

溶媒によるクロマトグラフィーの制御

荒川 力¹, 江島 大輔², 津本 浩平³, Pete Gagnon⁴

(¹Alliance Protein Laboratories)

(²味の素株式会社)

(³東京大学大学院新領域創成科学研究科)

(⁴Validated Biosystems)

1. 初めに

タンパク質の調製は、タンパク質製剤の開発にとっては勿論のこと、低分子薬剤開発の研究手段としても必須である。タンパク質の精製はいろいろなクロマトグラフィーを駆使してなされるが、クロマトグラフィーの働きを支える主役はなんと言っても塩である。塩の濃度や種類を変えることによってタンパク質のカラムへの結合や、カラムからの溶出が制御される。例えば疎水性クロマトグラフィー (HIC) の場合は硫酸アンモニウムやリン酸、イオン交換クロマトグラフィー (IEC) の場合は塩化ナトリウムが汎用される。しかしこれらの塩で常に良好な分離や、回収率が得られるとは限らない。最近、クロマトグラフィーの分離・分析能を改善するために、新たな溶媒を利用する技術が開発されている。ここでいう溶媒とは、0.1M 以上の溶質を含む水溶液を指す。本稿ではクロマトグラフィーにおける溶媒の利用方法について、最近の進展も含めて解説する。

2. ゲル濾過カラムへのタンパク質の吸着を防ぐ

ゲル濾過 (サイズ排除クロマトグラフィー, SEC) はタンパク質製剤の承認申請にとって最も重要な分析データである。SEC で会合体や断片の量が許容範囲内であることを示さないと承認されないといっても過言ではない。SEC の最大の問題はタンパク質の樹脂担体への吸着である。特に会合体が選択的に吸着しやすい。米国当局 (FDA) は会

合体の存在の有無を、SEC だけではなく分析用超遠心やその他の方法でも確認するよう製薬会社に要求している。そのためタンパク質の樹脂への吸着を防ぐ努力がなされる。しかしながら、この努力がかえって分析対象となるタンパク質溶液の実態を反映させないことになってしまうこともある。例えば、カラムからのタンパク質の溶出を促進するためアセトニトリル (AN) がしばしば使われるが、この溶媒は会合体の解離を促進する。事実、会合体を含んでいるサンプルを AN 存在下で SEC により分析すると会合体の量は大幅に減少する。同じサンプルを AN 溶液で超遠心分析しても、同じく会合体が消えてしまう (注, AN 存在下での超遠心分析はセルを傷めてしまうので勧められない)。また AN はタンパク質の変性剤でもあることから、SEC 分析への使用は勧められない。AN は疎水結合を弱めることによって、タンパク質のカラムへの結合を防ぐが、その影響はタンパク質間相互作用や分子内相互作用にも影響してしまい、会合体の解離や、タンパク質の変性が起こる。アルコールもしばしば使われる。しかしながら、これらの有機溶媒は、確かに疎水的相互作用は弱めるものの、静電的相互作用を強めるので、逆にカラムへの吸着を促進することがある。

静電的相互作用は塩濃度を高めれば防ぐことが可能である。実際、SEC ではある程度の濃度の塩化ナトリウムを展開溶媒に加えたり、高濃度のリン酸緩衝液を用いたりすることが多い。特に高濃度のリン酸緩衝液は SEC の分離能向上に効果がある場合が多い。しかしながら、リン酸、塩化ナトリウムともに濃度の上昇が、疎水的相互作用を強めてしまう。有機溶媒とは逆の効果で、タンパク質のカラムへの吸着を高めうる。我々は 0.2M 以上のアルギニンの添加が、調べた限りでは普遍的にタンパク質のカラムへの吸着を防ぐことを見出した。その一例として図 1 にアクチビンの SEC の結果を示す¹⁾。アクチビンの SEC はこれまで成功した例がない。図 1A に示すように、塩化ナトリウ

Solvent modulation of chromatography

Tsutomu Arakawa (Alliance Protein Laboratories, 3957 Corte Cancion, Thousand Oaks, CA 91360, USA), Daisuke Ejima (Ajinomoto Co. Inc., 1-1 Suzuki-cho, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-8681, Japan), Kouhei Tsumoto (The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa 277-8562, Japan), and Pete Gagnon (Validated Biosystems, 240 Av Vista Montana, Suite 7F, San Clemente, CA 92672, USA)

