



マルチモード多機能型カラムの応用

荒川 力¹・江島 大輔²

要 約

多機能型（マルチモード）カラムは、中性pH付近で電荷を持たないMEP（mercaptoethylpyridine）と、正あるいは負電荷を持つものに大別される。MEPは抗体と主に疎水性相互作用で結合し、カラムの洗浄や抗体の溶出には酸性溶媒やアルギニン溶液が用いられる。MEPとは異なり電荷と疎水性を持つ多機能型カラムは、静電相互作用と疎水性相互作用でタンパク質を結合し、pHの変化、塩化ナトリウム、アルギニンなどで溶出する。多機能型カラムは、その疎水性故に予想に反する結合を示すことがあるが、その場合でも、塩化ナトリウムやアルギニンを適切に使うことで溶出が可能となり得る。

1. はじめに

タンパク質の精製においては、伝統的にイオン交換クロマト、疎水性クロマト、逆相クロマトなどが用いられる。これらのクロマトに使われるカラムは、疎水性あるいは電荷のような一つの性質を用いて、タンパク質と結合する。最近普及が進みつつある多機能型（マルチモード）カラムは、主に疎水性と静電相互作用の両方による結合が可能な構造を持っている。8種類ほどの多機能型カラムがタンパク質の精製に使われており、基本的に陰

イオン型、中性型、陽イオン型に大別される。ここでは多機能型カラムによるタンパク質および抗体精製への応用、目的タンパク質類縁体の分離、洗浄や溶出に有効な溶媒などについて解説する。

2. 多機能型カラム

現在8種類ほどの多機能型カラムがタンパク質の精製に使われている。これらのカラムの化学的性質や、製造元が表1にまとめてある。これらのカラムは基本的に芳香環と解離基を有する構造を持っている。すなわち芳香環がタンパク質との疎水性相互作用の主な起動力となっている。4種の陽イオン交換多機能型カラムは一個ないし複数の解離基（たとえばカルボキシル基）を有しており、中性pH付近では負に帯電している（表1）。pHを極端な酸性にしない限り、負電荷を失うことはない。逆に陰イオン多機能型カラム4種類はすべて一個の解離基（たとえばアミノ基）を有しており、溶液のpHに依存して正電荷を持つ（表1）。これら4種の陰イオン多機能型カラムは異なるpKを持っており、中性付近で電荷を持たないのはMEPのみである。すなわちMEPのみが中性pH付近では静電相互作用を持たないことになる。この特徴がMEPを他の多機能型カラムと区別する要因となっている。

ほとんどのタンパク質製剤は生物細胞、あるいは生物そのものを使って生産される。よって精製の原料となるタンパク質は生理食塩水に近い状態で収穫される。たいいていの場合、ろ過などの簡単な前処理後、pHや塩濃度などはそのままにして、カラムに負荷するのがもっとも簡便な方法で、タンパク質への影響も最小限に抑えられる。その場合MEPを除くすべての多機能型カラムは何らかの静電相互作用を起こすことになる。タンパク質、カラムの電荷状態によって、相互作用が結合に向く場合も、反発に向く場合もある。これに反し、電気的に中性のMEPはほぼ疎水性相互作用のみでタンパク質と結合する。その意味では、MEPは単純な構造を持つ疎水性カラムと類似している。しかし、MEPと疎水性カラム

表1. 各種多機能型カラムの性質と販売元

カラム	pH 7での電荷	販売元
HEA HyperCel	プラス	Pall
PPA HyperCel	プラス	Pall
Capto adhere	プラス	GE
MEP HyperCel	ゼロ	Pall
Capto MMC	マイナス	GE
Eshmuno HCX	マイナス	Millipore
Toyopearl MX-Trp-650M	マイナス	Tosoh
Nuvia cPrime	マイナス	Bio-Rad

