

平成 30 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：2016～2017

課題番号：16K18301

研究課題名(和文)モノリス型マイクロ細孔の表面修飾と物質移動に基づいたタンパク質PEG化反応の加速化

研究課題名(英文)Surface modification of monolithic pore for solid phase protein PEGylation based on its mass transfer

研究代表者

吉本 則子(YOSHIMOTO, Noriko)

山口大学・大学院創成科学研究科・助教

研究者番号：40432736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では拡散抵抗が低減されるモノリスイオン交換担体をタンパク質の位置選択的なPEG修飾反応場として応用することを検討した。反応収率および反応の選択性を制御する因子として担体細孔内での物質移動特性とタンパク質の結合特性に着目し、モノリス細孔のサイズおよびリガンド密度がそれらに及ぼす影響を調べた。その結果、いずれのモノリスにおいても拡散抵抗が無視小であること、タンパク質一分子当たりのリガンドとの結合数は細孔サイズ、リガンド電荷密度に関わらず一定であることを明らかにした。さらに、PEG化反応において反応操作温度を上昇させることにより位置選択性を維持したまま20%まで収率を向上させることができた。

研究成果の概要(英文)：Site-specific PEGylation of proteins was examined by applying a monolithic ion exchange chromatography with low diffusional resistance. The mass transfer property within pores and the binding of proteins to solid phase were focused as the factors dominating the yield and selectivity of the reaction. The effects of pore size and density of ligands of monolithic supports on the above factors were clarified. Negligible mass transfer resistance was observed with respect to any monolithic supports used. The number of binding sites was unaffected by pore size and the density of ligands. Furthermore, the reaction yield was improved from 5% to about 20% by increasing reaction temperature while the site-specificity of reaction was maintained.

研究分野：Bioseparation

キーワード：モノリス クロマトグラフィー PEG化タンパク質 固相反応

1. 研究開始当初の背景

タンパク質にポリエチレングリコール (PEG) を修飾することで、生体安定性を大幅に増加させることができる。この PEG 修飾には、一般的にはタンパク質中の lysine 残基の ε-アミノ基が用いられる。lysine 残基はタンパク質表面に存在することが多く反応は容易に進行する。しかし、複数の lysine 残基が表面に存在した場合、同時に反応が進行するため、複数の修飾異性体が生成する。これら修飾異性体の分子サイズ・表面電荷は類似しており分離は容易ではない。

PEG 化タンパク質修飾異性体の分離にはイオン交換クロマトグラフィー (IEC) が用いられ、修飾数・修飾位置の異なる異性体の分離が可能であることが報告されている。この IEC を反応に応用し、タンパク質を静電相互作用により担体に結合させると、反応部位を減少させることが可能となる。固体表面に面した部位を反応から保護し bulk 液界面に露出された部位のみを修飾することができる。さらに、静電相互作用による結合は塩濃度・pH により強度が変化するため、固体表面へのタンパク質の結合・脱着は比較的温和な条件で制御できる。このため、固体表面上で生成した PEG 化タンパク質は、通常のクロマトグラフィー分離操作により精密分離することができるようになる。

しかし、数 nm を超える高分子のクロマト細孔における拡散係数 (細孔内拡散係数) は bulk 溶液における分子拡散係数の数分の 1 以下に低下しており、液相反応と比べて不利になる点が多い。そこで本研究では、細孔内拡散抵抗のない連続した貫通孔を有するモノリス型クロマト担体をタンパク質の固相反応場として応用することを試みた。モノリス型クロマト担体の細孔サイズは数 μm であり、従来の微粒子型クロマト担体が数十~数百 nm であるのに対して非常に大きい。また、硬い基材を使用することにより、空隙率も 0.6 程度まで高い値を実現している。さらに基材とカラム骨格が一体化しており、チューブ状、ディスク状などの多様な形状をとることが可能である。このため、高流速でも性能を維持したまま操作が可能となり、生産性の高いプロセスを構築することが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、モノリス型イオン交換担体をタンパク質 PEG 化反応の固相反応場として応用し、反応収率の向上に向け、モノリス細孔のサイズ・リガンド構造、反応操作条件の最適化を行うことを目的とした。種々の細孔構造におけるタンパク質の保持溶出挙動からクロマト分離の機構モデルに基づいて解析し、その保持特性と物質移動特性を明らかにすることとした。また、さまざまな反応操作条件において PEG 化反応を行い、反応機構を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

