

氏 名	なか むら こう し 中 村 孝 司
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	論農博第 2512 号
学位授与の日付	平成 16 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Studies on High-performance Affinity Chromatography : Preparation of the Chromatographic Gels, Evaluation of the Chromatographic Conditions, and the Application to Purification of Enzymes (高性能アフィニティークロマトグラフィーに関する研究: クロマトグラフィー用ゲルの調整, クロマトグラフィー条件の検討, および各種酵素の精製への応用)
論文調査委員	(主 査) 教授 井上 國世 教授 小川 正 教授 安達 修二

### 論 文 内 容 の 要 旨

生体物質の多くは、特定の物質を見分けて結合し、相互作用する性質を有している。例えば、酵素は基質や阻害剤と、抗体は抗原と特異的に結合する。アフィニティークロマトグラフィーは生体物質のもつこれらの生物学的識別能力を利用した分離方法であり、タンパク質や酵素など生体物質の分離精製に広く使用されている。したがって、アフィニティークロマトグラフィーが高性能化されれば、迅速、簡便な臨床分析やバイオ医薬品などの大量、迅速精製、さらには体内の有害成分だけを除去する血液浄化への応用などが期待できる。

本論文は、ポリメタクリレート基材とした TSKgel Toyopearl および G5000PW を用いて、アフィニティークロマトグラフィーの高性能化に関し、短時間・高感度分析および大量・迅速精製の両面について検討した結果をとりまとめたものである。

第 1 章では、各種群特異性リガンドを使用したアフィニティークロマトグラフィーの高性能化についてまとめている。第 1 節では、TSKgel G5000PW (粒子径: 10  $\mu\text{m}$ ) にイミノ二酢酸を導入した金属キレートアフィニティークロマトグラフィーの高性能化を検討した結果を述べている。金属イオンとして亜鉛イオンを用い、グリシン濃度の直線勾配溶出法を用いることにより、金属に親和性のあるタンパク質混合物および酵素類が高度に分離し、高活性を保持することを示した。試料の溶出ピークは、イオン交換や疎水性クロマトグラフィーに比べてよりシャープであり、高性能化できたことを確認した。第 2 および 5 節ではヘパリンアフィニティークロマトグラフィーについて述べている。G5000PW (粒子径: 10  $\mu\text{m}$ ) および Toyopearl HW-65M (粒子径: 40-90  $\mu\text{m}$ ) にヘパリンを還元アミノ化法で固定化し、分析および工業的精製について検討した。ヘパリンを固定化した充填剤は、ヘパリンが分子中にスルホン酸基やカルボキシル基を有するため、種々のタンパク質と静電的に結合する。このため陽イオン交換クロマトグラフィーと同様に NaCl 濃度の直線勾配溶出法により、タンパク質混合物が短時間で分離可能となった。アンチトロンビン III (AT-III) は血液凝固抑制剤として工業的精製法の確立が求められており、ヒト血漿からの AT-III の精製について、市販の各種ヘパリン固定化担体と比較検討した結果が述べられている。ヘパリン-Toyopearl は AT-III に対する結合容量が最も高く、一回のクロマトグラフィー操作で高純度の AT-III が精製可能であり、充填剤の洗浄に使用されるアルカリに対する耐久性も高いことを示した。第 3 節では色素 (Cibacron Blue F3GA) を Toyopearl HW-65M (粒子径: 40-90  $\mu\text{m}$ ) に固定化し、酵素の精製および色素充填剤の欠点である色素漏洩に関し検討した結果を述べている。Toyopearl を基材とした担体は、アガロースを基材とした担体と同レベルのタンパク質吸着容量を有し、酵素類の精製度も良好であることを示した。一方、色素漏洩は、アガロースを基材とした担体より少なく、アルカリ洗浄も可能で、工業的精製用として使用可能な充填剤であった。第 4 節では *p*-アミノベンズアミジンを細孔径の異なる 3 種類の Toyopearl に固定化し、セリンプロテアーゼ類の精製について検討した結果を述べている。トリプシンの吸着容量を比較した結果、細孔径に大きく依存することを示し、アフィニティークロマトグラフィー用充填剤の作成には細孔

