

研究助成報告書(中間・終了)

No.1

整理番号	H28-J-014	報告者氏名	瀬戸 弘一
------	-----------	-------	-------

研究課題名

バイオセパレーションに向けた糖鎖組み込み型多孔体の開発

<代表研究者> 機関名：福岡大学工学部化学システム工学科 職名：助教 氏名：瀬戸 弘一

<共同研究者>	機関名：	職名：	氏名：
	機関名：	職名：	氏名：
	機関名：	職名：	氏名：
	機関名：	職名：	氏名：

<研究内容・成果等の要約>

バイオテクノロジーの中で、生体物質を分離精製する技術、すなわちバイオセパレーションはバイオプロセスの中核と言える。バイオセパレーションでは、サイズ排除分離が一般的である。数ナノから数マイクロメートルのサイズをもつタンパク質、ウイルス、および細菌をサイズ排除するためには、ターゲットよりも小さな孔をもつ限外濾過膜あるいは精密ろ過膜が用いられる。しかしながら、サイズ排除分離では、目詰まりおよび圧力損失の増大が問題となる。さらに、サイズ排除では、選択的な分離が困難であるといった致命的な欠点もある。従って、バイオセパレーションには、サイズ排除分離よりも親和性(アフィニティ)分離が有効である。

本研究では、グライコモノリスと名付けた糖鎖組み込み型多孔体を作製し、流通式におけるアフィニティーバイオセパレーションに用いた。このグライコモノリスの多孔質構造形成は、ポリアクリルアミド部位の重合誘起相分離に起因する。グライコモノリスの細孔径は、モノリス作製時のポロゲンとなるアルコール溶媒の種類を変えることにより数百ナノメートルから数マイクロメートルの間で制御可能であった。細孔径の制御は、様々な生体物質に対応可能なデザイン型のバイオセパレーション材料を提供する。グライコモノリス内の細孔は貫通孔であり通液可能であったため、流通式タンパク質分離に適用可能である。グライコモノリス中の糖鎖密度が大きいため、糖結合性タンパク質(コンカナバリン A)に対するグライコモノリスの吸着容量は糖鎖高分子固定化材料の吸着容量よりも大きかった。吸着したコンカナバリン A をグライコモノリスから溶出させると、流出液中のコンカナバリン A 濃度は供給液の 11 倍高くなった。グライコモノリスへのコンカナバリン A の吸着は特異的であり、他のタンパク質が共存していてもコンカナバリン A のみを吸着した。本研究で開発したグライコモノリスは、強固かつ選択的な吸着性、大きな吸着容量、およびターゲットの多様性を兼ね備えたバイオセパレーションマテリアルとなつた。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

● 口頭

- [1] 瀬戸 弘一, 生体分子認識を利用したバイオセパレーションおよびバイオセンシングマテリアルの開発, 化学工学会 第82年会, 東京, 2017年3月 6-8 日.
- [2] 三浦 佳子, 松本 光, 瀬戸 弘一, 星野 友, 高分子ゲルモノリスによるフロー化学プロセスの開発, 化学工学会 第82年会, 東京, 2017年3月 6-8 日.
- [3] 麻生 早紀, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, 糖鎖修飾マイクロスフェアの大食細胞への付着と取込, 粉体工学会 2017 年度 春期研究発表会, 東京, 2017年5月 16-17 日.
- [4] 瀬戸 弘一, 麻生 早紀, 山下 勝也, 塚本 七海, 廣橋 由美子, 新戸 浩幸, 糖鎖固定化微粒子を用いたマクロファージの飲食作用評価, 化学工学会 第49回秋季大会, 名古屋, 2017年9月 20-22 日.
- [5] 原田 真緒, 坂本 純希, 瀬戸 弘一, 廣橋 由美子, 新戸 浩幸, 天然ポリフェノールコーティング金ナノ粒子を用いたバイオセンシングの応用, 化学工学会 第49回秋季大会, 名古屋, 2017年9月 20-22 日.
- [6] 塚本 七海, 竹本 聰, 柳場 俊亮, 中島 可奈英, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, AFM および FCM の異種計測法による細胞・粒子間相互作用の評価, 化学工学会 第49回秋季大会, 名古屋, 2017年9月 20-22 日.
- [7] 佐伯 篤志, 瀬戸 弘一, 神波 誠治, 廣橋 由美子, 新戸 浩幸, 金属メッシュデバイスの構造微細化により高感度化したバイオセンサーの開発, 化学工学会 第49回秋季大会, 名古屋, 2017年9月 20-22 日.
- [8] 松本 光, 瀬戸 弘一, 星野 友, 三浦 佳子, ゲル空間を有する多孔質材料のフロー触媒反応への応用, 化学工学会 第49回秋季大会, 名古屋, 2017年9月 20-22 日.

