

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26820363

研究課題名(和文) PEG化タンパク質位置異性体の変性構造を固液界面で特異認識する精密分離プロセス

研究課題名(英文) Development of separation process for PEGylated positional isoforms based on the intrinsic interaction with specific structure on the solid-liquid interface

研究代表者

吉本 則子 (Yoshimoto, Noriko)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40432736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：イオン交換クロマトグラフィーにおけるPEG化タンパク質修飾位置異性体の分離機構について塩濃度勾配溶出法(LEG)およびpHグラジエントにより解析した。PEG化タンパク質位置異性体の保持係数は、PEG鎖が修飾されたlysine残基のpKaの値に依存し、LEGおよびpHグラジエント法のいずれにおいてもpKaの値が低いものほど早く溶出されることが分かった。また変性PEG化タンパク質・PEG化DNAの修飾位置異性体分離において正味の電荷の違いではなく立体構造が重要であることを明らかにした。またPEG化タンパク質の分子拡散係数および細孔内拡散係数を測定し、カラム内における物質移動特性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The mechanism for the retention on ion exchange chromatography was analyzed with respect to the positional isoforms of PEGylated proteins by the linear salt salt gradient and pH gradient methods. The distribution coefficients of positional isoforms depended on pKa of modified lysine residue. The isoform eluted earlier when the modified lysine had low pKa values. The steric effect was found to be important in the separation of isoforms compared to their difference in charge on the basis of the retention behaviors of denatured proteins and PEGylated DNA. The diffusion coefficients of PEGylated proteins were determined in bulk solution and in the ion exchange resin to clarify the mass transfer properties in column.

研究分野：生物分離工学

キーワード：PEG化タンパク質 イオン交換クロマトグラフィー 異性体分離

## 1. 研究開始当初の背景

水溶性合成高分子であるポリエチレングリコール (PEG) を修飾した PEG 化タンパク質は、native タンパク質と比較して高い生体内安定性を有している。このため、バイオベター・バイオシミラーな次世代医薬品として期待されている。しかし、タンパク質中の PEG 修飾部位の制御は難しく、PEG 化タンパク質は PEG 修飾数・部位の異なる修飾異性体混合物として生成する。この為、PEG 化反応液から目的部位が修飾された PEG 化タンパク質を複数のクロマトグラフィー工程により精製する必要があるが、合理的な分離プロセスは確立されていない。サイズ排除クロマトグラフィー・限外ろ過・電気泳動などの分子サイズの差異に基づく分離手法では PEG 修飾数異性体の分離が可能であるが修飾位置異性体の分離はできない。一方、イオン交換クロマトグラフィー (IEC) では、修飾異性体との電気的相互作用の違いを利用して修飾数・修飾位置異性体を同時に分離することが可能である。このため、IEC を用いた高効率な PEG 化タンパク質修飾異性体分離プロセスの構築が期待されている。イオン交換クロマト担体におけるタンパク質の分子認識機構を支配するパラメータは、タンパク質の正味電荷・分子量だけでなく、その立体構造によっても変化する。このため、PEG 化タンパク質修飾位置異性体の立体構造を変化させることによりさらに分離効率が向上する可能性が期待できる。クロマト分離プロセスの開発は、経験に基づき試行錯誤的に操作条件を決定する手法から分子認識機構を数学的モデルにより記述し、モデルに基づき分離効率を予測し、最適な操作条件を迅速に決定する手法へと移行している。本研究においても、PEG 化タンパク質のクロマト溶出挙動に対する数学的モデルの適応と分離条件の決定への応用を検討した。

## 2. 研究の目的

本研究では、タンパク質のクロマトグラフィー分離において確立された数学的モデルを用いて、PEG 化タンパク質修飾異性体のイオン交換クロマトグラフィーにおける保持溶出機構を記述し、得られたパラメータとそれぞれの構造異性体の構造特性の関係を明らかにする。さらに、PEG 化タンパク質の立体構造を制御し、高効率な分離を達成することを目的とする。

