

イムノアフィニティークロマトグラフィーに関する研究（吸着体の調製法とその応用）

南陽研究所 機能高分子グループ 中村 孝司
加藤 芳男
長谷川 正積

1. はじめに

近年、バイオテクノロジー技術の進歩により、種々のバイオ医薬品が上市され、臨床試験に供されている。これらのバイオ医薬品は、酵素、タンパク質、ペプチド等の生体高分子がほとんどで、生理活性、薬理作用を失わないように温和な条件下での精製が要求され、かつ原料中の目的物質濃度は低い場合が多い。またバイオ医薬品は生命に直接かかわってくるため高い精製度も要求される。このような生体高分子を高純度に精製する手段としてカラムクロマトグラフィーが利用されている¹⁾。生体高分子のカラムクロマトグラフィーは原理によって大別すると(1)ゲルろ過クロマトグラフィー(2)イオン交換クロマトグラフィー(3)疎水性クロマトグラフィー(4)アフィニティークロマトグラフィーの四つに分類される。ゲルろ過、イオン交換および疎水性クロマトグラフィーは分離の原理が物質のもつ物理的、化学的特性の差に基づいているため、分離の際の特異性は一般に低く、目的物質の純度を上げるためには、数種類のクロマトグラフィーを組み合わせるにより達成可能ではあるが、収率が減少し長時間を要する。これらに対してアフィニティークロマトグラフィーは、二種の生物学的に活性な物質間に作用する特異的かつ可逆的な相互作用を利用しているため、精製度はしばしば数千倍にも達し、活性な物質の回収率も非常に高く、目的物質と特異的に結合するリガンドが入手可能であれば短時間で高純度の目的物質が得られることになる。

アフィニティークロマトグラフィーの中でも、抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーは、分離プロセスに免疫反応の選択性と特異性を利用しているため、タンパク質の精製手段として非常に有効であり、この方法により多くのタンパク質が精製されている。しかしながら、活性化型担体に抗体を固定化し、免疫吸着体を調製する時、抗原に対する吸着量が少ないといった問題がおこる²⁾。この問題は固定化

される抗体の配向性が良くないためである。今回、我々はこの問題を解決すべくTSKgel Tressyl-5PWを用い抗体固定化条件を詳細に検討し、抗原吸着効率の高い免疫吸着体の調製方法を確立した。本稿では、その抗体の固定化方法および免疫吸着体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーの応用について紹介する。

2. 実験

[1] 抗体の固定化

(1) 抗体（アフィニティー精製）の固定化

0.5~5.0mgの抗ヒトアルブミン抗体（ヤギ、アフィニティー精製、Biosys社製）を0.25gのTSKgel Tressyl-5PW（東ソー製）に2mlの1M リン酸カリウム緩衝液（pH6.5~8.5）中、4 で振盪させ固定化した。

(2) 抗体（IgG画分）の固定化

抗ヒトアルブミン、抗ヒトトランスフェリン、抗ヒトIgG、抗ヒトIgM、抗ヒトオロソムコイド、抗ヒトプラスミノーゲン抗体（ウサギ、IgG画分、Dako社製）各1mlを0.25gのTSKgel Trsyl-5PWに2mlの1.5M リン酸カリウム緩衝液（pH7.5）中、25 で振盪させ固定化した。

(3) 抗体固定化量の測定

抗体の固定化量は、固定化反応前後のゲルスラリー上清のタンパク質量をTSKgel G3000SW XL（7.8mm I.D. × 30cm、東ソー製）で測定することにより計算した。

[2] 抗原結合量の測定

各種抗体を固定化した充填剤を0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4）でスラリー濃度10%に調製した。調製したスラリーをカラム（6mmI.D. × 1cm）に加え、アスピレーターで吸引しながら充填した。充填したカラムをHPLC装置に装着し、0.1Mリン酸緩衝液（pH7.4）を流速0.5ml/min、25 で平衡化した。平衡化後、抗原各5.0mgを0.5mlの0.1M リン酸緩衝液

(pH7.4) に溶解し、流速0.5ml/minでカラムに注入した。吸着されない過剰の抗原を完全に洗浄した後、充填剤に吸着した抗原は0.1 Mクエン酸 - HCl溶液 (pH1.6) で溶出した。カラム溶出液を5ml採取し、この溶出液をUV280nmの吸光度を測定することにより、タンパク質濃度を測定し、抗原吸着量を計算した。アルブミン、トランスフェリン、IgG、IgMの濃度はE1%(280nm)をそれぞれ5.8、11.4、14.7、13.3とし計算した。

