

## シリカゲル-キトサン IMAC 担体の調製とタンパク質の吸着挙動

前田 良輔・久松 奈津美\*

## Preparation of silica gel-chitosan IMAC and adsorption behavior of protein

Ryosuke MAEDA and Natsumi HISAMATSU\*

## Abstract

Immobilized metal ion adsorption chromatography (IMAC) was prepared by silica gel-chitosan composite support (chitosilica) combined with metal ions such as  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$ . Firstly, adsorption behavior of each metal ion on chitosilica was studied. The maximum adsorption amount of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$  were calculated from adsorption isotherms to be 86.8, 9.98, and 8.25  $\mu\text{mol/g}$ , respectively. On the other hand, the maximum adsorption amounts of the model protein (BSA) on the carrier which combined with  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$  were 0.138, 0.133, and 0.112  $\mu\text{mol/g}$ , respectively. It is very interesting that there were no significant difference in relation to the adsorption amounts of BSA on the supports which have each metal ion.

Key words : Chitosan, Silicagel, IMAC, Protein adsorption

## 1. 諸言

タンパク質の物理化学的性質は非常に変化に富み、その精製には様々な方法を展開させなければならない。この問題を軽減する精製法のひとつとして、固定化アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)法が効果的である。そこで、金属イオンに対して親和性が高く、金属キレート樹脂となり得るキトサンを用いて、新しい IMAC 用担体を作製することを目的とする。Fig. 1 に示すように、シリカゲル上にキトサンを固定し、タンパク質と特異的に相互作用する金属を吸着させた担体を、IMAC 担体とすることで、タンパク質の吸着及び分離を行う。

本研究では、キトサンを固定化したシリカゲル(キトシリカ)に、 $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  を吸着させ、各金属イオン固定化キトシリカに対する牛血清アルブミン(BSA)の吸着挙動を調べた。

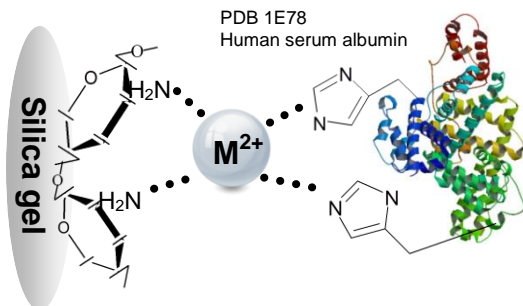


Fig. 1 Schematic representation of proposed IMAC.

IMAC の担体は、金属キレートを作る有機配位子を色々な多糖類合成ポリマーに結合させたものが主流で、一般的に高価である。クロマトグラフィー担体に固定された特異的な金属キレートとタンパク質との可逆的な相互作用によってタンパク質を分離する<sup>1)</sup>。

キトサンは、Fig. 2 に示すように甲殻類外骨格由来の天然高分子であるキチンを脱アセチル化することで得られる物質で、アミノ基を有する多糖類である。これまで、その大きな潜在能力のため様々な研究がなされており、金属キレート樹脂としての用途開発も行われている<sup>2)</sup>。

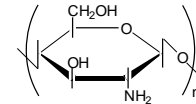


Fig. 2 Chemical structure of chitosan.

## 2. 実験方法

## 2.1 試薬

キトサンは大日精化工業(株)製脱アセチル化度 100% のものを使用した。シリカゲルは silicycle 社製の粒径 40~63  $\mu\text{m}$  の破碎状カラムクロマトグラフィー用を塩酸で前処理したものを使用した。酢酸、HEPES、メタノール、ポリエチレングリコール(PEG)、塩化銅(II)二水和物、塩化コバルト(II)六水和物、塩化ニッケル(II)六水和物、プロテインアッセイ CBB 溶液 (5 倍濃縮) はナカライテスク(株)、ジメチルスルホキシド(DMSO) は和光純薬工業(株)、アンモニア水、エピクロロヒドリン、水酸化ナトリウムは関東化学(株)、牛血清アルブミン(BSA)は Sigma-Aldrich Co. より入手し、いずれの試薬もさらなる精製は行わずに使用した。

