

血液凝固第九因子の精製は、これで決まり！

文献より；硫酸エステル型・塩耐性陽イオン交換体による Factor IX の精製



イオン交換クロマトグラフィー（IEC）は吸着容量が大きいことから、血漿たんぱく質のキャプチャー工程に広く用いられています^{1,2}。しかしながら、IECは試料中の塩濃度の影響を受けやすく、試料溶液が塩を含む場合は、ろ過に加え、脱塩や透析などの前処理が必要になります。一方、最近では塩濃度の影響を受けにくい塩耐性（salt-tolerant）イオン交換体が市販されており、マルチ（ミックス）モード充填剤の一種としてこれらの精製に用いられるようになってきました。

今回は、塩耐性陽イオン交換体である TOYOPEARL® Sulfate-650F を用いて、プロトロンビン複合体濃縮製剤（PCC）から血液凝固第九因子（Factor IX）を効果的に精製した例を紹介いたします。

尚、塩耐性イオン交換体およびマルチ（ミックス）モードクロマトグラフィー用充填剤は、本シリーズのテクニカルノート（トヨパール） No. 2, 5, 7, 19 にも関連した報告がありますのであわせて参照ください。

●文献紹介³

M. Begić et al., Salt-tolerant cation-exchanger containing sulfate groups as a viable alternative for mixed-mode type and heparin-base affinity resin, Biotechnol. J., 2021; 2100100, CC BY NC ND, <https://doi.org/10.1002/biot.202100100>

スルホ基を官能基にもつ陽イオン交換体 TOYOPEARL GigaCap® S-650M や SP-650M に対し、より高い塩耐性を有する陽イオン交換体である TOYOPEARL Sulfate-650F には、硫酸エステル基が官能基として導入されています（FIGURE 1）。初めにこれらの陽イオン交換体 3 種について、リゾチームを用いて溶離液の pH と塩濃度が吸着量に与える影響を調べたところ、スルホ基をもつ陽イオン交換体に比べ、硫酸エステル基をもつ TOYOPEARL Sulfate-650F は、塩濃度依存性が大きく異なっており、より高い塩濃度においても吸着能を有することがわかりました（FIGURE 2）。その理由として、硫酸エステル型では官能基の S 原子と基材の炭素原子の間に -O- が存在しており、スルホ型の -CH₂- に比べ、疎水性が高くなっていることで、塩耐性の性質が付与されていることが考えられました。



FIGURE 1 Difference between sulfonium-type (left) and sulfate-type ion exchanger (right)

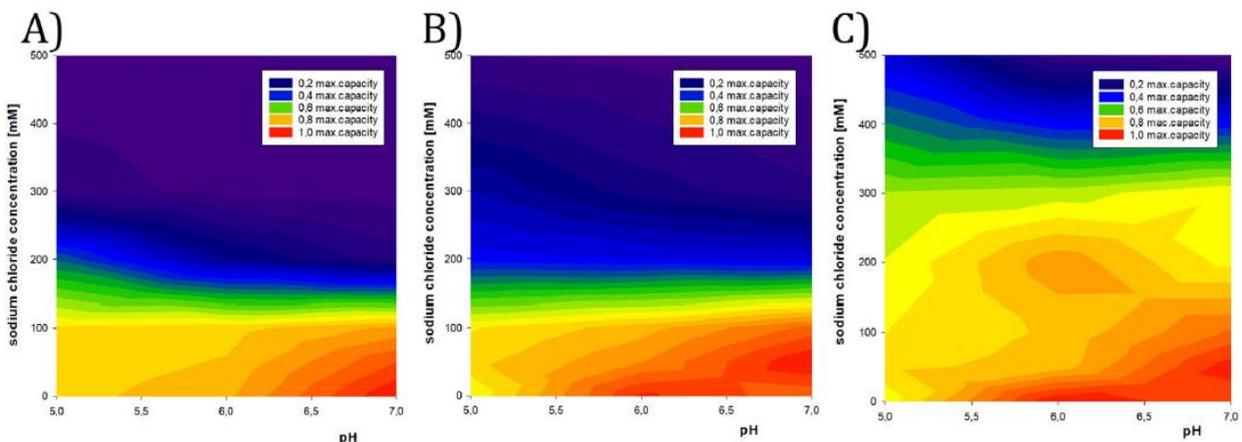


FIGURE 2 Heat plot of pH and salt concentration dependence on normalized binding capacity of Lysozyme for: (A) TOYOPEARL GigaCap S-650 M, (B) TOYOPEARL SP-650 M and (C) TOYOPEARL Sulfate-650F