[3] タンパク質の分離

免疫吸着体による抗原の分離は6mmI.D. × 1cmまたは6mmI.D. × 4cmのカラムを用い、25 で実施した。測定装置はポンプ (東ソー製 CCPM)、検出器 (東ソー製 UV8020、検出波長: 280nm) により構成した。

[4] Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

免疫吸着体で分離精製されたタンパク質の純度はSDS-PAGEで実施した。SDS-PAGEは4-20%のポリアクリルアミドゲル(アトー製)を用いLaemmli法³⁾に従い実施した。電気泳動は定電流(22mA)、30分泳動し、電気泳動後のゲルの染色はクーマシーブリリアントブルー(ナカライ製)で実施した。

3. 結果と考察

[1] TSKgel Tressyl-5PWについて

TSKgel Tressyl-5PW (以下Tressyl-5PW) は、粒子径10 μm、細孔径約1000 のTSKgel G5000PW⁴⁾に2,2,2-トリフルオロエタンスルホニルクロライド(トレスシルクロライド)を反応させ活性化された充填剤で、トレスシル基が約20 μmol/ml gel導入されている。Tressyl-5PWはリガンド中のアミノあるいはチオール基とFig. 1のように反応し、リガンドを化学的に固定化できる。

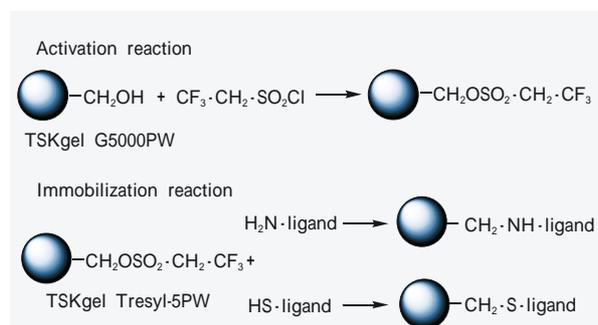


Fig. 1 Activation and immobilization reactions

[2] アフィニティー精製抗体の固定化

抗体の固定化量と抗原の吸着量の関係を調べるため、アフィニティー精製抗体、Tressyl-5PWを用い固定化条件を検討した。本研究では抗体として抗ヒトアルブミン抗体(ヤギ、アフィニティー精製品)を用いた。

(1) 固定化緩衝液のpHの影響

固定化緩衝液のpHの影響について検討した結果をFig. 2に示した。ヒトアルブミンの結合量は、ヒトアルブミンのE1%(280nm)を5.8として測定した。また、固定化された抗体の効率は、抗体を二価とし、抗アルブミン抗体、ヒトアルブミンの分子量をそれぞれ15、6.7万として計算した。抗体の固定化反応は、固定化反応時に使用する緩衝液のpHが高いほど進行しやすく、pH 7以上で96%以上の固定化収率が得られた。抗原であるヒトアルブミンに対する吸着量もpHの上昇と伴に増加し、pH 7.5で最高となった。固定化された抗体の効率はpH 7~8で70%以上の値が得られており、抗体が有効に固定化されていることが判明した。抗体はFig. 3に示したような構造をしており、Fab部分に抗原結合部位がある。このため、有効な免疫吸着体を作成するためには抗体のFc部分で充填剤に固定化する必要がある。また、抗体のFab部分の外側は親水性であるのに対し、Fc部分は疎水性であると考えられている⁵⁾。本検討では、固定化用の緩衝液として1Mリン酸緩衝液を使用した。この緩衝液中ではタンパク質がTressyl-5PWに疎水的に吸着し固定化されるため、非常に効率よく固定化されることを我々は既に報告している⁶⁾。この高濃度のリン酸緩衝液中で抗

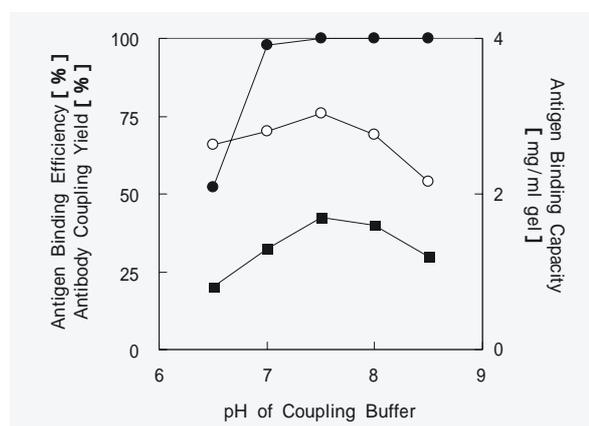


Fig. 2 Effect of pH of coupling buffer on (●) antibody coupling yield, (○) antigen binding efficiency and (■) antigen binding capacity. Affinity-purified anti-human albumin antibody (2.5mg) was reacted with 0.25 g of Tressyl-5PW in 2 ml of 1 M potassium phosphate buffer of pH 6.5-8.5 at 4 °C for 16h.