## 2.2 キトシリカの調製

キトシリカの調製は Xi らの手法<sup>3)</sup>を改良し、次のように行った。キトサン、PEG、1 M-酢酸を各々 2, 10, 88 wt% の割合で混合し、キトサン溶液を調製した。次に、この溶液 200 mL と塩酸処理したシリカゲル 100 g を加え、一晚静置した後、減圧乾燥した。乾燥後メタノールによりデカンテーションを数回行い PEG を除去した後、0.1 M-NaOH/メタノール溶液を 500 mL 加えて、60  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間攪拌した。これを減圧乾燥させたもの

\*本校専攻科物質化学工学専攻

に、DMSO 溶液 500 mL を加え、更にここに 1 mol 当量のエピクロロヒドリンを徐々に添加し、60 °C で 24 時間攪拌した。これを再度減圧乾燥し、純水でデカンテーション後、0.85 M-NH<sub>3</sub> 水溶液を 1 L 加え、60 °C で 4 時間攪拌した。これを純水で入念に洗浄したものを凍結乾燥しキトシリカを得た。

### 2.3 拡散反射赤外分光法(FT-IR)による測定

キトシリカ、キトサン、シリカゲル、PEG のそれぞれの試料と KBr を 1 : 9 の割合で混合し、KBr をブランクとして、拡散反射フーリエ変換赤外分光光度計 (Perkin-Elmer Spectrum-One) による測定を行った。

### 2.4 キトシリカへの Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> の吸着<sup>4)</sup>

塩化銅二水和物を PH 5, 塩化コバルト六水和物, 塩化ニッケル六水和物を PH 6 の塩酸-アンモニア緩衝溶液で調製した 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300 ppm の様々な濃度の Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> 溶液を 30 mL と、キトシリカ 0.5 g を混合し 30 °C で 17 時間振とう後濾紙で濾過を行い、原液と濾液中の金属イオン濃度を原子吸光分析装置 (Analytik Jena 社 novAA350) により定量した。

### 2.5 タンパク質分離担体(金属担持キトシリカ)の調製

500 ppm-Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> 溶液 450 mL にキトシリカ 20 g を加え、30 °C で 24 時間振とう後、濾紙で濾過し、凍結乾燥を行い、タンパク質分離担体 (金属担持キトシリカ) を得た。また、濾液と原液を原子吸光分析装置 (Analytik Jena 社 novAA350) により濃度を測定し、各金属の吸着量を測定した。

### 2.6 走査型電子顕微鏡(SEM)観察

タンパク質分離担体、キトシリカ及びシリカゲルを金蒸着の後 FE-SEM を用いて、さまざまな倍率において担体表面の形態を観察した。

### 2.7 CBB 法による BSA の検量線の作成<sup>5)</sup>

HEPES 緩衝液 (pH 7.55) で調製した 0.1~1.5 g/L の BSA 溶液を、紫外-可視吸光度計 (Shimadzu UV1240) を用いて波長 280 nm で吸光度を測定し、BSA 濃度を決定し ( $A_{280}^{1\%} = 6.6$ )、各 BSA 溶液 100  $\mu$ L に CBB 溶液 5 mL を加え試験管ミキサーで攪拌し、10 分間静置後、紫外-可視吸光度計 (Shimadzu UV1240) を用いて波長 595 nm で吸光度を測定し、CBB による BSA の検量線を作成した。得られた検量線を用いて BSA の定量を行った。

### 2.8 BSA の吸着等温線の作成

シリカゲル、キトシリカ、金属担持キトシリカを各 0.5 g ずつバイアル瓶に取り、HEPES (pH 7.55) を 1.5 mL ずつと、同じ緩衝液で調製した 0.05~0.5 g/L の BSA 溶液を 30 mL ずつ加え、30 °C で 8 時間振とう後、3500 rpm で 3 分間遠心分離機にかけた。この上澄み液 0.1 mL に CBB 溶液 5 mL を加え試験管ミキサーで攪拌し、10 分間静置後、紫外-可視吸光度計 (Shimadzu UV1240) を用いて波長 595 nm で吸光度を測定し吸着等温線を描いた。

