

タンパク質精製過程で起こる タンパク質の高密度状態と会合

荒川 力¹・津本 浩平²・江島 大輔³

要 旨

タンパク質の精製において、カラム担体をタンパク質で飽和させたり、ポンプでカラムのトップからタンパク質溶液を注入したりすると、担体上で結合・吸着したタンパク質が高密度状態になる。それがしばしばタンパク質の会合や沈殿の原因となることもある。そのような可能性の有無を簡単に判断できる方法がいわゆるバッチによるタンパク質のカラム担体への結合である。飽和しない量のタンパク質溶液とカラム担体をバッチで混合すると、タンパク質はランダムに担体上に分散するので高密度状態にはならない。バッチ法で会合が起こらずカラムのみで起こるなら、高密度状態が原因となっている可能性が高い。しかしバッチ法ではコストや利便性の面で問題解決にはならないので、カラム法での解決が必要とされる。またタンパク質精製の過程で、溶媒置換や溶液の濃縮のために限外ろ過法が用いられるが、カラム担体と同様の問題が膜上でも起こり得る。我々はこの会合の問題がアルギニンを用いることにより解決できることを示してきた。適切な濃度のアルギニンを、負荷するタンパク質溶液に添加したり、溶出液に加えたりすることにより、タンパク質の回収率や会合体の量を改善できることを示してきた。

序 言

医薬用あるいは実験試薬として使用されるタンパク質の生産において、クロマトグラフィーと限外ろ過はもっとも重要な技術の一つである。タンパク質の精製にはカラムクロマトグラフィーが汎用される。通常タンパク質をカラム担体に結合・吸着させ、塩濃度やpHを変化させることにより、結合したタンパク質を溶出させる。この結合過程において、カラム内ではタンパク質の高濃度、高密度状態が起こっている可能性がある。同様の問題は限外ろ過によるタンパク質溶液の濃縮過程でも起こり得る。すなわち上記のカラムで起こるような現象が、タンパク質の濃縮過程でも起こり得る。これらの高密度、高

濃度から生じる問題は特に溶解度の低いタンパク質では顕著になる。たとえば最近細胞の分化因子として注目を集めているTGF- β ファミリータンパク質は非常に会合性が強く、精製、濃縮、分析などの過程で解決の困難な問題を引き起こすことが知られている。この稿では、このような高密度状態が起こる背景、それに由来する問題点、その解決法について解説する。

カラム内でのタンパク質の高密度状態

タンパク質の精製にはイオン交換、疎水性クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー（たとえばプロテイン-AやATP-カラム）などのカラムクロマトグラフィーが用いられる。これらのカラムは一般に大量のタンパク質が結合できるように工夫されている。たとえば1 mLのカラムに50–100 mgのタンパク質が結合できるようなものもある。実際にはこれらのカラムのタンパク質結合サイトの数はこれよりもはるかに多いが、立体障害などの理由である程度以上結合できなくなる。カラムの担体にこのように大量のタンパク質を結合させると、固相表面にタンパク質が高密度で蓄積することになる。この状態は、後の稿（栗之丸執筆）の高分子電解質へのタンパク質吸着現象と類似している。タンパク質溶液でも50–100 mg/mLというかなりの高濃度下では、タンパク質間相互作用が起こることがよく知られている。同様に、カラムに結合した状態でも、タンパク質分子間相互作用が起こる可能性はきわめて高いと考えられる。もちろん負荷するタンパク質量を減らせば飽和状態にはならないが、その分コストが高くなる。たとえば仮に100 Lのカラムを使って飽和状態にする場合と比べると、タンパク質負荷量をその10%にした場合、1000 Lのカラムが必要となる。このことは10倍の大きさのカラムが必要となるだけでなく、それに比例して溶媒の量も10倍必要となることを意味する。通常カラムからのタンパク質の溶出にはカラム容量の5倍程度の溶出液を必要とするので、カラムの大きさが10倍になると、必要な溶出液も10倍となる。すなわち溶媒の量は500 Lから5000 Lと