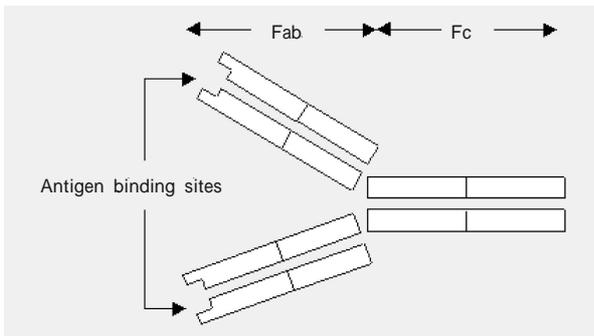


Fig. 3 Structure of IgG

体を固定化すると、まず抗体のFc部分が疎水的に吸着した後、固定化されるため効率の良い免疫吸着体が作成されたものと推測している。

Fig. 4に抗体量の影響について検討した結果を示す。固定化に使用する抗体量が増加するとヒトアルブミンに対する結合量も増加したが、固定化された抗体の効率は、抗体量の少ない時、最高値が得られ、抗体量の増加と共に減少した。これは抗体分子が大きいいため、固定化される抗体量が多くなると立体障害がおこるためと推定している。

[3] IgG画分の固定化

(1) 抗ヒトアルブミン抗体の固定化

アフィニティー精製抗体は免疫吸着体の調製に有効であるが、種類が限られている。このため比較的に入手しやすいIgG画分の固定化についても検討した。アフィニティー精製品の場合と異なり、IgG画分は総タ

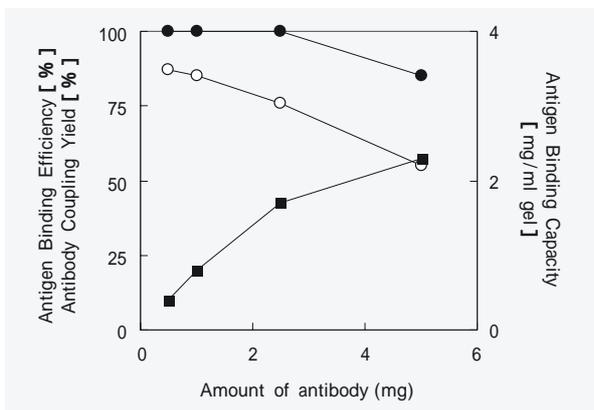


Fig. 4 Effect of amount of reacted antibody on (●) antibody coupling yield, (○) antigen binding efficiency and (■) antigen binding capacity. Affinity-purified anti-human albumin antibody (0.5-5mg) was reacted with 0.25g of Tressyl-5PW in 2 ml of 1 M potassium phosphate buffer (pH7.5) at 4 °C for 16h.

ンパク質量が多いため25 °Cで固定化反応を実施した。

Fig. 5にIgG画分固定化時の緩衝液のpHの影響をFig. 6に固定化反応の経時変化を示した。アフィニティー精製品と同様、pH 7.5~8付近でヒトアルブミンに対する吸着量が最大となった。固定化反応の経時変化では、固定化時間と共に抗体の固定化量は増加した。ヒトアルブミンの吸着量は、8時間で最高値が得られた。