## 3. 研究の方法

## (1) PEG 化タンパク質の生成

末端に活性化基 (NHS, マレイミド基) を有する PEG ( $M_w = 5000 \sim 40000$ ) とタンパク質を回分式反応器内で混合することで PEG 修飾反応を行った。

モデルタンパク質には hen egg white lysozyme ( $M_w \approx 14300$ ) および bovine serum albumin (BSA,  $M_w \approx 65000$ ) を用いた。

## (2) イオン交換クロマトグラフィーにおける保持溶出挙動の解析

スルホニル基や Quaternary ammonium 基を導入したアガロース、セルロース、ポリメタクリレートベースとするイオン交換担体を用いて、塩濃度直線勾配溶出法・pH 勾配溶出法により、イオン交換担体の保持溶出挙動の解析を行った。各条件下で得られた溶出塩濃度からイオン交換クロマトグラフィー担体上での吸着サイト数、イオン交換平衡パラメータの値を決定した。

## (3) PEG 化タンパク質の構造特性解析

サイズ排除クロマトグラフィー、電気泳動、動的光散乱法を用いて分子半径を決定した。また蛍光分光光度計を用いて  $300 \sim 400 \text{ nm}$  における蛍光スペクトルを測定し 3 次構造の解析を行った。分子拡散係数は Taylor 法に基づき細管におけるパルス応答曲線から決定した。

## 4. 研究成果

## (1) イオン交換クロマトグラフィーにおける PEG 化タンパク質修飾位置異性体の分離機構

イオン交換クロマトグラフィーを用いて塩濃度勾配溶出法 (liner salt gradient elution, LGE) により PEG 化タンパク質を分離した場合、PEG 修飾数の多い順にカラムから溶出されることが分かっているが修飾位置異性体がどのように溶出されているのかは明らかにされていない。このため、LGE で溶出された各フラクション (Fig. 1) を Hubboch らにより提案されている pH グラジエント法により分析し、修飾位置異性体の溶出順を調べた。

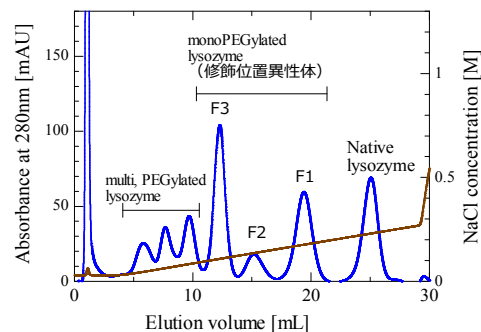


Fig. 1 PEG 化 lysozyme のイオン交換クロマトグラフィーにおける溶出曲線  
塩濃度直線勾配溶出法 pH7

Hen egg white lysozyme は 6 つの lysine 残基を有しており、N 末端のアミノ基を含め 1 分子当たり 7 個の被修飾アミノ基が存在する。Lysine 残基の pKa は周囲のアミノ酸の影響により、それぞれ異なりプロテインデータバンクにより提供される結晶構造に基づき (PDB#:1E8L)、propKa を用いてそれぞれの pKa を計算した (Table 1)。また、Henderson-Hasselbalch 式により各 pH における PEG 化 lysozyme 修飾位置異性体の表面電荷を計算し (Fig. 2)、等電点 pI を決定した (Table 1)。

Table 1 lysozyme に含まれる lysine 残基 (K) の pKa と PEG 化 lysozyme の pI

	K1	K13	K33	K96	K97	K116
pKa	10.38	10.83	9.73	10.34	10.38	10.15
pI	10.74	10.76	10.71	10.72	10.74	10.78

pI (native lysozyme): 10.84

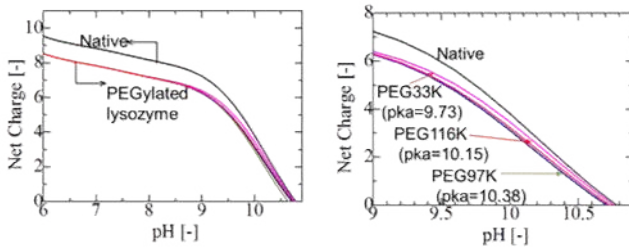


Fig.2 PEG 化タンパク質位置異性体の表面電荷

この結果、修飾された lysine 残基の pKa が低いほど、等電点は native タンパク質から低下することが分かった (Table 1)。これらの結果を基に pH グラジエントにおける PEG 化タンパク質位置異性体の修飾 lysine 残基を決定し LEG における位置異性体の溶出順を決定した (Fig. 3)。