3. 1 モノリス担体におけるタンパク質の保持・物質移動特性の評価

(1) 使用したモノリスカラム担体

Table 1 に示す細孔サイズおよびリガンド密度の異なるモノリスイオン交換担体を使用した。細孔サイズの異なる担体は、BIA separation より供与を受け、リガンド密度の異なる担体はリガンド修飾前の担体を Prof. Ales Podgornik より供与してもらい、80°C の恒温槽内で修飾反応を行った。

Table 1 使用モノリスカラム

(a) 細孔サイズの異なるチューブ状カラム\*1

リガンド	細孔サイズ $d_p$ [μm]
強アニオン交換リガンド	1.5
QA	2.0
弱アニオン交換リガンド	6.0
DEAE and EDA	1.5
strong cation exchanger	2.0
SO3	6.0

\*1 チューブ状モノリス (CIMmultus™, BIA separation, Slovenia) の規格を下記に示す。

基材 : Poly(glycidyl methacrylate-co- ethylene dimethacrylate)、カラム体積  $v_t = 1\text{ mL}$ 、チューブ外径  $d_{e1} = 18.6\text{ mm}$ 、チューブ内径  $d_{e2} = 6.7\text{ mm}$ 、チューブ高さ  $Z = 4.2\text{ mm}$ 、空隙率  $\epsilon = 0.62$

(b) リガンド密度の異なるディスク状カラム\*2

ligand	ligand modification time [h]
SO3	4
	8
	24
	48

\*2 ディスク状モノリスの規格を下記に示す。  $d_p = 1.5\text{ μm}$ 、 $\epsilon = 0.62$ 、disk volume  $v_t = 0.02\text{ mL}$ ；ディスク内径  $d_c = 3\text{ mm}$ 、 $Z = 3\text{ mm}$

(2) モノリス細孔の評価

(2-1) 透過係数の決定

モノリスカラムに純水を通液し、その際の圧力損失  $\Delta P$  [Pa] を測定した。移動相の線速度  $u$  [m/s] に対してカラム長さで規格化した圧力損失  $\Delta P/Z$  をプロットし (Fig. 1)、次式より透過係数  $L_p$  を決定した。

$$L_p = \frac{u\mu^2}{\Delta P} \quad (1)$$

ここで、 $\mu$  は移動相粘度 [Pa·s] である。

(2-2) リガンド密度の決定

イオン交換基の緩衝能により、カラム溶出液の pH は、カラムに通液させている移動相の pH 変化に対して遅れが生じる。この pH 応答性のシフト量とリガンド密度の間には良い相関関係がある。そこで、それぞれの pH 応答体積  $\tau$  [mL] を (Fig. 2)、細孔表面積で規格化し、相関関係に基づいてリガンド密度を見積もった。

