

## B207

## モノリスクロマトグラフィーによるバイオ分離

(山口大)○(学)西隅由樹子 (学)阿部光代 (正)吉本則子 (正)山本修一\*

【緒言】クロマトグラフィーはタンパク質、DNA、バイオナノ粒子などのバイオ分離方法として重要である。通常のクロマトグラフィーでは充填剤細孔内拡散が分離性能を支配し、特に巨大バイオ分子では分離時間を長くする必要がある。対流貫通孔を主体とした一体材料であるモノリス(Fig.1)を用いたクロマトグラフィーは流速に依存しない分離方法が特長であるが(Fig.2)、どのようなバイオ分離に最適であるかは不明である。本研究では、モノリスクロマトグラフィーの分離機構を解析することにより、その特徴を生かした利用方法を明らかにすることを目的としている。

【実験】主としてイオン交換基が導入されたdisk形状のポリマーモノリス(CIM monolith disk, BIA separations)を使用した。標準型のサイズは( $d_c=1.2\text{cm}$ ,  $Z=0.3\text{cm}$ ,  $\varepsilon=0.62$ ,  $V_t=0.34\text{mL}$ )、ミニサイズは( $d_c=0.52\text{cm}$ ,  $Z=0.495\text{cm}$ ,  $\varepsilon=0.62$ ,  $V_t=0.1\text{mL}$ )、陰イオン交換基としては主としてQAを、陽イオン交換基としては $\text{SO}_3^-$ 基が修飾されたものを利用した。サンプルは95merまでの合成オリゴヌクレオチドDNAや標準タンパク質を使用した。NaCl塩濃度直線勾配溶出実験をAKTA purifierで実施し、得られた溶出曲線をモデルで解析した[1]。

【結果と考察】吸着サイト数とDNAの分子量の関係を調べたところ、従来の微粒子充填型カラムとほぼ同じ値であった(Fig.3)。また0.1mLのmini-diskでも同様の結果が得られた。モノリスにおいてはDNAが大きくなてもピーク幅はむしろ狭くなっている(Fig.4)。この現象をモデル解析したところ、Fig.3でも明らかにDNAの吸着サイト数が大きいため、カラム内移動距離(時間)が短く、鋭いピークになることがわかった(Fig.5)。また、カラム出口における分配係数 $K_R$ とピーク幅はdiskサイズにかかわらず良好に相関された(Fig.6)。

モノリスのタンパク質静的吸着量は多孔性充填剤に比べて低いのは明らかであるが、タンパク質の分子量が大きくなると動的吸着量についてはモノリスのほうが有利となる領域が存在することも既に指摘している[2]。

以上の結果から、モノリスを用いたクロマトグラフィーは、大きなタンパク質、DNA、プラスミド、ウイルス、ウイルス様粒子などのバイオナノ粒子の分離に適していることと考えられる。また、0.1mLまでの小型化が容易にできることや、96穴マイクロプレート形状が可能であることも[3]、プロセス設計の加速には有利である。

**Symbols**  $B$ : 吸着サイト数[-]  $C^*$ : 注入サンプル量とカラム体積で規格化した濃度[-]  $d_c$ : カラム内径[cm]  $F_V$ : 流速[mL/min]  $GH$ : 規格化した勾配 [M]  $I_R$ : 溶出塩濃度 [M]  $K_R$ :  $I=I_R$ における分配係数[-]  $M_w$ : 分子量  $V_t$ : カラム体積[mL]  $Z$ : カラム高さ[cm]  $z_p^* = z/Z$ : ゾーンのカラム入り口からの相対距離[-]  $\varepsilon$ : 空隙率[-]  $\sigma_V$ : ピーク標準偏差[mL]

**References** [1] S. Yamamoto *et al.*, *J. Chromatogr.A*, 1216(2009)2612  
[2] S. Yamamoto, A. Kita, *IChemE., FBP*, 84, C1(2006)72  
[3] N. Yoshimoto *et al.*, *J. Chem. Eng. Jpn*, 41(2008)200

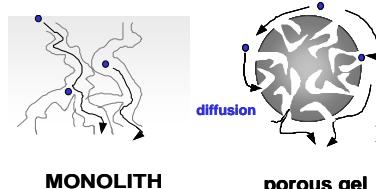


Fig.1 モリスと多孔質充填剤

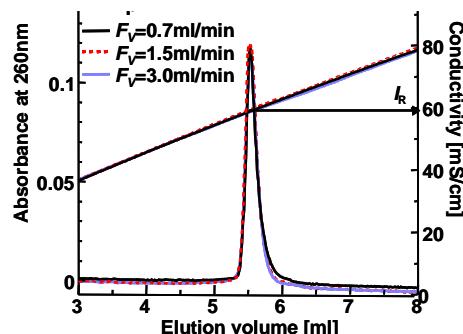


Fig.2 溶出曲線の流速依存性(QA disk standard sample poly(T) 50mer)

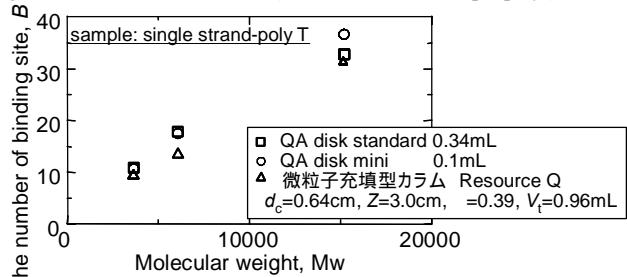


Fig.3 吸着サイト数とDNA分子量の関係

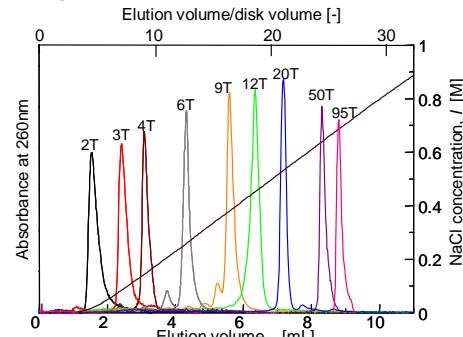
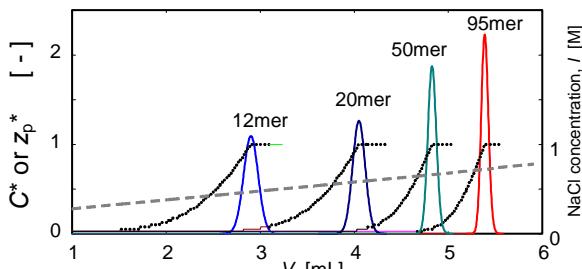
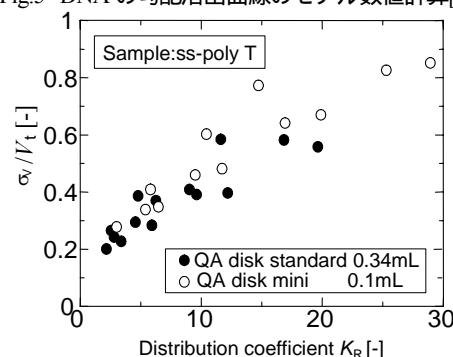


Fig.4 DNAの勾配溶出曲線(sample single strand-poly T)

Fig.5 DNAの勾配溶出曲線のモデル数値計算[1] 点線は $z_p^*$ Fig.6 DNAの勾配溶出曲線ピーク幅と $K_R$ の関係[1]