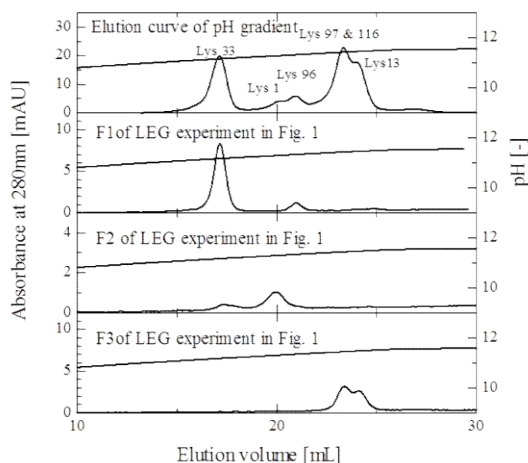


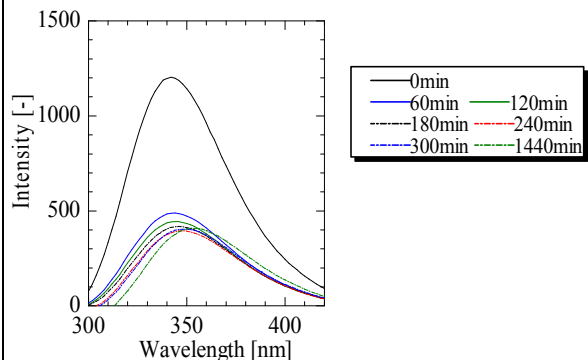
Fig.3 pH グラジエント法による PEG 化 lysozyme 修飾位置異性体の修飾位置の同定

LEG における PEG 化タンパク質位置異性体の溶出順は pH グラジエント同様であり pKa の低い lysine 残基が修飾されたものほど早く溶出されることが分かった。一方、Fig.2 に示すように LEG を行っている pH7 では、修飾位置異性体間での表面電荷の差はほとんど無く、イオン交換担体との 1 分子当たりの吸着部位数の値も native lysozyme とほとんど変わらない<sup>(2)</sup>。この為、イオン交換担体は PEG 化タンパク質位置異性体の表面電荷の差に基づき分離を行っているのではなく、各 lysine 残基との結合強度の違いにより位置異性体の分離を行っているものと考えられる。

(2) 変性 PEG 化タンパク質のイオン交換クロマトグラフィーにおける保持溶出挙動 修飾位置異性体の修飾 lysine 残基が PEG 化タ

ンパク質全体の構造に寄与する影響、および立体構造の違いがイオン交換担体との結合に及ぼす影響を調べるために、PEG 化 lysozyme の変性過程および変性 PEG 化 lysozyme のイオン交換担体における保持特性を解析した。LEG により分画した F1 および F3 のフラクションを回収し、遠心ろ過により濃縮後、8 M 尿素および 0.01 M DTT により変性を行った。変性過程における蛍光スペクトルはいずれも長波長側にシフトしており 3 次構造が崩壊していることが確認できた (Fig.4)。

