研 究

バイオ用途への応用を目的とした磁性アミロースビーズの開発

岸本 幹雄^{☆1}, 臼杵 直樹^{☆1}, 坪井 聡子^{☆1}, 河野 研二^{☆1}, 西矢 芳昭^{☆2}, 楠本 正博^{☆2}^{☆1}日立マクセル 開発本部, 〒618-8525 京都府乙訓郡大山崎町小泉1.^{☆2}東洋紡績 敦賀バイオ研究所, 〒914-0047 敦賀市東洋町10-24.

Development of Magnetic Amylose Beads for Biological Application

Mikio Kishimoto^{☆1}, Naoki Usuki^{☆1}, Satoko Tsuboi^{☆1}, Kenji Kono^{☆1},
Yoshiaki Nishiya^{☆2} and Masahiro Kusumoto^{☆2}^{☆1}Hitachi Maxell, Ltd., 1 Koizumi, Ohyamazaki-cho, Otokuni-gun, Kyoto 618-8525, Japan.^{☆2}Toyobo Co., Ltd., 10-24 Toyo-cho, Tsuruga 914-0047, Japan.

Received February 20, 2007

SYNOPSIS

Magnetic beads were developed for the purpose of applying to biological use. The beads were composed of magnetite particles coated with amylose which showed the affinity bonding with maltose binding protein. The beads showed superior response to magnetic field based on the high magnetization and superior dispersability after the removal of magnetic field in the process of purifying a protein from biological samples. The beads showed five times greater efficiency in purification of protein than amylose resin beads currently on the market.

KEY WORDS

magnetic beads, magnetite particles, amylose, maltose, protein

1 緒 言

磁性粒子は外部磁界により迅速に分離回収や誘導ができるため、バイオテクノロジーの分野で広く研究され、既に磁性粒子を無機あるいは有機化合物で修飾した各種の磁性ビーズが実用化されている¹⁻⁴⁾。特に、磁性粒子にシリカの被膜を形成した粒子サイズが5 μ m程度の磁性シリカビーズは、外部磁界によりサンプル液中で容易に磁性ビーズだけを分離捕集できるため、自動化に適した核酸抽出用の磁性ビーズとして広く使用されている^{5,6)}。磁性ビーズを用いた生体物質の抽出精製において、通常粒子サイズが小さくなるほど表面積が大きくなるため、精製効率は向上する。しかし微粒子化により磁化が小さくなるため磁界による捕集性が低下し、操作性が悪くなる問題がある。

最近では表面修飾磁性ビーズの用途として、タンパク質精製を自動化してハイスループット化する用途への展開が期待されている。しかしタンパク質精製を目的とした磁性ビーズとしては、His-tag融合タンパク質用磁性ビーズ以外、ほとんど実用化されていないのが現状である⁷⁾。

筆者らは、効率よくタンパク質を精製できる磁性ビーズの実用化を目的に、約200nmのサイズの球状のマグネタイト粒

子の表面にアミロースを被着させた磁性アミロースビーズを開発した。この磁性アミロースビーズは、マルトース結合タンパク質(MBP)がアミロースに特異的に結合することを利用したものであり、この磁性アミロースビーズによりMBPを効率よく抽出精製できることを確認した。

本報では、磁性アミロースビーズの合成方法と、磁界捕集性およびタンパク質抽出精製能について調べた結果を報告する。

2 実験方法

磁性アミロースビーズの原料となる酸化鉄粒子は、以下に示す鉄塩の水溶液中の酸化反応により合成した。硫酸第一鉄(FeSO₄·6H₂O)を溶解したFe²⁺の水溶液を攪拌しながらNaOH水溶液を滴下して水酸化第一鉄を析出させた。この水酸化第一鉄の懸濁液のpHを9~10に調整して、懸濁液の温度を約80°Cに維持して、空気酸化により酸化鉄粒子を作製した。この酸化鉄粒子は、X線回折によりFe₃O₄の構造を有するマグネタイト粒子であることを確認した。マグネタイト粒子のサイズは、pHや温度、酸化条件により変化するが、本報告では、平均粒子サイズが約200nmのマグネタイト粒子を用いて磁性

