

# 大腸菌由来の遺伝子組み換え L-アスパラギナーゼの凝集体分析

## 著者

Andrew Coffey and  
Andrea Angelo P. Tripodi,  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

生物製剤タンパク質の凝集を定量することは、品質と安全性を確保するうえで不可欠な要素です。遺伝子組み換えタンパク質は、pH、濃度、温度の変化、表面力やせん断力への曝露など、凝集の原因となる可能性のあるさまざまな条件に遭遇します。酵素 L-アスパラギナーゼはその構造上、特殊な高分子量凝集体を生成する傾向があるため、凝集を定量するのは困難です。

このアプリケーションノートでは、シリカ-ジオールタイプ固定相 (Agilent ProSEC 300S) および親水性ポリマーコーティングシリカ相 (Agilent AdvanceBio SEC) という 2 種類のサイズ排除カラム (SEC) を使用して、凝集を定量する方法について説明します。また今回の実験では、長時間にわたる試験で性能を比較することにより、メソッドの堅牢性も検証しました。

## はじめに

何年も前に、酵素 L-アスパラギナーゼの抗がん特性が同定されました<sup>1, 2</sup>。この酵素は、アスパラギンをアスパラギン酸とアンモニアに変換します。特定のがん細胞ではアスパラギン合成酵素が欠損しているため、アスパラギン酸をアスパラギンに変換することはできません。このような細胞にアスパラギンが供給されなくなると、細胞はアポトーシスを起こします。そのため、L-アスパラギナーゼは重要な生物製剤ターゲットとなり、いくつかの遺伝子組み換え酵素製品が生み出されました。

L-アスパラギナーゼの凝集は、多くの遺伝子組み換え生物製剤の場合と同様に、重要品質属性であり、製造および品質管理時に定量する必要があります。しかし、活性化したアスパラギナーゼは同一の 37 kDa サブユニットで構成される 148 kDa の四量体酵素です。そのため、存在する可能性のある凝集体には、低分子量種だけではなく、八量体および高次の種が含まれています。

遺伝子組み換えアスパラギナーゼの凝集を定量する際の課題は、以前に報告されています<sup>3</sup>。高次凝集体を定量する際のばらつきは、ロット間のばらつきも含め、さまざまなベンダーのさまざまなサイズ排除カラムで指摘されています。

## 実験手法

### 試薬および薬品

- 試薬および薬品はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。
- 大腸菌由来の L-アスパラギナーゼは Sigma-Aldrich から購入しました。

### 装置構成

分析は、次のモジュールで構成された、Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムで実施しました。

- 1260 Infinity II バイオイナートクォータリポンプ (G5654A)
- 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンブラ (G5668A)
- 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- 1260 Infinity II 多波長検出器、バイオイナートフローセル搭載 (G7165A)

データは、Agilent OpenLab CDS 2.6 ソフトウェアで取り込みました。

構成に Agilent 1260 Infinity Bio-SEC マルチ検出器システム (G7805A) を加えて、光散乱分析を実施しました。

光散乱データは、Agilent GPC/SEC ソフトウェアで解析しました。

### サンプル前処理

20.0 mg/mL のウシ血清アルブミン (BSA) および 10.0 mg/mL のミオグロビン (MYO) の原液を移動相で前処理しました。等量を混合して、BSA-MYO システム適合性標準を作成しました。

L-アスパラギナーゼは、バイアルの中身を 1.0 mL の移動相で溶解して前処理しました。

BioRad ゲルろ過標準 (GFS) タンパク質標準は、バイアルの中身を 5.0 mL の移動相で溶解して前処理しました。

### 移動相の調製

100 mM リン酸ナトリウムと 100 mM NaCl の移動相は、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  および  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液に NaCl を添加し、pH を 7.2 に調整しました。次に溶液を、0.2  $\mu\text{m}$  メンブレンフィルタろ過しました。

光散乱分析のために、移動相を 0.1  $\mu\text{m}$  メンブレンフィルタで 3 回ろ過しました。

表 1. メソッド条件

	HPLC 条件
カラム	Agilent ProSEC 300S 5 $\mu\text{m}$ , 300 $\text{\AA}$ , 7.5 $\times$ 300 mm (p/n PL1147-6501)、または Agilent AdvanceBio SEC 2.7 $\mu\text{m}$ , 300 $\text{\AA}$ , 7.8 $\times$ 300 mm (p/n PL1180-5301)
移動相	100 mM リン酸ナトリウム + 100 mM NaCl, pH 7.2
流量	0.5 mL/min
カラム温度	25 °C
注入量	20 $\mu\text{L}$
合計分析時間	30.0 分
検出	UV、280 nm (特に指定のない限り)
シーケンス	上昇段階 (通液を含む) 0.1 mL/min、5 分 0.2 mL/min、5 分 0.3 mL/min、5 分 0.4 mL/min、5 分 0.5 mL/min、120 分 (通液) 分析段階 0.5 mL/min、30 分

