

タンパク質の凝集形成とクロマトグラフィー

津本 浩平^{1*}・江島 大輔²・荒川 力³

会合凝集は、タンパク質の製剤化 (formulation)、貯蔵 (storage)、ハンドリング (handling) において最も大きな問題となる。というのは、凝集形成が各種治療用タンパク質を用いる際の副作用の原因となりえるからである^{1,2)}。精製過程あるいは製剤化における会合形成の制御のみならず、品質管理における会合形成の正確かつ高感度な検出がきわめて重要である。

タンパク質の溶液中でのクロマトグラフィーは、ゲルろ過 (分子篩クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーとも呼ばれる。以下SECと略す) に代表される分配型と、イオン交換クロマトグラフィーや親和性クロマトグラフィーに代表される吸着型に大別される。いずれの場合も、カラム樹脂あるいは担体とタンパク質分子表面との相互作用の制御が、そのクロマトグラフィーのパフォーマンスの優劣を左右している。

本稿では、その特徴的な凝集抑制作用からタンパク質のハンドリング技術に大きな進展をもたらしつつあるアルギニンがクロマトグラフィーにおける展開溶媒としても有効に機能するという我々の最近の知見をまとめてみたい。

アルギニンの持つ凝集抑制作用： タンパク質ハンドリング技術との関連

アルギニンはタンパク質のリフォールディングに汎用される添加剤の一つである³⁾。主に折りたたみ中間体の凝集抑制剤、溶解度を高める試薬、添加剤として用いられている³⁻⁷⁾。凝集抑制作用そのものは、ポリエチレングリコールやシクロデキストリン、プロリンなども凝集抑制作用をもつが、アルギニンはそれらにはないユニークな性質を持つ。すなわち、タンパク質変性剤としてよく知られているグアニジンと同様のグアニジウム基を有し、会合抑制作用があるにもかかわらず分子内相互作用を弱めることなく、変性効果を示さない。アルギニンは後に述べる折りたたみ促進剤であるアラニンやグリシンとは異なり、タンパク質に結合する傾向を示す。しかしグアニジンと比べると結合量ははるかに少ない。またグアニジンよりも動的半径がはるかに大きいので、分子内への浸透性が少ない。しかしフリーのアミノ酸側鎖との相互作用を見ると、対象の分子が小さければアルギニン

はグアニジンと似ている。アルギニンの特殊性はタンパク質全体を対象として現れるらしい^{8,9)}。

アルギニンは一度折りたたまれたタンパク質、特に可溶性のオリゴマー分子の解離も容易には行わない。また、常温常圧においては、オリゴマーの状態で存在する酵素の活性を失わせることもなく、その形状をほとんど変化させない¹⁰⁾。このような性質から、さまざまな応用が可能になっている、というわけである。

大腸菌などを用いた大量発現システムにより調製したタンパク質がしばしば凝集体として得られることが知られており、封入体と呼ばれる。この封入体には、いわゆる「古典的な」封入体、すなわちかなり変性した構造を持つ分子種の強い会合によると考えられる、物理的に「固い」封入体と、可溶性画分にも発現タンパク質が現れるような、天然様分子種の弱い会合によってできる「ルーズな」封入体がある。最近われわれは、後者の封入体について、アルギニンを用いた天然様分子の可溶化が可能であることを見いだしている^{11,12)}。

アルギニンはSECのパフォーマンスを改善する

SECは、タンパク質精製において汎用される分離方法であり、電気泳動や逆相 HPLC と並んでタンパク質の分析や品質管理に広く用いられている。たとえば、治療に用いられるタンパク質に関しては、SECの分析結果が最も重要な位置を占めている。SECはタンパク質の分子量を決定すること、その分子形状を調べることに使われる¹³⁾。タンパク質のリフォールディングへの応用例¹⁴⁾も報告されている。