著者紹介 ¹アライアンス プロテイン ラボラトリーズ（社長）
²東京大学大学院工学系研究科・医科学研究所（教授）
³味の素（主席研究員）

E-mail: tarakawa2@aol.com (tarakawa@ap-lab.com)

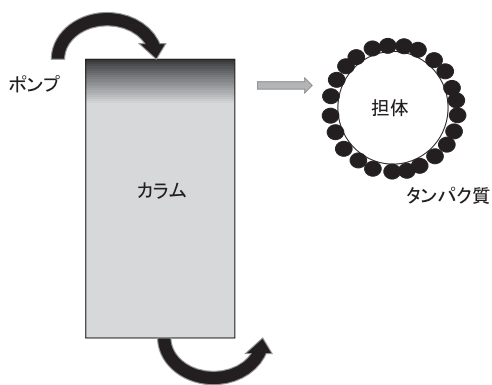


図1. タンパク質溶液をカラムのトップから注入

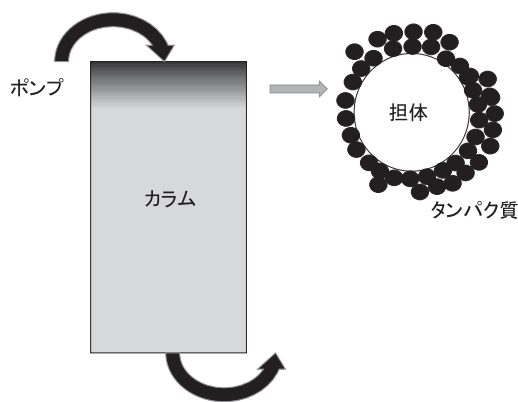


図2. タンパク質溶液をカラムのトップから注入

膨大な量が増えてしまう。いかにカラムを飽和状態近くまで負荷できるかが、コスト面での大きな課題となる。

仮にカラム全体を飽和しなくても、担体上での高密度状態はカラムのトップからタンパク質を注入すればいつも起こり得る現象である。図1に示すように、通常負荷するタンパク質溶液はポンプでカラムのトップから注入される(矢印)。その場合当然注入された部分にある担体から順にタンパク質が結合していくことになる。常に一定濃度のタンパク質がカラムのトップから注入され続けるので、結合が強いものほど端から飽和状態が形成されていく(濃淡の濃い部分)。図1右には、そのようにして形成された、カラム担体上でのタンパク質の状態を示している。タンパク質間の相互作用が強い場合には、図2に示すように担体上でタンパク質の層が形成されていくことも起こり得る。このような担体上での高密度状態は結合したタンパク質にどのような問題をもたらすだろうか。最大の問題はタンパク質の会合である。会合したタンパク質は相乗効果によりさらに強くカラムに結合するので、その溶出はきわめて困難になる。たとえば親和性クロマトグラフィーの場合、通常酸で溶出することが多いが、より酸性の溶出液が必要になることも考えられる。仮に溶出ができて、変性や会合したタンパク質は活性を失ったり、沈殿したりすることも頻繁に見られる。さらに極端な場合、カラムから溶出できなくなることも起こり得る。

ゲルろ過でも同様の問題が起こり得る。ゲルろ過カラムはタンパク質をできるだけ結合・吸着させないように設計されているが、それでも非特異的結合は多かれ少なかれ起こる。ゲルろ過ではタンパク質溶液はカラムのトップから少量注入されるので、そのトップの位置で結合・吸着が起こる。そのような結合はタンパク質の溶出位置の遅れ、非対称な溶出ピーク、回収率のロス、カラ