著者紹介 ¹Alliance Protein Laboratories (president) E-mail: tarakawa@ap-lab.com

²味の素（株）イノベーション研究所 フロンティア研究所 先端融合研究グループ

との間には大きな違いがある。

3. MEP

図1に示すように、MEPはピリジル基以外に5個のメチル基とチオエステル基を持ち、その構造は疎水性クロマトのそれよりも複雑である。疎水性クロマトは、通常生理食塩水のような低塩濃度ではタンパク質を結合できず、硫酸のような塩析塩の存在のもとで、結合が可能になる。結合したタンパク質は、通常塩析塩の濃度を下げることにより溶出する。MEPの場合、結合の強さはタンパク質に強く依存する。かなりのタンパク質は、低塩濃度では部分的な結合しか起こさない^{1,2)}。塩化ナトリウムの添加によって結合を強めることができる場合もある²⁾。ところが、抗体やFc融合タンパク質では事情が大きく異なる。これらの分子は一般にMEPとよく結合する^{1,3)}。余分な塩の添加を必要としない。実際MEPはプロテインAカラムの代用品として開発された⁴⁻⁶⁾。プロテインAは抗体に特異的に結合するので、ほとんどの不純物は非結合画分（フロースルー）として回収される。すなわちプロテインAに結合した抗体を溶出できれば、ほぼ純品に近いものが得られる。しかしプロテインAにはいくつかの難点がある。たとえば抗体の結合が強く、溶出にはかなりの酸性溶媒が必要とされ、そのような条件で溶出すると、抗体が酸変性する可能性がある⁷⁾。さらにプロテインAがカラムから脱離し、酸性溶出した抗体溶液に混入してくることである⁷⁾。脱離したプロテインAは抗体と溶液中で複合体を形成するので、その分離精製が困難なことである。プロテインAの洗浄による劣化や価格の問題も無視できない。プロテインAカラムはタンパク質でできているので、通常の強アルカリ洗浄が困難である。また小さなスケールでは無視できても、抗体薬品の生産などでは大容量カラムが使われ、そのコストは膨大なものとなる。これらの問題はMEPでは起こらない。MEPでは抗体の溶出はMEPに正電荷を持たせることによって起こさせる。ここがMEPと他の多機能型カラムとの大きな違いである。すなわち抗体を疎水性相互作用のみで結合させ、正に帯電した抗体との低pHでの反発的な静電相互作用で溶出させる。MEPのピリジン基のpKは4.8なので、弱酸性にすれば(pH 5ぐらい)、

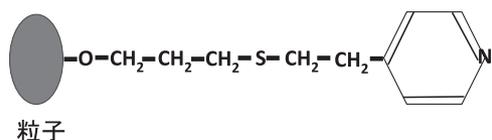


図1. MEPカラムの構造。楕円の部分はMEPが結合しているカラム粒子。

抗体の溶出に十分な部分的正電荷をMEPに持たせることができる。pH 5ぐらいにすると抗体の正味の正電荷も増加する。プロテインAからの溶出には通常4以下のpHが必要とされる。それに比べるとpH 5ぐらいだと抗体の構造は安定に保たれている。MEPはもちろん安価であると同時に、アルカリ洗浄も可能である。

プロテインAは広範囲の生物種の抗体の精製に有効であるが、ネズミの抗体には有効でない。結合性が弱く、塩の添加などの前処理が必要である^{8,9)}。またネズミの抗体は酸に弱いので、仮に結合できても酸溶出に難点がある。これらの問題はMEPや次に述べるイオン性多機能型カラムにより解決できる可能性がある。

MEPによる抗体精製の一番大きな問題は十分な純度がMEPのみでは達成できないことである。MEPは基本的には疎水性クロマトであり、プロテインAのような抗体特異性はない。不純タンパク質も強く結合し得る。抗体の溶出が弱酸性で起こるのは利点でもあり、欠点でもある。酸性溶出前の洗浄条件が限られている。塩化ナトリウム入りのpH 5.5の溶媒が推奨されているが、筆者らの経験では、この条件では不純物はほとんど溶出してこない^{1,3)}。筆者らは、中性pHでの、低濃度尿素（1 M以下）、エチレングリコール（25%以下）、アルギニン（0.2 M以下）に洗浄効果あることを報告している。これらの濃度が上がると、抗体の溶出が起こる可能性がで^{1,3)}。