分析にせよ、調製にせよ、リフォールディングにせよ、SECを行うと、タンパク質がカラムマトリックスに結合する傾向があり、結果として異常な分離プロファイルを示したり、収量が減少したり、樹脂にダメージを与えたりする。このような場合、目的のタンパク質の分子量を正しく求めることができなくなる。担体への非特異的結合を低減させるために、さまざまな工夫が報告されてきた¹⁵⁻¹⁸⁾。たとえば、NaCl やリン酸を高濃度で用いることにより、タンパク質と樹脂との相互作用を低減させる、というものがある¹⁵⁾。しかしながら、高塩濃度は疎水の相互作用を強くし、結果としてタンパク質間相互作用を

* 著者紹介 ¹ 東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻 (助教授) E-mail: tsumoto@k.u-tokyo.ac.jp

² 味の素 (株) アミノサイエンス研究所, ³ Alliance Protein Laboratories

促進して凝集形成に導かれる可能性が高いことはもはやいうまでもないであろう。一方、疎水的相互作用を弱めるような尿素や有機溶媒の展開溶媒への添加が報告されている。が、こちらはイオン相互作用を上昇させてしまう¹⁶⁾。加えて、すでに会合凝集形成してしまっている分子種を解離させてしまうために、分析に用いることは難しくなる。これらは、これらを添加剤としてSECに用いることが、樹脂へのタンパク質の非特異吸着を抑制するのには必ずしも効果的でないこと、サンプルの状態を十分反映させた分析が困難になることを意味する。極端なpHを用いることにより分離能を向上させる試みもなされている^{17,18)}。しかしながら、このような条件はタンパク質のコンフォメーションを変化させたり、凝集形成を導いたりし、結果として分析対象のタンパク質が本来ある状態の分析を不可能にしてしまう。

われわれは、このような非特異的な吸着をアルギニンが抑制することを見いだした¹⁹⁾。たとえば、ある抗体を微酸性下で加熱処理に付した後、抗体の品質管理に最もよく用いられている、シリカ担体をベースとした東ソーのG3000SWを用いたSECに供すると、ピークプロファイルは図1Aに示すようになる。ところが、この結果では、タンパク質溶液を超遠心分析により解析した結果とは、その会合体の量が一致しない。すなわち、会合凝集体の回収量が著しく低下しているのである。そこで、このSECの展開溶媒に0.2 MのL-アルギニン塩酸塩を加え、同様のカラムにより分析したところ図1Bのようになり、単量体量に対して、会合凝集体が著しく上昇していることが分かる。この図1Bの結果から求められる会合体量

は、超遠心分析の結果とよい一致を示していた。アルギニンを展開溶媒に用いることにより、さまざまなサブクラスの抗体について、会合凝集体を再現性よく検出することができることも明らかになっている。

抗体の会合凝集を正確に検出するだけでなく、アルギニンを展開溶媒として用いることにより、シリカ担体に安定に結合する（不可逆的に結合して溶出されない）分子種の分析が可能になる。たとえば、インターロイキン6、インターフェロン γ 、塩基性線維芽細胞成長因子、アクチビンのような高疎水性サイトカインのSECにおいては、それら分子の可溶性多量体どころか、単量体の検出そのものが困難であることが多い。しかし、アルギニンを展開溶媒に添加することによりSECにおけるピーク溶出が可能である。また、シリカ担体だけでなく、デキストランベースの担体にも、この手法が有効であることも確認している¹⁹⁾。

会合凝集体の検出には、分析超遠心（AUC）、Field-Flow-Fractionation（FFF）、動的光散乱などの分析法を用いることが可能である。しかしながら、バイオ医薬生産現場の品質管理にこれらの手法を用いるには、定量性や簡便性などにまだ課題が残っており、やはりSECを用いることが現実的である。アルギニンを展開溶媒への添加剤に用いることにより、SECのパフォーマンスが大幅に向上できることは、バイオ医薬の観点からも特筆に価するだろう。

親和性クロマトグラフィーにおける溶出にアルギニンを用いることができる

生体高分子の精製において、親和性クロマトグラフィーはその精製度を高める上で最も効果的な手法の一つであろう。たとえば、抗体の精製においては、そのFc領域に特異的にかつ高親和性を持って結合するリガンドであるProtein-AやProtein-Gを固定化した樹脂を用いることで、十分な精製を行うことができる。しかしながら、この高親和性がしばしば溶出時に問題を生じさせる。溶出には、これらのリガンドとの相互作用を弱めるために、抗体もしくはリガンドを一時的に変性させるような極端に低いpHを用いる。しかしながら、変性させるような条件を抗体の精製に用いると、しばしば構造変化だけでなく、分解や会合凝集を引き起こすことが知られている^{3-14, 20-22)}。このような問題を回避するために、より温和な条件での溶出^{15,16,23)}や低親和性マトリックスを用いる試みがなされている¹⁷⁻²⁸⁾。

