The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Development of a New Dye-Iminodiacetic Acid-Zn Matrix and Expanded Bed Adsorption Chromatography for Single Step Recovery of Alcohol Dehydrogenase from Un-clarified Cell Homogenate
Author(s)	Chusnul, Hidayat
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44970
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【15】

氏　　名	Chusnul, Hidayat（チュスヌル　ヒダヤット）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学　位　記　番　号	第　18115　号
学位授与年月日	平成15年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学　位　論　文　名	Development of a New Dye-Iminodiacetic Acid-Zn Matrix and Expanded Bed Adsorption Chromatography for Single Step Recovery of Alcohol Dehydrogenase from Un-clarified Cell Homogenate **（菌体破砕液など混濁液から生産物を1段階回収する膨張層型吸着クロマトグラフィの開発－アルコールデヒドロゲナーゼをターゲットとする色素-iminodiacetic acid-Zn型アフィニティ担体の新規開発と精製操作の最適化）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　塩谷　捨明 （副査） 教　授　仁平　卓也　教　授　小林　昭雄　教　授　金谷　茂則 教　授　室岡　義勝　教　授　清水　浩　教　授　原島　俊 助教授　高木　睦

論　文　内　容　の　要　旨

本論文では、菌体破砕液など混濁液からのアルコールデヒドロゲナーゼの1段階回収のための新規な色素-Iminodiacetic Acid（IDA）-Zn担体と膨張層型クロマトグラフィ法を研究している。適切な比重を持たせるためにアルミナ粒子を基材とし、アガロースをコーティングした担体粒子表面にIDAと色素（Cibacron Blue 3GA（CB））を導入し、亜鉛を結合することによりアルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）吸着性の高い新規な担体を開発し、精製成績を指標として操作条件を最適化し、高性能膨張層型クロマトグラフィ法を開発することに成功している。本論文は5章から構成されている。

第1章では膨張層型クロマトグラフィ精製について概論するとともに、本論文の目的と意義について述べている。即ち、微生物培養液あるいは培養細胞破砕液から目的タンパク質を精製するにあたり、通常の充填層型クロマトグラフィでなく膨張層型クロマトグラフィを採用すると菌体分離の工程を省略できる点で有利である。しかし、膨張層型クロマトグラフィ用の適切な担体がなく、その開発が待たれている。そこで、適切な比重とタンパク質への親和性を兼ね備えた担体の開発とこれを用いた精製政策を考案している。

第2章では、アルミナ粒子にアガロースをコーティングすることにより適切な比重の担体を構築し、高い沈降速度を確認している。この担体にIDAを結合し、さらに色素（CB）も同時に結合することにより、ADHの吸着容量の増大に成功している。ADHは色素-IDA-Zn結合型担体に速やかに吸着され、2時間以内に平衡に達している。吸着は0.5 M NaCl溶液を用いることにより促進され、酵母菌体破砕液中のタンパク質濃度が高いほど吸着に適している。担体とADHとの多価結合を解析した結果、平均結合サイト数は4.5であることを明らかにしている。

第3章では、新規担体に吸着したADHの脱着条件について充填層型クロマトグラフィにより検討している。タンパク質の脱着はEDTAとイミダゾールのいずれでも可能である。4 mM EDTAでは0.5 M NaClが最適であり、精製

倍率4.5が得られている。EDTAの代わりにイミダゾールを用いることにより精製倍率は6.5に増大しているが、ADHの回収率は40.6%と低い。担体に菌体破砕液を加える前に担体をイミダゾールで平衡化しておくこと、および脱着用イミダゾールの濃度を2段階に変化させることにより、精製倍率8.4、回収率76.8%といずれも高い値が得られている。

第4章では、色素-IDA-Zn担体を用いたADHの膨張層型吸着クロマトグラフィーによる精製について検討している。混濁した菌体破砕液からのADHの吸着に、菌体や菌体残渣はほとんど影響しないことがわかっている。膨張層型クロマトグラフィーでの色素-IDA-Zn担体への動的結合容量は、0～15 mMのイミダゾール濃度では367～597 U/ml担体である。さらに、吸着緩衝液にイミダゾールを添加することによって混在するタンパク質の吸着を低減化できることが明らかとなっている。最適なイミダゾール濃度（5 mM）では動的結合容量は569 U/mlに達している。実際に混濁した菌体破砕液からの膨張層型クロマトグラフィによるADHの精製を検討した結果、イミダゾール濃度5 mMで、精製倍率8.8、回収率93.5%という好成績が得られている。

第5章では、以上の結果を基づき、新規に開発した色素-IDA-Zn結合型アガロースコートアルミナ粒子を担体とし、担体の平衡化と吸着、脱着工程にイミダゾールを用いる膨張層型クロマトグラフィによる培養生産タンパク質の新規精製法を提案している。

論文審査の結果の要旨

微生物培養は医薬品など有用タンパク質の生産手段として極めて重要であるが、生産物であるタンパク質の充填層型クロマトグラフィによる精製のためには菌体分離工程が必要であり、これが精製コストを低減化する上で大きな問題になっている。一方、菌体分離工程が不要な膨張層型クロマトグラフィには適切な担体が無く実用的ではない。これに対して本論文では、

(1) アルミナ粒子をアガロースでコートし、さらに色素とIDAの両方を結合することにより、適切な比重を有するとともにタンパク質（ADH）吸着容量の高い、新規な膨張層型クロマトグラフィ用担体を創製している。

(2) 新規担体に吸着したADHの脱着には、従来用いられてきたNaClによる塩濃度調整だけでなくEDTAやイミダゾールによる拮抗作用を利用した新操作法が有効であることを実証している。

(3) 色素-IDA-Zn担体を用いたADHの膨張層型吸着クロマトグラフィーによる精製においてイミダゾールの使用は動的結合容量を顕著に増加させることを示している。

(4) 膨張層型吸着クロマトグラフィーにおいて単にイミダゾール濃度を高漫度（150 mM）にシフトすることによって特異的脱着が行われ、新方式によれば菌体分離工程が無くても高度な精製倍率と回収率が達成されることを実証している。

微生物培養液から有用タンパク質を精製する技術は産業的に重要であるが、本論文は上述のように菌体分離工程の不要な膨張層型クロマトグラフィに使用可能な新規な担体を開発し、さらにその有用性を実験によって実証している。本研究の成果は、今後の微生物培養による医薬品等の有用タンパク質生産における精製法開発に寄与するところが大きい。

よって本論文は、生物化学工学、とくに生物精製工学の分野で原著な貢献をするものであり博士論文として価値あるものと認める。