●ポスター

- [1] 塚本 七海, 有田 拓哉, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, 大食細胞への微粒子の付着・取込に対する単一細胞・単一粒子レベルでの観測, 平成28年度物理化学インターラッジセミナー兼油化学界面科学部会九州地区講演会, 福岡, 2017年11月 26 日.
- [2] 麻生 早紀, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, 糖鎖修飾シリカ粒子のマクロファージへの付着と取込, 平成28年度物理化学インターラッジセミナー兼油化学界面科学部会九州地区講演会, 福岡, 2017年11月 26 日.
- [3] 塚本 七海, 竹本 聰, 柳場 俊亮, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, フローサイトメトリーによる細胞・ナノ粒子間の相互作用の評価, 化学工学会 第82年会, 東京, 2017年3月 6-8 日.
- [4] 瀬戸 弘一, 細胞表面を模倣したバイオマテリアルの設計, 化学工学会 第82年会, 東京, 2017年3月 6-8 日.
- [5] 松本 光, 瀬戸 弘一, 秋吉 孝則, 星野 友, 三浦 佳子, サイズ制御されたゲルネットワークの流通式触媒反応への応用, 化学工学会 第82年会, 東京, 2017年3月 6-8 日.
- [6] 秋吉 孝則, 松本 光, 瀬戸 弘一, 星野 友, 三浦 佳子, 高活性および長寿命をもつPd担持ナノゲルの設計, 化学工学会 第82年会, 東京, 2017年3月 6-8 日.
- [7] 佐伯 篤志, 瀬戸 弘一, 廣橋 由美子, 新戸 浩幸, 神波 誠治, 金属メッシュデバイスの微細化によるバイオセンサーの高感度化, 第54回化学関連支部合同九州大会, 北九州, 2017年7月 1 日.
- [8] 原田 真緒, 瀬戸 弘一, 廣橋 由美子, 新戸 浩幸, 天然ポリフェノールコーティング表面への生体分子結合能評価, 第54回化学関連支部合同九州大会, 北九州, 2017年7月 1 日.
- [9] 麻生 早紀, 塚本 七海, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, 種々の生体物質が固定化された粒子に対するマクロファージの貪食作用の差異, 化学工学会 第49回秋季大会, 名古屋, 2017年9月 20-22 日.

●論文

- [1] Hirokazu Seto, Makoto Shibuya, Hikaru Matsumoto, Yu Hoshino, Yoshiko Miura, Glycopolymers monolith for affinity bioseparation of proteins in a continuous-flow system: Glycomonolith, J. Mater. Chem. B, 5, 1148-1154, 2017.
- [2] Hikaru Matsumoto, Hirokazu Seto, Takanori Akiyoshi, Makoto Shibuya, Yu Hoshino, Yoshiko Miura, Macroporous Monolith with Polymer Gel Matrixas Continuous-Flow Catalytic Reactor, Chemistry Letters, 46, 1065-1067, 2017.

