

平成 24 年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「高機能性磁性微粒子を用いた高速・高効率
酵素精製プロセスの開発」

研究開発成果等報告書

平成 25 年 3 月

委託者 関東経済産業局

委託先 よこはまティーエルオー株式会社

目 次

第1章 研究開発の概要	1
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1-2 研究体制	4
1-3 成果概要	7
1-4 当該研究開発の連絡窓口	8
第2章 本 論	9
2-1 His-Tag タンパク質精製用ビーズの開発	9
2-2 精製条件の最適化	10
2-2-1 酵素の活性測定	10
2-2-2 Ni-NTA ビーズ結合容量の検討	11
2-2-3 精製条件の検討	11
2-2-4 最適精製条件での他社ニッケルアガロース（カラム法）との比較	12
2-3 その他のアプリケーション	13
2-4 超伝導磁気分離装置を利用した酵素精製自動化装置の開発	14
2-4-1 装置構成	14
2-4-2 磁気フィルターの性能	16
2-4-3 装置の性能	17
第3章 全体総括	18
3-1 成果の総括と事業化・製品化への課題	18
3-2 事業化・製品化の見通し	19
3-3 新技術の展開	19
3-4 工業所有権の取得状況	20

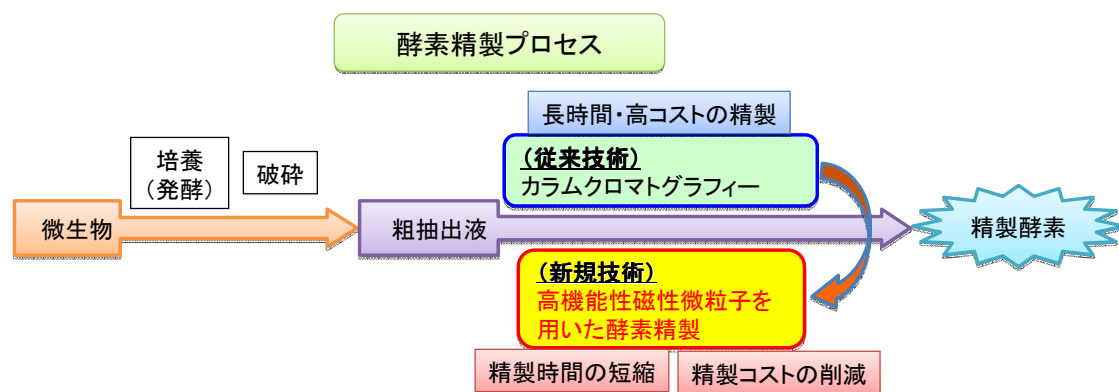


図 1-2. 酵素精製プロセス

高機能性磁性微粒子（FG ビーズ）は東京工業大学の半田研究室にて開発されたアフィニティー精製^{（用語2）}用の担体である。ナノサイズで分散性が良く効率的な結合を行うことができる、タンパク質の非特異的な吸着が極めて少ないといった従来の担体にはない優れた特徴を有する。

高機能性磁性微粒子（FG ビーズ）は粒子径 30～40nm のフェライト微粒子をコアとして、その表面をスチレンとグリシジルメタクリレート（GMA）共重合体によって被覆し、更に GMA でシード重合したコアシェル構造を有する粒子径約 200nm の無孔性ビーズである。粒子表面の poly-GMA によってタンパク質の非特異的な吸着を抑えることができ、従来カラムクロマトグラフィー用の担体として用いられてきたアガロースビーズと比べ、目的タンパク質の高純度精製を可能にした。また、フェライト微粒子を内包しているため磁石によって容易に回収できるため、従来用いられてきたカラム法と比べて短時間で回収効率の高いバッチ法^{（用語3）}による精製が可能となった^{（文献1）}。

半田研究室では、この高機能性磁性微粒子を用いたアフィニティー精製法により多くの薬剤についてその標的タンパク質を単離・同定し、薬剤の作用メカニズムを解明する等の研究成果を上げている。最近では、サリドマイド催奇性の原因タンパク質を同定、サイエンス誌に掲載され、国内外で大きな反響を呼んでいる^{（文献2）}。このように、この高機能性磁性微粒子を用いたアフィニティー精製法は多くの実績を有する。多摩川精機ではこの高機能性磁性微粒子およびスクリーニング自動化装置を、創薬研究用として 2009 年より販売開始した。

上記の通り、高機能性磁性微粒子（FG ビーズ）を用いたアフィニティー精製法（バッチ法）は非常に有効であるが、酵素の大量精製に適用する場合、次の 2 つの大きな課題を抱えている。

（用語2）【アフィニティー精製】タンパク質などの生体分子との間の特異的な親和性を利用して生体分子を精製する方法。目的の生体分子を含む溶液とそれと特異的に結合するリガンドを固定化した担体を混合させると、溶液中の目的の生体分子のみが担体に結合する。目的の生体分子が結合した担体を洗浄してそれ以外の成分を除いた後に、溶出液によって目的の生体分子を担体から解離させて回収する。

（用語3）【バッチ法】バッチ吸着を利用した最も簡単な精製方法。リガンドを固定化した担体を溶液に加え、リガンドに物質を吸着させ、簡単な遠心沈殿や、濾過や、凝集などで洗浄・回収する。洗浄・回収法に応じて、適当な比重、適当なサイズ、凝集能をもった担体を選ばれる。操作は、カラム法と比べて、はるかに簡単で短時間で済む。

（文献1）特許 3086427 号 薬剤固定化粒子及びタンパク質精製法、特許 3292721 号 SG 粒子を用いたスクリーニング方法、特許 4621911 号 マグネタイト微粒子の製造方法、特開 2006-88131 ポリマー被覆強磁性粒子の製造方法及びポリマー被覆強磁性粒子

（文献2）Ito, T. *et al.*, Science, 327, 1345-1350 (2010)、平成 22 年 3 月 12 日 毎日新聞、他

(a) アフィニティー担体からの溶出方法

上記の薬剤標的タンパク質の精製では、磁性微粒子にリガンド^(用語4)として薬剤を固定化し、それをタンパク質溶液と混合し目的タンパク質を結合させ、磁性微粒子を洗浄後、目的タンパク質を溶出・回収している。溶出したタンパク質は変性させ電気泳動で分析するので、溶出法は加熱変性溶出法、またはリガンド競合溶出法でよい。しかし酵素の場合、磁性微粒子にリガンドとして酵素阻害剤等の基質類似物を固定化してアフィニティー精製を行うが、加熱変性溶出は酵素が失活するため不可であり、リガンド競合溶出も好ましくない(溶出後、酵素とリガンドを分離する必要がある。また、リガンドが強固に結合し分離できない場合もある)。アフィニティー担体からの溶出方法としては、溶出バッファーの塩濃度や pH の変化で溶出させるのが好ましいが、そのためにはリガンドの選定が重要となる。塩濃度や pH の変化(マイルドな条件)で解離させるために、リガンドの特異性が低下する場合も予想される。リガンドの特異性が低下した場合、ワンステップのアフィニティー精製では目標の純度、回収率が達成できない可能性がある。そこで、新たに表面を陽イオンあるいは陰イオンに荷電した磁性微粒子(イオン交換用磁性微粒子)を開発し、イオン交換^(用語5)とアフィニティー精製を組み合わせた2ステップ精製法を検討する。

(b) 磁気分離方法

上記の薬剤標的タンパク質の精製では、タンパク質溶液および磁性微粒子の洗浄液が少量(0.2~0.5ml)であり、磁性微粒子は短時間で磁気回収が可能であった。酵素大量精製の場合、粗抽出液や洗浄バッファーは数リットル~数十リットルと大容量化するので単純な磁気分離は不可能である。そこで、流路を利用した磁気分離プロセス(装置)、および高速大量処理を目指し、強い磁場を利用する超伝導磁気分離法を検討する。

(2) 実施内容

① アフィニティー精製用のリガンドの選定

- ・ His-Tag タンパク質精製用 Ni-NTA 磁性微粒子の作製とモデル酵素 His-PQQ GDH を使用した性能評価、他社比較。

② イオン交換用磁性微粒子の開発

- ・ 陰イオン・陽イオン交換用磁性微粒子の作製と官能基量定量。

③ 精製条件の検討、最適化

- ・ His-PQQ GDH 精製における精製条件の最適化検討と他社比較。
- ・ 大スケール酵素精製における精製条件の最適化検討。

④ 流路を利用した磁気分離プロセスの開発

(用語4) 【リガンド】アフィニティー精製において担体に固定化しておく分子のこと。ある生体分子を精製したい場合に、それと特異的に結合する分子をリガンドとして担体に固定化して利用する。リガンドとしては、薬剤標的タンパク質を精製する場合の薬剤、酵素を精製する場合の酵素阻害剤等がある。