テクニカルノート

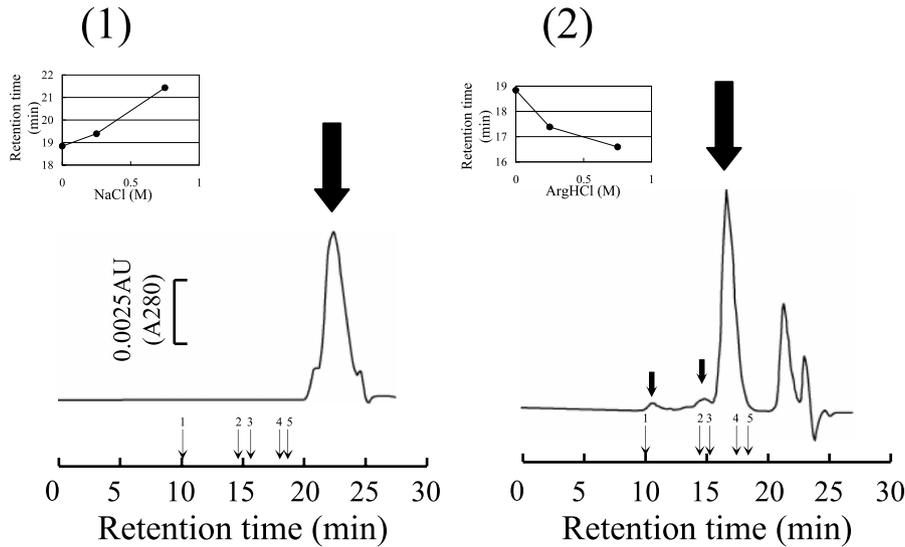


図1 アクチビンのゲル濾過 (SEC) による分析

(1) は 0.75M 塩化ナトリウム存在下, (2) は 0.75M アルギニン存在下での分析結果である. 大きな矢印は天然状態のアクチビン, 小矢印は会合体を示している. 挿入図は天然状態のアクチビンの溶出位置と塩化ナトリウム濃度 (1), アルギニン濃度 (2) との相関を表す. ArgHCl はアルギニンが塩酸塩として存在していることを示している. 矢印 1-5 は分子量マーカーの位置. 文献 1 より抜粋した.

ムを展開溶媒に添加するとアクチビンは低分子と同じ位置 (21 分) に溶出してくる. これはアクチビンがカラムと相互作用し, その溶出が遅れたため, たまたま塩と一緒に溶出されてきたものと思われる. これは 0.75M の塩化ナトリウムを用いた場合であるが, むしろ塩化ナトリウム濃度にとともにより吸着が強くなる傾向を示す. 一方アルギニンを添加するとアクチビンの溶出位置が徐々に前に移動し, 0.75M アルギニンの存在下では完全に塩の前に溶出する (図 1B), またアクチビン会合体はさらにその前に溶出する. アクチビン活性二量体が低分子からも, 会合体からも分離されることを示している.

図 2 に抗体の会合体分析の結果を示す. 現在医薬品開発において抗体製剤に大きな関心が集まりつつある. 抗体は極めて会合しやすく, その会合体分析は抗体製剤開発にとって必須である. その際, 最も大きな問題は会合体のカラムへの吸着である. 図 2A はそれを顕著に示している¹⁾. 0.1M リン酸を含んでいるにもかかわらず, この SEC の結果を見れば, 会合体含量はほとんど存在しない, と解釈することになる. さらに 0.2~0.4M の塩化ナトリウムを添加しても分析結果はほとんど同様である (図 2B と C). ところが, 展開溶媒に 0.2M のアルギニンを加えると会合体のピークをはっきり見出すことができる (図 2D). またモノマーの収率も上がり, 全体で約 2.4 倍のタンパク質が溶出している. 図 2A と比べても会合体の存在は明瞭である. このサンプルは 50% ほどの会合体を含むことが分