アミロースビーズを合成した結果について述べる。

アミロースとしては市販品を使用し、このマグネタイト粒子の表面に被着させた。まず超音波分散機を用いてマグネタイト粒子の水分散体を作製した。アミロースは、熱水には溶解するが室温ではほとんど溶解しないことが知られている。そこでこの温度によるアミロースの溶解量の差異を利用してマグネタイト粒子表面にアミロースを析出させた。まず予備実験として、本検討に用いたアミロースに水を加え、攪拌しながら90℃に加熱するとほぼ透明液となり、この液を室温まで冷却するとほぼ全量が析出することを確認した。そこでマグネタイト粒子の水分散液に所定量のアミロースを添加し、攪拌しながら90℃で1時間加熱し、その後1時間かけて25℃まで徐冷することにより、マグネタイト粒子表面にアミロースを析出させた。

水洗、ろ過、乾燥後、マグネタイト粒子の表面にアミロースを強固に被着させるため、加熱処理を行った。その際、アミロースの構造を変化させないように、アミロースの構造変化を調べながら雰囲気と温度を調整し、加熱処理条件を窒素ガス中、60℃で2時間加熱とした。

このようにして合成した磁性アミロースビーズは、その後の溶液反応においてアミロースが脱落することがなく、マグネタイトの表面に強固に被着していることを確認している。

マグネタイト粒子へのアミロースの被着の確認は、FTIRを用いて行った。アミロースビーズの磁界中での捕集性は、ビーズの分散液に磁界を印加したときの吸光度の時間変化から調べた。またアミロースビーズのMBP融合タンパク質の精製能は、MBP融合タンパク質の発現プラスミドを導入した培養大腸菌の破碎液に磁性アミロースビーズを加えてMBP融合タンパク質を抽出し、その抽出量を電気泳動法により調べた。

3 実験結果及び考察

3.1 磁性アミロースビーズの構造

Fig.1にアミロースをマグネタイトに対して1wt%添加し、上述した方法によりマグネタイト粒子の表面にアミロースを被着させた磁性アミロースビーズのSEM写真を示す。粒子はサイズが約200nmで、ほぼ球状形状を有している。アミロース

Fig.1 SEM photograph of magnetic amylose beads.

は微量であるためSEM写真からは観察されず、原料となるマグネタイト粒子とほぼ同一形状を示す。

Fig.1に示す磁性アミロースビーズについてFTIR解析を行った。Fig.2(a)に、アミロースのFTIRスペクトルを示す。また合成したマグネタイト粒子と磁性アミロースビーズについてもFTIR測定を行った。Fig.2(b)に、この磁性アミロースビーズとマグネタイト粒子とのFTIRの差スペクトルを示す。900～1200 cm^{-1} に存在するC-O吸収は多少のシフトはあるが、ほぼ一致している。

アミロースは、Fig.3に示すように多数のグルコースがグリコシド結合により重合し、直鎖状になった高分子である。Fig.2(b)の差スペクトルにおいて、アミロースの特長的な吸収ピークである900～1200 cm^{-1} の吸収ピーク位置が、元のアミロースの吸収ピーク位置とほぼ一致していることから、アミ

Fig.2 (a) FTIR spectrum of amylose and (b) differential spectrum of magnetic amylose beads and magnetite particles.

Fig.3 Structure of amylose.

ロースはFig.3の構造を維持した状態でマグネタイト粒子に被着していると考えられる。ビーズ上でのアミロースの結合状態は不明であるが、アミロースとマグネタイト粒子表面のOH基間での結合と考えられる。

原料に用いたマグネタイト粒子と、このマグネタイトに対してアミロースを1wt%被着させた磁性アミロースビーズの保磁力は80 Oeで、飽和磁化は81.8 emu/gであった。