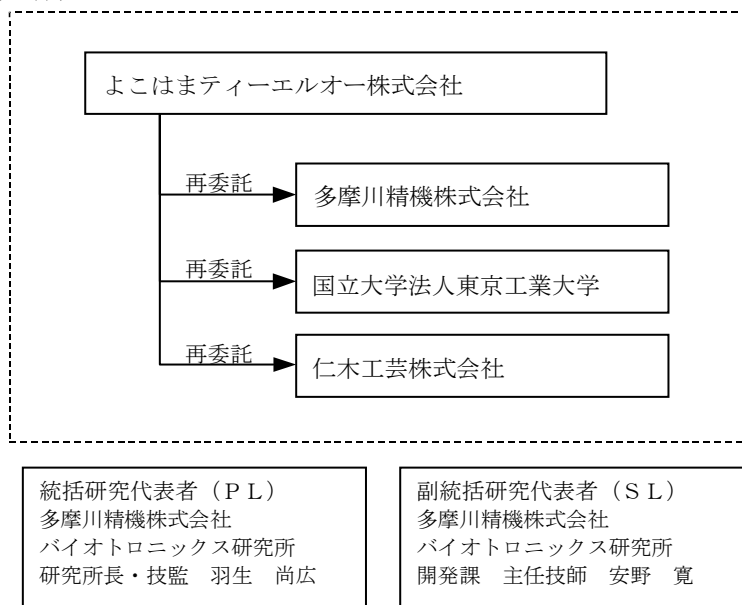
(用語5) 【イオン交換精製】荷電基をもつ担体と、反対の荷電基をもつタンパク質とを静電的に結合させた後、同じく担体の荷電基に静電結合するカウンターイオンの濃度を高め、担体に吸着したタンパク質をカウンターイオンと置き換えて溶出する手法。カウンターイオンの濃度を徐々に上げると、結合したタンパク質は、担体への静電結合の弱い順番に溶出してくる。

- ・試作機による磁気分離、再分散工程評価と、一連のプロセス（結合、洗浄、溶出工程）でのタクトタイム、磁性微粒子回収率などの定量評価。
 - ・試作機の評価結果をもとにした実証機的设计・製作。
- ⑤ 超伝導磁気分離装置の開発
- ・超伝導磁気分離装置とフィルター装置を使った数十リットルスケールの磁気分離性能評価。
- ⑥ 流路を利用した磁気分離プロセスと超伝導磁気分離装置の組合せによる最適化
- ・評価結果をもとにした実証機的设计・製作と評価。
- ⑦ プロジェクトの管理・運営
- ・事業管理機関における本プロジェクトの管理。
 - ・実用化・事業化に向けた到達度合いの検証と課題についての研究実施者との調整。

1-2 研究体制

(1) 研究組織及び管理体制

1) 研究組織（全体）

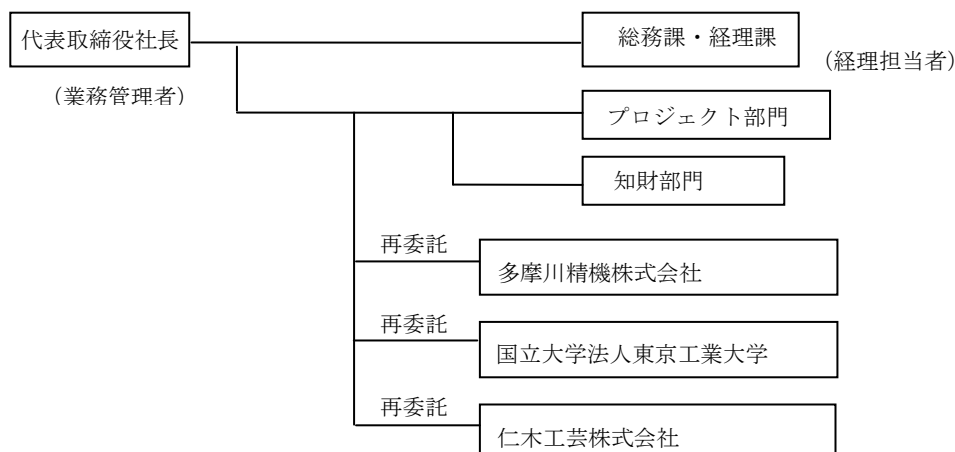


2) 管理体制

①事業管理機関

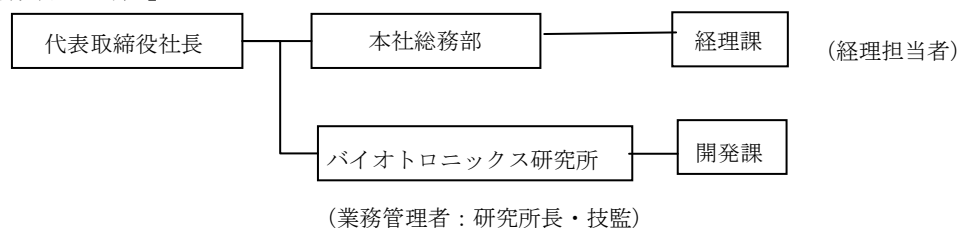
（業務管理者：取締役 事業部長）

[よこはまティーエルオー株式会社]

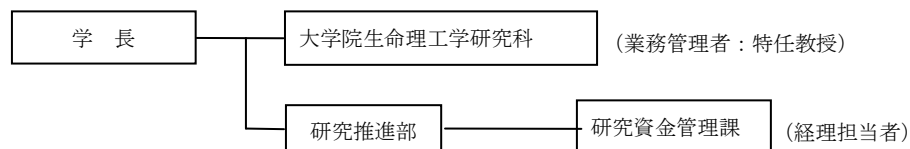


②再委託先

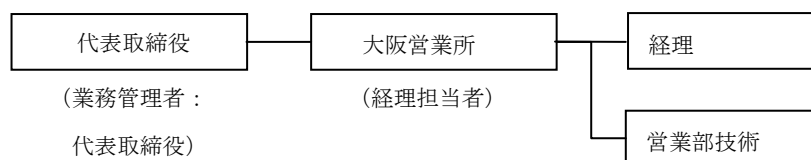
[多摩川精機株式会社]



[国立大学法人東京工業大学]



[仁木工芸株式会社]



(2) 管理員及び研究員

【事業管理機関】 よこはまティールオー株式会社

管理員

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
岡林 光志	プロジェクト部門 部門長	⑦

【再委託先】

(研究員)

多摩川精機株式会社

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
羽生 尚広	バイオトロニクス研究所 研究所長・技監	①②③④⑤⑥
安野 寛	バイオトロニクス研究所 開発課 主任技師	④⑤⑥
田中 俊行	バイオトロニクス研究所 開発課 主任	①②③④⑤⑥
関口 健司	バイオトロニクス研究所 開発課 主任補	①②③④⑤⑥
藤井 純子	バイオトロニクス研究所 開発課 研究員	①②③④⑤⑥

国立大学法人東京工業大学

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
半田 宏	大学院生命理工学研究科 特任教授	①②③
坂本 聡	大学院生命理工学研究科 助教	①②③

仁木工芸株式会社

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
仁木 丈文	代表取締役	⑤
矢野 昌克	大阪営業所 営業部 技術	⑤

1-3 成果概要

モデル酵素として His-PQQ-GDH を使用し、アフィニティー精製用リガンドとして His-Tag タンパク質精製に一般的に用いられている Ni-NTA を固定化した磁性微粒子を用いて回収率、非特異的吸着有無を他社品と比較し性能を評価するとともに精製条件の検討、最適化を行った。また新規磁気分離技術を用いた精製プロセスでは磁気分離装置の試作機を評価し、サブテーマ④流路を利用した磁気分離プロセスと⑤超伝導磁気分離装置を組合せた実証機製作評価が目標であった。

① アフィニティー精製用のリガンドの選定

- ・ His-Tag タンパク質精製用の Ni-NTA 固定化ビーズを作製した。
- ・ 上記ビーズを使用して、純品の His-Tag タンパク質である His-アディポネクチンの結合実験を行なった。結果、コントロールとして同時に行った Flag-アディポネクチンの結合が見られず、His-アディポネクチンのみを回収できたことから、Ni-NTA ビーズが作製できていると判断した。
- ・ 他社品との比較を行い回収率、非特異吸着有無等で優位性を得た。