(2) 各種抗ヒトタンパク質抗体の固定化

抗ヒトアルブミン抗体で得られた最適条件を用いて、各種抗ヒトタンパク質抗体の固定化を実施した。

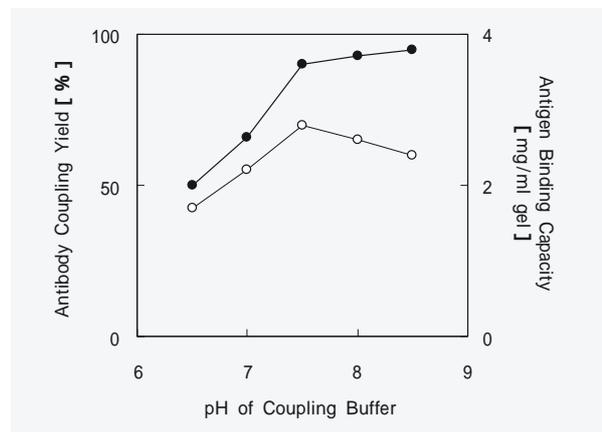


Fig. 5 Effect of pH of coupling buffer on (●) antibody coupling yield and (○) antigen binding capacity. IgG fraction of anti-human albumin antibody (10.7mg) was reacted with 0.25 g of Tressyl-5PW in 2 ml of 1 M potassium phosphate buffer of pH 6.5-8.5 at 25 °C for 16h.

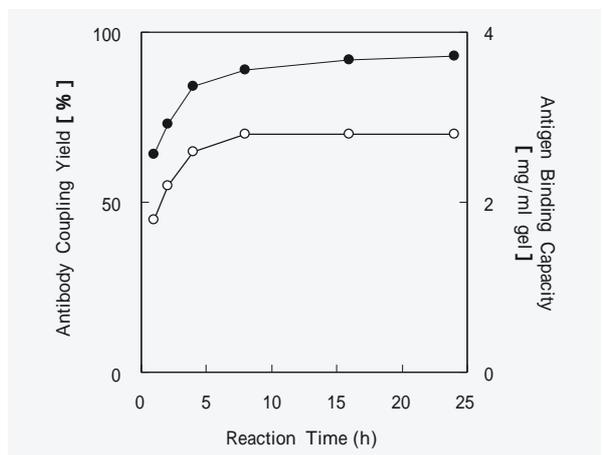


Fig. 6 Effect of reaction time on (●) antibody coupling yield and (○) antigen binding capacity. IgG fraction of anti-human albumin antibody (10.7mg) was reacted with 0.25 g of Tressyl-5PW in 2 ml of 1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) at 25 °C.

結果をTable 1に示した。検討した全ての抗体で、固定化収率は80%以上であり、抗原の結合量は2~3 mg/ml gelであった。IgMのように非常に大きな分子でも同様の抗原結合量が得られたが、Tresyl-5PWの細孔径が大きいためと考えている。

[3] 応用例

(1) タンパク質の精製

Table 1で作成した各種抗ヒトタンパク質抗体を固定化した充填剤を用い、ヒト血漿からタンパク質の精製を実施した。結果をFig. 7-9に示した。Fig. 7, 8より、高純度のアルブミンやトランスフェリンが短時間で精製できることがわかる。Fig. 9ではプラスミノゲンの精製を検討した。プラスミノゲンの血中含有量は非常に少ない(~0.2mg/ml)ため、試料注入量を

増加させ精製した。SDS-PAGEより高純度のプラスミノゲンが精製されたことがわかる。またpH1.6で溶出したにもかかわらず、80%以上の活性回収率が得られた。

血友病は、特異的な凝固因子濃度が低いことが原因の先天性出血性疾患である。最もよく知られているのが、第VIII因子欠乏症であり、X染色体遺伝である⁷⁾。このため血液製剤メーカーは血漿より第VIII因子を精製し、医薬品として販売している。血液凝固因子の血中含有量は非常に少ないため、従来のイオン交換クロマトグラフィーをベースとした精製法では、精製ステップも多く、長時間を要していた。この問題を解決するため、最近では精製工程にイムノアフィニティークロマトグラフィーが導入されている⁸⁾。

Table 1 Results of coupling of various antibodies to Tresyl-5PW

Antibody	Amount of antibody reccted [mg]	Coupling yield [%]	Antigen binding capacity [mg/ml gel]
Anti-human albumin antibody	9.0	89	2.8
Anti-human transferrin antibody	7.5	89	2.0
Anti-human IgG antibody	5.5	96	2.5
Anti-human IgM antibody	5.0	90	2.5
Anti-human 1-acidglycoprotein antil	12	83	-
Anti-human plasminogenantibody	5.5	90	-

Anti-human serum protein antibodies (5-12 mg) were reacted with 0.25 of Tresyl-5PW in 1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) at 25 for 8 h. Antigen binding capacity was not determined for anti-human 1-acidglycoprotein antibody and anti-human plasminogen antibody.