(a) native lysozyme



Mono PEGylated lysozyme

(b) F1 in Fig.1

(c) F3 in Fig.1

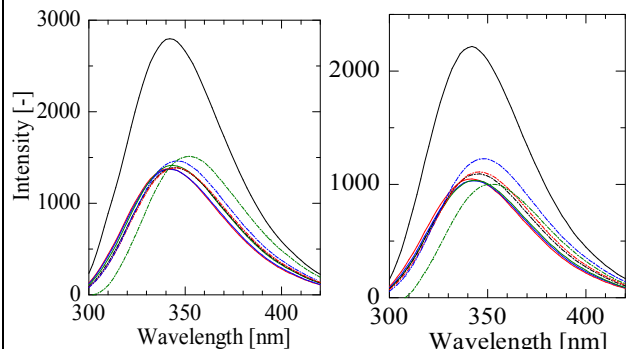


Fig.4 native lysozyme および PEG 化タンパク質修飾位置異性体の変性過程における Trp 蛍光スペクトル

これまで native 構造を有している PEG 化タンパク質は Trp 蛍光スペクトルに変化はなく PEG 修飾により 3 次構造の変化が起こらないと報告されている。しかし、変性開始後 120 min 間における蛍光スペクトルの最大吸収波長は native タンパク質よりも短く、3 次構造の崩壊速度が native タンパク質よりも遅いことが示唆された。また、Fig.5 に、完全変性させた PEG 化 lysozyme の LEG における溶出曲線を示す。

いずれの PEG 化 lysozyme も塩濃度グラジエント開始前にカラムから溶出されるものが多く、またカラムに保持されたものもグラジエント開始直後に溶出され、その溶出位置は異性体間で差は無かった。これらは、立体構造を崩壊させた場合、各 lysine 残基とイオン交換基との結合強度の差も減少することを示し、修飾位置異性体の

分離には lysine 残基近傍の立体構造が重要であることが示唆された。

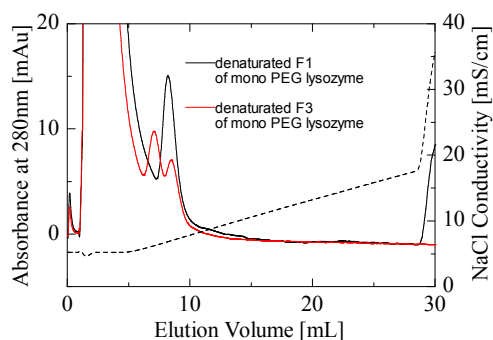


Fig. 5 変性PEG化lysozymeのイオン交換クロマトグラフィーにおける溶出曲線

### (3) PEG化DNAのイオン交換クロマトグラフィーにおける保持溶出挙動

変性構造のPEG化タンパク質とイオン交換担体との結合を決定する上で立体構造が重要であることが示唆されたが、凝集などの副反応によりタンパク質の変性構造を維持するのは困難であった。この為、3次構造を有さない荷電性のモデル分子としてオリゴヌクレオチド(DNA)を用い、修飾PEG分子がイオン交換担体との電気的相互作用に及ぼす影響について調べた。

9TのDNA ( $M_w = 2676$ )の末端に分子量2000のPEGを修飾し、イオン交換クロマトグラフィーでLEGにより未反応の9T DNAとPEG化9T DNAを分離した結果をFig.6に示す。

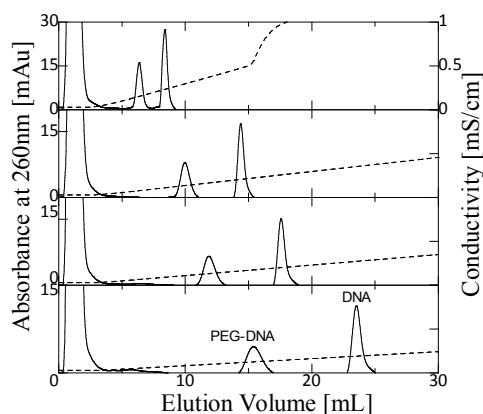


Fig. 6 PEG化DNAのイオン交換クロマトグラフィーにおける溶出曲線  
DNA:9T PEG:2K Column:QA monolith

PEGは電荷を持たないにもかかわらず、負電荷を有するDNAと正電荷を有するイオン交換担体との電気的相互作用は阻害され、未修飾のDNAよりも溶出塩濃度が大きく阻害される結果となった。またグラジエントボリュームとともに溶出塩濃度は低下しておりイオン交換担体との電気的相互作用には一定のイオン交換平衡が成立していることが分かった。各グラジエントボリュームに対して溶出塩濃度をプロットしたところ直線関係が得られ(Fig. 7)、この直線からイオン交