② イオン交換用磁性微粒子の開発

【方針変更】

- ・ 事業開始当初、培養液中に存在する目的酵素は微量（0.1～1%程度）と想定。純度を上げるためにはイオン交換用とアフィニティー精製用の磁性微粒子による2ステップ精製が必要との認識であった。
- ・ モデル酵素として組換え酵素 His-PQQ GDH を使うことに方針変更したが、アドバイザーより「組換え酵素の場合、産業レベルではそこまで低純度のものを精製するのは採算性から見ても現実的ではない。実際は培養条件の検討を行なうことにより少なくとも10%以上の純度からスタートしているのが実態である」との指摘があった。
- ・ 実際、組換え大腸菌を培養したところ、His-Tag タンパク質は10%以上の純度を有しており、Ni-NTA ビーズでアフィニティー精製を行なったところ、1ステップで大幅に純度を上げることに成功した。
- ・ イオン交換用磁性微粒子の開発は不要となり、アフィニティー精製用磁性微粒子の開発及び精製条件の検討に注力することとした。

③ 精製条件の検討、最適化

- ・ His-PQQ GDH の発現と酵素活性の測定を実施した。
- ・ 組換え大腸菌破碎液を使用して His-PQQ GDH の精製を実施、純度を上げることに成功した。
- ・ 各種精製条件（結合反応、洗浄、溶出条件）、磁性微粒子使用量等最適条件を確立し、従来のカラムクロマトグラフィーによる精製法に対して回収率、非特異的吸着の有無において優位性を見出せた。
- ・ 1 リットルスケールでの精製を行い上記同様の精製結果を得たが、それ以上のスケールアップ検討には至らなかった。

④ 流路を利用した磁気分離プロセスの開発

- ・サブテーマ⑤の超伝導磁気分離装置、フィルター装置と組合せた試作機の評価を完了した。
- ・評価結果を基に実証機を設計、製作完了した。サブテーマ⑤と合わせてモデル酵素、バッファーを使用してタクトタイム、回収率の評価を実施した。

⑤ 超伝導磁気分離装置の開発

- ・超伝導磁気分離装置とフィルター装置試作機の評価が完了した。
- ・評価結果を基にフィルター装置実証機を設計、製作が完了した。
- ・モデル酵素、バッファーを使用してタクトタイム、回収率の評価を実施した。

⑥ 流路を利用した磁気分離プロセスと超伝導磁気分離装置の組合せによる最適化。

- ・超伝導磁気分離装置とフィルター装置、流路・反応槽それぞれの実証機を組み合わせ、10 リットルの洗浄バッファーとモデルタンパク質を使用し磁気分離性能、タクトタイム等の定量評価を行なった。
- ・実際の培養液を使用し、サブテーマ③で得た最適条件でのバッチ法による精製を行った。用手小スケールと比較し回収率、非特異的吸着等若干差があるものの高純度の目的酵素が得られた。なお結合、洗浄、溶出を繰り返す連続精製は行っていない。

⑦ プロジェクトの管理・運営

- ・事業管理機関における本プロジェクトの管理と実用化・事業化に向けた到達度合いの検証と課題についての研究実施者との調整を行なった。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

① 研究開発機関

多摩川精機株式会社 バイオトロニクス研究所
研究所長・技監 羽生 尚広
TEL : 0265-21-0501 FAX : 0265-21-1896
E-mail : naohiro-hanyu@tamagawa-seiki.co.jp

② 事業管理機関

よこはまティーエルオー株式会社
プロジェクト部門 部門長 岡林 光志
TEL : 045-339-4441 FAX : 045-340-3541
E-mail : oka-ytlo@ynu.ac.jp

第2章 本論

多摩川精機は、アフィニティー精製用 FG ビーズとそれを用いた自動化装置の製造・販売を行っており、製薬メーカーや大学・研究機関にて主に薬剤標的タンパク質を精製する目的で利用されている。本事業では、これまでに培った新たな官能基を有したビーズ開発やビーズへの新規リガンド固定化方法の開発の経験を活かして、各種酵素精製用磁性微粒子を開発した。

本事業では、グルコースセンサーに使用されるために高付加価値であり高純度の精製を必要とする「PQQ GDH(pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase)」をモデル酵素とし、His-Tag を付けた組換え酵素 (His-PQQ GDH) を使用する方針とした。His-Tag タンパク質精製用 Ni-NTA ビーズを作製するとともに、仁木工芸との共同開発で超伝導を利用して数～数十リットルスケールの精製を行なう磁気分離装置を完成させた。

2-1 His-Tag タンパク質精製用ビーズの開発

磁性微粒子 (FG ビーズ) は直径 30～40nm のフェライト微粒子をコアに、スチレン及びグリシジルメタクリレートで被覆した粒子径 200nm の均一な球状粒子である。また、有機溶媒耐性を有し、表面に様々な官能基を導入することが可能である。今回の目的酵素である His-PQQ GDH を精製するため、一般的に His-Tag タンパク質を精製する目的で利用される市販の Ni-NTA アガロースを参考に、N,N-ジメチルホルムアミド中、COOH 基を活性化した NHS (活性化エステル) ビーズに N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid を固相化、その後、二価のニッケルを配位させることで His-Tag タンパク質精製用の Ni-NTA ビーズを作製した (図 2-1-1)。

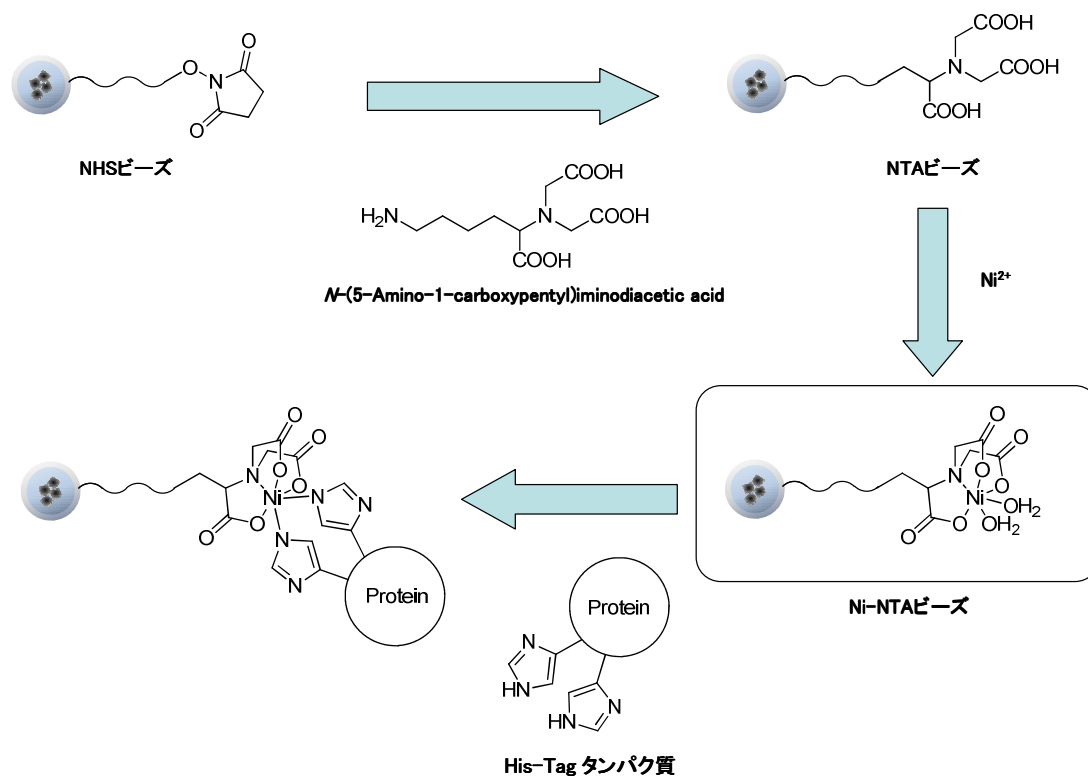


図 2-1-1. Ni-NTA ビーズの作製と His-Tag タンパク質の精製

中間体の NTA ビーズは高速液体クロマトグラフィーにて NTA の導入量 (遊離の NHS 量) を

定量し、十分量導入できていることを確認した。最終の Ni-NTA ビーズの評価は純品の His-アディポネクチン、Flag-アディポネクチンを用いてアフィニティー精製を行い、Flag-アディポネクチンは回収せず、His-アディポネクチンのみ特異的に回収できることを確認した (図 2-1-2)。これにより、作製した Ni-NTA ビーズが His-Tag タンパク質精製に対し、問題なく機能することが証明された。