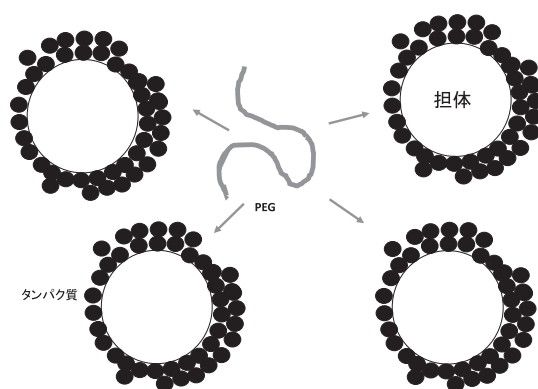


図3. SXC. PEGによってタンパク質をカラム担体上に塩析する機構。

ムの劣化などさまざまな問題の原因となる。

SXC (Steric eXclusion Chromatography, 塩析クロマトグラフィー)

タンパク質の高密度状態を担体上で意図的に起こさせる精製方法が最近開発された¹⁾。よりカラムの大きさを縮小し、タンパク質の生産コストを下げようというわけである。これをSXC (Steric eXclusion Chromatography, 直訳すると排除体積クロマトグラフィーになるが、それよりも塩析クロマトグラフィーの方が原理をよく表していると思われる)という。担体表面をタンパク質で飽和させると、さらにその上にタンパク質を吸着させることは同じ電荷を持つ分子間の電気的反発で難しくなる。何層ものタンパク質の表面吸着は通常起こらない。それを強い塩析効果のあるPEGの添加で実現させたのがSXCである。すなわち図3に示すようにPEGの排除体積による塩析作用で、分子間の電気的反発に打ち勝ってタンパク質相互作用を強め、タンパク質の重層化を達成する方法である。PEGによるタンパク質の結晶化の過程と

類似している。すなわち吉澤らの稿で述べるように、タンパク質の凝集、沈殿を起こす条件より若干低いPEG濃度を使うことにより、上記のような担体へのタンパク質重層化が可能となる。ただしPEGを添加すると溶液の粘度が高くなるので、カラム内での流速を下げるか、バッチ法で行う必要がある²⁾。もちろんこの方法を使うと、上の高密度で起こるタンパク質の会合の問題はさらに大きくなることが予想される。

バッチ法でタンパク質の低密度状態を作る

そのような会合が実際に問題となっているかどうかを調べる簡便な一つの方法が、タンパク質のカラムへの結合をバッチで行うことである。すなわち図4に示すように容器内に担体を分散させ、そこにタンパク質溶液を攪拌しながら添加する。そうするとタンパク質担体の結合部位にランダムに結合するので、負荷タンパク質量が十分低い場合、担体上での高密度状態は起こらない。もし高密度状態が会合の原因となっている場合、バッチ法ではタンパク質が担体上で分散しているので溶出が容易になり、また溶出したタンパク質の会合や変性が抑制される。ただしこの方法は原因の解明にはつながらず、実際の解決にはならない。カラム内での高密度による問題は別の方法で解決する必要がある。バッチ法はあまりに不便で、カラムを飽和させないのでコスト高となり、実用的ではない。

上記の理由でバッチ法は医薬用タンパク質の大量生産には適さないが、タンパク質試薬の精製には問題ない。すなわちタンパク質の結合をバッチで行い、溶出をカラムで行う方法である。バッチで飽和しない量のタンパク質を担体に結合させた後、それをカラムに充填し、通常の溶出を行えばよい。

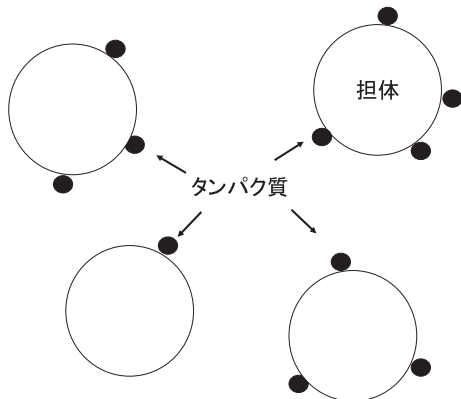


図4. バッチ法によるタンパク質のカラム担体への結合・吸着

アルギニンを使った会合問題の解決

前稿（平野執筆）で述べられたように、アルギニンはタンパク質間あるいは低分子間相互作用、またタンパク質とカラムとの相互作用などを抑制する。最近の研究により、そのようなアルギニンの効果が分子間の静電相互作用、疎水性相互作用、芳香環を介した相互作用の抑制に起因していることが示唆されている。そのようなアルギニンの効果を用いて、高密度タンパク質の問題が解決できる可能性がある。