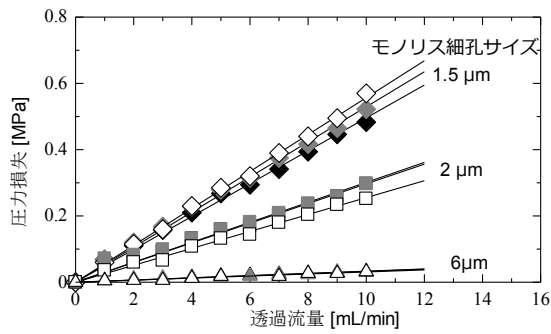


Fig.1 モノリスカラムに純水を通液した際の線速度と圧力損失の関係<sup>1-1</sup>

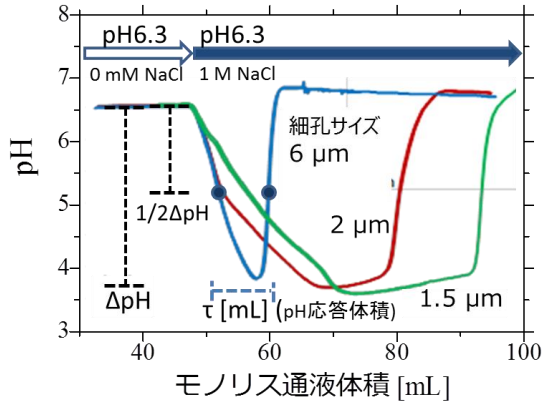


Fig.2 モノリスカラムの pH 応答性<sup>1-1</sup>  
塩を含まない 20 mM リン酸緩衝液(pH 6.3)を用いてカラムを平衡化し、移動相を段階的に 1 M NaCl を含む 20 mM リン酸緩衝液(pH=6.3)に切り替えカラムに通液させた。(リガンド

(2-3) タンパク質吸着容量の決定  
一定濃度のタンパク質溶液を供給し、カラム溶出液中に吸着せずに溶出してきたタンパク質濃度を測定し、破過曲線を得た。また 0.2 mL のモノリスディスクの場合、体積が小さ過ぎるために、正確な破過点を測定することが困難であった。このため、破過点まで吸着させた後、塩により脱着させた際のタンパク質の溶出ピークより吸着量を求めた。

### (3) モノリス細孔におけるタンパク質の保持・物質移動特性

各種モノリスにおけるタンパク質の保持特性を解析するために塩濃度勾配溶出実験を行い、カラム固相体積  $V_s (= \epsilon V_t)$  [mL] で規格化した塩濃度勾配  $GH (= g^* V_s, g: \text{塩濃度勾配} (= (I_{\max} - I_0) / V_g, I_{\max}: \text{最終塩濃度 [M]}, I_0: \text{初期塩濃度 [M]}, V_g: \text{勾配体積 [mL]})$  [M] と溶出塩濃度  $I_R$  [M] よりタンパク質の吸着サイト数  $B$  を次式に基づいて決定した (Fig. 3)。

$$GH = I_R^{(B+1)} / A(B+1) \quad (1)$$

$$A = K_c \Lambda^B \quad (2)$$

ここで  $K_e$  はイオン交換平衡定数、 $\Lambda$  はイオン交換容量である。また、物質移動特性を示す指標として溶出ピークの標準偏差  $\sigma$  [mL] とカラム溶出塩濃度  $I_R$  [M] を用いて理論段相当高さ HETP を求めた。

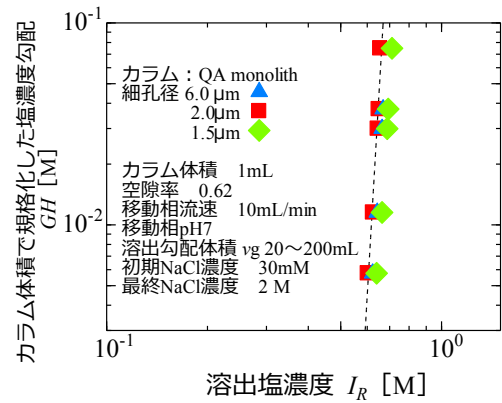


Fig.3 塩濃度勾配溶出法における溶出塩濃度と塩濃度勾配の関係<sup>1-1</sup>

$$\text{HETP} = Z^* (\sigma / V_R)^2 \quad (3)$$

$$V_R = V_0 + K_R \cdot V_s \quad (4)$$

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

### 3. 2 モノリス細孔におけるタンパク質 PEG 化固相反応操作

Polyethylene glycol (PEG) succinimidyl carbonate activated PEG (SUN BRIGHT ME-050CS (NOF)、分子量  $M_r = 300-20,000$ ) を PEG 修飾剤として使用、CIM SO3 monolith カラムを PEG 化反応の反応器として使用した。低塩濃度の移動相でタンパク質をカラムに吸着させ、その後、活性化 PEG 溶液をカラムに通液させることで PEG 化反応を開始した。その後、活性化 PEG 溶液は 0.5 mL/min の流量で 24 時間、一定温度でカラムを循環させた。PEG 溶液の循環を終了させた後、低塩濃度の移動相でカラムを洗浄し、徐々に移動相の塩濃度を増加させ生成した PEG 化タンパク質および未反応のタンパク質をカラムから回収を行った。