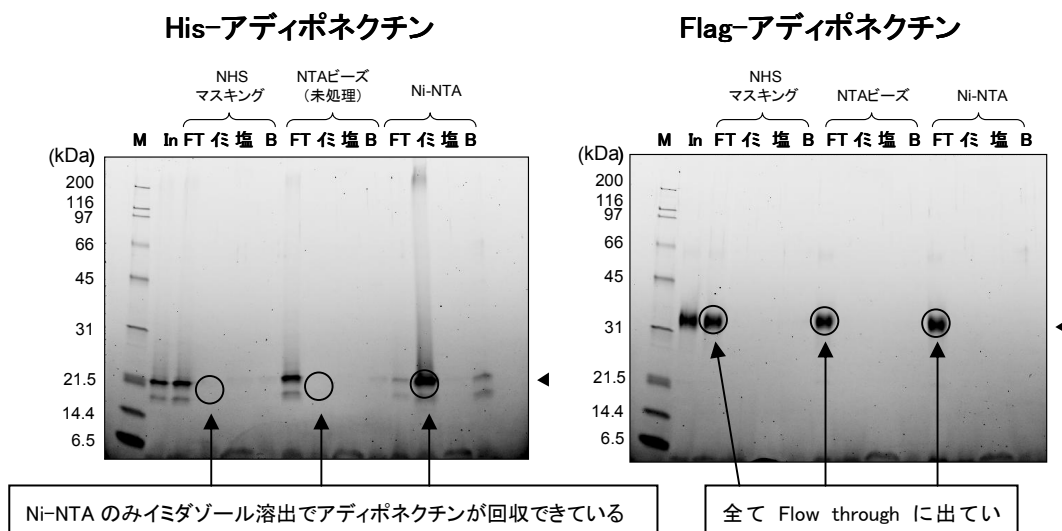


図 2-1-2. Ni-NTA ビーズ評価

2-2 精製条件の最適化

Ni-NTA ビーズを用いた His-PQQ GDH の精製条件の検討を行い、条件を最適化した。

2-2-1 酵素の活性測定

目的酵素である PQQ GDH の純度や回収率を評価するため、酵素活性測定法を検討した。基質としてグルコース、メディエーターとして DCIP(2,6-Dichloroindophenol)等を使用し、DCIP の 600nm の吸光度変化を分光光度計にて測定した (図 2-2-1)。このとき、1 分間に 1 μ mol の DICP が還元される酵素活性を 1U とした。検討の結果、再現良く酵素活性を測定することが可能となり、PQQ GDH の酵素活性を純度及び回収率の評価に使用できることが確認できた。

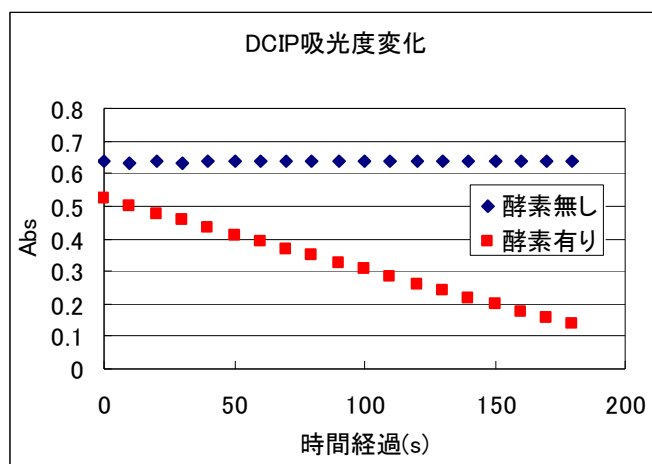


図 2-2-1. PQQ GDH の存在による DCIP 吸光度変化

2-2-2 Ni-NTA ビーズ結合容量の検討

2-1 項で作製した Ni-NTA ビーズの His-Tag タンパク質の結合容量を調べるために、Ni-NTA ビーズ 1mg へ大腸菌破碎液の量を振り添加、その中に存在する His-PQQ GDH がどの程度の量で飽和するかを検討した。結果、Ni-NTA ビーズ 1mg に対し、当初ビーズの表面積から予想していた通りの 100 μ g が結合することが分った (図 2-2-2)。そして、添加量が 100 μ g より少ない場合、95%という高い結合率を示した。結合率は 2-2-1 項の酵素活性測定方法から算出した。

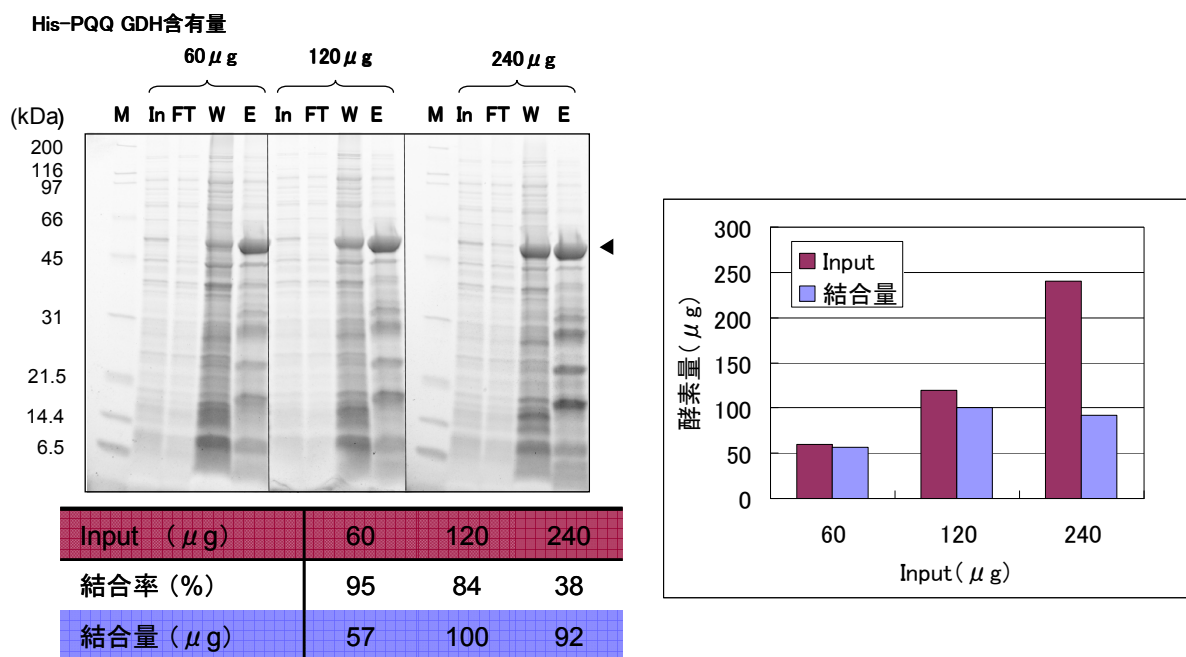


図 2-2-2. Ni-NTA ビーズ結合容量検討

2-2-3 精製条件の検討

目的酵素 His-PQQ GDH の精製条件の最適化を行った。主な 6 項目を下記に示す。

① 所要結合反応時間の検討

Ni-NTA ビーズが目的の His-PQQ GDH と結合するために必要な時間を検討した。市販のニッケルアガロースのプロトコールは 120 分が一般的であったため、その時間を基準とし、少しずつ短くしていき、最終的に 10 分という短い結合時間でも十分であることが分った。今回は 10 分までしか検討は行っていないが、更なる短縮も可能であるかもしれない。

② イミダゾール濃度検討

目的酵素の回収量増加と非特異的吸着の減少に向けて、バッファー中のイミダゾール濃度を 10mM、20mM、100mM と振り、最適値を検討した。結果、10mM と 20mM では目的酵素の回収量、非特異的吸着の変化は見られず、100mM では非特異的吸着は減少したが、目的酵素も結合せず、回収率が低下してしまった。回収量が変化しないことから、非特異的吸着を抑えるためにイミダゾール濃度は 20mM とすることとした。