3.2 磁性アミロースの磁界による捕集

磁性アミロースビーズの磁界による捕集性を調べた。濃度が1wt%になるように水に磁性アミロースビーズを入れ、超音波分散機により磁性アミロースビーズの水分散体を作製した。次にこの分散体を一辺が10 mmの正方形で高さが30 mmのガラス製の吸光セルに入れ、セル側面に表面磁界が約3000 Oeの磁石を接触させた。セルに波長が555 nmの光を照射し、磁性アミロースビーズの捕集に伴う吸光度の時間変化を調べた。結果をFig.4に示す。磁石の磁界により磁性アミロースビーズが捕集される結果、約10秒で分散液はほぼ透明になった。比較のために、市販の核酸精製用の磁性シリカビーズの捕集性も示す。この磁性シリカビーズは、酸化鉄粒子をシリカの被膜でカプセル化した粒子サイズが約5 μ mの球状粒子である。

磁性アミロースビーズは、粒子サイズが約200 nmと小さいにもかかわらず、5 μ mのシリカ磁性ビーズと同等の磁界捕集性を示す。これはシリカビーズの飽和磁化が約25 emu/gであるのに対して、磁性アミロースビーズが約82 emu/gと大きい飽和磁化を有するためである。また磁界捕集後の磁性アミロースビーズの再分散性については、以下の方法で調べた。

磁石を引き離れた後の磁性アミロースビーズは凝集しているため、ボルテックミキサー（振動回転式攪拌装置）で数分間振動分散させた。次に、分散直後の吸光度を上述した方法と同じ方法で調べた。その結果、吸光度は磁界印加前とほぼ同じ値を示し、再分散処理により初期の分散状態に戻ることを

Fig.4 Response to a magnetic field of magnetic amylose beads and magnetic silica beads.

確認した。

以上の結果より、磁性アミロースビーズ表面に結合させたタンパク質を溶離させる上で、問題のないレベルの再分散性を示すことがわかった。これは飽和磁化は大きい保磁力が80 Oeと小さいため、磁界を印加しない状態では磁気凝集力が小さく、容易に再分散するためと考えられる。

3.3 磁性アミロースビーズによるタンパク質精製

磁性アミロースビーズを用いて、マルトース結合タンパク質 (MBP) がアミロースに特異的に結合することを利用して、MBP融合用ベクターを用いて大腸菌などで発現させた目的タンパク質を簡単に精製できることを見出した。

Fig.5に原理図と精製プロセスを示す。まず目的のMBP融合タンパク質を含む溶液に磁性アミロースビーズを添加し、MBPを磁性アミロースビーズのアミロースに結合させる。この磁性アミロースビーズとMBP融合タンパク質の複合体を磁界により捕集した後、不要な成分を除去する。捕集した磁性アミロースビーズを洗浄液中で再分散および捕集を数回繰り返し洗浄する。最後にマルトースを含む溶液を用いて磁性アミロースビーズからMBP融合タンパク質を溶出させ、目的タンパク質を精製することができる。MBP融合タンパク質は、グルコースがグリコシド結合したアミロースの先端部分に特異的に結合していると考えられる。磁性アミロースを用いたタンパク質の精製は、アミロースに特異的に結合したMBP融合タンパク質を高濃度のマルトース溶液中に分散させると、アミロースはマルトースとの結合を優先し、MBP融合タンパク質がアミロースビーズから溶離しやすくなることを利用するものである。

MBP融合タンパク質の精製能を以下の方法で調べた。まずMBP融合タンパク質の発現プラスミドを大腸菌に導入した。この大腸菌を培養し、MBP融合タンパク質を発現させた。次に発現したMBP融合タンパク質を含む大腸菌破砕液に磁性アミロースビーズを加え、Fig.5に示した方法により、菌体破砕サンプルからMBP融合タンパク質を抽出精製した。

抽出したMBP融合タンパク質を電気泳動により調べた結果をFig.6に示す。比較のために、アミロースを結合させた非磁性レジンビーズを用いた結果も示す。この非磁性レジンビーズとして、NEB社製のアミロースレジンビーズを使用した。なお非磁性レジンビーズは、磁性アミロースビーズに対して

Fig.5 Principle and process for the purification of maltose binding protein (MBP) using magnetic amylose beads.