1. アルギニンを負荷するタンパク質溶液に添加する

アルギニンはタンパク質の相互作用を抑えるので、担体に結合したタンパク質分子間相互作用を抑制することが期待される。我々は遺伝子組換えで作った、2量体をほとんど含まないIL-6を陽イオン交換カラムで精製した際、2量体のピークを予想に反して観察した³⁾。すなわちカラム精製が2量体の形成を促進したことになる。負荷するIL-6溶液に0.2–0.25 Mの酢酸塩を添加すると、IL-6の回収率は若干増えただけであるが、2量体の量は半減した。この濃度の酢酸塩はIL-6のカラムへの結合を弱めるので、おそらくタンパク質がある程度カラム内に分散し、濃縮効果が弱まったことに起因するものと考えられる。0.2 Mのアルギニンの添加はさらに劇的な効果を示した^{4,5)}。総回収率は若干上昇するのみだが、2量体のピークはほとんど認められなくなるほど減少した。これは次の2つの効果によるものと考えられる。

1. 酢酸塩と同様IL-6のカラムとの結合を弱めて、タンパク質の濃縮効果が抑えられた。
2. アルギニンがカラムに結合したタンパク質分子間相互作用を抑制した。

疎水性クロマトグラフィーでも同様の効果があるものと考えられる。しかしこの場合アルギニンはカラムとタンパク質の疎水性相互作用を抑制するので、回収率が顕著に増加することが認められている⁶⁾。よってアルギニンの濃度が高いと、タンパク質はカラムに結合できなくなる可能性が高い。イオン交換でも同様のことが起こるが、その場合はイオンであるアルギニンがカラムとタンパク質の静電相互作用を抑制することに起因している。

2. アルギニンを使った溶出 我々は主にProtein-Aなどの親和性カラムにおいてアルギニンの溶出効果を示してきた⁷⁻⁹⁾。その結果の中で溶出効果と同時に、会合体の量が減少することも示してきたが、その効果の説明は上記の場合ほど簡単ではない。それはアルギニンの強い溶出効果による。一般に、親和性クロマトグラフィー