③ 塩濃度検討

バッファー中の塩化カリウム濃度を 150mM、500mM とし、最適な塩濃度を検討した。150mM は一般的な条件であるので、特に 500mM という高塩濃度で静電的なタンパク質の結合を防ぎ、純度を上げることができるか検討した。結果、静電的なタンパク質の吸着を抑えることが出来たが、ビーズの凝集が起り易く分散性が低下してしまった。そのため、ビーズ同士の分散が不十分で洗浄不足となり、目的酵素以外のタンパク質が残存してしまった。この結果を受け、塩濃度は 150mM とすることとした。

④ 界面活性剤濃度検討

タンパク質の非特異的吸着低減のために、疎水的な吸着を抑える目的で界面活性剤濃度を 0.1%、0.2%、2%とした検討を実施した。結果、界面活性剤を増やすことでニッケルと His-PQQ GDH の結合が阻害され回収量が減少した。界面活性剤濃度は 0.1%とすることとした。

⑤ 洗浄回数検討

結合反応後の洗浄回数の検討を行った。洗浄 1 回、2 回ではまだ目的以外のタンパク質の吸着が見られるため、純度を上げるためには 3 回の洗浄が良いことが分った。

⑥ 溶出時間検討

結合反応後の目的酵素をビーズより溶出するために必要な時間を検討した。市販のニッケルアガロースのプロトコールは 30 分が一般的であったため、その時間を基準とし、最終的に 10 分という短い結合でも十分であることが分った。今回は 10 分までしか検討は行っていないが、結合反応時間同様、更なる短縮も可能であるかもしれない。

2-2-4 最適精製条件での他社ニッケルアガロース（カラム法）との比較

前項の検討結果より、本事業で作製した Ni-NTA ビーズ（FG ビーズ）の最適条件、他社アガロース（カラム法）の推奨条件で大腸菌破碎液から目的の His-PQQ GDH の精製を実施、結果を比較した。

Ni-NTA ビーズは目的以外のタンパク質の非特異的吸着がほとんど無く、目的の His-PQQ GDH を純度良く精製できた。また、回収率も Ni-NTA ビーズ 95%、他社ニッケルアガロースは 77%と勝っていた（図 2-2-3）。これにより、His-Tag タンパク質精製用ビーズとして市販品以上の性能を有する担体が開発できたと判断できた。後述の超伝導磁気分離装置と組み合わせた検討も実施した。

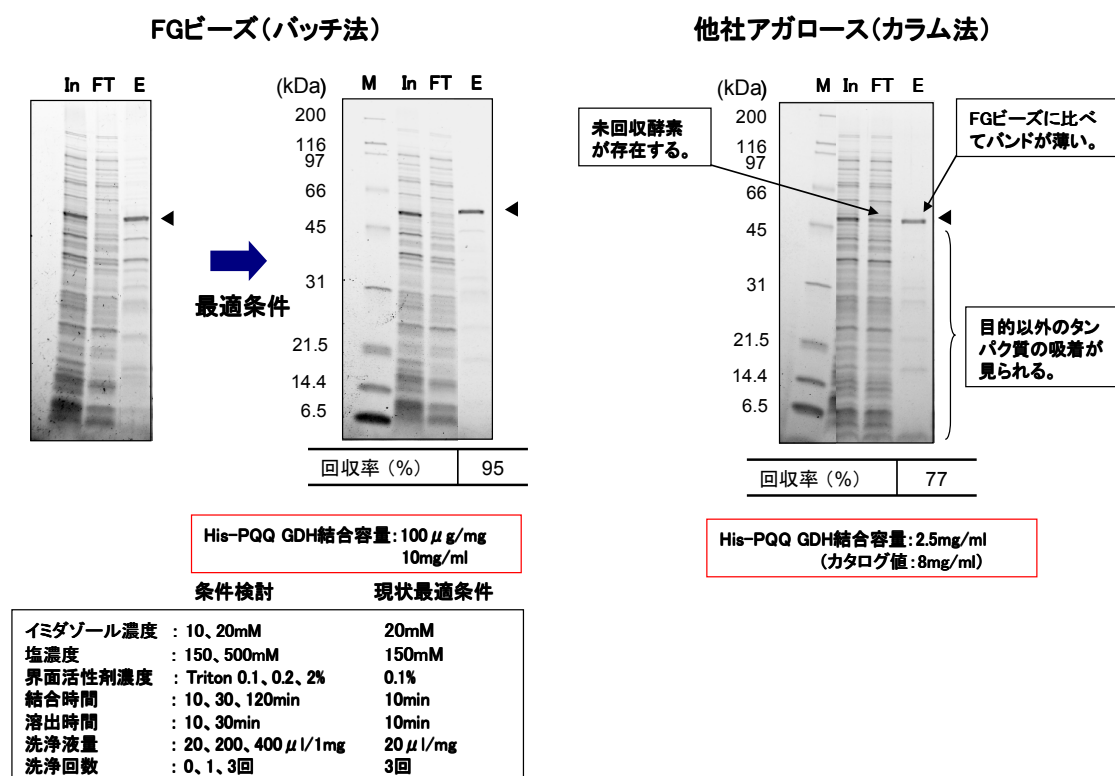


図 2-2-3. 市販のニッケルアガロースとの検討

2-3 その他のアプリケーション

本事業では 7 種類のイオン交換用ビーズ（陰イオン交換ビーズ 5 種類、陽イオン交換ビーズ 2 種類）も作製、イオン交換用官能基の定量方法も開発したが、Ni-NTA ビーズによるアフィニティー精製にて、1 ステップで大幅に純度を上げることに成功したため、イオン交換用ビーズは使用しなかった。しかし、開発は終了しているため、イオン交換が必要な際に使用することが可能である。また、酵素の阻害剤や基質をリガンドとした検討も行い、種々のリガンド固定化技術を確認すると共に実際の精製も実施した。His-Tag タンパク質精製以外のアフィニティー精製も実施することが可能となった。タンパク質固定化ビーズの作製も行い、ストレプトアビジンビーズ、ニュートラアビジンビーズ、Protein A ビーズ、Protein G ビーズを開発した。これらを使用して実際に免疫沈降、抗体精製の検討も実施し、既存の担体よりも優れた性能を有することが確認できている。超伝導磁気分離装置と組み合わせることで今後多くの用途に展開できると考えられる。

2-4 超伝導磁気分離装置を利用した酵素精製自動化装置の開発

数 ml で行なう薬剤標的タンパク質精製に比べ、酵素精製は粗抽出液や洗浄バッファのボリュームが数リットル～数十リットルと大容量であり、短時間での磁気分離を行なうためには磁気分離性能を大幅に向上させる必要がある。そこで磁気分離用に超伝導磁石を利用して数リットル～数十リットルの粗抽出液や洗浄バッファ中に分散させた磁性微粒子を高速・高効率に回収することを目指して自動化システムを開発した。

2-4-1 装置構成

超伝導磁気分離装置のボア（磁場）を区分し、それぞれに「結合」、「洗浄」、「溶出」工程用磁気フィルターを配置、それぞれを攪拌槽と流路で繋ぎ、さらには工程間を受け渡す役目の流路を追加することで、全工程連続して自動化できるシステムとした。（図 2-4-1）。