## 3 結果と考察

### 3.1 キトシリカの調製

キトシリカは淡黄色粉末として得られ、収量は原料のシリカゲル 100 g に対して 64.1 g であった。

### 3.2 拡散反射赤外分光法(FT-IR)による測定

拡散反射 FT-IR を用いたキトシリカ、シリカゲル、キトサン、PEG の測定を行ったところ Fig. 3 のようになった。キト

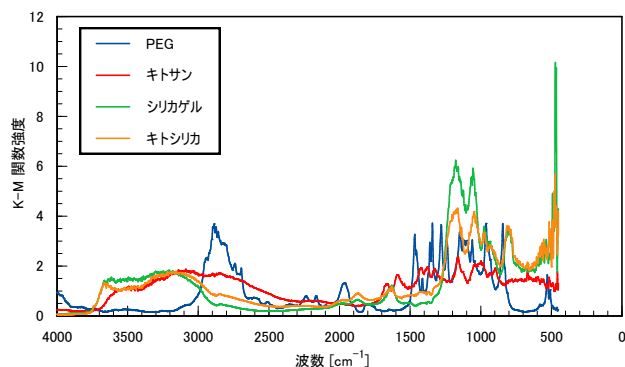


Fig. 3 Diffuse reflectance FT-IR spectrum of the supports.

シリカとシリカゲルには、792 cm<sup>-1</sup> 付近の Si-OH 変角振動、993 ~ 1100 cm<sup>-1</sup> 付近の Si-O-Si の伸縮振動といったシリカゲルに起因する吸収が観察された。また、キトシリカとキトサンには 650 cm<sup>-1</sup> 付近の N-H 振動、900 cm<sup>-1</sup> 付近の C-N 伸縮振動が観察された。また、キトシリカと PEG のみに共通する吸収が見られないことから PEG はほぼ除去できていると考えられる。キトシリカとキトサンのみに共通する吸収があまり見られないのは、キトサンはシリカゲルの表面だけに固定化されており、キトシリカ上のキトサンは相対的に少量であり、明確なピークとして観測できなかったと考えられる。

### 3.3 キトシリカへの Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> の吸着実験

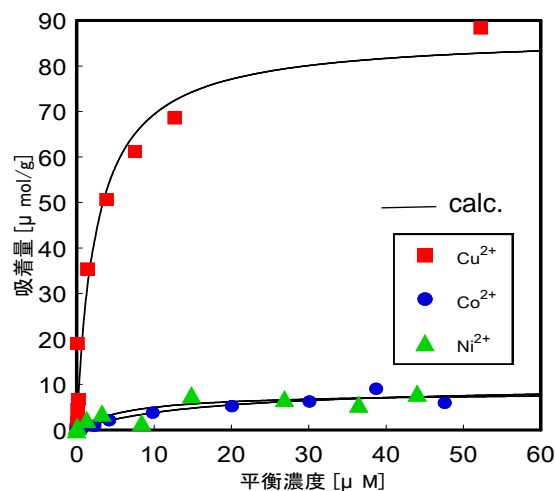


Fig. 4 Adsorption isotherms of Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> on chitosilica at 30 °C.

Fig. 4 はキトシリカへの Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> の吸着等温線を示す。このようにキトシリカの吸着等温線は(1)式に示す Langmuir モデルへの良好な相関がみられる。

$$Q = \frac{Q_{max}KC}{1 + KC} \quad (1)$$

ここで  $Q$ ,  $Q_{max}$ ,  $K$ ,  $C$  はそれぞれ吸着量, 最大吸着量, 吸着平衡定数, 平衡濃度を示している。Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> のキトシリカへの最大吸着量はそれぞれ 86.8, 9.98, 8.25  $\mu$ mol/g-support であった。Cu<sup>2+</sup> は Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> に比べて著しく吸着量が大きく、これは比較的軟らかい金属である Cu<sup>2+</sup> がアミノ基と配位しやすいためと考えられる<sup>6,7)</sup>。

