

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06921

研究課題名(和文)モノリス型混合作用吸着材料の開発とタンパク質・ペプチド精製プロセスへの応用

研究課題名(英文) Development of mixed-mode monolith-type adsorption materials and their application to purification process of proteins and peptides

研究代表者

田中 孝明 (Tanaka, Takaaki)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：00217043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ医薬品等のタンパク質・ペプチドの分離精製に用いられることを目指して、混合作用モノリス型吸着材料の開発を行った。高分子製のモノリス骨格部分を相分離法を用いて多孔質となるように作製し、主として混合吸着作用を有するヒドロキシアパタイト粒子の複合化を行った。高分子にはポリメチルメタクリレートとポリ乳酸を用いた。作製した材料の吸着性能の評価を行い、モデル系として牛血清アルブミンと牛γ-グロブリンなどが分離できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患や癌の治療に抗体(γ-グロブリン)などのバイオ医薬品の製造技術の進化が求められている。2020年には新型コロナウイルス感染症COVID-19によるサイトカインストームの抑制にも抗体医薬の投与が検討されている。このような状況の中でモノリスクロマトグラフィーを用いたオンラインモニタリングなど、バイオ医薬品の分離精製・分析が迅速・簡便に行われることがますます期待されている。本研究で開発した混合作用モノリスは操作条件についてはさらなる検討が必要なものの、これらの用途に利用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study mixed-mode monolith-type adsorption materials were developed to be used in separation and purification of proteins and peptides in biopharmaceuticals production. Porous monoliths were prepared from polymers (poly(methyl methacrylate) and poly(lactic acid)) via phase separation methods. Hydroxyapatite particles that have mixed-mode (multimodal) type adsorption property were mainly composited with the monoliths. The prepared monoliths have adsorption abilities toward model proteins. For example, bovine serum albumin and bovine gamma-globulin were separated by one of the developed monoliths.

研究分野：生物化学工学

キーワード：バイオセレーション モノリス 吸着材料 タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイオ医薬品の生産において分離精製プロセスの最適化は抗体医薬や生理活性ペプチドなどの普及の鍵を握っている。現在のところ、多種類の分子が溶解している溶液から目的分子を取り出すためには、吸着剤微粒子を円筒状の容器に充填したカラムクロマトグラフィーが主として用いられている。カラムクロマトグラフィーではイオン交換・疎水性相互作用・アフィニティー相互作用など種々の原理で分離が行われるが、近年注目されているのは混合作用クロマトグラフィーである。混合作用クロマトグラフィーでは、複数の吸着機能を用いるため、比較的安価な吸着材料で分離が困難な目的物質も分離可能となる。一方、吸着材料の利用形態に関しては、圧密化による圧力損失が大きい粒子充填型カラムクロマトグラフィーに対して、圧縮強度の高いモノリス型クロマトグラフィーが注目されるようになってきている。

2. 研究の目的

上記の背景の下、本研究課題では混合作用のクロマトグラフィーとモノリス型クロマトグラフィーを組み合わせたモノリス型混合作用吸着分離材料の開発とそのタンパク質・ペプチドへの分離に関する応用研究を目的とした。研究代表者の田中は相分離法を用いた多孔質材料の開発とタンパク質・ペプチドの探索研究を、研究分担者の山本はタンパク質等のクロマトグラフィー分離の研究を、同じく研究分担者の木村はヒドロキシアパタイト等の無機材料研究を行っている。各研究者の強みを生かし、連携して研究を進めた。