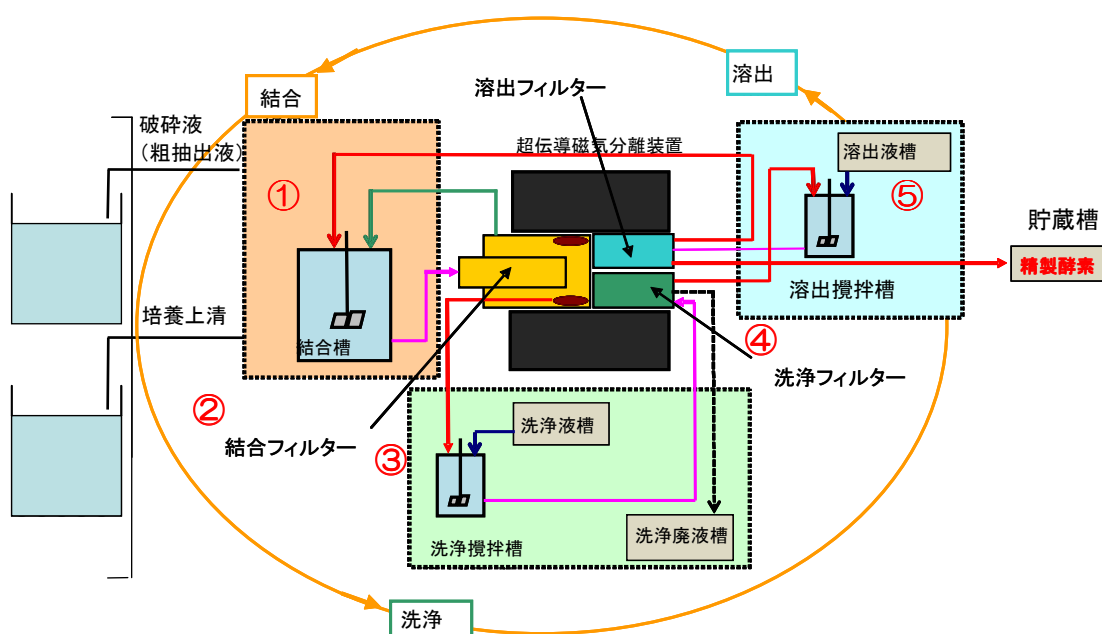


図 2-4-1 装置構成

動作フローを下記に示す。

- ① 結合槽で破砕液（あるいは培養上清）と磁性微粒子を混合。その混合液を結合フィルターに送る。
- ② 結合フィルターでは、超伝導磁石により目的酵素と結合した磁性微粒子とその他上清を分離。磁性粒子は磁場中からポンプで吸引し洗浄攪拌槽へ、上清は結合槽へ戻す。
- ③ 洗浄攪拌槽に入った磁性微粒子は洗浄液槽からの洗浄バッファーと混合攪拌し、粒子表面に付着した目的酵素以外の物質を取り除く。
- ④ ③の混合液は洗浄フィルターに送られ、②結合フィルター同様に磁性微粒子と洗浄バッファーとを分離。磁性微粒子は溶出攪拌槽、洗浄バッファーは洗浄廃液槽に送られる。
- ⑤ 溶出攪拌槽の磁性微粒子は溶出液槽からの溶出液と混合攪拌され、目的物質と磁性微粒子を切り離す。これら混合液は溶出フィルターにて、④洗浄フィルター同様に磁性微粒子と目的酵素が入った溶出液に分離。磁性微粒子は洗浄工程を経て結合槽へ戻され、目的酵素が入った溶出液は貯蔵槽に回収される。

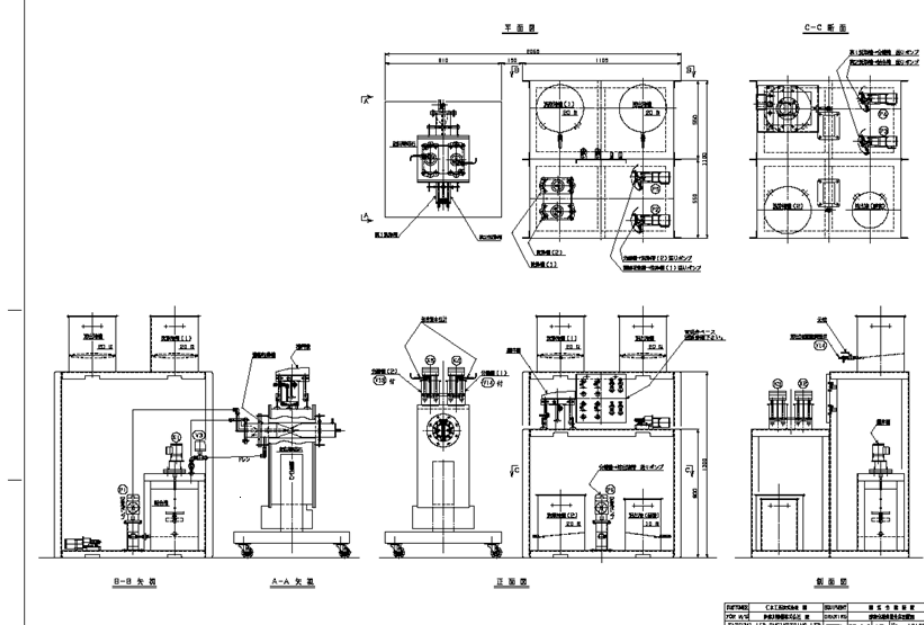


图 2-4-2. 装置外形图



図 2-4-3. 装置外觀

2-4-2 磁気フィルターのパフォーマンス

磁性微粒子とモデルタンパク質溶液を使って磁気分離特性を確認したところ、流速 20 リットル/h にて 99%以上の回収率が得られた。また磁場中からの磁性微粒子の取り出しにおいてもフィルター内の残存がほとんどなく、効率良く取り出せる事がわかった（図 2-4-4）。

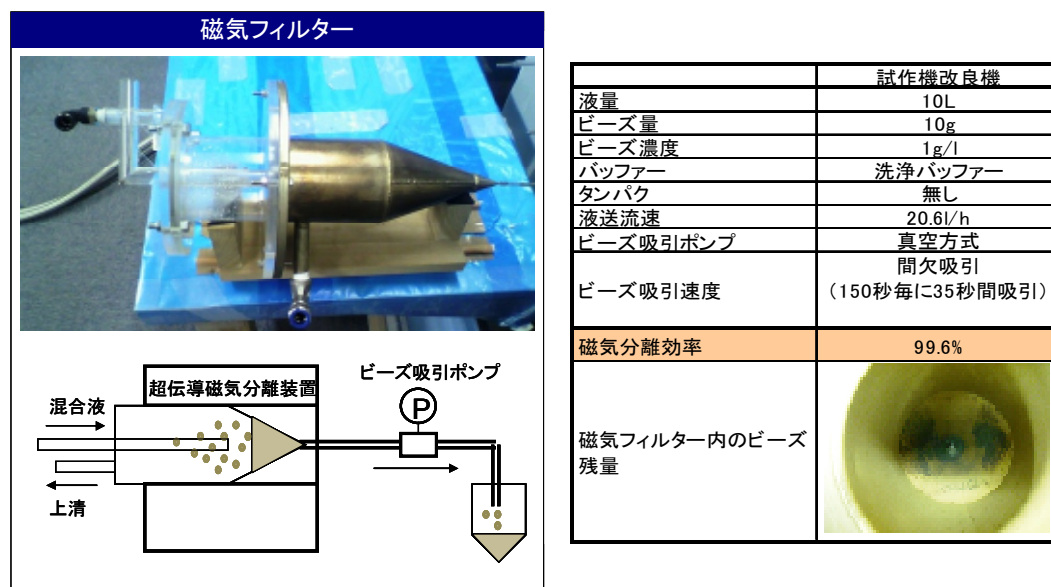


図 2-4-4. 磁気フィルター磁気分離実験結果

強磁場中でしかも著しく断面積が狭くなる箇所やポンプの内部を磁性微粒子が通過する場合、磁性微粒子の破損する懸念から、各箇所通過前後の磁性微粒子をサンプリングして外観確認とスクリーニング実験による磁性微粒子の状態を確認したが、破損も無く性能を確保できることがわかった（図 2-4-5）。