3.4 タンパク質分離担体(金属担持キトシリカ)の調製

Cu 担持キトシリカは淡青色粉末, Co 担持キトシリカは淡桃色粉末, Ni 担持キトシリカは淡黄緑色粉末として得られ, 収量はもとのキトシリカ 20 g に対してそれぞれ 18.7 g, 15.6 g, 18.5 g であった。

3.5 走査型電子顕微鏡(SEM)観察

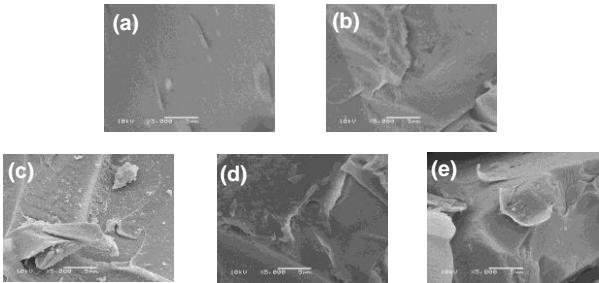


Fig. 5 SEM images of (a) silicagel, (b) chitosilica, (c) Cu-loaded chitosilica, (d) Co-loaded chitosilica, and (e) Ni-loaded chitosilica.

タンパク質分離担体、キトシリカ及びシリカゲルを Fig. 5 に示すように SEM による形態観察を行った。いずれの画像も 5,000 倍のものであり、平滑な表面状態のシリカゲルに比べ、キトシリカ、タンパク質分離担体の表面には物質の付着が確認された。

3.6 CBB 法による BSA の検量線の作成

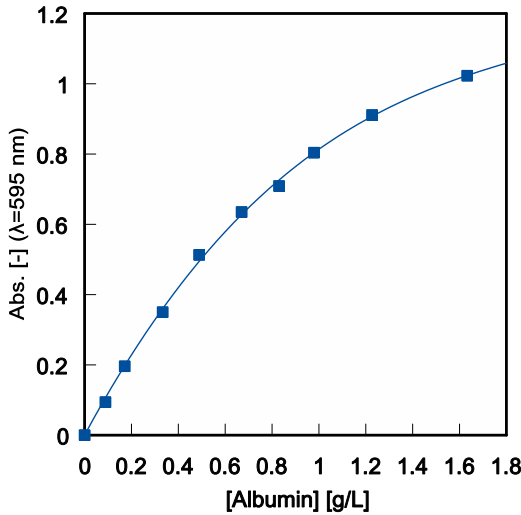


Fig. 6 Calibration curve of BSA concentration by Bradford method using CBB solution.

Fig. 6 に BSA の検量線を示す。このグラフから分かるように、CBB によるタンパク質の検量線は、一般的な Lambert-Beer 則に従う直線関係は得られないことが特徴であり、ここでは二次関数としてフィッティングした。CBB の変色は、タンパク質中のアルギニンやリシン残基と CBB 中のスルホン酸基の結合、および非極性アミノ酸とトリフェニルメチル基の結合に基づいており、化学量論的に結合するものではない。また、タンパク質の種類によっても発色の程度が異なる。

3.7 BSA の吸着等温線

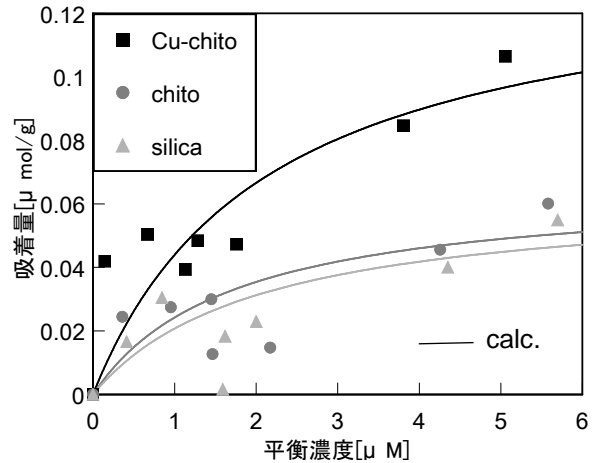


Fig. 7 Adsorption isotherms of BSA on silicagel, chitosilica, and Cu-supported chitosilica at 30 °C.