## 結果と考察

各カラムは、前のセクションで示した、同じ一連の手順に従って処理しました。

初期段階では、目的の操作流量 0.5 mL/min に達するまで、0.1 mL/min の増分で流量を上昇させました。次に、各カラムに 120 分間通液しました (約 8 ~ 9 カラム容量)。注入シーケンスには、ブランク (移動相)、BioRad GFS タンパク質標準、BSA-MYO システム適合性標準を含めました。遺伝子組み換えアスパラギナーゼを注入した後、さらに BSA-MYO および BioRad GFS 標準を注入しました。

図 1A と 1B は、調査した 2 本のカラムのクロマトグラムを比較したものです。ProSEC 300S カラムの寸法は 7.5 × 300 mm であり、カラム容量は 13.3 mL です。AdvanceBio SEC カラムの寸法は 7.8 × 300 mm であり、カラム容量は 14.3 mL です。

流量 0.5 mL/min では、より大きい AdvanceBio SEC カラムにおいて、リテンションタイムが最大 2.2 分遅くなっています。ただし、図 1A と 1B によれば、タンパク質が大きくなると、AdvanceBio SEC カラムの溶出が早くなっていることが明らかです。この結果は、AdvanceBio SEC カラムのポア容積が十分に大きい (5.0 mL に対して 6.4 mL) ことを示しており、分離能力は約 30 % 高くなっています。

クロマトグラムは、両方の種類のカラムの BioRad GFS タンパク質標準および BSA-MYO システム適合性標準の分離結果を示しています。クロマトグラムのプロットは最大ピークで正規化しています。ピーク 7 のミオグロビンは両方のサンプルで共通しており、リテンションタイムの再現性が優れていることがわかります。サンプル中に存在するタンパク質のいくつかの二量体に対応する小さいピークは適切に分離されており、図の凡例に示されています。

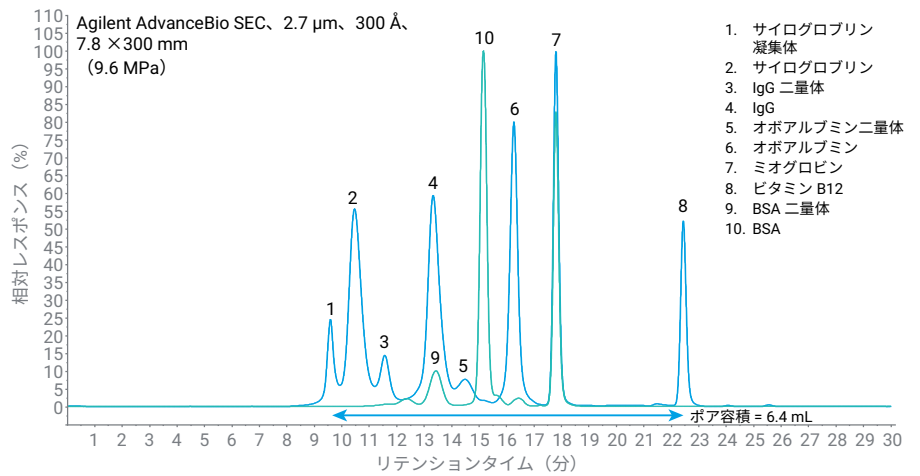


図 1A. BioRad GFS タンパク質標準 (ピーク 1 ~ 8) および BSA-MYO システム適合性標準 (ピーク 9 と 10) の Agilent AdvanceBio SEC カラムによるクロマトグラムの重ね表示