<研究の目的、経過、結果、考察>

バイオテクノロジーの中で、生体物質を分離精製する技術、すなわちバイオセパレーションはバイオプロセスの中核と言える。バイオセパレーションでは、サイズ排除分離が一般的である。数ナノから数マイクロメートルのサイズをもつタンパク質、ウイルス、および細菌をサイズ排除するためには、ターゲットよりも小さな孔をもつ限外濾過膜あるいは精密ろ過膜が用いられる。しかしながら、サイズ排除分離では、目詰まりおよび圧力損失の増大が問題となる。さらに、サイズ排除では、選択性的な分離が困難であるといった致命的な欠点もある。従って、バイオセパレーションには、サイズ排除分離よりも親和性(アフィニティ)分離が有効である。

近年、細胞表面に存在する糖鎖がウイルス・細菌の感染、細胞間接着、受精、およびガン転移などあらゆる生命現象における分子認識に関与していることが徐々に明らかとされている。この生体内で働く糖鎖を導入した合成高分子を糖鎖高分子という。高分子中の糖鎖は、集積化されているため強固な相互作用を形成する。糖鎖高分子を材料界面に配置すれば細胞表面を模倣でき、糖鎖がもつ強固かつ選択性的な生体親和性を発現できる。本研究では、糖鎖の分子認識機能を利用したバイオセパレーション材料の開発を目的とする。

1) グライコモノリスの作製および物性評価

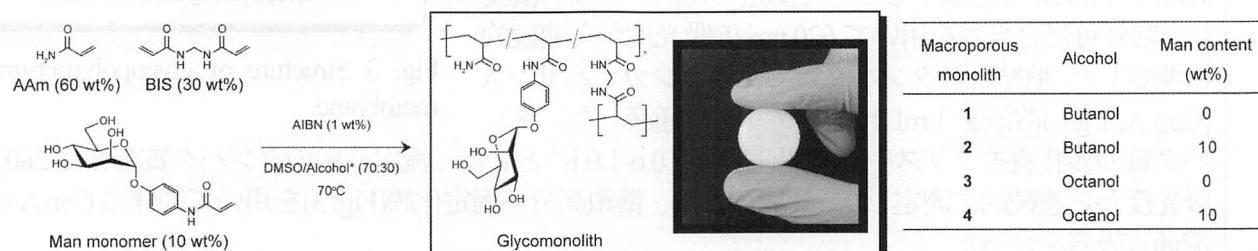


Fig. 1 Schematic illustration for preparation of glycomonolith.

グライコモノリスは、アルコールをポロゲンとして用いたポリアクリラミドの重合誘起相分離によって作製した(Fig. 1)。アクリラミド(AAm, 240 mg, 60 wt%)、糖鎖(マンノース)モノマー(40 mg, 10 wt%)、および架橋剤(BIS, 120 mg, 30 mol%)を800 μLのDMSOおよびアルコール(ブタノールあるいはオクタノール)の混合溶媒(7:3)に溶解させた。糖鎖を導入していないモノリス(AAm : BIS = 70 : 30)も同様に作製した。モノマー溶液を30 min以上窒素バーピングし、200 μLの開始剤溶液(1 wt%)をモノマー濃度に加えた。これを内径20 mmのガラスバイアルに注加して70°Cでインキュベートした。反応終了後、円柱状のグライコモノリスをメタノール中に1日以上浸漬し洗浄した。得られたグライコモノリスを水に1日以上浸漬させて膨潤させた。高いモノマー濃度および架橋剤密度のおかげで、水で膨潤した多孔質モノリスは比較的硬く、自立可能であった(Fig. 1)。収量を測定するため、膨潤したグライコモノリスを凍結乾燥した。収率は、一様に90%以上であった。得られたモノリスの内部構造は、電界放出型走査型電子顕微鏡(FE-SEM)により観察した(Fig. 2)。短鎖のアルコール(ブタノール)をポロゲン溶媒として用いると、多数の微細球が房になっていた。一方で、ポロゲン溶媒としての長鎖アルコール(オクタノール)の使用は、より大きな微細球の形成を誘導した。すべてのモノリス内部で、マクロ孔が観察された。乾燥状態のモノリスの細孔分布および細孔体積は、水銀ポロシメーターにより測定した。ポロゲン溶媒としてブタノールおよびオクタノールを用いると、乾燥したモノリス中の