### 4. 研究成果

#### 4.1 モノリス細孔特性とタンパク質保持・物質移動特性の関係

Fig. 1 に示すようにモノリスに純水を通した際の圧力損失はいずれのリガンド種においても細孔サイズが大きくなるほど低下した。その傾きは細孔径の 2 乗に依存して増加する結果となった (傾き 0.053 ( $d_{\text{pore}} = 1.5 \mu\text{m}$ ), 0.029 ( $d_{\text{pore}} = 2 \mu\text{m}$ ), 0.0033 ( $d_{\text{pore}} = 6 \mu\text{m}$ ))。これより、モノリス細孔における圧力損失  $\Delta P$  は毛管束モデルにより次式で記述することが可能であることが分かり、さらにいずれの細孔径の担体においても空隙率は一定 ( $\epsilon = 0.62$ ) であることが確認できた。

$$\begin{aligned} \Delta P &= 32 \mu Z d_c^{-2} u \\ &= C_2 \mu Z d_{\text{pore}}^{-2} (F_v / A_c \epsilon) \quad (6) \end{aligned}$$

ここで、 $d_c$  は細孔を一つのキャピラリーとした際の細孔径であり、 $C_2$  は比例定数、 $F_v$  は移動相体積流量、 $A_c$  はカラム断面積である。ま

た、pH に対する応答性は細孔サイズが低下し、表面積が増加するほど遅れが大きくなった (Fig. 2)。遅れ幅を pH 変化の 50% で読み取ると、細孔サイズの 2 乗、すなわち表面積に比例して増加し、細孔サイズが変わってもリガンド密度が一定の状態、表面積の増加によりリガンド容量が増大していることが明らかとなった。一方、リガンド修飾の反応時間によりリガンド密度を変化させたモノリスを使用した場合、反応時間が増加するにつれて圧力損失、pH 応答に対する遅れ幅が増大する傾向が見られた。反応時間が 24h と 48h のものは既に市販の CIM S03 monolith disk (BIA separation) と同等の値をとり、反応時間 24h でリガンド密度はほぼ飽和することが分かった。

タンパク質の吸着容量に対する細孔サイズの影響を調べたところ、細孔サイズが小さいものほど同様に表面積の増大に伴い吸着量が増加する結果となった (Fig. 3)。また、分子量の大きなタンパク質ほど吸着量が多いことが分かる。

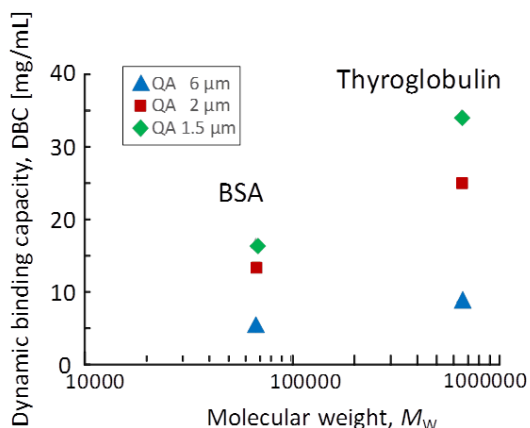


Fig. 3 タンパク質の吸着量と細孔サイズの関係<sup>1-1</sup>

リガンド密度の異なるモノリスにおいてもリガンド密度の増加とともに吸着量の増加が見られたが、密度の低い細孔では、タンパク質の非特異的な吸着により回収量が著しく低下し正確な吸着量を測定することは出来なかった。