●塩耐性陽イオン交換体 TOYOPEARL Sulfate-650F による Factor IX の精製

次に、塩耐性陽イオン交換体 TOYOPEARL Sulfate-650F を用いて PCC 中のビタミン K 依存性血液凝固因子の分離を試みました。結果を以下に示します。まず 0.4 mol/L NaCl を含む高塩濃度の溶離液により、吸着の弱い血液凝固第二因子 (Factor II)、第七因子 (Factor VII)、第十因子 (Factor X) を、カラムに吸着させずに溶出させました。その後、吸着した第九因子 (Factor IX) を、塩濃度 (低減) および pH (上昇) のステップグラジエントで溶出させました。TOYOPEARL Sulfate-650F を用いることで、試料を脱塩処理することなく、従来用いられてきたヘパリンアフィニティークロマトグラフィーと同等純度の Factor IX を得ることができました。

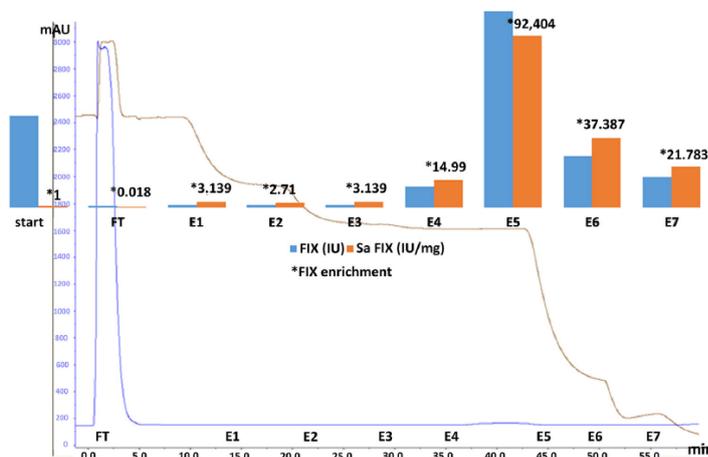


FIGURE 4 Purification of clotting factor IX and removal of other vitamin K-dependent clotting factors (FII, FVII, and FX) on sulfate resin TOYOPEARL Sulfate-650F. Conditions: Äkta Explorer chromatographic system (Cytiva) with a 2 mL sample loop, and a 1 mL column, flow 2 mL min⁻¹, room temperature. Buffer A (starting buffer), 400 mM NaCl, 20 mM phosphate, pH 4.5, 39.1 mS cm⁻¹; Collected fractions were eluted with Buffers 1–7 (cf. Materials and methods). Blue: Factor IX activity (IU mL⁻¹) and enrichment (red) were presented. The activity of FX was detected only in the flow-through fraction, and no FX clotting activity was detected in the eluate

Ref.; M. Begić et al., Biotechnol. J., 2021; 2100100, CC BY NC ND, <https://doi.org/10.1002/biot.202100100>

●参考文献

1. T. Burnouf, An overview of plasma fractionation, Annals of Blood, 2018, 3: 33, <https://aob.amegroups.com/article/view/4496/5240>
2. J. M. Bult, Plasma fractionation technologies: benefit and limitations, September 21, 2021 <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjV4c3nIbf7AhUQCkHewNDUkQFnoECAsQAQ&url=https://www.isbtweb.org/2Fresource/2Fjan-bult-pdf.html&usq=AOvVaw2kL9acty1TOUXLib1B7sgD>
3. M. Begić et al., Salt-tolerant cation-exchanger containing sulfate groups as a viable alternative for mixed-mode type and heparin-base affinity resin, Biotechnol. J., 2021; 2100100, CC BY NC ND, <https://doi.org/10.1002/biot.202100100>

●TOYOPEARL Sulfate-650F および充填カラム SkillPak™ 製品一覧表

| 品番 | 品名 | 規格 |
|---------|---|----------------|
| 0023468 | TOYOPEARL Sulfate-650F | 250 mL |
| 0045205 | SkillPak 1 Sulfate-650F x 5 | 1 mL x 5本 |
| 0045241 | SkillPak 5 Sulfate-650F | 5 mL x 1本 |
| 0045318 | SkillPak 50 Sulfate-650F | 50 mL x 1本 |
| 0045319 | SkillPak 200 Sulfate-650F | 200 mL x 1本 |
| 0045227 | SkillPak 1 CIEX Library (GigaCap S-650S, GigaCap CM-650M, Sulfate-650F) | 1 mL x 3種 x 2本 |
| 0045230 | SkillPak 1 Salt Tolerant Library (Sulfate-650F, NH ₂ -750F) | 1 mL x 2種 x 3本 |



※ “TOYOPEARL”、“TOYOPEARL GigaCap”、“トヨパール”は日本等における東ソー株式会社の登録商標です
 ※ “SkillPak”は Tosoh Bioscience LLC の製品名です
 ※ 掲載のデータ等はその数値を保証するものではありません。お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認ください

東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部 ☎(03) 5427-5180 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2
 大阪支店 バイオサイエンス ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
 名古屋支店 バイオサイエンス ☎(052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7
 福岡支店 ☎(092) 781-0481 〒810-0001 福岡市中央区天神1-13-2
 仙台支店 ☎(022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1
 カスタマーサポートセンター ☎(0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>
 HPLC Applications Database <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/applications-database-jp>
 お問い合わせE-mail hlc@tosoh.co.jp