Fig. 7 にシリカゲル、キトシリカ、Cu 担持キトシリカへの BSA の吸着等温線を示した。BSA の吸着等温線における実線は(1)式に示した Langmuir モデルへのフィッティングである。フィッティングの結果、シリカゲル、キトシリカ、Cu 担持キトシリカへの BSA の最大吸着量はそれぞれ、0.063, 0.066, 0.138 μmol/g であることがわかった。シリカゲル、キトシリカ、Cu 担持キトシリカへの BSA の最大吸着量は Cu 担持キトシリカ > キトシリカ > シリカゲルの順で大きいことが分かった。このことより、Cu 担持キトシリカは BSA に対して比較的高い親和性があることが分かった。これは比較的軟らかい金属である Cu がアミノ基やヒスチジン残基と配位しやすいためと考えられる。

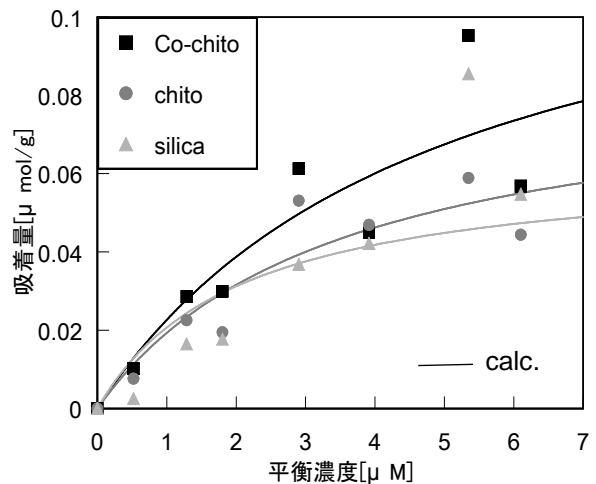


Fig. 8 Adsorption isotherms of BSA on silicagel, chitosilica, and Co-supported chitosilica at 30 °C.

Fig. 8 にシリカゲル、キトシリカ、Co 担持キトシリカへの BSA の吸着等温線を示した。BSA の吸着等温線における実線は Langmuir モデルへのフィッティングである。フィッティングの結果、シリカゲル、キトシリカ、Co 担持キトシリカへの BSA の最大吸着量はそれぞれ、0.063, 0.086, 0.133 μmol/g であり、Co 担持キトシリカ > キトシリカ > シリカゲルの順で大き

いことが分かった。このことより、Co 担持キトシリカは BSA に対して比較的高い親和性があることが分かった。

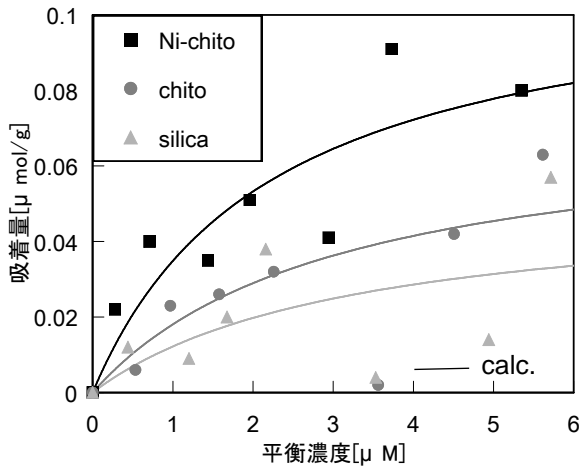


Fig. 9 Adsorption isotherms of BSA on silicagel, chitosilica, and Ni-supported chitosilica at 30 °C.