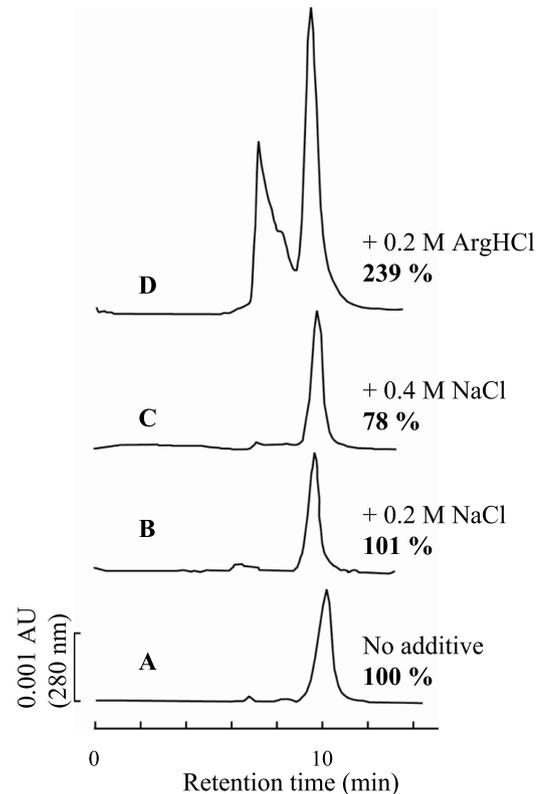


図2 モノクローナル抗体のゲル濾過 (SEC) による分析
B と C は塩化ナトリウム, D はアルギニンの存在下での結果. 右の数字は添加物なしでの A に対する回収率を示している.

かっていた。これはアルギニンが会合体を作ったのではなく、アルギニンなしではカラムに吸着してしまう会合体がアルギニンで溶出されたからである。実際アルギニン存在下での会合体量は超遠心などの分析結果とよく一致する。

3. ヒドロキシアパタイト；CHT (ceramic hydroxyapatite)

一般的な CHT の操作では低濃度のリン酸存在下でタンパク質をカラムに結合させ、リン酸濃度を上昇させることによりタンパク質を溶出する。分離や回収率を塩化ナトリウム濃度で調整することも行われる。このような静電的相互作用が中心となっている場合、有機溶媒の添加はそれを強め、塩の添加はそれを弱めるのみとなり、溶媒による分離・分析能の向上は期待しにくい。ところがポリエチレングリコール (PEG) は非常に面白い効果を示す。図 3 に示すように抗体を CHT カラムに 10mM のリン酸緩衝液中で結合させ、リン酸濃度を 0.5M まで直線的に上昇させてタンパク質を溶出すると、主要ピークと同時に高濃度リン酸側に会合体に相当するピークが得られる。この溶出溶媒側 (0.5M リン酸) に PEG を添加しておく、PEG とリン酸の両方の濃度が同時に直線的に増加することになる。そのような濃度勾配を導入することによりモノマー、会合体どちらのピークにも変化が起こる。3.75% の PEG-6000 の存在下では、モノマーのピークの位置が少しリン酸濃度の高い方にずれる (図 3 中)。勿論このピークの PEG 濃度は 3.75% にはなっていない。会合体ピークの溶出位置はさらに高濃度側にずれ、モノマーとの分離がよくなる。7.5% PEG ではさらにその影響が顕著にでており、2 番目の会合体ピークは 500mM リン酸に達しても観察されない

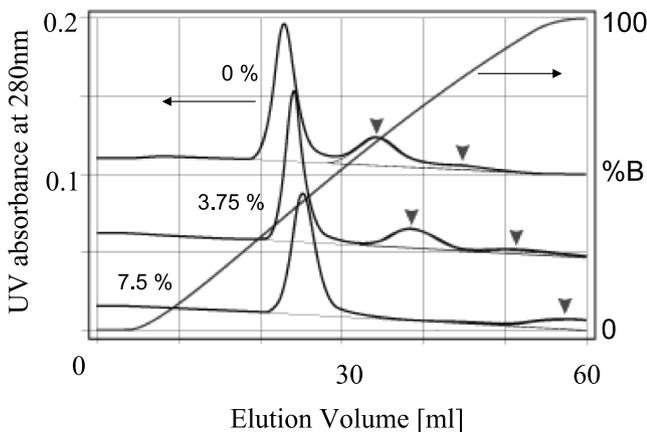


図 3 モノクローナル抗体のヒドロキシアパタイトカラムによる分析

10mM リン酸で吸着させたタンパク質を、直線的にリン酸濃度を 500mM まで上昇させて溶出させた。

上) PEG なし。中) 3.75% の PEG-6000 が 500mM リン酸側のみに存在。下) 7.5% の PEG-6000 が 500mM リン酸側に存在。