3. 研究の方法

ポリメチルメタクリレートなどの高分子を多孔質化したモノリスとヒドロキシアパタイトや高分子電解質を複合させて混合作用モノリス型分離材料の開発を行った。当初、分離対象としてはタンパク質やペプチドを用いることを検討したが、ペプチドは定量と検出に時間と費用がかかるため、分子量の小さなタンパク質で代用し、主としてタンパク質で分離実験を行った。タンパク質の定量にはビシンコニン酸法を用いた。混合タンパク質の分離の場合にはSDS-PAGEを用いて分離の状況を確認した。混合作用モノリスの作製には相分離法で作製した高分子モノリスに各種吸着材料を複合化して作製した。複合化する混合作用型吸着材料にはヒドロキシアパタイト、メチルメタクリレート-メタクリル酸-共重合体、キトサン誘導体を検討した。

4. 研究成果

(1) モノリス骨格作製

モノリスの骨格の高分子多孔質材料としてポリメチルメタクリレートとポリ乳酸を検討したが、高分子としてポリメチルメタクリレートを用いた場合は溶媒としてアルコール-水-混合溶媒を用いた熱誘起相分離法にて、ポリ乳酸の場合は1,4-ジオキサン-Tween 80 混合液を溶媒、水を非溶媒とする非溶媒誘起相分離法にて、それぞれ、混合作用を有する吸着材料と複合化できる可能性がある多孔質材料を作製できることが分かった。

(2) モノリス骨格に複合させる吸着材料の検討

ポリメチルメタクリレートは高イオン強度では疎水性相互作用を有することが期待されるので、混合作用を付加するために、下記のヒドロキシアパタイトの複合化と並行して、陽イオン交換型のメチルメタクリレート-メタクリル酸-共重合体の複合化を試みたが、陽イオン交換作用によるタンパク質の吸着性が見られなかった。また、陰イオン交換型のキトサン誘導体の場合は第四級アンモニウム塩の官能基を有する誘導体の合成はできたが、その後のモノリスとの複合化のための架橋が容易ではなかった。そこで、陽イオン交換-陰イオン交換の混合相互作用を有するヒドロキシアパタイトを中心に混合作用モノリスを作製することを検討した。

(3) ヒドロキシアパタイトナノ粒子を複合化したポリメチルメタクリレートモノリスの作製

まず、比較的合成が容易な長さ数百 nm の針状のヒドロキシアパタイトナノ粒子を調製し、エタノール-水-混合溶媒を用いてポリメチルメタクリレートを多孔質化するときに添加して混合作用モノリスを作製した。走査型電子顕微鏡でモノリス断面を観察すると、モノリス内でのヒドロキシアパタイトの分散性が悪かった。これは、ヒドロキシアパタイトを合成した後に乾燥させると乳鉢で粉碎してもポリメチルメタクリレート溶液中で十分に分散しなかったためと考えられた。そこで、ヒドロキシアパタイトを乾燥させる前に界面活性剤 Tween 80 の溶液に分散させてから濾過後に乾燥させることを試みた。その結果、モノリス内でのヒドロキシアパタイトの分散性は高まったが、凝集部分が見られた (図 1 (a))。そこでヒドロキシアパタイトを乾燥させずに複合化することを検討した。そのために溶媒を 1-プロパノール-水-混合溶媒に変えた。1-プロパノール (bp. 97.5 °C) の場合はエタノール (bp. 78.3 °C) の場合よりも高い水分含量でもポリメチルメタクリレートを溶解でき、類似の 2-プロパノール (bp. 82.4 °C) よりも沸点が高

いため、高温での溶解が可能となる。このことを利用して、合成後に濾過で捕集した含水ヒドロキシアパタイト中の水分量を測定し、その水分と1-プロパノール-水-ポリメチルメタクリレート-溶液の相図を元に含水ヒドロキシアパタイトの添加量を計算して複合モノリスを作製した。その結果、図1(b)に示すように分散したヒドロキシアパタイトを複合化したポリメチルメタクリレート製モノリスを作製することができた。

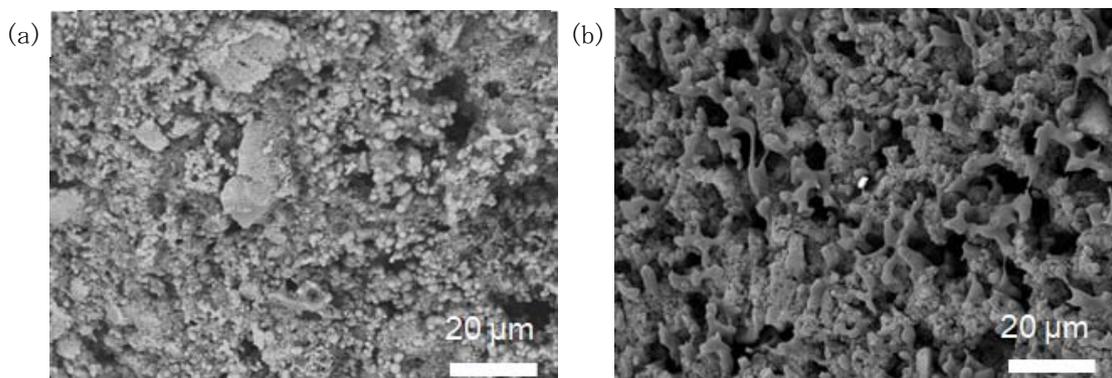


図1 ヒドロキシアパタイトを複合化したポリメチルメタクリレートモノリスの断面。
(a) エタノール-水-混合溶媒と Tween 80 で処理した乾燥ヒドロキシアパタイトを用いた場合。
(b) 1-プロパノール-水-混合溶媒と湿潤ヒドロキシアパタイトを用いた場合。

(4) ヒドロキシアパタイト複合化ポリメチルメタクリレートモノリスの分離特性

このモノリスを用いてタンパク質の吸着特性を調べた。モノリス表面と底面の密な部分を除去後、厚さ 2 mm、直径 13 mm の円盤状に成型し、ステンレス製のフォルダーに装着した (図2 (a))。このフォルダーをシリンジに接続し (図2 (b))、タンパク質溶液や緩衝液を通液した。牛血清アルブミン (BSA, 66 kDa) と牛 γ -グロブリン (BGG, 160 kDa) に加えて、ペプチドの代替として分子量の小さい鶏卵白リゾチーム (LSZ, 14 kDa) の吸着実験を行った。10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8 or 7.0) 中では3種類のタンパク質とも複合モノリスに吸着したが、BSA よりも BGG や LSZ の方が吸着しやすい傾向が見られた。また、400 mM リン酸ナトリウム緩衝液を用いる (pH 6.8 or 7.0) と吸着したタンパク質が溶出した。



図2 ステンレス製フォルダー内のモノリス (a)とシリンジに装着した状態(b)

複数のタンパク質の分離のモデル系として BSA と BGG の混合タンパク質の吸脱着実験を行った。BSA の吸着を抑制するためにはリン酸ナトリウム緩衝液の濃度を 20 mM に高めると良いことが分かった。図3に分離実験の例を示す。B γ とA①のレーンを比較すると分子量 66 kDa の BSA が吸着されずに BGG の H 鎖と L 鎖が吸着されていることが分かる。A② (と A③) では BGG も破過していた。20 mM のリン酸ナトリウム緩衝液でモノリスを洗浄後 (W①, W②), 400 mM リン酸緩衝液で溶出すると最初の 1.5 mL に濃縮された BGG が溶出された (D①)。BSA も若干溶出されていたが、洗浄時に 20 mM よりも少し高い濃度のリン酸緩衝液を用いることにより、除去できると考えられる。

作製したモノリスを図2と同様であるが、HPLC用の接続部品を溶接したフォルダーに装着し、HPLCを用いた吸着実験を行ったところ、BSAよりもBGGの方がより吸着する傾向が示されたが、シリンジを用いた場合と比較すると分離性能が低かった。用いたHPLCポンプの脈流が原因と考えられ、脈流の少ないポンプの必要性が示唆された。

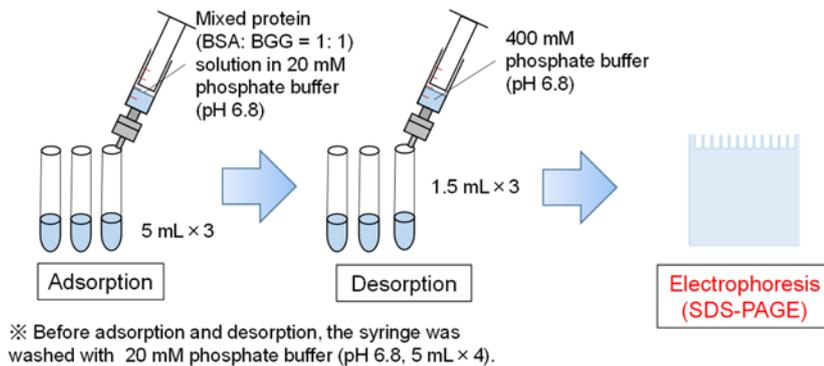
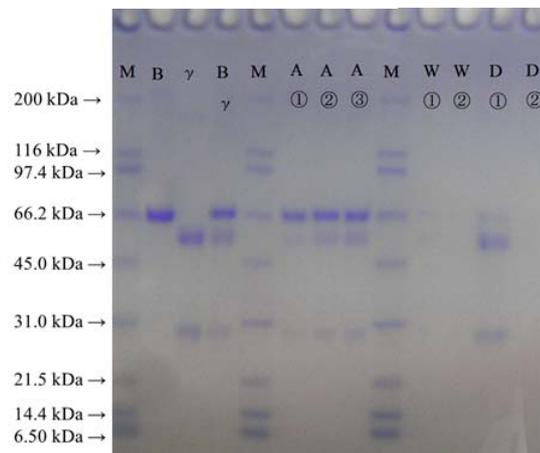


図3 混合タンパク質と混合作用モノリスを用いた吸脱着実験(上)と SDS-PAGE を用いた分析(右)

M: protein molecular weight makers, B: BSA, γ : BGG, B γ : mixed proteins, A① to A③: adsorption① to ③, W① to W②: washing① to ②, D① to D②: desorption① to ②



(5) ホロータイプヒドロキシアパタイト粒子とポリ乳酸との複合モノリスの作製と評価

W/O/W エマルション法により合成した直径 1 μm のホロータイプヒドロキシアパタイト粒子(図 4 (a)) は高いタンパク質吸着力を示した(図 4 (b)~(d))。こちらのヒドロキシアパタイト粒子は、デプスフィルター状のポリ乳酸多孔質材料(引用文献[1])に濾過を用いて複合化するとモノリス型膜状吸着材料を作製できた。作製した材料の断面を EDS-SEM で観察したところ、ポリ乳酸多孔質中に界面活性剤を用いて発達させた指状孔構造が複合化に有効であったことが分かった(図 4 (e)~(h))。この複合モノリスを用いると BGG の吸着回収ができることが示された(引用文献[2])。ナノサイズのヒドロキシアパタイトがマイクロメートルサイズの粒子を構成していることが複合化と吸着性能の鍵であったが、(3)で用いた粒子と比較すると粒子の合成に時間と費用が掛かる点が課題である。

(6) 得られた成果の国内外での位置付けと今後への展望

自己免疫疾患や癌の治療に抗体 (γ -グロブリン) などのバイオ医薬品の製造技術の進化が求められている(引用文献[3])。2020 年には新型コロナウイルス感染症 COVID-19 によるサイトカインストームの抑制にも抗体医薬の投与が検討されている。このような状況の中でモノリスクロマトグラフィーを用いたオンラインモニタリングなど、バイオ医薬品の分離精製・分析が迅速・簡便に行われることがますます期待されている(引用文献[4])。本研究で開発した混合作用モノリスは操作条件についてはさらなる検討が必要なものの、これらの用途に利用されることが期待される。

<引用文献>

- [1] H. Minbu, A. Ochiai, T. Kawase, M. Taniguchi, D. R. Lloyd, T. Tanaka, Preparation of poly(L-lactic acid) microfiltration membranes by a nonsolvent-induced phase separation method with the aid of surfactants, *J. Membr. Sci.*, 479, 85-94 (2015).
- [2] T. Tanaka, Y. Takai, A. Nagase, K. Teraguchi, H. Minbu, A. Ochiai, I. Kimura, M. Taniguchi, Protein adsorption characteristics of nanoparticle-assembled hollow microspheres of hydroxyapatite and their composites with PLLA microporous membranes, *Heliyon*, 5, e01490 (2019)
- [3] 大政健史, 集中研における研究開発と神戸 GMP 施設そして高度製造に向けて, *生物工学*, 97, 422-425 (2019).
- [4] 吉本則子, 山本修一, バイオ医薬品ダウンストリームクロマトグラフィーの効率化, *生物工学*, 97, 393-396 (2019).

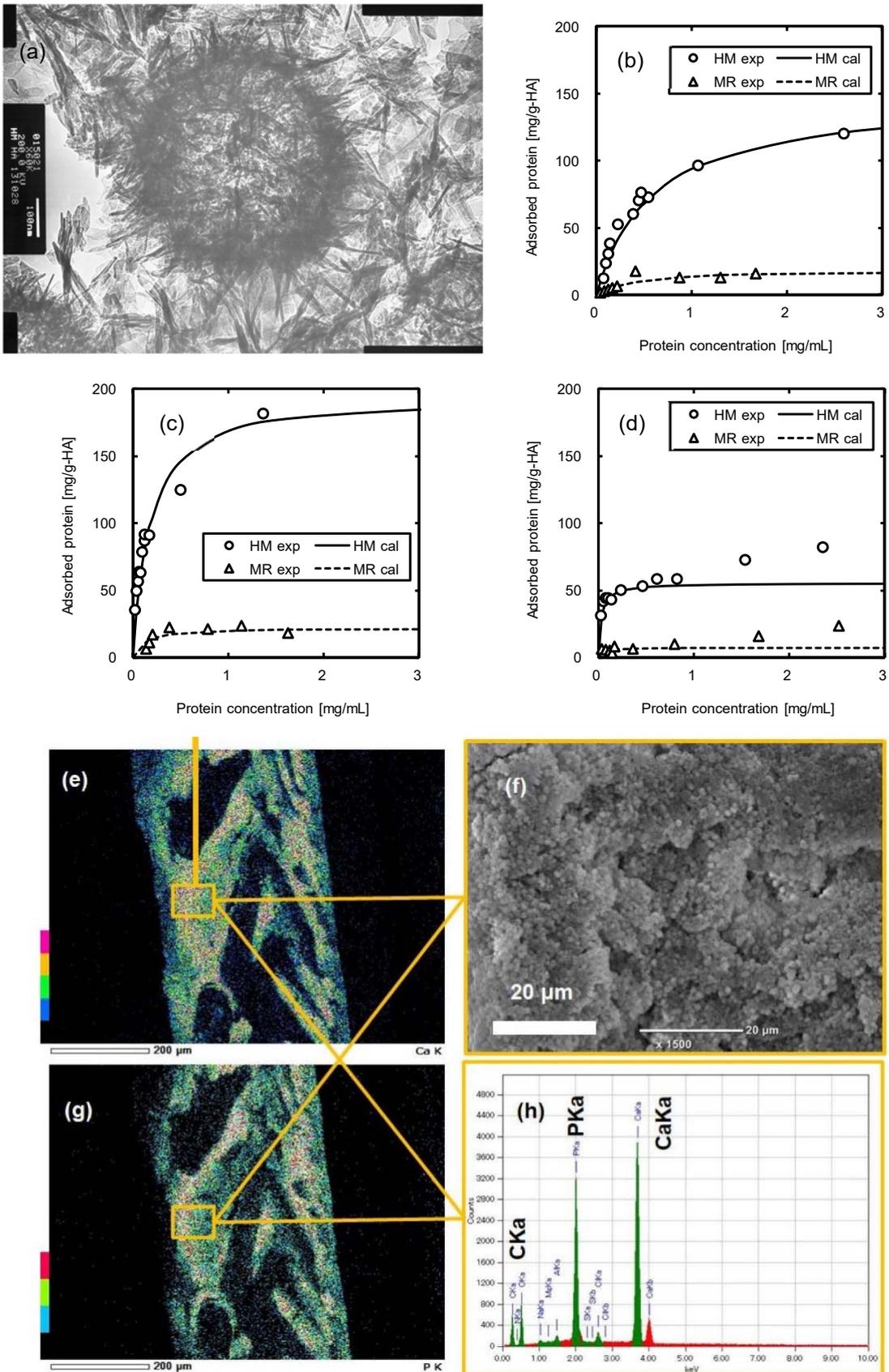


図4 ホロータイプヒドロキシアパタイト粒子 (HM) とポリ乳酸との複合モノリス。(a) ホロータイプヒドロキシアパタイト粒子の TEM 写真。(b)-(c) HM とタンパク質 (BSA (b), BGG (c), LSZ (d)) の吸着曲線。MR は HM と同程度の大きさの市販の棒状ヒドロキシアパタイト粒子。cal は Langmuir 型吸着曲線。(e) 複合モノリス断面中の Ca の分布を示す EDS-SEM 写真。(f) Ca と P の多い部分の断面の SEM 写真。(g) 複合モノリス断面中の P の分布を示す EDS-SEM 写真。(h) EDS スペクトル。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka Takaaki, Takai Yoshihiko, Nagase Akifumi, Teraguchi Kazuki, Minbu Hiromi, Ochiai Akihito, Kimura Isao, Taniguchi Masayuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Protein adsorption characteristics of nanoparticle-assembled hollow microspheres of hydroxyapatite and their composites with PLLA microporous membranes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e01490 ~ e01490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2019.e01490	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 高橋夏海, 山田愛, 落合秋人, 谷口正之, 田中孝明
2. 発表標題 PMMA-ヒドロキシアパタイト複合モノリスの作製とタンパク質吸着特性
3. 学会等名 日本膜学会第40年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中孝明, 高井慶彦, 長瀬明史, 寺口一樹, 民部裕洋, 落合秋人, 木村勇雄, 谷口正之
2. 発表標題 ナノヒドロキシアパタイト集合体の中空マイクロスフィアのタンパク質吸着特性
3. 学会等名 化学工学会第84年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ai Yamada, Natsumi Takahashi, Akihito Ochiai, Masayuki Taniguchi, Takaaki Tanaka
2. 発表標題 PREPARATION OF POROUS SURFACE, MEMBRANE AND MONOLITH OF PMMA BY USING ALCOHOL/WATER MIXED SOLVENTS
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Fusion Technology 2018 at Niigata (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤澤まりの, 高橋夏海, 落合秋人, 谷口正之, 田中孝明
2. 発表標題 PMMA-ヒドロキシアパタイト複合モノリスを用いたタンパク質の分離
3. 学会等名 日本膜学会第41年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Natsumi Takahashi, Marino Fujisawa, Ai Yamada, Akihito Ochiai, Masayuki Taniguchi, Takaaki Tanaka
2. 発表標題 Protein separation using PMMA-HA composite monolith
3. 学会等名 The 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 修一 (Yamamoto Shuichi) (80144921)	山口大学・大学院創成科学研究科・教授(特命) (15501)	
研究分担者	木村 勇雄 (Kimura Isao) (00169921)	新潟大学・自然科学系・教授 (13101)	