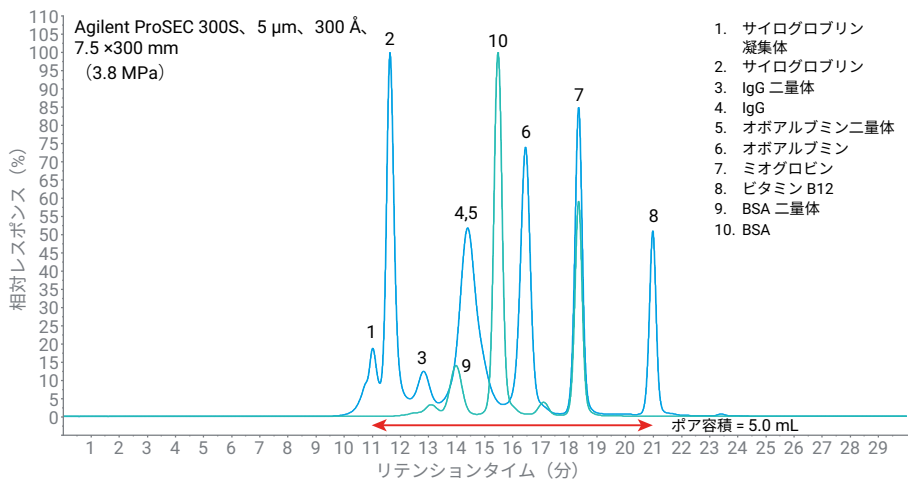


図 1B. BioRad GFS タンパク質標準 (ピーク 1 ~ 8) および BSA-MYO システム適合性標準 (ピーク 9 と 10) の Agilent ProSEC 300S カラムによるクロマトグラムの重ね表示

表 2 に、システム適合性混合物である、BSA 二量体と単量体のピーク間、および BSA 単量体とミオグロビン単量体のピーク間の分解能値を示します。

ポア容積を大きくすると同時に、粒子サイズを小さくすることにより（これにより、高いカラム効率を実現）、ProSEC 300S カラムと比較して、AdvanceBio SEC カラムの分解能が大幅に向上します。

図 2 は、X-軸のリテンションタイムに対して Y-軸に分子量を対数プロットすることにより作成した検量線を示しています。この曲線から、ポア容積に差があることが明らかになります。そこで、さらなる試験を実施しました。

固定相ロットが異なる 2 本目の AdvanceBio SEC カラムを使用して、性能の時間変化をモニタリングしました。シーケンスは、次を含む、25 回の連続注入で構成しました。

- ブランク (mp)
- BioRad GFS タンパク質標準
- BSA-MYO 標準

このシーケンスを 12 回繰り返して、6 日間で合計 300 回の注入を実施し、シーケンス間のカラム性能を比較しました。

図 3 は、300 回の注入実験において、BSA-MYO の分解能に一貫性があることを示しています。

表 2. BSA-MYO の分解能値の比較

	Agilent AdvanceBio SEC (2.7 μm, 300 Å, 7.8 × 300 mm)	Agilent ProSEC 300S (5 μm, 300 Å, 7.5 × 300 mm)
BSA 二量体 - BSA 分解能	2.64	2.16
BSA-MYO 分解能	6.28	5.49