4. 電荷を持つイオン性多機能型カラム

この種のカラムは中性pH付近で正電荷を持つものと、負電荷を持つものに大別される。これらのカラムを図2に単純化して示してある（実際の構造はもっと複雑である）。正電荷を持つものは、MEPとpKが大きく異なるCpto adhere (pK 10)、HEA HyperCel (pK 8)、PPA HyperCel (pK 8)の3種類である（表1）。3種ともpKが8以上と高いので、pKより下の中性pH付近では正に帯電している（図2）。先に述べたようにこの点がpHを5

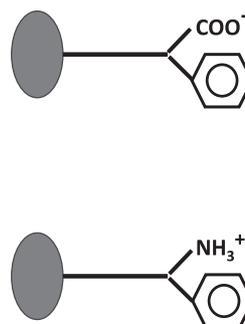


図2. 陰イオン交換および陽イオン交換多機能型カラム

ぐらいにしないと正に帯電しないMEPと異なる。よって負電荷を持つタンパク質とは静電相互作用と疎水性相互作用の両方で結合し得る(図3の矢印の部分)。図3に示すように、pK以上にpHを上げると当然カラムは正電荷を失うので、タンパク質との静電相互作用は解消される。しかしこのような高いpHではタンパク質が変性する可能性があり、疎水性相互作用が大きくなることから起こりうる。通常の陰イオン交換カラムでは、正電荷を失えばタンパク質はカラムに結合できないが、陰イオン交換多機能型カラムでは、疎水結合で結合できる可能性がある。逆に図3のようにpHをタンパク質のpI以下に下げると、今度はタンパク質が負電荷を失い、正電荷を持つようになり、やはり静電相互作用は減少するか、反発に変化する。一般に、図3に示すようにpHを下げれば下げるほど溶出効果は高まる。しかしタンパク質の酸変性が起こりうる。

一方、カルボキシル基を有する多機能型カラムCapto MMC, Nuvia cPrime, Toyopearl MX-Trp-650M, Eshmuno HCXは、図2, 4に示すように中性pH付近では負に帯電し、正に帯電しているタンパク質と静電相互作用を起こす(矢印の部分)。この場合、タンパク質が負に帯電するような高いpH、あるいはカルボキシル基が電荷を失う低いpHでは静電相互作用が消失する。こ

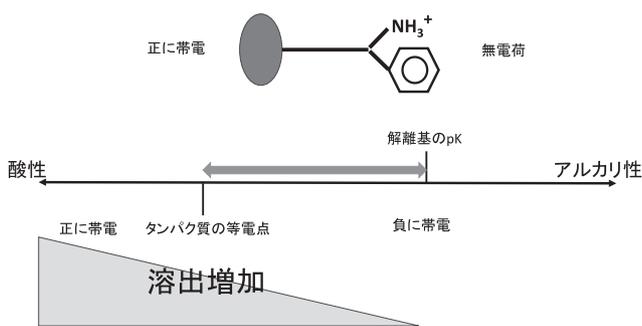


図3. 陰イオン交換多機能型カラムとタンパク質の電荷状態のpH依存性. 酸性で溶出効果が增大することを示している。

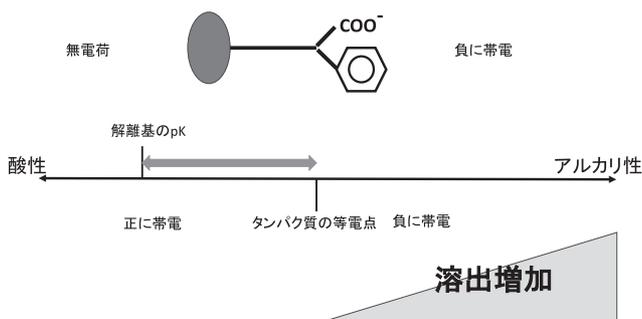


図4. 陽イオン交換多機能型カラムとタンパク質の電荷状態のpH依存性. アルカリ性で溶出効果が增大することを示している。

の場合、一般にpHを上げれば上げるほど溶出効果は増大する。しかしこの場合も極端なpHでは、タンパク質が変性し、疎水性相互作用が強まる可能性がある。また静電相互作用がなくても、疎水性相互作用のみでタンパク質が結合し得る場合もある。このように静電相互作用と疎水性相互作用が同時に働く多機能型カラムでは予期しないことが起こりうる。以下にその例をあげる。