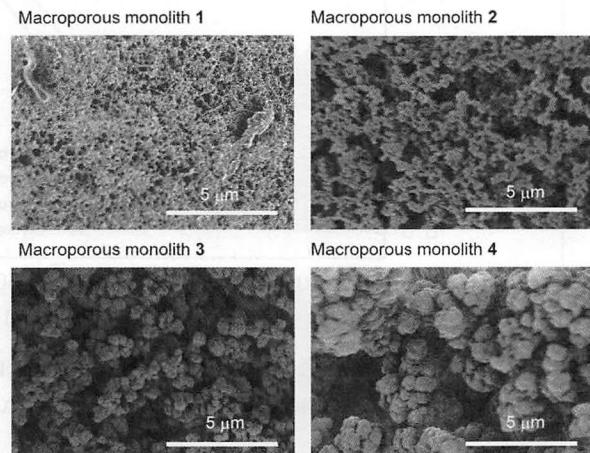


Fig. 2 SEM images of macroporous monoliths.

孔径はそれぞれ数百ナノメートルおよび数マイクロメートルであった。このモノリスの多孔質構造への溶媒の影響は、ポリマーの溶解性、形成した核の相分離速度、および相分離した核の数の違いと提案されている。10 wt%の糖鎖の導入は、差ほど多孔質特性に寄与しなかった。得られたモノリスの水透過性を調べた。グライコモノリスは貫通孔をもつため、通液可能であった。グライコモノリスに6 mL h⁻¹で水を透過したときの圧力損失から、グライコモノリス 2 および 4 の Darcy の透過係数を算出すると、それぞれ 5.4×10^{-15} および 1.3×10^{-13} m² であった。これは、それぞれ数百ナノメートルおよび数マイクロメートルの孔径をもつ市販のメンブレンフィルターの水透過性に相当する。

2) グライコモノリスを用いたタンパク質の流通式吸着

タンパク質の連続流通吸着用のモノリスは、乾燥することなく用いた。膨潤したモノリスをホルダーに充填し、連続流通システムに装着した。タンパク質の吸着前、HEPES 緩衝溶液(10 mM)を 12 時間以上透過することでモノリスをコンディショニングした。モノリスの空孔体積は、ボイドマーカー(ブルーデキストラン、分子量 2000 kDa)を 1 mL/h で通液することで測定した。マーカー濃度は、紫外可視分光器を用いて 620 nm の吸光度から連続的に測定した。糖結合性タンパク質であるコンカナバリン A (Con A, 1 g/L)溶液を 1 mL/h でモノリスに通液した。タンパク質の多孔質モノリス中の空間速度は、0.6-1.0 h⁻¹とした。流出液中のタンパク質濃度は 280 nm の吸光度から連続的に測定した。比較のため、糖鎖高分子固定化膜(Fig. 3)を用いて同様に Con A の連続流通式吸着を行った。

Con A 溶液をグライコモノリスに通液した際の破過曲線および動的吸着量を Fig. 4 に示す。Con A は、糖鎖をもたないモノリス 1 を通液直後に破過が起きた。一方で、グライコモノリス 2 および 4 を用いた際の破過点は、ベッド体積が約 30 であった。糖鎖高分子固定化膜を用いると Con A 溶液を通液してからすぐに破過に達した。ライコモノリス 2 および 4 は異なる孔径分布をもつにもかかわらず、同程度の動的吸着容量を示した。また、グライコモノリスへの動的吸着量は、糖鎖高分子固定化膜よりも 10 倍以上大きかった。これは、吸着剤中の糖鎖密度に起因する。Con A を吸着した後のグライコモノリスの透過性は、変化が無かった、これはファウリングが起きていないことを表している。