Fig. 9 にシリカゲル、キトシリカ、Ni 担持キトシリカへの BSA の吸着等温線を示した。BSA の吸着等温線により得られた実線は Langmuir モデルへのフィッティングである。フィッティングの結果、シリカゲル、キトシリカ、Ni 担持キトシリカへの BSA の最大吸着量はそれぞれ、0.052  $\mu\text{mol/g}$ 、0.073  $\mu\text{mol/g}$ 、0.112  $\mu\text{mol/g}$  であり、Ni 担持キトシリカ > キトシリカ > シリカゲルの順で大きいことが分かった。このことより、Ni 担持キトシリカは BSA に対して比較的高い親和性があることが分かった。

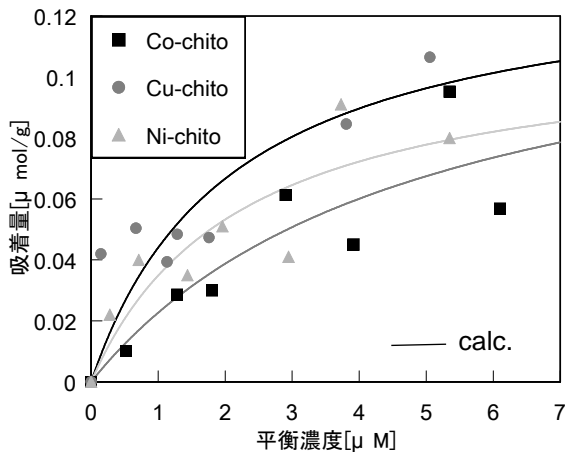


Fig. 10 Adsorption isotherms of BSA on each metal ion supported chitosilica at 30°C.

Fig. 10 に Cu, Co ならびに Ni 担持キトシリカへの BSA の吸着等温線を示した。Cu, Co, そして Ni 担持キトシリカへの BSA の最大吸着量はそれぞれ、0.138, 0.133, 0.112  $\mu\text{mol/g}$  であり、各金属担持担体間に大きな差は見られなかった。しかしながら、吸着等温線の初期の立ち上がりは、Cu 担持キトシリカ > Ni 担持キトシリカ > Co 担持キトシリカの順で大きく、この順で BSA との相互作用が強いことが明らかになった。これは軟らかい金属である方がアミノ基やヒスチジン残基と配位しやすいためと考えられる。また、相互作用が比較的弱いことはデメリットではなく、むしろ脱離が穏やかに進行するためのメリットと言え、市販品なども  $\text{Cu}^{2+}$  ではなく  $\text{Co}^{2+}$  を用いる一つの要因である。

今回の実験のフィッティングの結果、各担体上への BSA の吸着挙動は Langmuir モデルへの相関があまり良好なものではない。特に BSA の高濃度域での吸着量の増大は、もはや単分子層吸着ではなく多分子層吸着の可能性も示唆されるため、BET の吸着等温線への相関等が今後の検討課題とされる。

#### 4. 結言

$\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  のキトシリカへの吸着等温線は Langmuir モデルへの良好な相関が得られた。また、最大吸着量はそれぞれ 86.8, 9.98, 8.25  $\mu\text{mol/g-support}$  であった。BSA の吸着量はタンパク質分離担体 > キトシリカ > シリカゲルの順で大きく、タンパク質分離担体は BSA に対して比較的高い親和性があることが分かった。BSA の最大吸着量は Cu 担持キトシリカ > Co 担持キトシリカ > Ni 担持キトシリカの順で大きく、BSA との相互作用は Cu 担持キトシリカ > Ni 担持キトシリカ > Co 担持キトシリカの順で大きいことが分かった。

#### 謝辞

キトサンを提供していただいた大日精化工業㈱に御礼申し上げます。

#### 引用文献

- 1) Clontech TALON Metal Affinity Resins User Manual.
- 2) キチン・キトサン研究会編, キチン・キトサン実験マニュアル, 技報堂出版, 61-67 (1991).
- 3) F. Xi and J. Wu, *Journal of Chromatography A*, **1057**, 41-47 (2004).
- 4) Jianmin Wu, Luan, and Zhao, *International Journal of Biological Macromolecules* **39**, 185-191 (2006).
- 5) 菅原潔, 副島正美蛋白質の定量法, 学会出版センター, 155-160 (1990).
- 6) 栗山明子, 平成 23 年度特別研究論文, 北九州工業高等専門学校.
- 7) 末廣志穂, 平成 22 年度卒業研究論文, 北九州工業高等専門学校.

(2013 年 11 月 11 日 受理)