(図 3 下)。このような PEG の効果は IEC においても見出されるので、その機構については次の節で述べる。ただこの場合 PEG の濃度も上がるので、より高いリン酸濃度で出る会合体はより高い PEG 濃度に露出される。PEG の効果が会合体の方により顕著に現れる原因の一つとなっている。

4. イオン交換クロマトグラフィー (IEC)

PEG の添加は IEC でも CHT と同じ効果をもたらす。図 4 は同じ抗体を使った陽イオン交換クロマトグラフィーの結果を示す。抗体を 10mM クエン酸緩衝液、pH6 で IEC カラムに結合させ、同じ pH でクエン酸濃度を 200mM まで直線的に上げると、矢印で示した 1 本のピークが得られる (図 4 上)。先に示したようにこの抗体は会合体を含んでおり、それはこの条件では分離せず、抗体単量体と一緒に溶出する。すなわち会合体は IEC では分離できないことになる。一般に抗体の分離は IEC では難しいが、それでも会合体の方がカラムに強く結合し、溶出が高塩濃度側にずれることがある。この実験においては、このような現象は見出されなかった。ところが PEG を使うと可能になる。図 4 下のカーブがそれを示している。これは PEG-4600 を用いた結果であるが、7.5% の PEG が分離過程を通して存在している。まず CHT で見られたようにメインピークの位置が高塩濃度側にずれている。会合体はさらにずれ、メインピークから分離している。以上の結果は、PEG の添加によって会合体が IEC でも分離できることを示している。なお、PEG-1000, PEG-6000 を用いた場合においてもほぼ同様の結果を示すことを付記する。