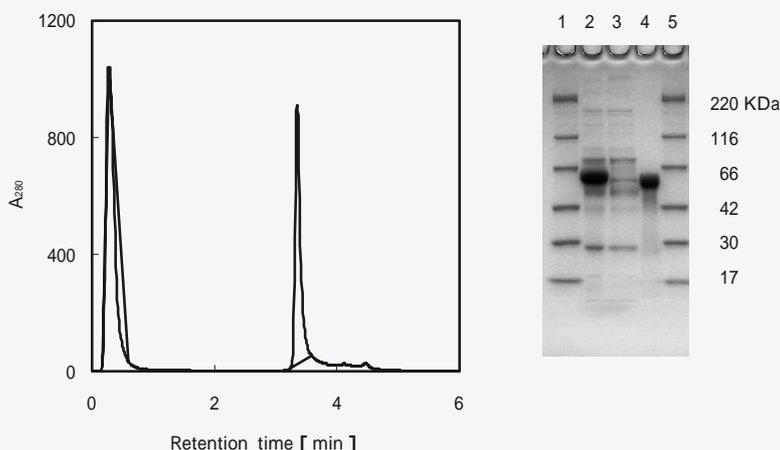


Fig. 7 Purification of albumin by high-purance affinity chromatography

Human serum (6 μ l) was applied to a column (6 mm I.D. \times 1 cm) of Tresyl-5PW coupled with anti-human albumin antibody at a flow-rate of 1 ml/min at 25 . The pH of eluent was changed stepwise from 7.0 to 1.6 at 3 min after the sample injection. Bound and unbound peaks were collected and subjected to SDS-PAGE. The results of SDS-PAGE are included; lanes 1 and 5, lane 2, lane 3 and lane 4 represents patterns of molecular weight markers, haman serum, unbound fraction and bound fraction, respectively.

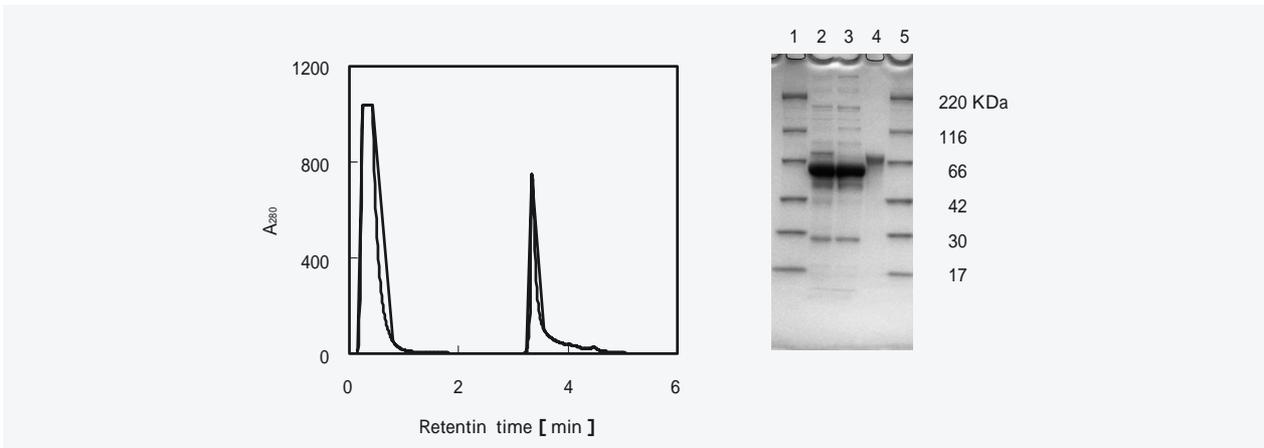


Fig. 8 Purification of transferrin by high-performance affinity chromatography
 Experimental procedure as for albumin in Fig. 7, except that 80 μ l of human serum was applied to a column of Tresyl-5PW coupled with anti-human transferrin antibody. The results of SDS-PAGE are included; lanes 1 and 5, lane 2, lane 3 and lane 4 represents patterns of molecular weight markers, human serum, unbound fraction and bound fraction, respectively.