換担体における吸着サイト数  $B$  とイオン交換平衡定数を含むパラメータ  $A$  を算出した(Table 2)。PEG化DNAの溶出塩濃度は修飾したPEGの分子量が増加するに下がって、減少したが吸着サイト数  $B$  の値は、いずれのPEG化DNAも未修飾のDNAと、ほぼ同等の値を示し、PEG修飾に伴い結合様式が変化していないことが分かった。一方、パラメータ  $A$  の値はPEG分子量の増加とともに低下しており、修飾PEGの存在により結合強度の低下がイオン交換担体との電気的相互作用の減少をもたらしていることが示唆された。また、これらの結果からイオン交換担体はPEG化DNAの正味の電荷を認識しているのではなく、立体構造の違いを認識して分離していることを示すものと考えられる。

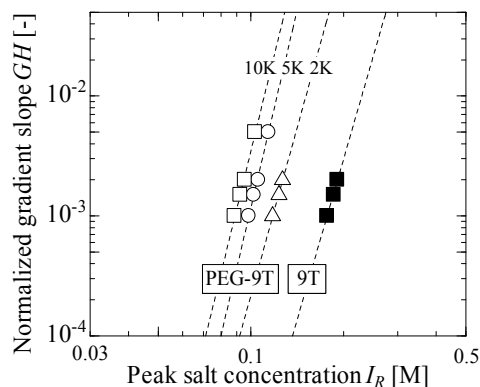


Fig. 7 LGEにおける塩濃度勾配とPEG化DNAの溶出塩濃度の関係  
DNA:9T Column:QA monolith

Table 2 PEG化DNAのクロマトパラメータ

	吸着サイト数 $B$	パラメータ $A$
9T	8.1	$1.98 \times 10^{-5}$
PEG2K-9T	8.3	$2.59 \times 10^{-7}$
PEG5K-9T	10.0	$8.70 \times 10^{-10}$
PEG10K-9T	9.5	$8.85 \times 10^{-10}$

### (4) PEG化タンパク質のイオン交換クロマトグラフィーにおける細孔内拡散特性

クロマトグラフィー分離は速度差分離であり、その分離効率は拡散により支配される。また、イオン交換担体内における細孔内拡散はバルク水溶液よりも制限されており、分子拡散係数よりも大幅に低下する可能性がある。この為、PEG化タンパク質の分子拡散係数  $D_m$ 、クロマト担体における細孔内拡散係数  $D_s$ 、水和半径との関係について調べた。動的光散乱法により計測したPEG化BSAの水和半径はConan Feeらにより提案された推算式<sup>(3)</sup>で算出される値とほぼ一致し、また分子拡散係数  $D_m$  はTaylor法により測定した値と一致することが分かった(Table 3)。また、PEG化タンパク質の分子拡散係数は水和半径を用いて次の相関式で記述できることが明らかになった(Fig. 8)。

$$D_m \times 10^{10} = 1.06 \times 10^{13} M_w^{-1.22} \quad (1)$$

Table 3 PEG 化 BSA の水和半径と分子拡散係数

	$R_h$ [nm]		$D_m \times 10^{10}$ [m <sup>2</sup> /s]	
	推算式 <sup>1)</sup>	DLS	Taylor 法	DLS
PEG20K	6.0	5.4	0.44	0.46
PEG40K	7.8	7.6	—	0.32