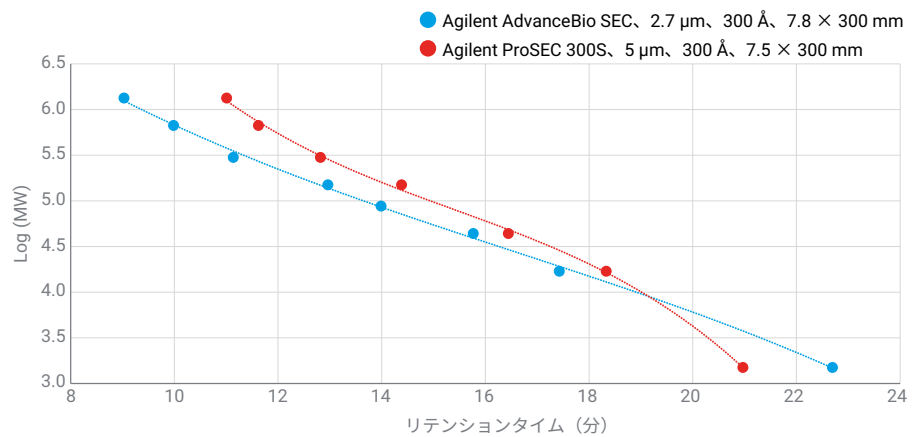


図 2. タンパク質のリテンションタイムに基づいて作成した検量線

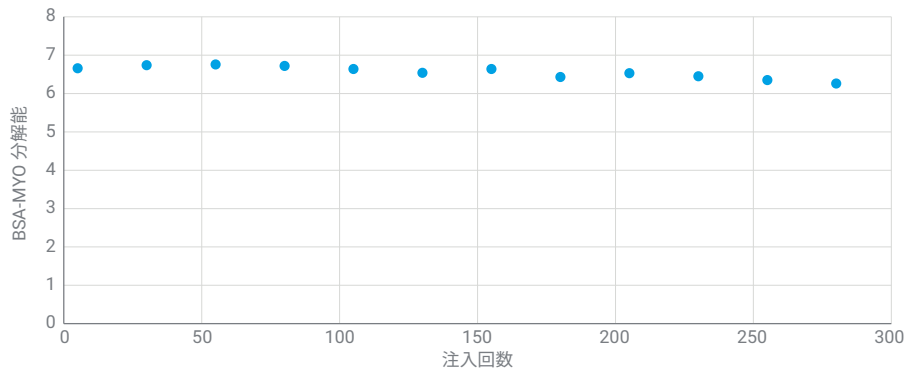
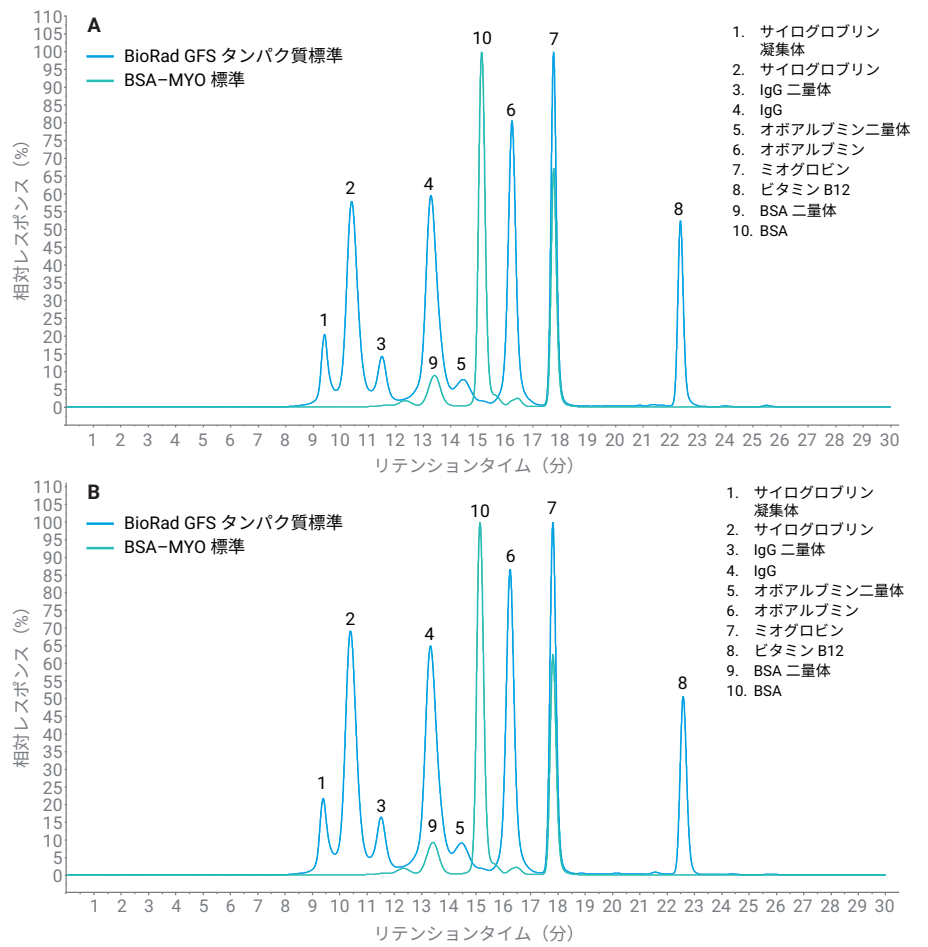


図 3. 300 回注入シーケンス時の BSA-MYO 分解能

図 4A と 4B は、シーケンスの開始時と終了時に得られたクロマトグラムを示しており、分析が堅牢であることが実証されています。

また、この結果は 1 本目の AdvanceBio SEC カラムと同等であり、ロット間の一貫性が優れたものであることを示しています。



**図 4.** 長時間にわたる 300 回注入シーケンスの開始時 (A) および終了時 (B) における、BioRad GFS タンパク質標準 (ピーク 1 ~ 8) および BSA-MYO システム適合性標準 (ピーク 9 と 10) の Agilent AdvanceBio SEC カラムによるクロマトグラムの重ね表示