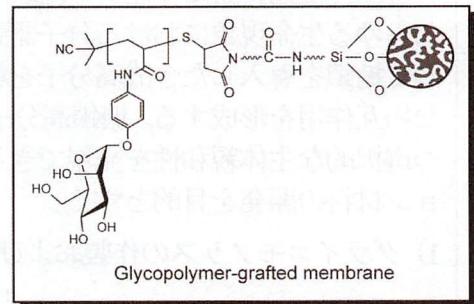
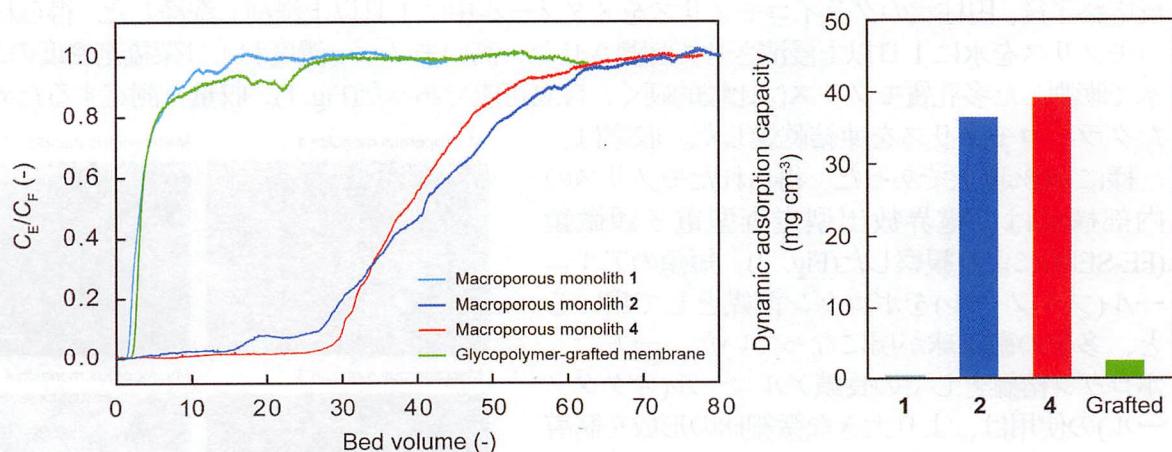


Fig. 3 Structure of glycopolymers-grafted membrane.

流出液中のタンパク質濃度は 280 nm の吸光度から連続的に測定した。比較のため、糖鎖高分子固定化膜(Fig. 3)を用いて同様に Con A の連続流通式吸着を行った。



グライコモノリス 2 から Con A を回収するため、溶出試験を行った。Con A が吸着したグライコモノリスに HEPES 緩衝溶液を 1 mL/h で 24 時間以上通液した。Con A を回収するため、酢酸を用いて流通液の pH を 2 まで下げた。流出液を連続的に回収し、流出液中の Con A 濃度を紫外可視分光器によって測定した (Fig. 5)。Con A は、最大で供給液濃度の 11 倍の濃度で溶出された。ベッド体積 1.2-7.4 のフラクション中の Con A の濃縮率は、5.1 であった。Con A の溶出率は 90% であり、ほとんどすべての Con A をグライコモノリスから回収できた。グライコモノリスは、生体分子の除去材料としてだけではなく生体分子の精製材料としても有効である。