それではなぜこのようなことが起こるのであろうか。

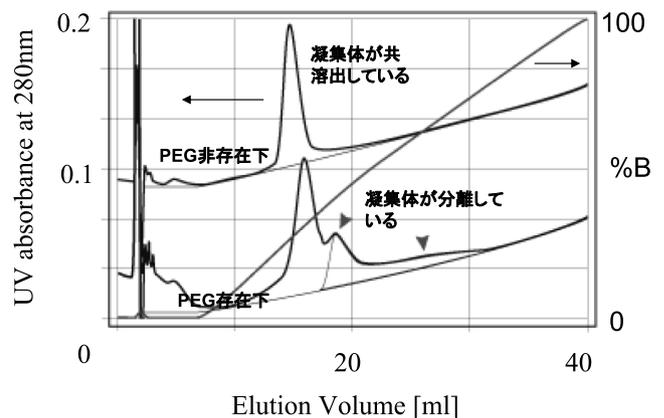


図 4 モノクローナル抗体の陽イオン交換カラムによる分析
10mM クエン酸で結合させた抗体を、直線的にクエン酸濃度を 200mM まで上昇させて溶出させた。

上) PEG なし。下) 7.5% PEG-4600 が両溶媒側に存在。会合体の大きさは四量体と八量体に相当する。

テクニカルノート

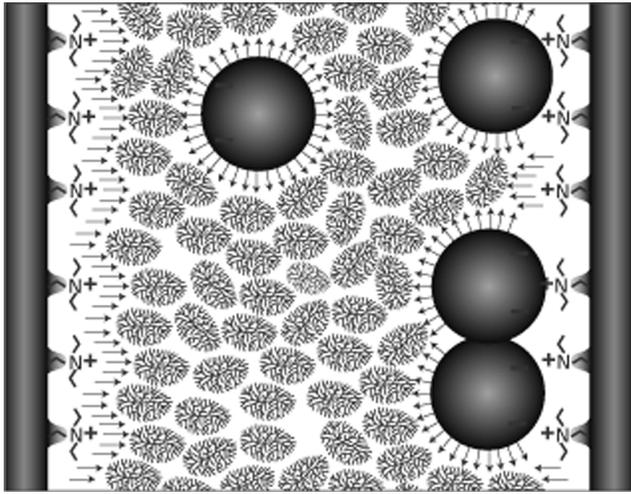


図5 PEGの排除体積効果
丸は負に帯電したタンパク質，棘の楕円はPEG分子を表す。

PEGは排除体積効果でタンパク質表面から排除されている。その模式図が図5である。このような排除体積効果はタンパク質がカラムに結合することによって減少する。そちらの方がエネルギー的に安定なので、PEGはカラムへの結合を強める。静電的相互作用は単純に次式で近似できる²⁾。

$$-\Delta G = K/I^{1/2} \quad (K: \text{カラムへのタンパク質の結合についての定数} [\text{cal}/\text{M}^{1/2}]; I: \text{イオン強度} [\text{M}])$$

ここで ΔG はタンパク質とカラムとの静電的相互作用のエネルギーである。もちろん負になればなるほど結合が強い。Kはタンパク質とカラムとの静電的相互作用を反映す

るパラメーターで塩濃度には依存しない。Iは溶媒のイオン強度である。この式はイオン強度、すなわち塩濃度が上がれば $-\Delta G$ は小さくなること、すなわち負の ΔG はよりゼロに近づくことを意味している。その結果結合が弱くなることになり、塩が溶出を促すことと対応している。PEGの存在下では、この $-\Delta G$ にさらにPEGとタンパク質との相互作用のエネルギー、 $\Delta\Delta G$ 、が加わることになる。ここで $\Delta\Delta G$ は

$$\Delta\Delta G = \Delta G (\text{カラムに結合した状態とPEGとの相互作用}) - \Delta G (\text{結合していない状態のPEGとの相互作用})$$

で表される。ここで排除体積効果は結合した方が低いので $\Delta\Delta G$ は負となる。すなわちPEGの存在下では結合のエネルギー、 $\Delta G + \Delta\Delta G$ は $\Delta\Delta G$ が負になる分だけより負の値が大きくなり、結合が強くなる。そのために結合したタンパク質の溶出にはよりイオン強度を上げることが必要となる。 $\Delta\Delta G$ は会合体の方がより負の値が大きくなるので、PEGの効果は会合体により強く働く。その結果会合体はPEG存在下では溶出がさらに遅くなる。ここで最も重要な事実、塩濃度を上げることによりタンパク質が予想どおりに溶出してくることである。すなわちPEGはタンパク質とカラムの結合の本質(式のK)には影響しない。

上述のPEGの効果は分離能の上昇につながっている。溶媒効果を会合体の形成を防ぐ目的に使うことが可能な場合もある³⁾。IL-6は陽イオン交換クロマトグラフィーをうまく行わないと会合体形成を促進する。例えば、pH5でIL-6をカラムに結合させ塩とpHの勾配で溶出すると、な