lysozyme、cytochrome C、ribonuclease A の 3 種類のモデルタンパク質を用い、吸着サイト数  $B$  の値を調べたところ、細孔径、リガンド密度に関わらず  $B$  の値はほぼ一致することが分かった (Fig. 4)。細孔径の異なるモノリスの場合、Fig. 3 に示すように溶出塩濃度もほぼ一致し、これらのリガンド密度が等しいことがこの結果からも確認できる。リガンド密度の異なるモノリスの場合、リガンド密度の増加とともに  $A$  の値のみが増加する結果となった。

吸着サイト数  $B$  の値は、pH が低下しタンパク質の等電点から離れるほど増加し (Fig. 4)、ラクtofエリンでは 12、抗体では 20 近い値を示し、いずれのモノリスにおいてもタンパ

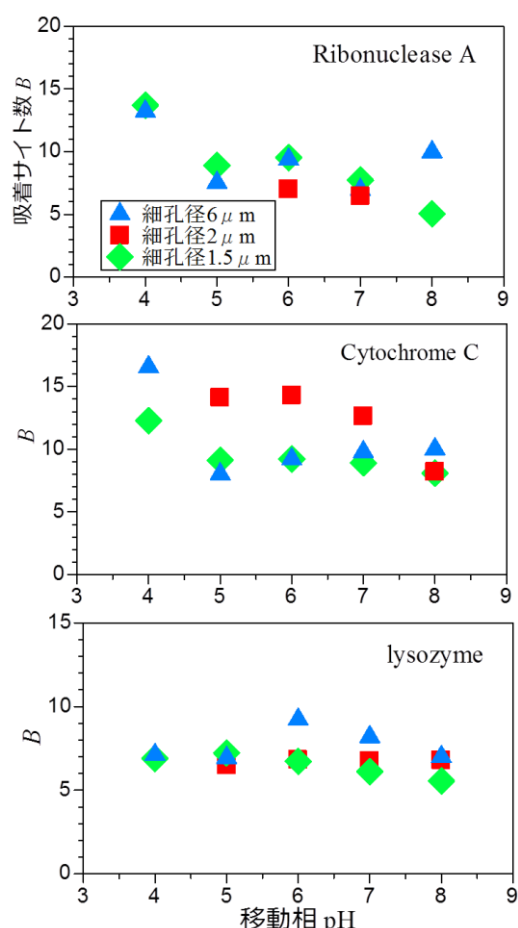


Fig. 4 タンパク質の吸着サイト数  $B$  と細孔サイズの関係<sup>1-1</sup>

ク質の表面電荷を反映した吸着サイト数の値が得られることが分かった。また、これらの吸着サイト数の値は従来の多孔性微粒子型カチオン交換担体のものとほぼ同等であった。また、塩濃度勾配溶出法により理論段相当高さ HETP を解析した結果、6 μm の細孔でわずかに大きい値を示したが、ほぼいずれの値もほぼ同等であり、分配係数  $K_R$  の増加とともに低下していくことが分かった。これらの値はディスク状のモノリスと一致し、本研究で用いたモノリス担体には拡散細孔が存在していないことを示している。