径の選択が重要であることを見出した。

第2章ではTresyl活性化型担体を用い、各種タンパク質を固定化する時の固定化条件について検討した結果を述べている。タンパク質を固定化するには充填剤に導入した活性基量と固定化に使用するタンパク質量との関係が重要で、この関係を考慮しないと、たとえリガンドを固定化しても目的物の吸着量が少ないことが判明した。また、タンパク質を固定化する場合、タンパク質の種類によってはTresyl活性基との反応性が低く、固定化反応が進行しにくい場合も認められたが、高濃度の塩（例えばリン酸カリウム）を含む中性ないし弱塩基性の緩衝液中で固定化反応を実施すると、タンパク質の固定化は容易に進行することを明らかにした。

第3章では各種抗体を固定化した免疫アフィニティークロマトグラフィーについて検討した結果を述べている。IgGの固定化条件を最適化することにより、抗原の吸着容量の高い免疫吸着体が得られ、調製された免疫吸着体を用いて血漿タンパク質が短時間で精製されること、およびタンパク質の定量にも応用可能であることを示した。

## 論文審査の結果の要旨

アフィニティークロマトグラフィーは生物学的親和性を利用した分離方法であり、タンパク質や酵素などの生体物質の分離精製に広く使用されている。この手法は迅速・簡便な臨床分析やバイオ医薬品などの大量精製、さらには血液浄化などへの応用が期待できるため、高性能化が望まれている。

本論文は、ポリメタクリレートを基材としたTSKgel ToyopearlおよびG5000PWを用い、アフィニティークロマトグラフィーの高性能化に関し、短時間・高感度分析および大量・迅速精製の両面について検討したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. 色素、ヘパリンおよび*p*-アミノベンズアミジンをToyopearlに固定化し、アガロースを基材とした場合よりも優れた吸着能を有する充填剤を開発した。これらの充填剤を用い、各種の酵素が短時間に精製できること、工業的精製分野で使用されるアルカリ洗浄に著しい耐性があることを確認した。目的物質の吸着容量が基材の細孔径に大きく依存することを見出した点は興味深い。

2. Tresyl活性化型担体に大豆トリプシンインヒビターを固定化する条件を詳細に検討した。低pHではタンパク質のアミノ基がプロトン化しているため固定化反応が遅い。一方、高pHでは固定化反応は速やかに起こるが、多点結合が促進されるため目的物質の吸着量が減少すること、また、固定化反応にはヒスチジン、チロシン、リジン残基が関与することを明らかにした。タンパク質の中には、Tresyl活性化型担体と極めて反応しにくいものも確認されたが、高濃度の塩（例えばリン酸カリウム）を含む中性ないし弱塩基性の緩衝液中での固定化反応により、これらのタンパク質の固定化も容易に進行することを示した。

3. Tresyl活性化型担体にリガンドとしてIgGを固定化するとき、高濃度リン酸緩衝液を用いることにより、IgGのFc部分が選択的に固定化されることを見出した。その結果として、抗原の吸着容量が増大することを明らかにした。

4. G5000PW（粒子径：10 μm）を用いたアフィニティークロマトグラフィーでは、イオン交換クロマトグラフィーや疎水性クロマトグラフィーと同様に、短時間・高度分離が可能となり、迅速・簡便が要求される臨床分析にも使用可能なことを実証した。

以上のように、本論文は、ポリメタクリレートを基材とする各種リガンド固定化法の検討、これらの固定化担体を用いるクロマトグラフィー条件の最適化、さらに各種酵素の精製への応用性の評価を行なうことにより、アフィニティークロマトグラフィーの高性能化において重要な多くの知見を得たものであり、酵素化学、食品分子機能学および農産製造学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成15年11月20日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。