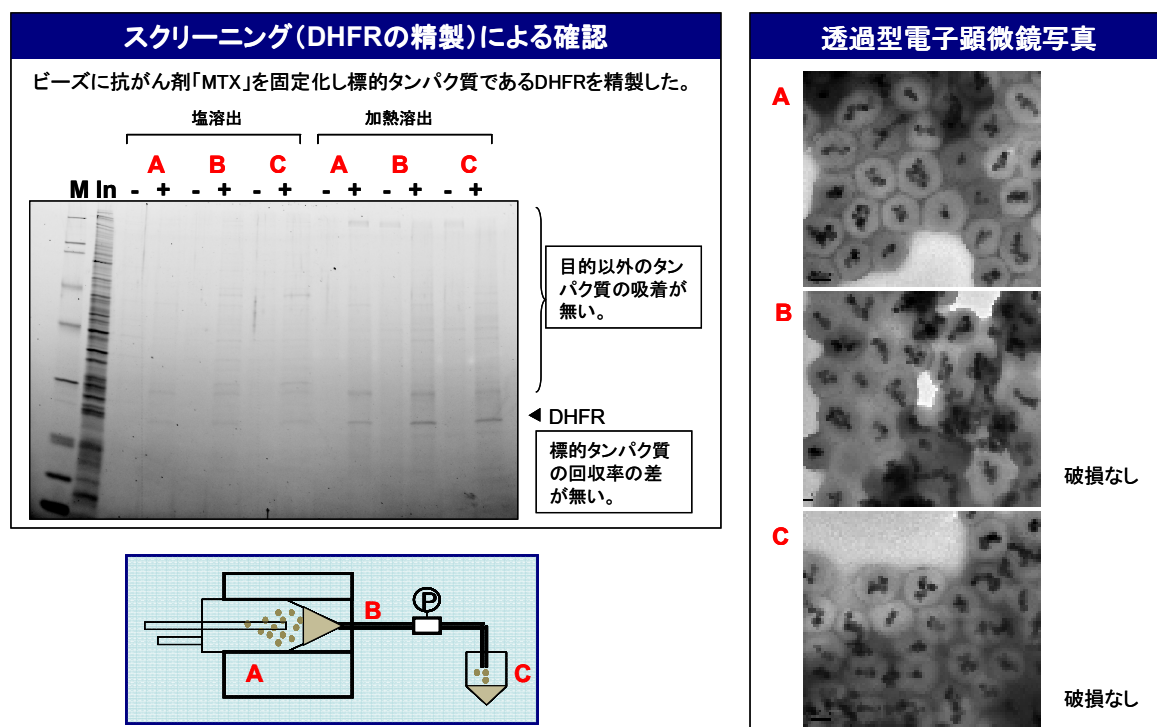


図 2-4-5. 磁気分離後の磁性微粒子

2-4-3 装置の性能

(1) タクトタイムの短縮

各工程の所要時間を検討した結果、一連の工程をおよそ 4 時間で行なうことが可能となった(図 2-4-6)。

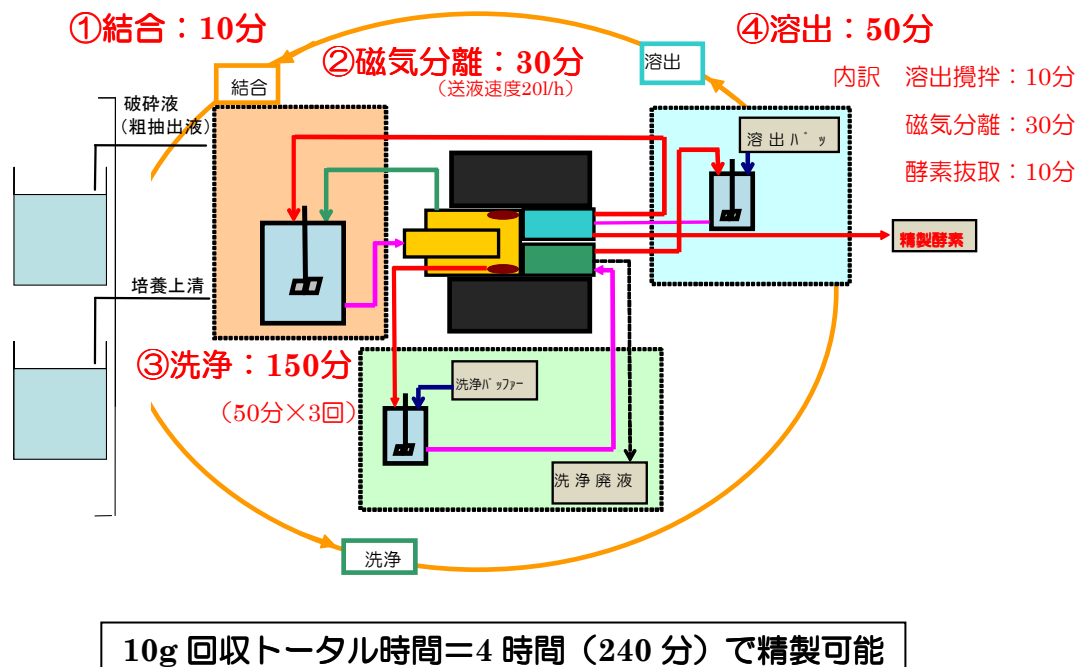
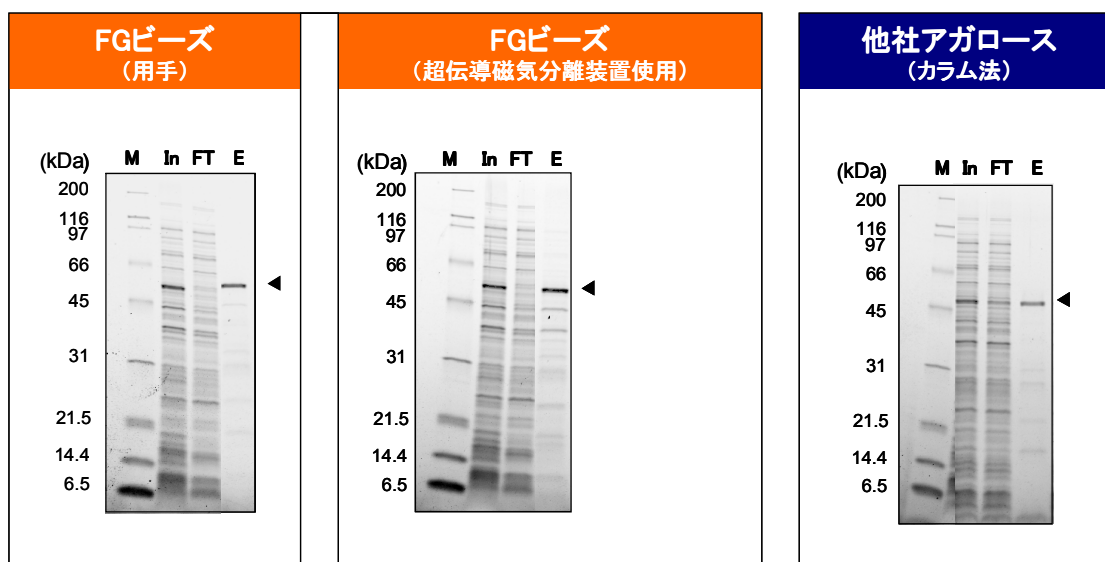


図 2-4-6. 精製タクトタイム

(2) 装置による酵素精製結果

装置を用いて酵素 (His PQQ GDH) 精製を行なった。磁性微粒子は Ni-NTA ビーズ、精製条件はサブテーマ③で得た最適値を使用した。



※ 超伝導磁気分離装置は10リットルスケール、用手及びカラム法は10mlスケール

図 2-4-7. 精製タクトタイム

カラム法と比較して高回収率で目的酵素の精製を行なうことができた。更なる精製条件検討を行なう。

(3) 従来技術との性能比較

従来技術に対して回収率（75→90）、精製時間（90→4 時間）に改善することができた（表 2-4-1）。

表 2-4-1. 従来技術との差異・優位性

	従来技術	新技術
条件	他社アガロース (カラム法)	FGビーズ (バッチ法)
担体使用量	4リットル	100g
平衡化バッファー使用量 (L)	40	10
洗浄バッファー使用量 (L)	16	30
溶出バッファー使用量 (L)	10	6
回収率 (%)	75	90
精製時間 (h)	90	4
純度 (%)	90	95
コスト	精製時間短縮達成は人件費や設備償却費の削減に繋がる事から、全体のコスト削減が可能と判断する	

第3章 全体総括

3-1 成果の総括と事業化・製品化への課題

サポイン事業3年間の成果の総括として当初目標に対する実績と課題を表 3-1-1 にまとめた。4項目の目標に対して Ni-NTA ビーズ、超伝導磁気分離装置を用いた酵素精製システムの開発が完了し、時間短縮、低コスト化が実現できた。今後事業化に向けて各課題の検討を行なっていく。

表 3-1-1. 実績と課題

目標	実績	事業化・製品化への課題
磁性粒子を利用した酵素精製	Ni-NTAビーズを開発し、モデルのHis-Tag 酵素を高回収率かつ高純度で精製することができた	① His-Tagタンパク質以外の有用物質(酵素、抗体等)精製用ビーズを開発する
磁気分離装置開発	超伝導磁石を使用することで永久磁石では対応できない数十リットルスケールでの磁気分離に対応できる装置が開発できた	② 全自動運転を評価する ③ 実際の利用を考えた密閉系での精製を実施する ④ 培養液からの連続精製を検討する
時間短縮(従来の1/10)	従来技術の1/20程度まで精製時間を短縮することができた	⑤ 結合、洗浄、溶出の各工程を並行して行う連続プロセスの条件検討を行い、更なる時間短縮を目指す
低コスト化	回収率の向上及び、精製時間の短縮により低コスト化を実現できた	⑥ 現在のFGビーズは研究用の用途(小スケール)で作製しているため、コスト削減のために工業用として大スケールでの合成方法を確立する ⑦ 超伝導磁気分離装置の低価格化を検討する