3) タンパク質に対するグライコモノリスの特異性

グライコモノリスを用いて、牛血清タンパク質(BSA)共存下からの Con A の選択的分離を行った。Con A および BSA 混合溶液を 1 mL/h でグライコモノリス 2 に 24 時間通液した。各タンパク質濃度は、1 g/L (全タンパク質濃度: 2 g/L)とした。流出液中のタンパク質の存在は、電気泳動によって確認した。タンパク質混合供給液およびグライコモノリス 2 を通った流出液の電気泳動画像を Fig. 6 に示す。BSA および Con A 混合溶液をベッド体積 15 まで透過した時、流出液中から Con A は検出されなかった。40 (w/v)%で調製された架橋密度 30 %の polyAAm ゲルのメッシュサイズは 2 nm 以下と推測されているため、BSA ($3.8 \times 3.8 \times 14.0$ nm) および Con A ($6.7 \times 11.3 \times 12.2$ nm) はゲルネットワーク内を拡散できない。従って、Con A の分離メカニズムは、サイズ排除およびサイズ分画では無く親和性吸着である。また、マンノースを導入したグライコモノリスには、他の糖(ガラクトース)結合性タンパク質は吸着しなかった (Fig. 7)。このタンパク質の非特異的吸着抑制は、ポリアクリルアミド骨格の親水性および無電荷という特徴に起因する。グライコモノリスを用いることで、共存系できさえ優先的に Con A を分離できた。

多孔質材料を糖鎖高分子自身で構築することで、高分子固定化膜のような従来のアフィニティ一分離材料よりもタンパク質吸着の大容量化を達成した。バイオセパレーションにおいてターゲットは、タンパク質、ウイルス、バクテリアと様々なサイズを対象とする。本研究で開発したグライコモノリスは、生体特異的な吸着性、大きな吸着容量、および細孔径の制御を兼ね備えたバイオセパレーションマテリアルである。

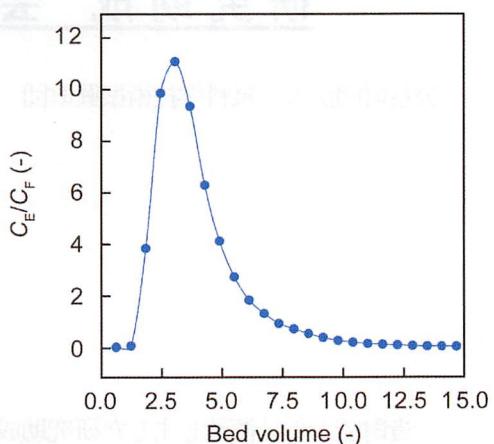


Fig. 5 Elution curve of Con A from glycomonolith 2.

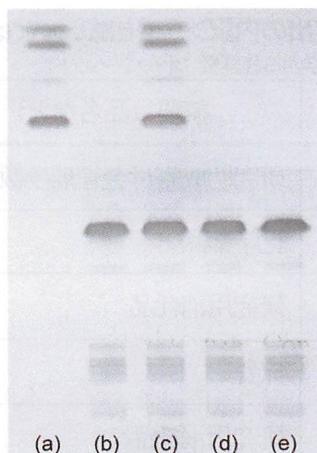


Fig. 6 SDS-PAGE results for (a) Con A solution (1 g/L), (b) BSA solution (1 g/L), (c) feed of Con A (1 g/L) and BSA (1 g/L) mixture, and (d) effluent obtained after permeation through glycomonolith 2.

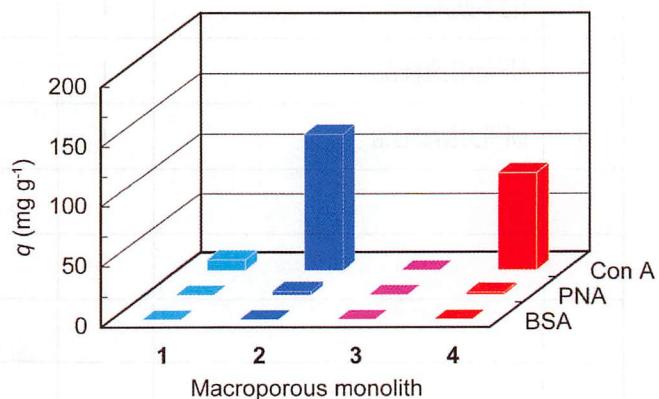


Fig. 7 Amounts of Con A, PNA, and BSA adsorbed to the macroporous monoliths in batch system.