、下層溶液を移動相とした場合には反時計廻り、上層溶液を移動相とした場合には時計廻りの自公転方向で高い分離効率が得られた。

④送液チューブ配管ラインに回転シール機構を組み入れて、汎用型高速 CCC を自転速度と公転速度が互いに異なる分離が可能な非同期型高速 CCC に改良した。

⑤非同期型高速 CCC でも  $P_{\text{backward}}$  で固定相は保持されなかったが、 $P_{\text{forward}}$  でのタンパク質分離は汎用型高速 CCC より良好な分離結果が得られた。

## 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)

[図書] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 四宮一総、柳平和寛、吉田和範、丸山博、伊東洋一郎、汎用型高速向流クロマトグラフ装置のタンパク質分離効率と非同期型逆回転機構の製作、日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月 29 日、日本薬学会 131 年会要旨集誌上において
- ② 四宮一総、柳平和寛、丸山博、伊東洋一郎、汎用型高速向流クロマトグラフ装置によるタンパク質の分離、日本薬学会第 130 年会 (岡山)、平成 22 年 3 月 29 日、桃太郎アリーナ
- ③ 四宮一総、柳平和寛、武藤實、伊東洋一郎、汎用型高速向流クロマトグラフ装置の考案と製作、日本薬学会第 129 年会 (京都)、平成 21 年 3 月 27 日、国立京都国際会館

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：カラム保持機構および向流クロマトグラフ装置

発明者：四宮一総、柳平和寛、吉田和範

権利者：日本大学

種類：特許

番号：特願 2011-020078

出願年月日：平成 23 年 2 月 1 日

国内外の別：国内

名称：向流クロマトグラフ装置

発明者：四宮一総、柳平和寛

権利者：日本大学

種類：特許

番号：特願 2009-051083

出願年月日：平成 21 年 3 月 4 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

四宮一総 (SHINOMIYA KAZUFUSA)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号：70215995