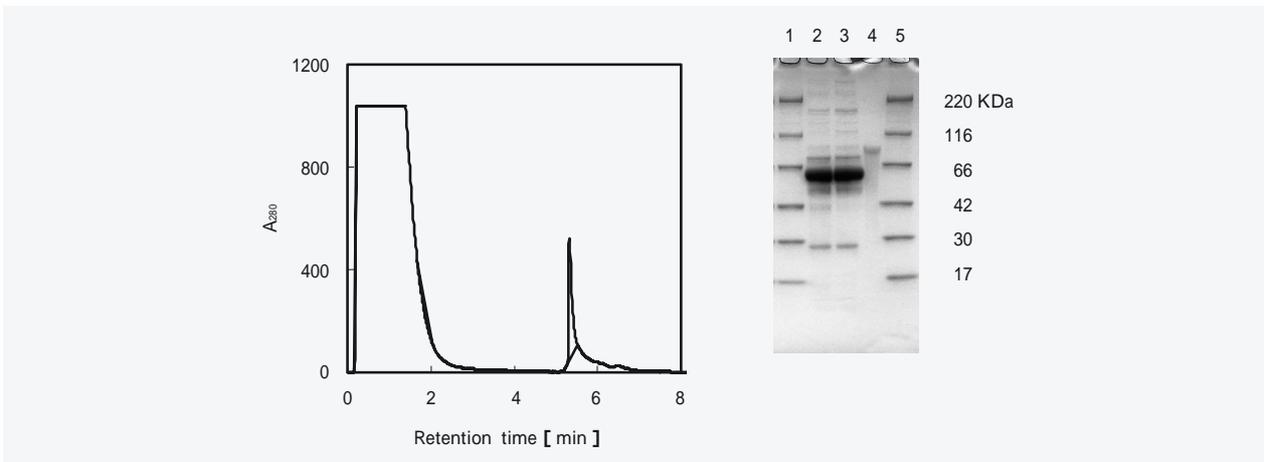


Fig. 9 Purification of plasminogen by high-performance affinity chromatography
 Experimental procedure as for albumin in Fig. 7, except that 500 μ l of human serum was applied to a column of Tresyl-5PW coupled with anti-human plasminogen antibody and the pH of the eluent was changed at 5 min after the sample injection. The results of SDS-PAGE are included; lanes 1 and 5, lane 2, lane 3 and lane 4 represents patterns of molecular weight markers, human serum, unbound fraction and bound fraction, respectively.

(2) 臨床分析

ヒト血清タンパク質の臨床分析についてもイムノアフィニティークロマトグラフィーが応用できる。Fig. 10では血清中のIgGの分析を実施した。試料は4分間隔で注入し、300回繰り返し測定した。IgG量はpH1.6で溶出したピーク高さより測定した。ピーク高さと注入したIgG量との間には、160 μ gまで直線性が確認された。本法による血清中のIgG定量を臨床検査で使用されるSRID (Single Radial Immuno Diffusion) 法と比較した。その結果をFig. 11に示すが、本法はSRID法と良好な相関性が認められた。

(3) プロテオーム解析の前処理

さて、ヒトの全遺伝子情報であるDNAの30億塩基対を調べるヒトゲノム計画は、ほぼ終了し、次のステップとして、これらゲノム情報を基にしてその最終発現産物である全タンパク質を網羅的に解析し、高度に複雑な生体システムの総合的理解を目指す研究(プロテオーム)が世界各国で熾烈な競争となっている。プロテオーム解析の流れは、二次元電気泳動でタンパク質を分離し、分離されたタンパク質をそれぞれ質量分析によりペプチドマップを作製したり、アミノ酸配列を決定する。これらのデータをもとにゲノム解析で得

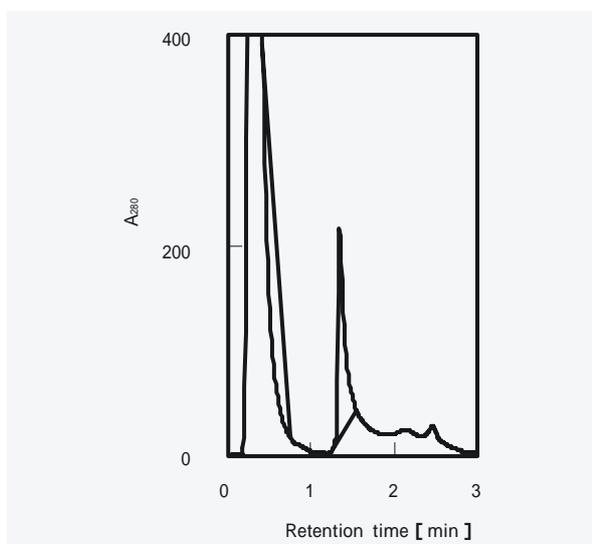


Fig.10 Analysis of IgG in human serum by high-performance affinity chromatography
A 1 μ l of human serum diluted 10-fold with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) was applied to a column (6 mm I.D. \times 1 cm) of Tyesyl-5PW coupled with anti-human IgG antibody at a flow-rate of 1 ml/min at 25 $^{\circ}$ C. Bound IgG was eluted by pulse injection of 1 ml of 0.1 M citric acid (pH 1.6) at 1 min after the sample injection.