1. 主に静電相互作用で結合しているタンパク質を塩で溶出できないとか、あるいは塩存在下で静電相互作用を抑制してもタンパク質が結合してしまう、といったことが起こりうる。特にこの現象は塩析効果の強い塩(硫酸、リン酸塩、クエン酸塩など)を使うと起こりやすいが、塩化ナトリウムでも起こる場合がある。これらの塩が高濃度(たとえば0.5 M以上)で存在すると、もちろん静電相互作用は抑えられるが、疎水性相互作用が強固化されてしまう。塩析効果の弱い塩を使うことでこれを防ぐことができる^{10,11)}。

2. 静電的反発が強い場合でも結合タンパク質が溶出しない場合がある。たとえば血清アルブミンはpH 4では正に帯電しているのに、負電荷を持つCapto MMCと容易に結合する^{10,11)}。結合後中性pHのリン酸緩衝液で洗浄すると、pIの低いアルブミンは負に帯電するようになり、よってCapto MMCと電気的反発を起こすが、それでも溶出してこない。これには二つの理由が考えられる。一つは疎水性相互作用が強い場合である。しかしこれが理由だと塩化ナトリウムではアルブミンを溶出できない。塩化ナトリウムを添加すると、塩析効果により結合がより強くなる。実際には中性pH付近で塩化ナトリウムによる溶出が起こる。もう一つの可能性は局所的な静電相互作用が結合を制御している場合である。すなわち図5に示すようにアルブミン全体としては正味で負電荷となっているが、局所的な正電荷がCapto MMCの負電荷と静電相互作用していることが考えられる。この場合局所的静電相互作用を切るのに塩化ナトリウムが有効である。ただし静電相互作用を弱めるのに十分な濃度以

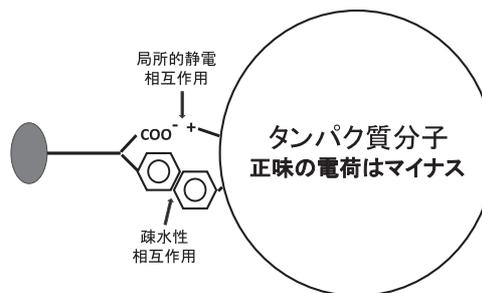


図5. タンパク質と陽イオン交換多機能型カラムの局所的静電相互作用

上の塩を使うと、疎水性相互作用が強固となり、溶出し
ないことも起こりうる。適度な塩化ナトリウム濃度が必
要とされる。

5. 目的タンパク質の類縁体の分離

タンパク質の精製は不純物の分離が目的であるが、類
縁体の分離も重要な課題である。類縁体はタンパク質の
生産中に起こる問題である。若干構造が変化したもの、
糖鎖が異なったもの、などが考えられる。これらの分離
にはもちろん単純なイオン交換や疎水性クロマトが有効
な場合もあるが、多機能型カラムが非常に効果的である。
その理由として考えられるのは、類縁体が静電的性質と
疎水の性質との両面で、ネイティブなものとは異なる可
能性があることである。そのような可能性を図6に示す。
この図では類縁体の特徴が誇張されている。すなわち構
造や糖鎖の違いで、電荷状態（正が2個）と疎水性（ア
ルキル鎖Rと芳香環）の両方が変化するように描かれて
いる。すなわち多機能型カラムでは、ネイティブと類縁
体との結合力の違いがより大きくなる。よって分離能が
上がる可能性が一つの例として考えられる。