我々は、親和性クロマトグラフィーにおける溶出溶媒にアルギニンを用いることで、比較的温和なpH条件で

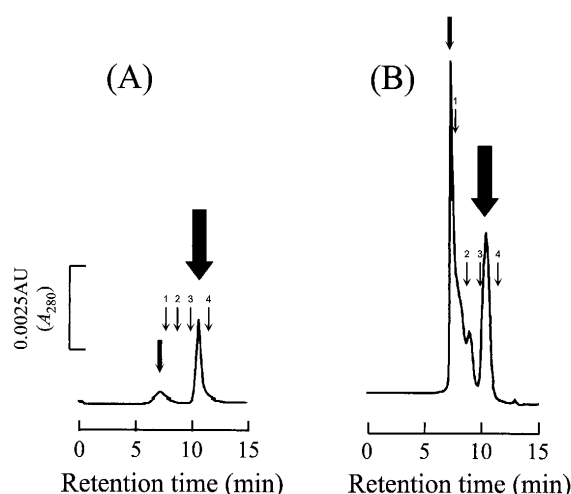


図1. G3000SWXL（東ソー製）を用いたSECによる抗体の分離。リン酸緩衝液下での分析結果を示した。(A) Argを加えなかった場合。(B) Argを0.2 M加えた場合。大きな矢印は抗体単量体、小さな矢印は会合凝集体を示している。分子量マーカーは以下のとおり：1, Thyroglobulin, 669K；2, ferritin, 440K；3, catalase, 232K；4, aldolase, 158K。

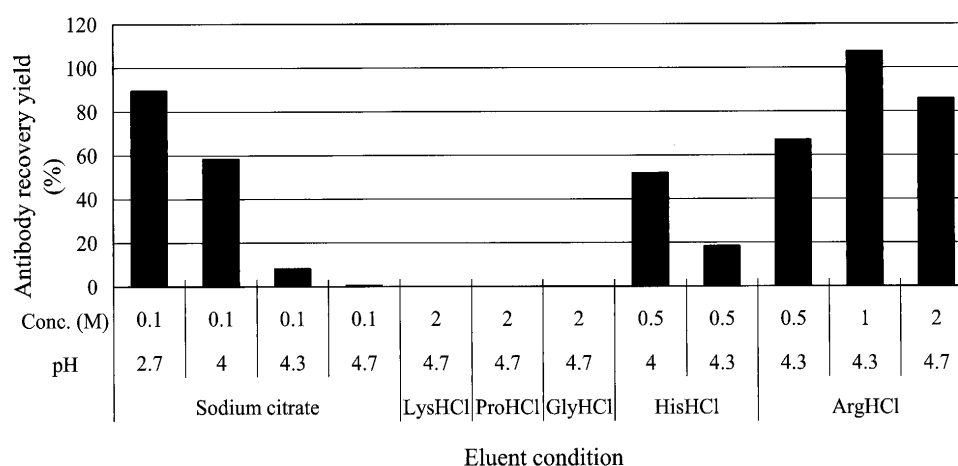


図2. さまざまな添加剤存在下でのProtein-AカラムからのヒトIgG4の回収率

の溶出が可能であることを見いだした^{29,30)}。Protein-Aを固定化した樹脂を用いた抗体の精製においては、アルギニンだけでなく、いくつかの誘導体、たとえばアセチル化アルギニンやアグマチンでもpH4.3で効率よく溶出することが可能であることを見いだしている(図2)。一方、グリシンやプロリン、リジン、ヒスチジンといったアミノ酸を用いても、アルギニンのような効果的な溶出は、同様のpHでは見られなかった(図2)。加えて、アルギニンで溶出した抗体はそのすべてが単量体であり、会合凝集の形成は観察されなかった。一方、グアニジン塩酸塩を用いたところ同様の溶出が可能となったものの、pHを中性に戻したところ会合凝集が形成されてしまい、本溶出法の特徴である単量体のみの特異的な回収はできなかった。