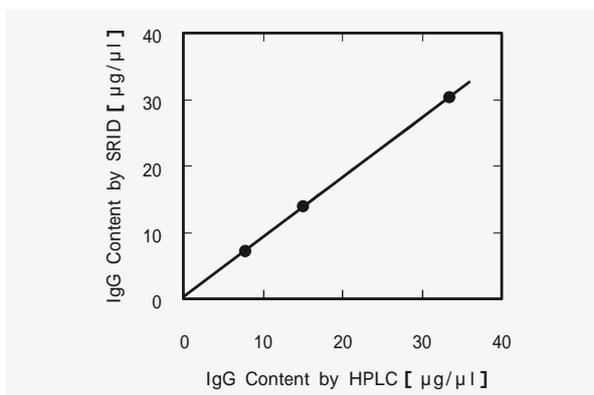


Fig.11 Relationship between IgG contents in human serum determined by single radial immunodiffusion (SRID) and by high-performance affinity chromatography (HPAC) Three human serum standards (1 μ l) of different IgG contents were analyzed in the same way as in Fig. 10.

られたデータベースを検索し、タンパク質と遺伝子の関係を明らかにする。プロテオーム解析の成否は、いかに多くのタンパク質をハイスループットで分離精製できるかにかかっている。

ヒト血清のプロテオーム解析では、まず二次元電気泳動により血清中のタンパク質が分離されるが、大量に存在するタンパク質の影響で、低発現量のタンパク質解析が困難となる。アルブミンとIgGだけでも血清中に存在する総タンパク質量の約70%を占める。これらのタンパク質をあらかじめ除去すれば、SDS-PAGEまたは二次元電気泳動において、アルブミンやIgGに近似した分子量または等電点を有する他の重要タン

パク質が検出できる、試料負荷量の増加が可能となり、低発現量のタンパク質の検出が改善される、ということになる。このアルブミンとIgGの除去にアフィニティークロマトグラフィーが利用されている。ヒトアルブミンと親和性のあるリガンドといえば、Cibacron Blueという色素または抗ヒトアルブミン抗体が考えられる。両者の性能を比較するため、色素を固定化した充填剤と本検討で得られた抗体を固定化した充填剤でヒト血清を分離した。色素が固定化された充填剤はアガロースを基材としたBlue-Sepharose 6FF (アマシャム製)とToyopearl AF-Blue (東ソー製)を使用し、抗体は表1に示した充填剤を使用した。Fig. 12にSDS-PAGEの結果を示した。第4、6および8レーンはそれぞれBlue-Sepharose、Toyopearl AF-Blueおよび抗ヒトアルブミン抗体固定化5PWに吸着したヒトアルブミン画分であるが、色素を固定化した充填剤はヒトアルブミン以外の成分まで吸着しており、やはり特異性は抗体の方が優れていた。したがって、ヒト血清中のアルブミン除去では、抗体固定化充填剤を使用した方が好ましいと言える。

表1に示した抗アルブミン、抗IgG抗体固定化充填剤を4:1の割合で混合した後、カラムに充填し、ヒト血清を分離したクロマトグラムをFig.13に示した。非吸着画分と吸着画分のSDS-PAGEをFig. 13の第9、10レーンに示したが、Tresyl-5PWは粒子径が10 μ mと小さいため、非吸着画分があまり希釈されずに溶出される。このため、その後のSDS-PAGEで負荷量を多くす