6. 溶媒による洗浄、溶出の制御

多機能型カラムとタンパク質が静電相互作用と疎水性
相互作用2個の異なる力で結合している場合、溶出が困
難になることは想像できる。まずもっとも簡単なMEP
について述べる。MEPの場合中性pH付近では疎水性相
互作用のみなので、溶媒の選択が単純なように思われる。
しかし実際のところそうではない。もっとも明瞭な例が
有機溶媒である。疎水性相互作用のみなら有機溶媒が強
い溶出効果をもつはずであるが、実際にはそうではない。
たとえばエタノールやプロパノールでは結合タンパク質
は溶出し¹³⁾ない。このことはタンパク質がMEPと疎水
性相互作用以外の力で結合していることを意味してい
る。有機溶媒の中では親水性の高いエチレングリコール

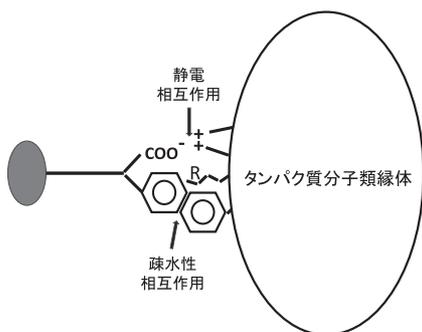


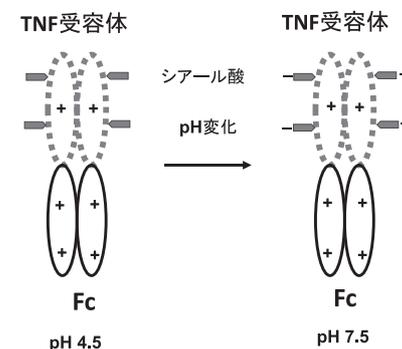
図6. タンパク質類縁体と陽イオン交換多機能型カラムの相互
作用

が若干有効である^{1,3)}。尿素やアルギニン溶液がカラム
の洗浄や、目的タンパク質の溶出に有効である。

電荷をもつ多機能型カラムでもアルギニン溶液が有効
である¹⁰⁻¹²⁾。静電相互作用が主な結合の起動力の場合、
塩化ナトリウムでも溶出できる場合が多いが、少しで
も疎水性相互作用の寄与があると、塩化ナトリウム添加
は逆効果になる。アルギニンはこのような場合、きわめ
て有効である。アルギニンは塩酸塩として使われる場合
が多いように、アルギニンイオンと対イオン（塩素イオン）
が存在し、塩化ナトリウムと同じように塩として働くの
で、静電相互作用を弱めることができる。塩化ナトリウ
ムと違うのは、塩析効果がないことである。逆に疎水性
相互作用を弱める効果を持つ。その効果は有機溶媒より
ははるかに弱い。アルギニンの効果は塩としての効果と、
弱い疎水性に起因しているものと考えられている。

7. エタナセプト（ET）を使った応用例

ETは図7に示すようにTNF受容体とFcとの融合分子
で、受容体部分には多くの糖鎖がついている。タンパク
質としてのpIは8付近だが、糖鎖のシアル酸に由来し
て分子全体としてのpIは5付近である。pH 4.5では分
子全体で正に帯電しているため、Canto MMCにはよく
結合する¹⁰⁾。ところがpHを7.5に上げて分子全体を負
電荷にしても、結合したETは溶出してこない。これは
図5に示したような、タンパク質部分の正電荷と局所的
静電相互作用によるものと考えられる。pHをさらに上
げると（たとえば8以上）、ETは容易に溶出できる。し
かし塩化ナトリウム添加による溶出の方がより簡便であ
る。図8にその結果を示す。これはpH 7.5で0から0.5 M
まで塩化ナトリウム濃度を上げて溶出したものである。
1個のピークがみられるが、すべてのタンパク質が溶出
していない。最後にpH 7.5の1 Mアルギニンで洗浄す