次に、抗原を固定した樹脂でのポリクローナル抗体の精製を同様に試みた。ヒトインターロイキン6(IL-6)で免疫したマウスの抗血清にある抗体を、IL-6を固定した樹脂に吸着させた後、2 MのArgの存在下で、pHの直線勾配で低下させたところ、pH5.4での溶出が確認された。SDS-PAGEによる分析などから、溶出画分に含まれるタンパク質のほとんどが抗体であること、SECにより溶出画分に含まれる抗体はそのほとんどが単量体であることが確認できた。このように、アルギニン溶出は親和性クロマトグラフィーを用いた抗体の精製にきわめて有効に機能することが明らかとなった³⁰⁾。

アルギニンを展開溶媒、溶出溶媒に用いたクロマトグラフィーについて、SECと親和性クロマトグラフィーを用いた抗体の分離・分析を中心に紹介した。さまざまなタンパク質の分離・分析への応用が大きく期待されることである。

文 献

- 1) Paborji, M. *et al.*: *Bogardus. Pharm. Res.*, **11**, 764 (1994).
- 2) Bleeker, W. K. *et al.*: *Blood*, **95**, 1856 (2000).
- 3) Tsumoto, K. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **20**, 1301 (2004).
- 4) Buchner, J. and Rudolph, R.: *Biotechnology*, **9**, 157 (1991).
- 5) Arora, D. and Khanna, N. J.: *J. Biotechnol.*, **52**, 127 (1996).
- 6) Tsumoto, K. *et al.*: *J. Immunol. Methods*, **219**, 119 (1998).
- 7) Shiraki K. *et al.*: *J. Biochem.*, **132**, 591 (2002).
- 8) Arakawa, T. and Tsumoto, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 148 (2003).
- 9) Kita, Y. *et al.*: *Biochemistry*, **33**, 15178 (1994).
- 10) Ishibashi, M. *et al.*: *Protein Pept. Lett.*, **12**, 649 (2005).
- 11) Tsumoto, K. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**, 1383 (2003).
- 12) Umetsu, M. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **328**, 189 (2005).
- 13) Stulik, K. *et al.*: *J. Biochem. Biophys. Methods*, **56**, 1 (2003).
- 14) Li, M. *et al.*: *Protein Expr. Purif.*, **33**, 1 (2004).
- 15) Stulik, K. *et al.*: *J. Biochem. Biophys. Methods*, **56**, 1 (2003).
- 16) Pacakova, V. *et al.*: *J. Chromatogr.*, **A 700**, 187 (1995).
- 17) Codevilla, C. F. *et al.*: *J. Liquid Chromatogr.*, **27**, 2689 (2004).
- 18) Watson, E. and Kenney, W. C.: *J. Chromatogr.*, **436**, 289 (1988).
- 19) Ejima D, *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **1094**, 49 (2005).
- 20) Vermeer, A. W. P. and Norde, W.: *Biophys. J.*, **78**, 394 (2000).
- 21) Martsev, S. P. *et al.*: *FEBS Lett.*, **361**, 173 (1995).
- 22) Buchner, J. *et al.*: *Biochemistry*, **30**, 6922 (1991).
- 23) Paborji, M. *et al.*: *Pharm. Res.*, **11**, 764 (1994).
- 24) Varady, L. *et al.*: *J. Chromatogr.*, **458**, 207 (1988).
- 25) Gulich, S. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **76**, 233 (2000).
- 26) Verdoliva, A. *et al.*: *J. Immunol. Methods*, **271**, 77 (2002).
- 27) Li, R. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **16**, 190 (1998).
- 28) Brown, N. L. *et al.*: *Mol. Biotech.*, **10**, 9 (1998).
- 29) Arakawa, T. *et al.*: *Protein Expr. Purif.*, **36**, 244 (2004).
- 30) Ejima, D. *et al.*: *Anal. Biochem.*, **345**, 250 (2005).