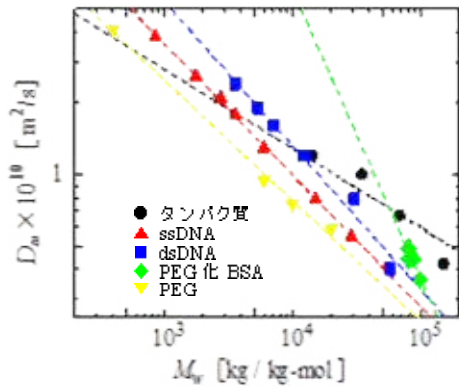
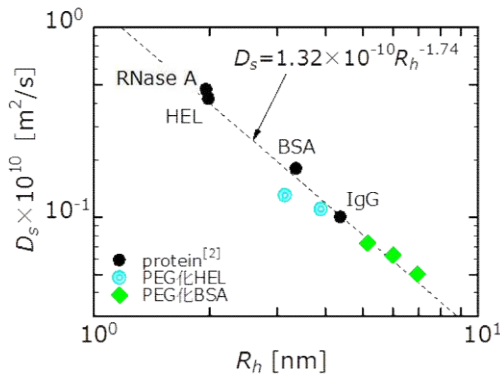


Fig.8 Taylor 法により求めた分子拡散係数と分子量の関係

高塩濃度の条件でイオン交換担体の電氣的相互作用が生じない条件で測定した細孔内分子拡散係数  $D_s$  も  $R_h$  に対してよく相関され (Fig. 9 (a))、分子拡散係数  $D_m$  からの低下率である  $D_s/D_m$  と分配係数  $K$  の間にも良い相関関係が得られることが分かった (Fig.9 (b))。以上より非吸着の条件下では細孔と分子半径の相対値により細孔内拡散係数さらにはピーク幅も決定できることが分かった。

(a) 細孔内拡散係数



(b) 分子拡散係数からの低下率

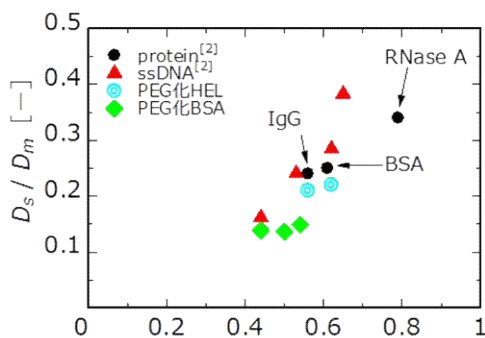


Fig.9 細孔内拡散係数と水和半径および分配係数の関係

さらに、実際分離で用いられる LGE における細孔内拡散係数についても調べた。

流速を変化させて LGE を行うと、流速の上昇とともにピーク幅は増大し、圧縮因子を考慮しピークの分散値  $\sigma$  から次式により算出した理論段高さ HETP と流速  $u$  の間には直線関係が得られた (Fig. 10)。

$$\text{HETP} = Z/L^2(\sigma/V_R)^2 \quad (2)$$

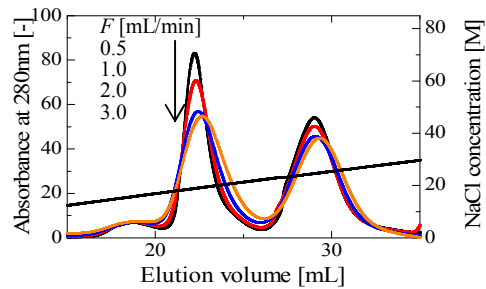
ここで、 $L=M^{1/2}$  ( $M<0.25$ )、 $3.22M/(1+3.13M)$  ( $0.25<M<12$ )、 $1$  ( $12<M$ )

また  $M = 1/2 (1+HK_R/1+HK^2) (B+1/B)$  である。さらに、 $u$ -HETP プロットの傾き  $C^0$  から細孔内拡散係数  $D_s$  を (3)、(4) 式で求めた。