TNF受容体-Fc融合分子
タンパク質部分のみ: pI = ~8
タンパク質+シアル酸: pI = ~5

図7. エタナセプトの構造

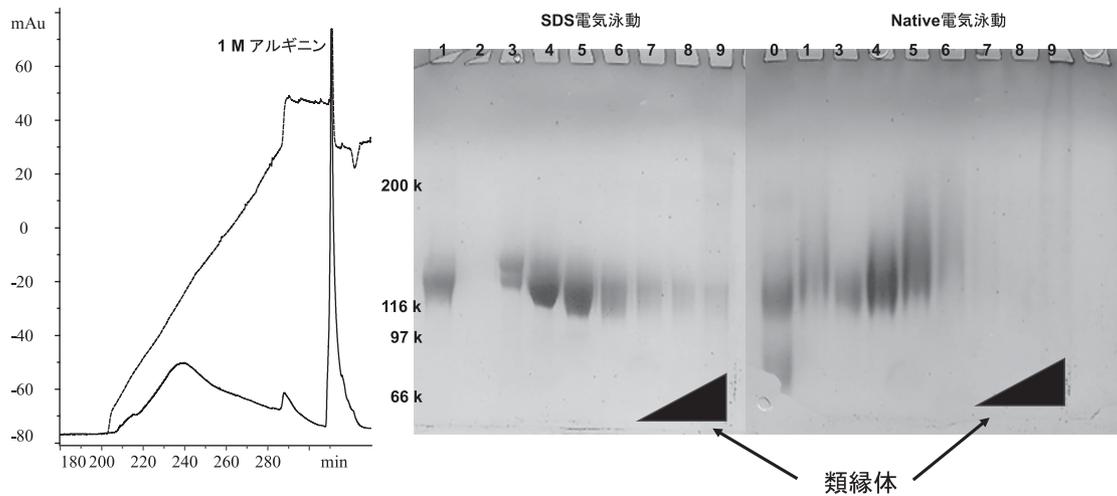


図8. エタナセプトのCapto MMCによる精製. ETはpH 4.5でCapto MMCに負荷. pH 7.5の20 mMリン酸で洗浄後, 0.5 M塩化ナトリウムで溶出. レーン0が精製に使われたサンプル. レーン1から8が溶出画分. レーン9が1 Mアルギニン. 三角印は類縁体の溶出位置.

ると大きな吸収ピークがみられる. 電気泳動で見られるようにこのピークにETが溶出してくる. 動物細胞で発現したETは多くの類縁体を含んでいる. 図8の三角印で示したように類縁体は最後の方, 特に1Mアルギニンのところで大量に溶出してくる. おそらく図6で示したような理由で, Capto MMCへの結合が強まったものと思われる.

文 献

- 1) Arakawa, T. *et al.*: *Protein Exp. Purif.*, **71**, 168 (2010).
- 2) Hirano, A. *et al.*: *J. Chromatogr. A.*, **1373**, 141 (2014).
- 3) Arakawa, T. *et al.*: *Protein Exp. Purif.*, **63**, 158 (2009).
- 4) Burton, S. and Harding, D.: *J. Chromatogr. A.*, **814**, 71 (1998).
- 5) Guerrier, G. *et al.*: *Bioseparation*, **9**, 211 (2000).
- 6) Schwart, W. *et al.*: *J. Chromatogr. A.*, **908**, 251 (2001).
- 7) Shukla, A. A. *et al.*: *J. Chromatogr. B.*, **848**, 28 (2007).
- 8) Nagaoka, M. and Akaike, T.: *Protein. Eng.*, **16**, 243 (2003).
- 9) Villemez, C. L. *et al.*: *Mol. Immunol.*, **21**, 993 (1984).
- 10) Arakawa, T. *et al.*: *Protein Exp. Purif.*, **116**, 144 (2015).
- 11) Hirano, A. *et al.*: *J. Chromatogr. A.*, **1338**, 58 (2014).
- 12) Hirano, A. *et al.*: *Protein Exp. Purif.*, **116**, 105 (2015).