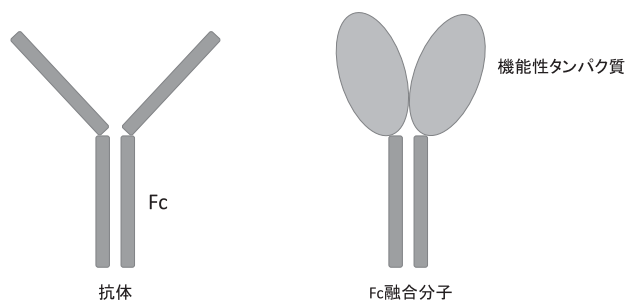


図5. 抗体（左）とFc融合分子の違い

において、タンパク質とカラムとの相互作用は強い。イオン交換における塩の添加、疎水性カラムにおける有機溶媒の使用、といった単純な条件ではタンパク質をカラムから溶出することは難しい。そこで酸やアルカリ溶液、タンパク質の変性剤などが用いられてきたが、それらはタンパク質の会合の原因になってしまう¹⁰⁾。アルギニン溶液を使うと、極端なpHや変性剤の使用の必要性がなくなるので、より安全な条件での溶出が可能となり、その結果会合が抑制されることになる。その典型的な例が抗体とともに研究開発が進められているFc融合分子である。図5に示すように抗体の抗原結合部分を機能性タンパク質と遺伝子レベルで置き換えたのがFc融合分子である。あるFc融合分子はProtein-Aに強く結合し、pH 3以下の酸性溶媒でないとカラムから溶出できない。そこでその近辺のpHの溶媒でProtein-Aから酸性溶出すると激しく会合することを認めた。ところがバッチでProtein-Aに結合させるとそれほど強い酸でなくても溶出可能であることから、このFc融合タンパク質の会合はProtein-Aカラム内で起こっている可能性が高い。この例では、弱酸性アルギニン溶媒を使うと会合の問題は一気に解決された¹¹⁾。このアルギニン効果はFc融合タンパク質分子間の相互作用、およびFc部分とProtein-Aとの相互作用を切断することに起因している。Protein-Aカラムの代用品として開発されたMEPを使うと、中性pHでもこのFc融合分子の溶出が可能となり、会合の問題は生じないことが分かった。

ゲルろ過カラムへの結合は特に溶解性の低い、会合性の強いタンパク質に顕著である。たとえばTGF-βファミリーのアクチビンの場合、タンパク質の回収率が低い上に、溶出位置が大きくずれていた¹²⁾。2量体も会合体も同じ位置に溶出するので、品質分析には使用不可能で

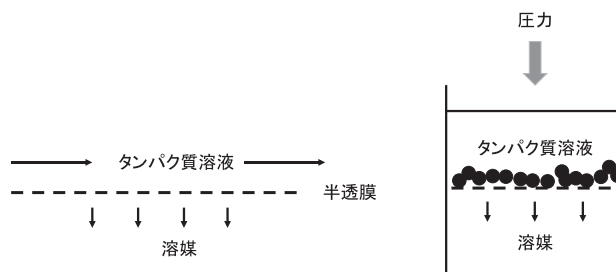


図6. 限外ろ過によるタンパク質溶液の濃縮。左：タンパク質溶液をポンプで膜状を流す方法。右：圧力でタンパク質溶液を濃縮。

ある。展開溶媒に0.2 M以上のアルギニンを加えると、これらの問題は大きく改善された。TGF-βファミリーほど顕著ではないが、同様の改善はより水溶性の高いタンパク質でも見られた。

限外ろ過による膜濃縮

タンパク質溶液の溶媒置換、濃縮には通常限外ろ過が使われる。どちらの用途に対しても、ポンプを使って圧力かける場合は、図6に示すように溶液が膜上を流れるので、膜上での濃縮効果は軽減される。それに反して圧力あるいは遠心力を用いてタンパク質溶液を膜濃縮すると、図6右に示すように、膜上でタンパク質濃度が上昇する。たとえば抗体をこの方法で濃縮すると50 mg/mL以上の濃度になるとゲル化する場合がある。特にゲル化の現象は低温で顕著である。濃縮による会合の問題はTGF-βファミリーでも顕著に起こることが認められており、この場合もアルギニンの添加で顕著に改善される。

文 献

- 1) Lee, J. et al.: *J. Chromatogr. A*, **1270**, 162 (2012).
- 2) Gagnon, P. et al.: *J. Chromatogr. A*, **1324**, 171 (2014).
- 3) Ejima, D. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **62**, 301 (1999).
- 4) Arakawa, T. et al.: *Protein Expr. Purif.*, **54**, 110 (2007).
- 5) Arakawa, T. et al.: *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **10**, 456 (2009).
- 6) Arakawa, T. et al.: *J. Chromatogr. A*, **1154**, 81 (2007).
- 7) Arakawa, T. et al.: *Protein Expr. Purif.*, **36**, 244 (2004).
- 8) Ejima, D. et al.: *Anal. Biochem.*, **345**, 250 (2007).
- 9) Arakawa, T. et al.: *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **10**, 456 (2009).
- 10) Arakawa, T. et al.: *Protein Pept. Lett.*, **15**, 544 (2008).
- 11) Arakawa, T. et al.: *Protein Expr. Purif.*, **63**, 158 (2009).
- 12) Ejima, D. et al.: *J. Chromatogr. A*, **1094**, 49 (2005).