図 5A と 5B はアスパラギナーゼのクロマトグラムを示しており、プロファイルは予想されたとおりのものであります。メインピーク 2 は、ASNase 酵素の四量体に対応しています。ピーク 4 は単量体、ピーク 1 は凝集体物質であると予想される一方、ピーク 3 は不明な物質であり、二量体の可能性があります。

これらの予想を確認するために、このデータを、以前にタンパク質標準から得られた検量線にプロットしました (図 6)。

予想に反して、試験した標準中に含まれる他の球状タンパク質と比較して、アスパラギナーゼのピークは予想よりも遅く溶出しています (つまり、この分子は、流体力学半径が小さい挙動を示しています)。そのため、光散乱検出器と UV 検出器を使用して、詳細な分析を実施することにしました。

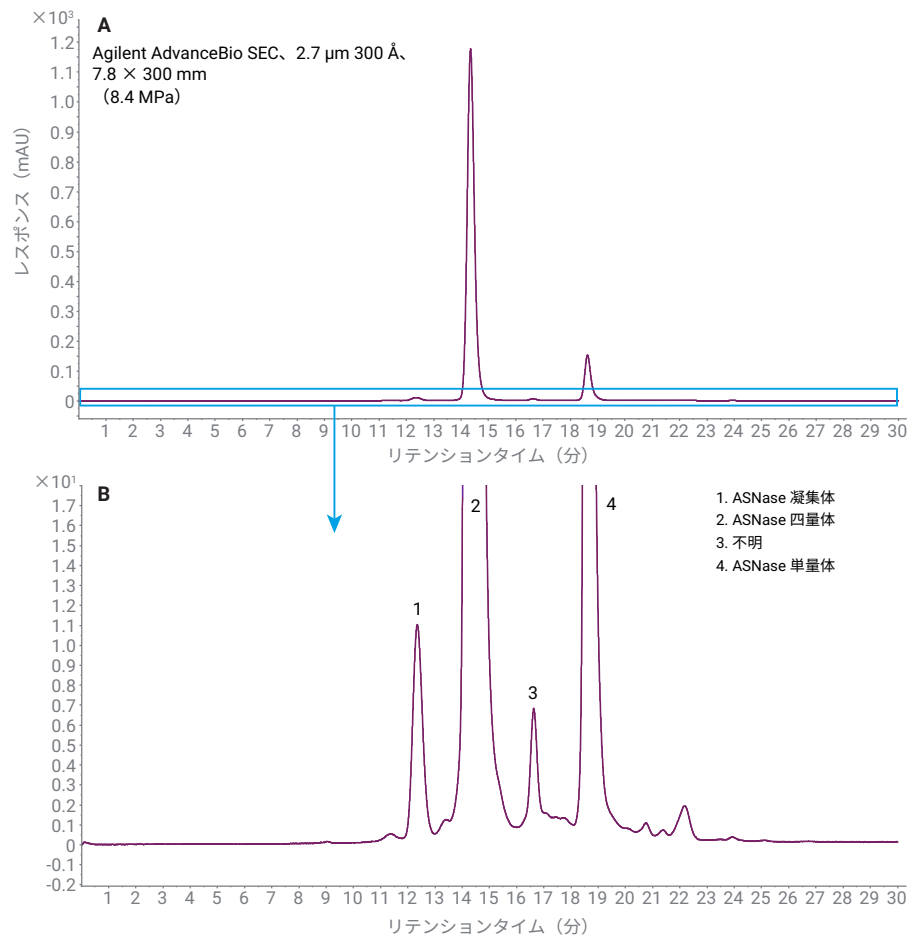


図 5. (A) Agilent AdvanceBio SEC カラムを使用したアスパラギナーゼのクロマトグラム。(B) 領域を拡大した図

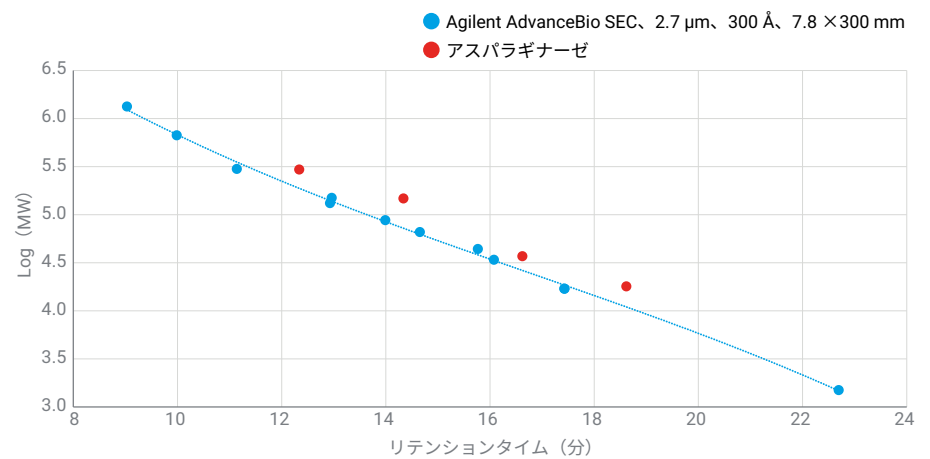


図 6. タンパク質標準に基づいて作成した検量線 (図 2 と同じ) とアスパラギナーゼのデータポイントの重ね表示

図 7 は、光散乱分析の結果を AdvanceBio SEC カラムと ProSEC 300S カラムで比較したものです。

AdvanceBio SEC カラムからのレスポンスにより、光散乱検出器シグナルと UV 検出器シグナルを同時に使用した分子量分析を実施できるようになりました。残念ながら、ProSEC 300S の光散乱シグナルはノイズが多すぎて、比較分析が実施できませんでした。

GPC/SEC ソフトウェアにより、メインピークの分子量が 139 kDa であると同定しました。これは、特定の屈折率増分 ( $dn/dc$ ) 値 0.186 と理論上の UV 吸光係数 ( $\epsilon^{0.1\%}$  280 nm) 0.64 を用いて計算しました。この分子量は、4 つの 37 kDa サブユニットを含む分子に対して予想される値と十分に一致しています。

## 結論

このアプリケーションノートでは、生物製剤酵素である L-アスパラギナーゼの凝集体分析において、Agilent ProSEC 300S カラムの代替となる効果的な改良型カラムとして、AdvanceBio SEC カラムが適合していることを実証しました。