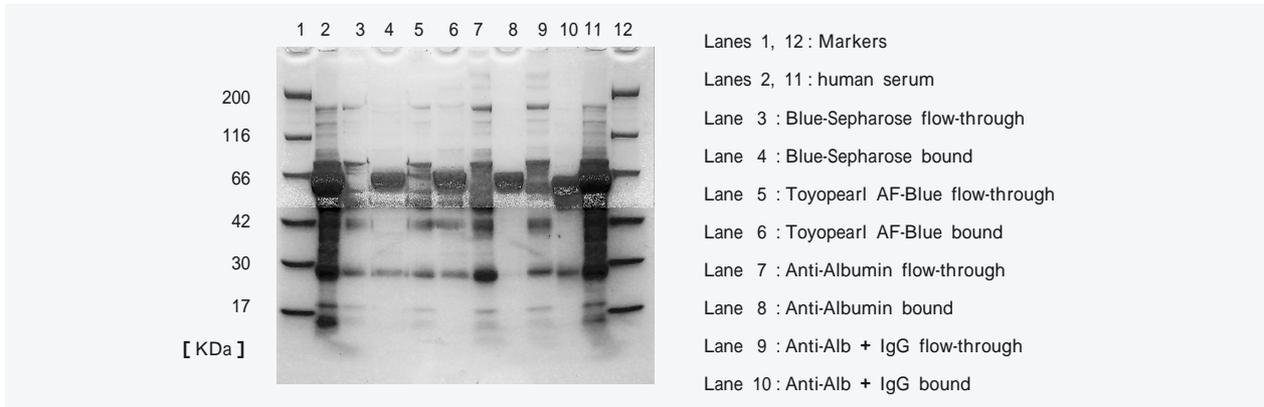


Fig.12 SDS-PAGE analysis

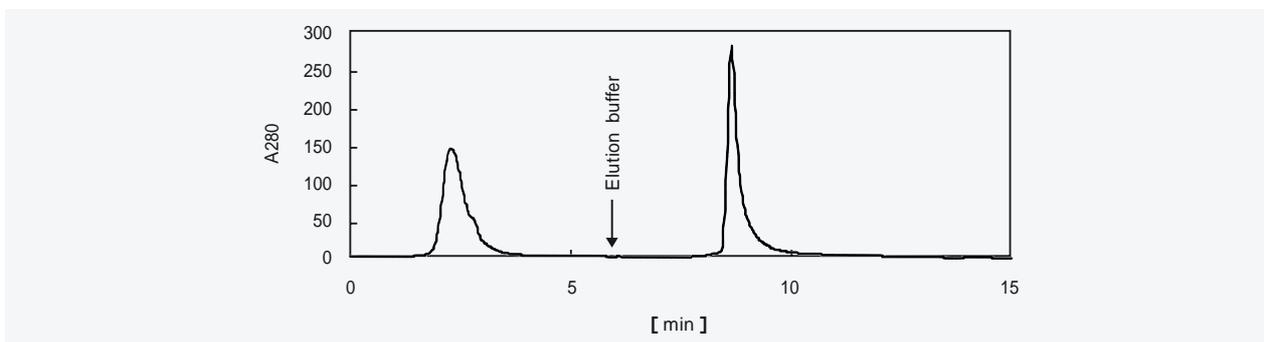


Fig.13 Removal of albumin and IgG by high-performance affinity chromatography

Human serum (20 μ l) was applied to a column (6 mm I.D. \times 1 cm) of Tresyl-5PW coupled with anti-human albumin and anti-human IgG antibody at a flow-rate of 0.5 ml/min at 25 $^{\circ}$ C. The pH of eluent was changed stepwise from 7.4 to 1.6 at 8 min after the sample injection. Unbound and bound peaks were collected and subjected to SDS-PAGE.

ることが可能となり、タンパク質の検出がさらに改善できる。

[4] おわりに

以上のようにTSKgel Tresyl-5PWはイムノアフィニティークロマトグラフィー用の充填剤として有効であった。抗体は温和な条件下で容易に固定化でき、抗体の固定化収率も高く、最適条件下で抗体を固定化すると、70~80%の抗原結合効率を示した。Tresyl-5PWを用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーにより、短時間で高純度のタンパク質が得られ、臨床分析にも応用可能である。また、本検討で使用した1Mリン酸緩衝液は抗体の固定化だけでなく、他のタンパク質の固定化にも使用可能である。

参考文献

- 1) バイオセパレーションプロセス便覧 (1996)
- 2) R. R. Walters, *Anal. Chem.*, 57, 1099 (1985)
- 3) U. K. Laemmli, *Nature*, 227, 680 (1970)
- 4) T. Hashimoto, H. Sasaki, M. Aiura, Y. Kato, *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, 16, 1789 (1978)
- 5) S. J. Van Oss, C. F. Gillman, A. W. Newman, *Phagocytic Engulfment and Adhesiveness as Cellular Surface Phenomena*, (1975)
- 6) K. Nakamura, T. Hashimoto, Y. Kato, K. Shimura, K. Kasai, *J. Chromatogr.*, 513, 367 (1990)
- 7) L. W. Hoyer, *New Engl. J. Med.*, 330, 38 (1994)
- 8) T. Burnouf, H. Goubran, M. Radosevich, *J. Chromatogr. B*, 715, 65 (1998)