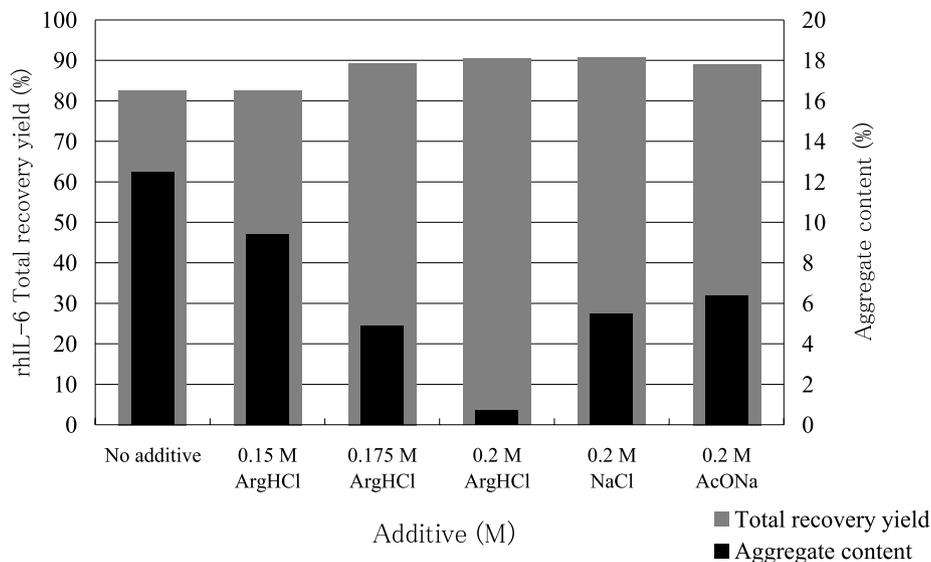


図6 IL-6の陽イオン交換カラムからの全回収率と会合体の含量
IL-6は図に示したような塩の存在下でカラムに負荷している。文献4から抜粋した。

にも工夫せずに溶出した場合、回収率は80%以上と高いものの12%以上の会合体を作ってしまう(図6)。このサンプルを負荷するときに0.2Mの塩を入れておくと、溶出条件が同じでも分離結果が大きく違ってくる。塩化ナトリウムや酢酸ナトリウムを添加すると収率は90%と若干上がるのみであるのに対し、会合体含量は5-6%と大きく減少する。0.2Mアルギニンだと収率は同じだが、会合体含量が1%程度にまで抑えられる。このアルギニンの効果は濃度依存的に起こる。これらの塩、アルギニンの効果はIL-6がカラムに結合する時に起こる会合を抑えることによるものと思われる。

5. 親和性クロマトグラフィー

親和性クロマトグラフィーの代表例は特異的なタンパク質間相互作用にもとづくものであろう。その一つに抗原カラムによる特異抗体の精製が挙げられる。この精製の一番の問題は結合した抗体の解離が困難であることにある。そのための工夫がいろいろなされてきたが、いまだに普遍的な溶媒は開発されていない。エチレングリコールはよく使われるが、それほど溶出力が強くなく、また濃度を上げすぎるとタンパク質の安定性が下がる可能性がある。塩化マグネシウムもしばしば使われるが、3-4Mといった高濃度を必要とし、極めて扱いにくい。最近アルギニンが使える可能性が指摘されたものの、まだ実験例が少なくその有用性は今後の応用例の報告を待たなくてはならない。

最近特に注目されている親和性カラムはProtein Aであろう。それは抗体薬剤の開発が注目されていること、抗体薬剤の投与量が多いこと、起因しており、生産コストに最も大きな影響を与えるのがProtein Aカラムである。Protein Aを用いた親和性クロマトグラフィーにおける一番の問題はカラムからの抗体の溶出にある。通常酸性溶液が用いられるが、そのため抗体が変性し、会合体を形成させる原因となっている。このような場合でもアルギニンが有効である^{4,5)}。0.36M以上の濃度でpH4以上での溶出が可能となり、酸変性が完全に防げる。図7にProtein Aと同じように使われるProtein Gの結果を示した。pH3.5以下だと0.1Mのクエン酸緩衝液と0.1Mのアルギニンはそれほど変わらない。pHが3.5に近づくとつれて回収率が急激に下がる。クエン酸緩衝液では濃度を0.7-1.1Mに上昇させても収率は全く改善されない。それに対しアルギニンは0.7M以上まで上げると、pH3.5以上でも50%以上の抗体が溶出する。1Mや2Mのアルギニンを使うと、pH4.2より高いpHにおいても60%の回収率が得られる。