例えば、現在の開放型である実験機を密閉型にすると共に、培養工程からの連続精製も検討する（図 3-1-2）。

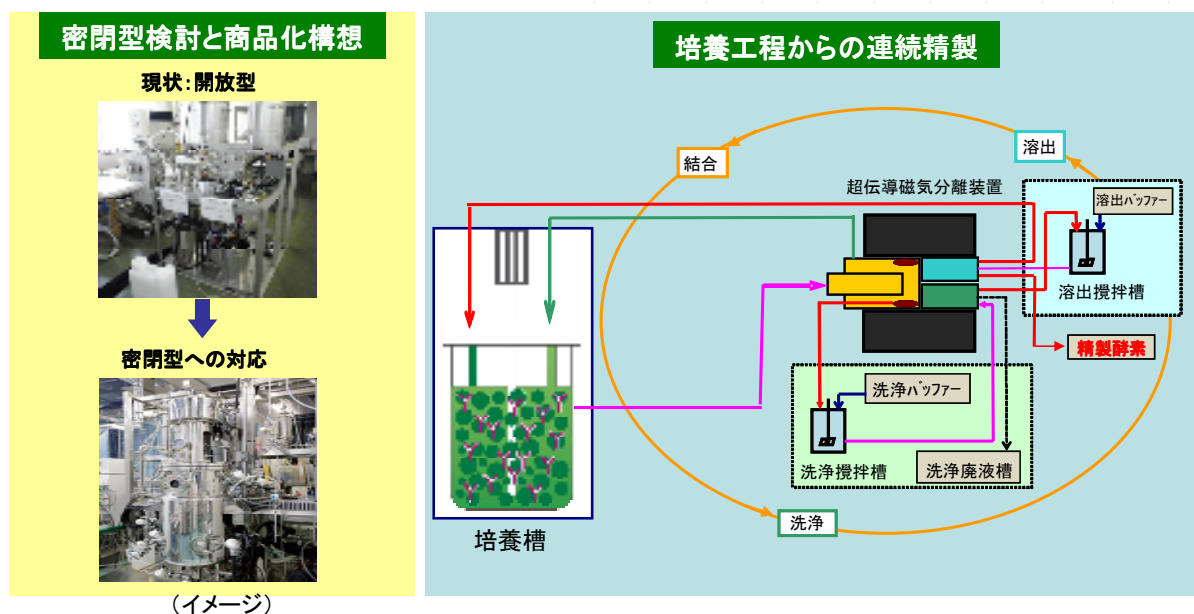


図 3-1-2. 商品化構想

3-2 事業化・製品化の見通し

2013 年 3 月 : サポイン事業終了

2013～2014 年 : 装置及びシステム完成に向けて継続検討

2015～2016 年 : ユーザ評価（評価先：酵素メーカー、装置メーカー、製薬会社）

2017 年 : 上市（酵素メーカー、バイオ医薬品メーカーへの採用を目指す）

2023 年 : バイオ医薬品用として 200～300 リットルクラスのシステムを上市する。

上記スケジュールを前倒しするため、助成制度等で補助金を獲得し製品化開発を加速させる。

3-3 新技術の展開

3-3-1 酵素精製

診断薬用など希少性あるいは付加価値が高い酵素の精製に使用する。本事業では実際にグルコースセンサーとして利用される高付加価値酵素 PQQ GDH の精製を実施、高純度、高回収率での回収を実現した。PQQ GDH は His-Tag を用いた精製であったが、Tag が付いていない酵素の精製も可能である。例えば、酵素の阻害剤（例：グルコシダーゼに対するデオキシノジリマイシン、アカルボース等）、基質（例：コレステロールオキシダーゼに対するコレステロール）をビーズへ直接固定化して目的酵素を精製することも可能である。FG ビーズは、エポキシ基、水酸基、アミノ基、カルボキシル基、NHS 基（活性化エステル）、トシル基、アジド基といった種々の官能基を有したビーズを品揃えしており、様々なリガンドの固定化に対応できる。これらは、目的、性質、状況に合わせて使い分けを行う。

3-3-2 抗体医薬等のバイオ医薬品精製

ビーズのラインナップとして、現在までにストレプトアビジンビーズ、Protein A ビーズ、Protein G ビーズを開発している（図 3-3-1）。これらを用いた免疫沈降、抗体精製は今後、

確実に需要があり、例えば、抗体医薬品製造で最も費用のかかる精製工程に利用することが可能である。FG ビーズは他社品に対して、目的以外のタンパク質の非特異的吸着がほとんどなく、目的タンパク質の回収量が多いことが優位点となっており、既存のシステムに置き換わるポテンシャルを十分有していると考えられる。まずは、製薬メーカーの研究開発部門の開発段階で製造化検討を行う上での小、中規模スケールの需要に対応し、将来的には 200～300 リットルクラスの精製を目指す（2023 年）。

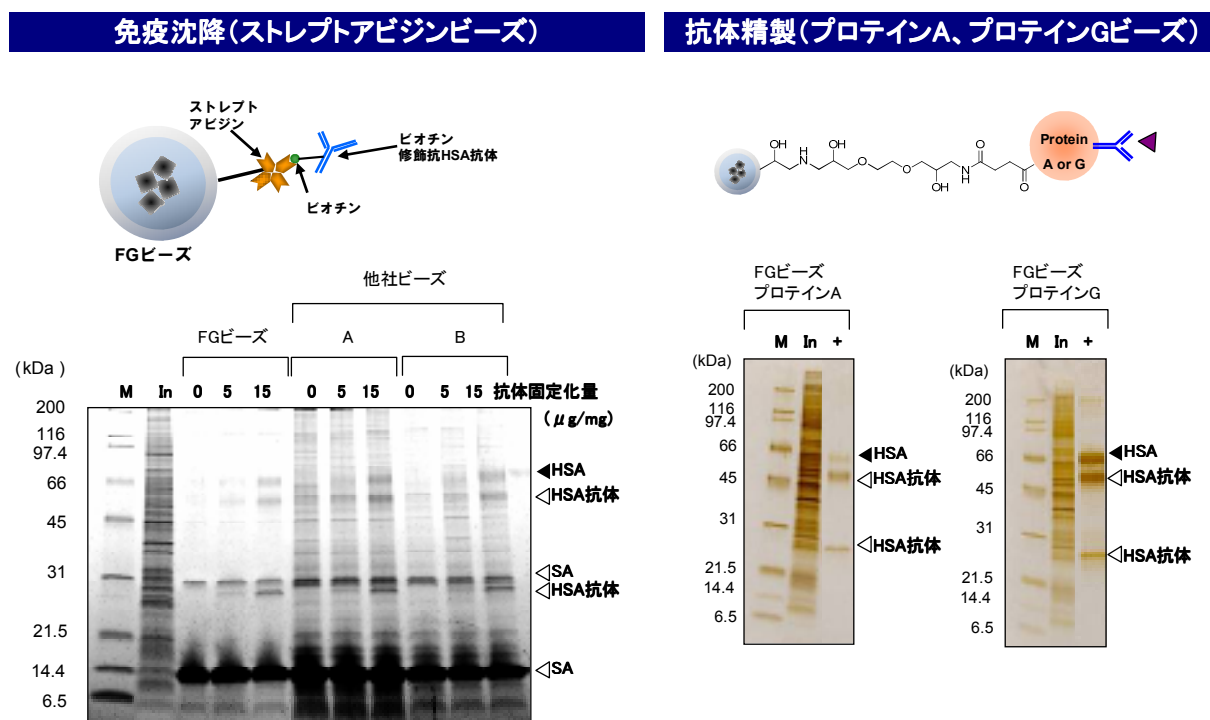


図 3-3-1. 免疫沈降と抗体精製

3-3-3 有用物質の回収

廃棄物からの有用物質の回収に使用する。様々な工場から出る廃棄物（廃液、廃固体）には純度が低く、濃度が薄いものの、多くの有用物質が含まれている。例えば、食品工場からの廃水には製造工程で使用される食品由来の機能性物質が種々含有しており、高濃度で回収できればサプリメント、食品添加物等として使用できる可能性がある。

3-4 工業所有権の取得状況

下記に示す 2 件の特許を出願した。

- ① 特願 2012-030599 磁気分離具、磁気分離装置及び磁気分離方法
- ② 特願 2013-037328 磁気分離装置及び磁気分離装置を使用した生物由来物質精製システム