$$\text{HETP} = A^0 + C^0 u \quad (3)$$

$$D_s = (d_p^2/30 C^0) \{HK/[1+HK^2]\} \quad (4)$$

(a) PEG 化 BSA 溶出ピークの流速依存性



(b)  $u$ -HETP プロット

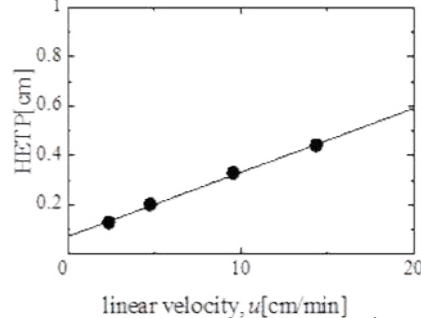


Fig.10 LEG における PEG 化 BSA 溶出ピークの流速依存性  $M_{\text{PEG}} = 12000$   
Column: Q Sepharose HP ( $Z = 15$  cm、 $d_p = 34$   $\mu\text{m}$ 、 $\varepsilon = 0.33$ )

また、溶出塩濃度における分配係数  $K_R$  は吸着サイト数  $B$  とパラメータ  $A$  を用いて次式で算出した。

$$K_R = A \cdot I_R^{-B} \quad (5)$$

この結果、LEG における  $D_s$  は修飾 PEG 分子量が増加するにつれて  $K_R$  とともに減少することが分かった (Fig. 11)。一方、 $K_R$  と分子拡散からの低下率  $D_s/D_m$  の値で評価したところ修飾 PEG の分子量によらず  $K_R(D_s/D_m) = 0.15$  でほぼ一定になることがわかった。この

ことから PEG 化タンパク質の溶出ピークの幅はカラム内の滞留時間と充填剤細孔と物質の大きさの相対比によって決まる拡散抵抗で一律に決定されることが分かる。塩濃度勾配溶出実験で得られた  $K$  と  $D_S$  は PEG 化 BSA の修飾 PEG 分子量が増加するにつれてともに減少した。一方、修飾 PEG 分子数、塩濃度勾配に関わらず  $K_R(D_S/D_m)$  は一定の値となることが分かった。

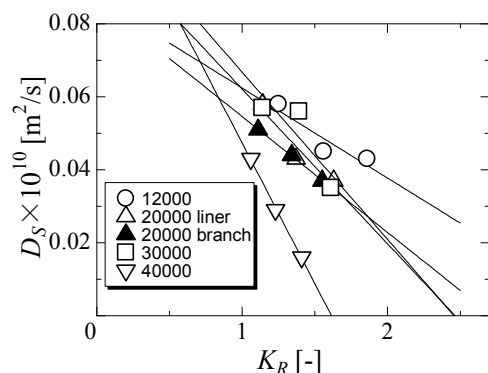


Fig.11 LEG における PEG 化 BSA の細孔内拡散係数と分配係数の関係

<引用文献>

- (1) J. Hubbuch *et. al*, *J. Chromatogr. A*, **1268**, pp. 102 (2012)
- (2) S, Yamamoto *et. al*, *Biotechnol. J.*, **5**, pp. 477 (2010)
- (3) C. J. Fee, *et. al*, *Bioconjugate Chem.*, **15**, pp.1304 (2004)

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 1 件)

1. Yu Isakari, Ales Podgornik, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto, S., "Monolith disk chromatography separates PEGylated protein positional isoforms within minutes at low pressure", *Biotechnology Journal*, 11(1), pp. 100 – 106, (2016)

[学会発表] (計 3 件)

1. 飯盛遊, 吉本則子, 山本修一, “モノリスイオン交換クロマトグラフィーにおける PEG 化タンパク質異性体の分離機構” 化学工学会第 81 年会、関西大学(大阪府吹田市) (2016. 3. 15)
2. 石川怜史, 吉本則子, 山本修一, “クロマトグラフィーにおける PEG 化タンパク質の移動現象に基づく細孔内拡散係数と分配係数の測定” 化学工学会第 81 年会、関西大学(大阪府吹田市) (2016. 3. 14)
3. Yu Isakari, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto, 'Analysis of chromatographic separation for PEGylated proteins on the basis of their diffusion behaviours in porous

particles', Proceedings of MMPE2014, p45, Hamburg (Germany), Sep. 26, 2014

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 則子 (YOSHIMOTO, Noriko)

山口大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40432736

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし