

(5) 生物学的親和性クロマトグラフィーにおける分子認識機構と移動現象の解析による新規高度バイオセンサーの開発

研究代表者 工学部 山本 修一

研究目的

生体分子の分離分析（センシング）には欠かすことのできないクロマトグラフィーは溶質とカラム固定相との平衡関係（分子認識）で分離が行われる。分子認識と拡散混合は独立ではなく、リガンドと溶質の相互作用の大きさや分布、さらには立体的配置により吸脱着拡散速度は著しく変化する。さらに、複数の相互作用が協調的に働くと分離挙動は一層複雑となる。本研究では分子認識機構と移動現象（拡散混合機構）を同時に解析し、新規高分離性能クロマトグラフィーバイオセンサーを開発することを目的とする。特に生体巨大分子（抗体、ウイルス）を対象とする。

研究成果

adeno virus は遺伝子治療のベクターとしての利用が考えられておりクロマトグラフィーによる高度精製は重要な操作となる。また、parvo virusなどは血液製剤から除去することが要求されている。virusのクロマトグラフィー分子認識機構の解明は重要な課題である。

Fig. 1, 2には巨大分子サイズ排除曲線とHETPデータの例を示す。半径10nm以上の粒子は従来超遠心で分離精製されていたが、クロマトグラフィーによる分離とキャラクター化が有効であることが明らかとなった。またHETPと移動相線速度uの関係についてFig. 2に示す。このデータからサイズ排除クロマトグラフィーにおける細孔内拡散などの物質移動（輸送）現象について解析している。今後はadeno virusなど他のvirus粒子のクロマトグラフィー保持機構を検討する予定である。

Hepatitis B surface antigen(以下HBsAg)は20 nm程度の直径を持つ巨大な粒子として存在することが知られている[5]。このような巨大分子の精製

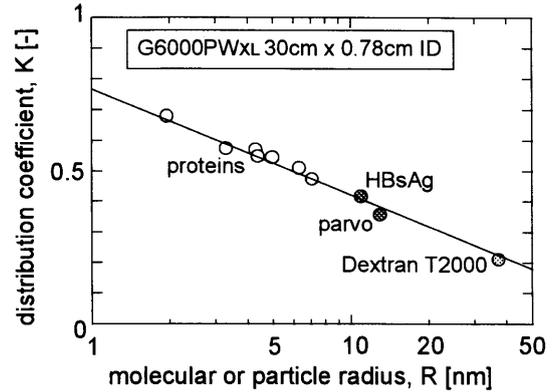


Fig. 1 Size exclusion curve. 分配係数Kはピーク保持容量から算出し、標準球状タンパク質の等価半径あるいはデキストランの粘性半径に対してプロットしている。HBsAgはhepatitis B surface antigen particleであり直径22nmの粒子として、parvo (human parvo virus B19)は直径26nmとしてプロットした。分子排除特性曲線 (size exclusion curve)はよく相関されている(相関係数0.99)。G6000PWは特に巨大分子に適しているhigh performance exclusion chromatography column (Tosih)である。

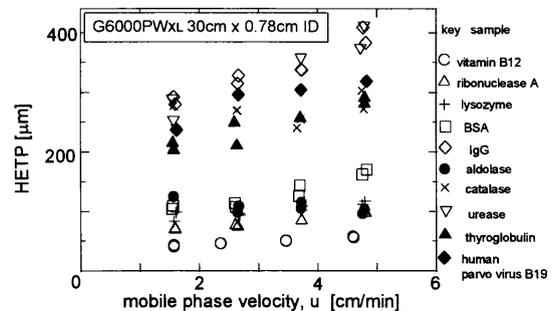


Fig. 2 HETP vs. mobile phase velocity u, $HETP = Z(w/t_R)^2/8$ で算出した。ここでZはカラム長、wはC=0.368 C_{max} におけるピーク幅 (C_{max} 、ピーク高さ)、 t_R はピーク保持時間である。HETP-u曲線の傾きから細孔内拡散係数が求められる。

方法としては大きな細孔径を持つ従来型のクロマトグラフィー充填剤を使用する方法の他に、粒子表面のみを利用する方法や、リガンドの三次元的配置を持つゲルを埋めこんだゲルなどが考えられる。架橋

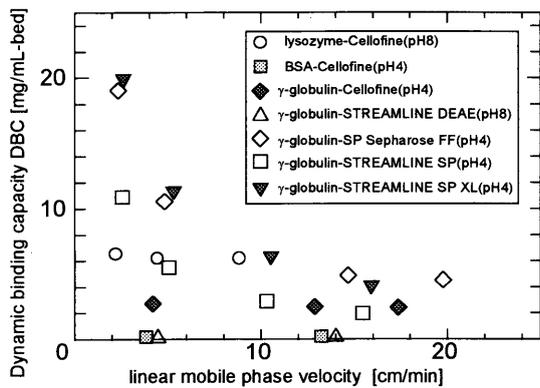


Fig. 3 Dynamic binding capacity DBC vs. mobile phase velocity. 動的吸着容量 DBC は破過曲線の10%破過容量 V_B とベッド体積 V_t 試料初濃度 C_0 から $DBC = C_0 V_B / V_t$ で計算した。Streamline は200 μm -agarose bead, Sepharose FF は90 μm -agarose bead, Cellofine=75 μm -Sulfated Cellulose bead である。SP=sulphopropyl, DEAE=diethylamonoethyl, BSA=bovine serum albumin.。BSA-SP Sepharose FF (pH4) で $DBC=47$ at 17cm/min のデータが得られているが、スケールの関係で Figure 中には表示していない。

度が高いセルロース粒子に硫酸基を導入した吸着剤 (cellulose) の分子排除特性から分子量数万以上のタンパク質は排除されることがわかった。Cellulose は HBsAg に対して強い親和性を持ち通常の IEC より効率良く吸脱着精製が可能であった。また、IgG に対しても親和性を示し表面吸着のみであるにもかかわらず吸着速度が早いために動的吸着量は通常のゲル型 IEC 充填剤とほぼ同じ程度となった (Fig. 3)。ただし BSA には親和性を示さず他の IEC ゲルとは異なる分子認識機構があることが示唆された。

産業技術への貢献

HIV (AIDS) をはしめとするウイルス性疾患や癌の臨床診断、タンパク質・ペプチド医薬品の工業分離プロセス、高性能分析手段、工業分離プロセスにおけるオンラインモニタリングと多岐にわたる。さらに研究の延長線上には遺伝子診断および治療への応用が期待できる。

研究発表

- 1) 山本修一ら、「コンポジットゲルによるタンパク質吸着吸着機構」、化学工学会第31回秋季大会、G219、p-94、1998、9.29
- 2) S. Yamamoto & E. Mlyagawa: Retention behavior of very large biomolecules in ion-exchange chromatography, 8th International symposium on the separation of proteins, peptides & polynucleotides, 1998.11.2, Vienna, Austria 235, p2.20
- 3) S. Yamamoto et al., "Resolution and retention of proteins near the isoelectric points in ion exchange chromatography", American Chemical Society Annual meeting, 1999

グループメンバー

氏名	所属	職 (学年)
山本 修一	工・応用化学工学	教授
久保 英己	工・応用化学工学	D1
石原 尚	キリンビール(株)	研究員
富川 英二	富士レビオ(株)	主任研究員
A. Jungbauer	オーストリア農大	教授
加藤 滋雄	神戸大学・工	教授

連絡先

TEL: 0806-35-9419 FAX: 0836-35-9933
E-mail: shuichi@po.cc.yamaguchi-u.ac.jp