この他色素親和性クロマトグラフィーや低分子親和性クロマトグラフィーにもアルギニンは効果を発揮する⁶⁾。

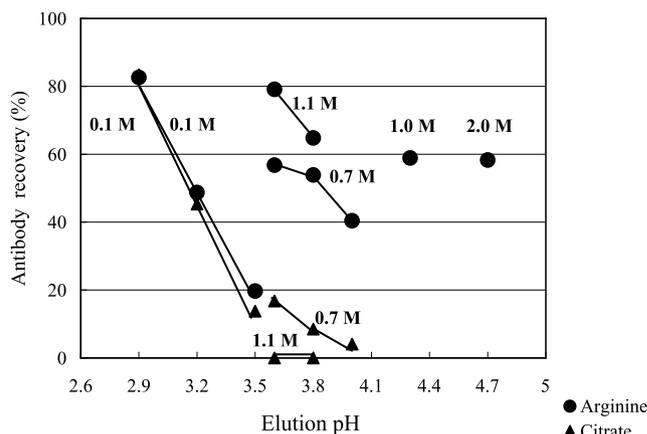


図7 モノクローナル抗体のProtein Gカラムからの回収率。結合した抗体はアルギニン(●)またはクエン酸(▲)溶液で溶出している。

Blue-Sepharoseのような色素カラムからの溶出には通常塩が使われるが、その回収率は極めて低い。回収率を上昇させるのに、いわゆる置換物質(Displacerという)が使われるが、それぞれのカラムに応じて開発する必要がある。アルギニンは塩に比べてはるかに高い収率を示すのみならず、よりシャープな溶出ピークを与える。すなわち高いタンパク質濃度溶液を与えることが可能であり、その後のさまざまな操作を容易にする。

6. 疎水性クロマトグラフィー(HIC)

HICの難点の一つは回収率が悪いことにある。その原因として結合によるヒステリシス現象、すなわちカラムへの結合によってタンパク質の構造が不可逆的に変化することがある。いったんカラムに吸着すると結合が強化され解離しにくくなることが多い。その典型的な例がアクチビンである⁷⁾。先に述べたようにアクチビンは疎水性の低いSECカラムにも吸着するのでいわば当然であろう。1M硫酸の存在下でアクチビンを結合させると、アクチビンが結合しない溶媒、即ち20mM Tris緩衝液、pH7.8においても全くタンパク質は溶出されない(図8A)。この溶媒に5%のアルコールを添加すると、溶出はブロードではあるものの負荷サンプルの約50%を回収できる(図8B)。0.5Mアルギニンを代わりに用いるともう少し溶出のプロファイルがシャープになり、ほとんど前方の2画分に溶出される(図8C)。回収率も60%と上昇する。0.5Mのアルギニンと5%のアルコールを同時に使うとほぼ全てが一画分に溶出され、回収率も70%以上となる(図8D)。アルギニンの溶媒への添加が、今までHIC精製が不可能だったアクチビンにさえ、極めて有効に機能していることは明らかである。この他IL-6や抗体にも顕著な有用性を示した。