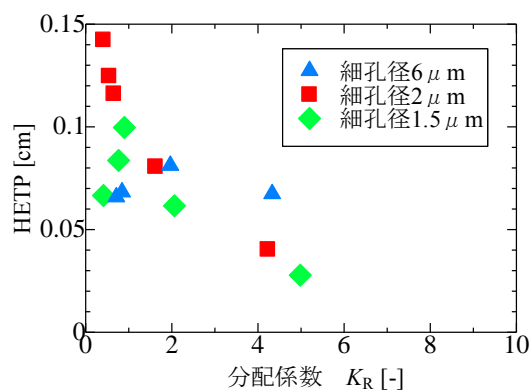


Fig. 5 HETP と細孔サイズの関係<sup>1-1</sup>

#### 4.2 モノリス細孔におけるタンパク質 PEG 化反応

従来の多孔性微粒子型イオン交換担体にタンパク質(hen egg white lysozyme)のPEG化反応を行った場合、PEG 修飾部位に対して高い選択性が得られるものの反応収率は液相反応と比較して著しく低下した。この原因として、物質移動が細孔内の拡散律速であることに加えて生成したPEG化タンパク質による細孔閉塞等の原因が考えられた。そこで、4.1で示したように拡散抵抗の無いモノリス担体をタンパク質の固相反応場として用いた。吸着容量およびタンパク質の保持特性解析によって得られた吸着サイト数 $B$ およびパラメータ $A$ から、各塩濃度条件における分配係数 $K_d (= AT^B)$ を計算し、分配係数および吸着密度を塩濃度により制御しPEG化反応を行った。

活性化PEGの加水分解を抑制するために4°Cの条件でPEG化反応を行った場合、モノPEG化タンパク質のみが選択的に生成したが、その収率は低くいずれの条件においても予想に反して微粒子型担体よりも大幅に低い5%程度の収率しか得られなかった(Fig. 6)。タンパク質の吸着密度を低下した条件でPEG化反応を行った場合、反応収率は大幅に減少した。また、反応時の塩濃度を上げて分配係数の低い条件で反応を行った場合、反応収率はわずかに低下したものの、PEG化タンパク質の分配係数が10程度の条件でPEG化反応を行った場合、PEG化タンパク質の生成と同時に移動相中に脱着していく挙動が確認された。

一方で、移動相PEG濃度をタンパク質の固相濃度に対して24倍まで増加させ室温まで反応温度を上昇させた場合、反応の選択性を維持したまま20%近くまでmono-PEG化タンパク質の反応収率を向上させることができた。これらの種々の条件検討の結果、本研究で用いたモノリスの基材表面からの排除が反応収率に大きく影響していると考えられる。このため、今後は未反応タンパク質の再利用も含め反応プロセスの生産性を向上させる反応操作条件の探索を行う必要がある。

#### 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2件)

1-1. Ales Podgornik, Masataka Hamachi, Yu Isakari Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto, Effect of pore size on performance of monolithic tube chromatography of large biomolecules, ELECTROPHORESIS, 査読有、Volume 38, Issue 22-23, pp. 2892-2899, (2017) DOI: 10.1002/elps.201700258

1-2. 濱地 正嵩、吉本 則子、山本 修一、巨大なタンパク質やバイオナノ粒子の拡散係数の測定方法、日本食品工学会誌、

査読有、Vol. 18, No. 4, pp. 187-191, (2017)

DOI: 10.11301/jsfe.17499

[学会発表] (計4件)

2-1. Yoshimoto Noriko, Kishi Yuhi, Ales Podgornik, Yamamoto Shuichi, Control of protein PEGylation reaction on the solid phase, 化学工学会第83年会、2018年3月、大阪

2-2. Hamachi Masataka, Simoes Cardoso Joao Carlos, Yoshimoto Noriko, Yamamoto Shuichi, Retention and Diffusion Behaviours of Large Biomacromolecules in Chromatography Solid Phase, Third International Symposium on Multiscale Multiphase Process Engineering, May, 2017, Toyama

2-3. 荒川侑弥、吉本則子、山本修一、ミニチュア化モノリスディスクの調製とその特性評価、化学工学会中国四国支部大会 宇部大会、2016年12月、宇部

2-4. 岸雄飛、吉本則子、山本修一、連続型タンパク質の固相PEG化反応プロセスの構築、化学工学会中国四国支部大会 宇部大会、2016年12月、宇部

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 則子 (YOSHIMOTO, Noriko)

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授  
研究者番号: 40432736

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山本 修一 (YAMAMOTO, Shuichi)

山口大学・大学院創成科学研究科・教授  
研究者番号: 80144921

(4) 研究協力者

Aleš Podgornik (PODGORNIK, Ales)

リュブリャナ大学(スロベニア)・教授