

氏 名	はし 橋 本 つとむ 勉
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	博 乙 第 2 号
学位授与の日付	平成 4 年 11 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	Development of Macroporous Synthetic Hydrophilic Resin-Based Packings for the Separation of Biopolymers (生体高分子分離用多孔質親水性合成高分子充填剤の開発)
審 査 委 員	(主査) 教 授 牧 野 圭 祐 教 授 佐 藤 昌 憲 教 授 田 中 信 男

論 文 内 容 の 要 旨

20世紀後半分子生物学が注目を集め、タンパク質あるいはペプチドを単離して機能を明らかにする研究が重要になった。当時はオープンカラム用ソフトゲルしかなく、分離は長時間を要し分離精度も不十分であったために、生理活性を維持した試料を手にすることは困難であった。このような状況に対応し、約15年前に、タンパク質ペプチド分離用の高速液体クロマトグラフィー用充填剤を工業的レベルで開発し応用法を確立するための研究を始めた。本学位論文は著者がこれまでにやってきた一連の研究の総括であり、研究開発を行った種々の充填剤の中で、多孔質親水性合成高分子充填剤に関する結果をまとめたものである。

論文で報告した充填剤は総て工業化されている6種類である。(1)サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 用充填剤 (2)イオン交換クロマトグラフィー (IEC) 用充填剤 (3)疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) 用充填剤 (4)逆相クロマトグラフィー (RPC) 用充填剤 (5)キレートアフィニティークロマトグラフィー (CAFC) 用充填剤 (6)アフィニティークロマトグラフィー (AFC) 用充填剤。

最初に種々の細孔径の SEC 用充填剤を開発した。これらはタンパク質が吸着しないという特徴をもつ。シリカ基材充填剤の欠点である高 pH あるいは低 pH での劣化がないことも大きな特徴である。また機械強度も大きく高圧での使用に適しており、塩溶液中でも膨潤収縮せず応用範囲が広い。この充填剤をペプチド、タンパク質、核酸などに対して用い、個々の細孔径に応じた良好な直線域をもつ較正曲線を得た。他の充填剤はすべてこの充填剤 (粒径: 10 μm 、細孔径: 数千オングストローム) を基材として調製した。

IEC 用としては、ジエチルアミノプロピル基を化学結合した弱アニオン充填剤 ($\text{pK}_a \sim 11.5$ 、イオン交換能: 0.12 mequiv/ml) を開発し、基本的特性ならびにタンパク質や核酸の分離への応用を研究した。この充填剤は、広い pH 範囲での分離に優れており、高分子量の試料の分離に適していることを証明した (活性収率: >80%)。HIC 用としては、エーテルリンカーを介してフェニル基を導入した充填剤 (リガンド担持量: 0.1 mmol/ml) を開発した。この高速液体クロマトグラフィーでは、リン酸アンモニウム濃度の逆勾配を溶出に用い、種々のタンパク質や RNA の分離が可能であることを示した (活性収率: 80%)。また高 pH ならびに低 pH でもリガンドの脱離がないことを報告した。RPC 用は、同様にエーテルリンカーを介してフェニル基を導入した。タンパク質に対して、シリカを基剤の逆相クロマトグラフィー用充填剤と同等の結果を得た。またこの充填剤は広い pH 範囲での洗浄が行えるので、大量分取に適していた。また本充填剤は大きな細孔系を持っているので、高分子量のタンパク質の分離に適していた (回収率: 70 ~ 80%)。CAFC 充填剤は、 $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ 基を導入して製造した。この充填剤に亜鉛錯体を形成し、

特異的相互作用するタンパク質を高分離能でしかも高回収率で分離することができた（回収率：>80%）。活性収率も高かった。また高 pH あるいは低い pH で長期間にわたって安定であった。AFC 用として、2, 2-trifluoroethanesulphonyl chloride で活性化した充填剤を開発し、この充填剤への抗体結合の最適化条件を決定した：1 M のリン酸緩衝液（pH 7.5）中で 25°C で 2 時間反応を行うと、2~3 mg/ml の抗体が担持できた。この充填剤を用い、抗原-抗体反応を利用したタンパク質の分離が特異的に行われることを報告した。

以上のように、生体試料中に極微量含まれる活性なタンパク質あるいはペプチドを単離精製できる種々の分離モードの高速液体クロマトグラフィー用多孔質親水性合成高分子充填剤を開発し、これらの特徴を明らかにした。現在これらを組み合わせることによって、多くの生理活性タンパク質あるいはペプチドが発見され、生物現象の解明に大きな貢献をしている。

論文審査の結果の要旨

橋本勉の博士論文について詳細な審査を行った。論文は英文で書かれており、詳細かつ論理的にまとめられている。論文の内容は、タンパク質等の生体高分子を分離・精製するための高速液体クロマトグラフィー用充填剤の先駆的開発とその分離特性解析に関するものであるが、親水性高分子を基材として用いることによってシリカ基材の充填材では不可能な分離・精製を可能にした点が注目し得るものであり、特にこれらが総て工業的に生産され市販されるに至った点は、類を見ない優れた業績である。また論文中には現在生化学で用いられている分離モードの総てが網羅されており、本学位論文に記載し説明されている分離用充填剤が今日の生化学研究の隆盛に多大な貢献をした点を高く評価する。特にこのような研究が国内外を問わず先駆的に行われたのは極めて重要である。論文に記載されている充填剤は、(1)サイズ排除クロマトグラフィー用充填剤 (2)イオン交換クロマトグラフィー用充填剤 (3)疎水性相互作用クロマトグラフィー用充填剤 (4)逆相クロマトグラフィー用充填剤 (5)キレートアフィニティークロマトグラフィー用充填剤 (6)アフィニティークロマトグラフィー用充填剤である。(2)~(6)の充填剤は総て(1)の充填剤を基材として約10年余にわたって開発されたものであり、初期の研究計画の設定の正しさを物語っている。

以上のように、本研究は生化学研究のための重要な分離材料である高速液体クロマトグラフィー用充填剤を工業化学製品として開発するために行われたものであり極めて工業的色彩の強いものである。論文記載内容は詳細かつ論理的に記述され8編の国際的学術雑誌に報告されており、本学の博士号（工学）を授与するに十分値するものと結論する。