テクニカルノート

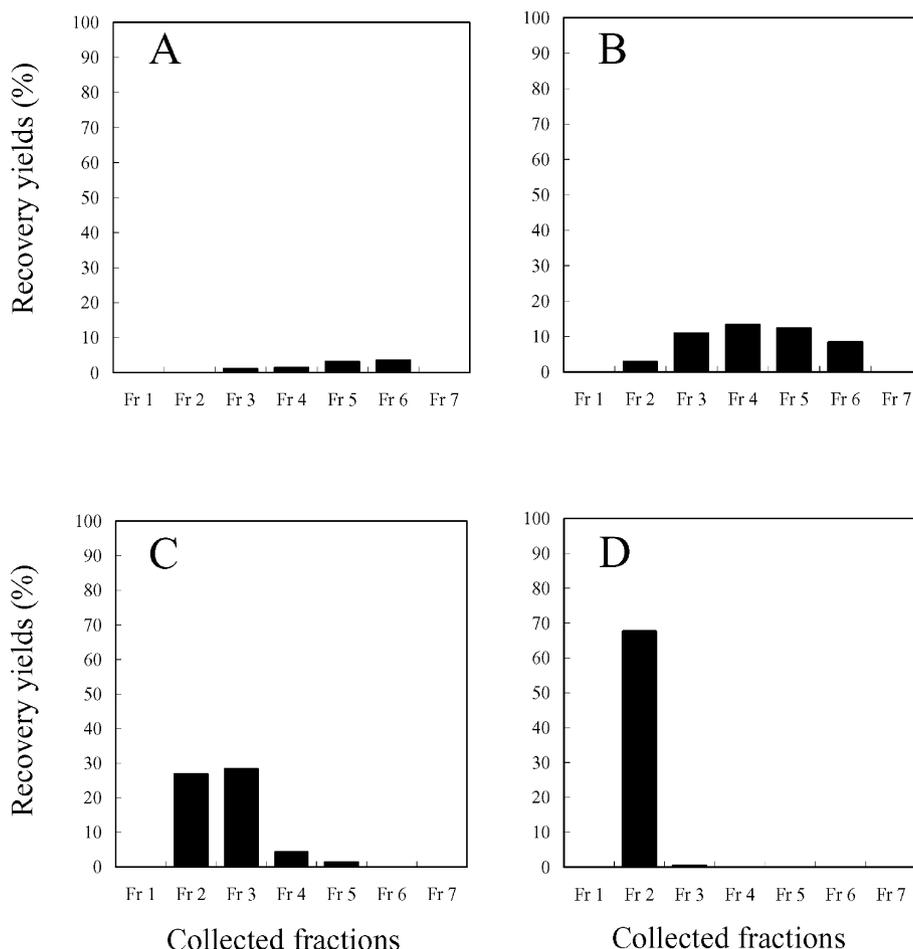


図8 アクチビンのHICカラムからの回収率

吸着したアクチビンは、(A) 20mM Tris-HCl (pH7.8), (B) (A)に5% アルコールを加えた溶媒, (C) (A)に0.5 M アルギニンを加えた溶媒, (D) (A)に5% アルコールと0.5M アルギニンを共存させた溶媒, で溶出している。おのおの、溶出開始時から3ml ずつ分画しており、分画後タンパク質濃度を決定した。文献8を参照のこと。

HIC のもう一つの不便な点として、タンパク質の溶出を塩濃度を下げることによって行うことに起因して、溶出液に塩イオンが含まれることが挙げられる。グリシンを使うことによってこれを克服できる場合も報告されている。ただしグリシンではタンパク質を直接HICカラムに吸着させることは難しい。HICの疎水性を相当に上げるか、タンパク質の疎水性が高くない限り、グリシンではタンパク質はHICカラムには吸着しない。そこでまず抗体をHICカラムに2M塩化ナトリウムの存在下で結合させる。その後2.5Mグリシンと置き換えても抗体は溶出されない。これは抗体とHICカラムとの結合がグリシン存在下では平衡にないことを意味している。グリシン存在下では結合が起こらなくても、一旦吸着するとカラムから脱離しなくなる。このような結合はグリシン濃度を下げ、エチレングリコール濃度を上げることで弱めることが可能である。この

溶出液はイオン強度が低いことから、前処理することなくIECの負荷サンプルとして用いることが可能である。

7. 最 後 に

いくつかの例を挙げて、溶媒がタンパク質のクロマトグラフィー分離や収率に如何に影響するか、について述べた。これらの溶媒添加物質はどれも粘度を上昇させ、カラムの流速やタンパク質の拡散速度には悪影響を及ぼすことから、あまり濃度を上げることはできない。ただし、ここで述べたアルギニン、PEG、グリシンはタンパク質の安定性を下げることは皆無といってよい。グリシンはタンパク質の安定化剤として知られている。今後、溶媒効果に関する実験例が増えれば、溶媒の新しい利用法が提案されていくことであろうし、あるいはさらに反例も指摘されていくことだろう。

テクニカルノート

-
-
- 1) Ejima, D., Yumioka, R., Arakawa, T., & Tsumoto, K. (2005) *J. Chromatogr. A.*, **1094**, 49–55.
 - 2) Stahlberg, J., Jonsson, B., & Horvath, C. (1991) *Anal. Chem.*, **63**, 1867–1874.
 - 3) Arakawa, T., Tsumoto, K., Nagase, K., and Ejima, D. (2007) *Protein Expr. Purif.*, **54**, 110–116.
 - 4) Arakawa, T., Philo, J.S., Tsumoto, K., Yumioka, R., & Ejima, D. (2004) *Protein Expr. Purif.*, **36**, 244–248.
 - 5) Ejima, D., Yumioka, R., Tsumoto, K., & Arakawa, T. (2005) *Anal. Biochem.*, **345**, 250–257.
 - 6) Arakawa, T., Ejima, D., Tsumoto, K., Ishibashi, M., & Tokunaga, M. (2007) *Protein Expr. Purif.*, **52**, 410–414.
 - 7) Tsumoto, K., Ejima, D., Nagase, K., & Arakawa, T. (2007) *J. Chromatogr. A.*, **1154**, 81–86.
-