- 1: Magnetic amylose beads
 2: Amylose resin beads
 (Same quantity to magnetic amylose beads)
 3: Amylose resin beads
 (Five times quantity to magnetic amylose beads)
 4: Cell extract (supernatant)

Fig.6 Results of analysis of electrophoresis of maltose bonding protein (MBP) purified by using magnetic amylose beads and amylose resin beads. The bandwidth shows the quantity of purified MBP.

同量および5倍の重量を用いて調べた。電気泳動によるバンド幅が目的タンパク質の精製量を示しており、磁性アミロースビーズは、非磁性レジンビーズを5倍の重量を使用したものと同等の精製量を示し、非磁性レジンビーズに比べて優れた抽出精製能を有することがわかる。また、宿主MBP由来のバックグラウンドが見られず、純度の高い精製タンパク質が得られることを示している。

この磁性アミロースビーズの優れたMBP融合タンパク質精製能は、非磁性レジンビーズの粒子サイズが約100 μ mと大きいものに対して、磁性アミロースビーズの粒子サイズが約200 nmと小さいことによる。磁性アミロースビーズは微粒子のため表面積が大きく、アミロースとMBPの結合サイトが多くなるためと考えられる。非磁性レジンビーズは、通常ガラスやプラスチック製のカラムに充填して洗浄液を流してMBP融合タンパク質を分離捕集するため、微粒子になると洗浄液が流れにくくなり、操作性が悪くなるため本質的に微粒子化が困難である。一方磁性アミロースビーズは磁界を利用した捕集が可能であるため、微粒子化による操作性の低下を引き起こすことなく優れたタンパク質精製能を発揮することができる。

4 結 言

マグネタイト粒子のバイオ用途への応用を目的として、タンパク質抽出精製用の磁性アミロースビーズを開発した。このビーズは、マルトース結合タンパク質がアミロースに特異的に結合することを利用したものである。得られた結果は、以下の通りである。

- (1) 約200 nmの球状のマグネタイト粒子の表面に、グルコースが直鎖状にグリコシド重合したアミロースを被着させた磁性アミロースビーズを開発した。
- (2) この磁性アミロースビーズは粒子サイズが約200 nmと小さいにもかかわらず、大きな飽和磁化を反映して優れた磁界捕集性を示した。また磁界除去後の再分散性も良好であった。
- (3) 大腸菌を用いてMBP (マルトース結合タンパク質)融合タンパク質を発現させ、磁性アミロースビーズを用いて精製した結果、非磁性レジンビーズを用いた場合に比べて約5倍のタンパク質精製能を示した。
- (4) これは磁性アミロースビーズが微粒子で表面積が大きいため、ビーズ表面のアミロースとマルトース結合タンパク質との結合サイトが多くなるためと考えられた。

なおこの磁性アミロースビーズは既に上市されており、タンパク質抽出用ビーズとして活用されている。

文 献

- 1) U.Hafeli, W.Schütt, J.Teller and M.Zborowski (ed.): "Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers", Plenum Press, New York, (1997).
- 2) D.Pouliquen: "Microspheres Microcapsules & Liposomes", ed. by R. Arshady Citus London, (2001)495.
- 3) Q.A.Pankhurst, J.Connolly, S.K.Jones and J.Dobson: "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine", J. Phys. D: Appl. Phys., **36**(2003)R167-R181
- 4) M.Abe and H.Handa: "Prospects for Medical Applications Using Beads in the Post-Genomic Era", J. Magn. Soc. Jpn., **28**(2004) 841-846.
- 5) R.Boom, C.J.A.Sol, M.M.M.Salimans, C.L.Jansen, P.M.E.Wertheim-van Dillen and J.van der Noordaa: "Rapid and simple method for purification of nucleic acids", J. Clin. Microbiol., **28**(1990)495-503.
- 6) H.Honda: "Magnetic Partcles Approaching to Biological and Medical Technology Field", J. Magn. Soc. Jpn., **25**(2001)1301-1307.
- 7) M.Kitabayashi: The 21th annual meeting of the molecular biology society of Japan, Abstracts, (1998)700.