粒子サイズを小さくして、ポア容積を大きくすることにより、カラム使用圧力をわずかに上昇させるだけで、分解能が大幅に向上しています。さらに、長時間にわたり使用する場合（6 日間で 300 回注入）でも優れた一貫性のある性能を示すこと、また光散乱検出により性能が向上することが実証されました。

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE50599102

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, July 28, 2023

5994-6587JAJP

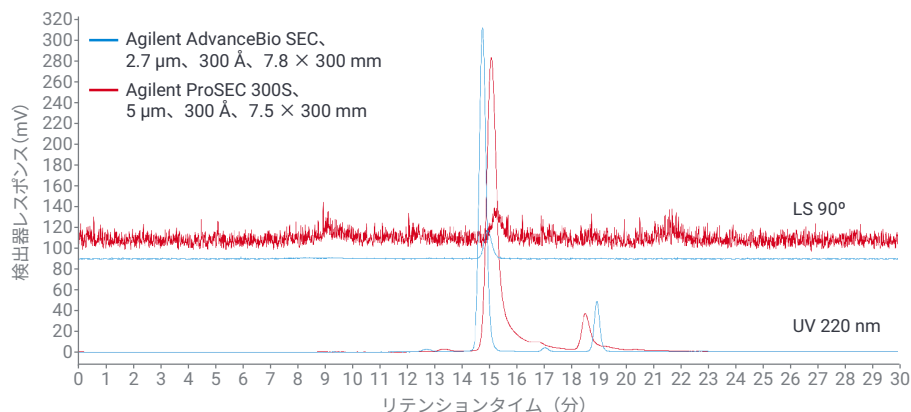


図 7. Agilent AdvanceBio SEC カラムを使用したアスパラギナーゼの光散乱 (LS) 検出器による分析結果

## 参考文献

1. Kidd, J. G. Regression of Transplanted Lymphomas Induced *In Vivo* by Means of Normal Guinea Pig Serum: I. Course of Transplanted Cancers of Various Kinds in Mice and Rats Given Guinea Pig Serum, Horse Serum, or Rabbit Serum. *J. Exp. Med.* **1953**, 98(6), 565–582.
2. Broome, J. D. Evidence That the L-asparaginase of Guinea Pig Serum Is Responsible for Its Antilymphoma Effects. I. Properties of the L-Asparaginase of Guinea Pig Serum in Relation to Those of the Antilymphoma Substance. *J. Exp. Med.* **1963**, 118(1), 99–120.
3. Gervais, D. *et al.* Robust Quantitation of Basic-Protein Higher-Order Aggregates Using Size-Exclusion Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, 139, 215–220.