

SEPARATION REPORT

TSKgel Ether-5PW によるたんぱく質の疎水クロマトグラフィー — TSKgel Phenyl-5PW との比較 —

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. TSKgel Ether-5PW と TSKgel Phenyl-5PW の比較	1
2 - 1. 基本構造および溶離条件	1
2 - 2. 標準たんぱく質の分離	2
2 - 3. 応用例	3
3. おわりに	6

1. はじめに

最近、高性能疎水クロマトグラフィーによるたんぱく質の分離が盛んに行われるようになってきています。中でも TSKgel Phenyl-5PW は親水性樹脂を基材とした充填剤で、多くのたんぱく質に対して優れた分離能を示します。

一方、シリカゲルにオリゴエチレングリコールを化学的に結合させた親水性充填剤も疎水クロマトグラフィー用充填剤としてたんぱく質の分離に有効であることが知られています。しかしながら、基材のシリカゲルは化学的に不安定であるために高い pH 領域で使用できないという欠点がありました。

この欠点を改良するため、親水性樹脂 TSKgel G5000PW にオリゴエチレングリコールを結合させた高性能疎水クロマトグラフィー用充填剤 TSKgel Ether-5PW を開発しました。ここでは TSKgel Ether-5PW を用いたたんぱく質の分離を TSKgel Phenyl-5PW と比較しながら紹介します。

2. TSKgel Ether-5PW と TSKgel Phenyl-5PW の比較

2-1. 基本構造および溶離条件

TSKgel Ether-5PW 及び TSKgel Phenyl-5PW の基本構造を図 1 に示します。標準的な溶離条件は共に 1 ないし 2 mol/L の硫酸アンモニウムなどの高濃度から低濃度への塩濃度グラジエントです。詳しい条件については TSKgel Phenyl-5PW についてのセパレーションレポート (No.31 及び No.32) がありますのでご参照ください。

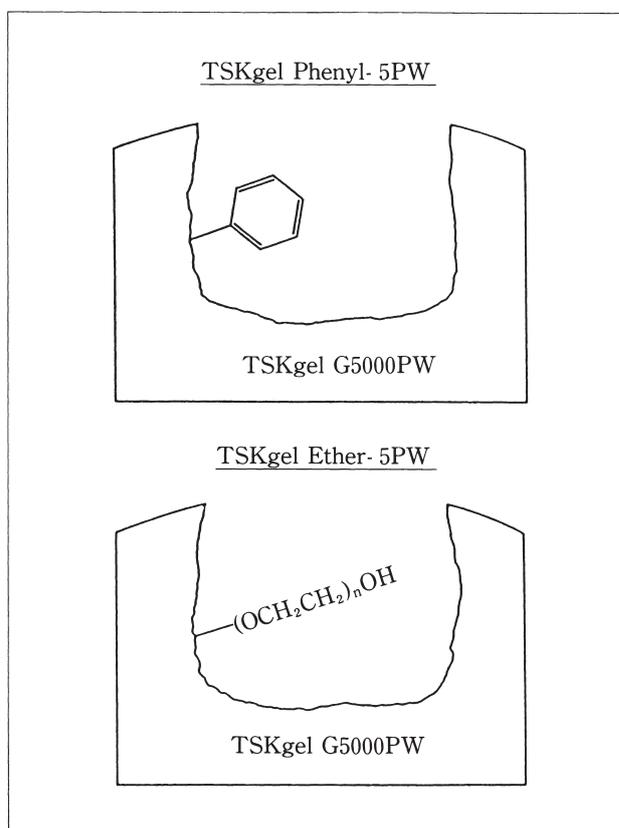


図 1 TSKgel Phenyl-5PW と TSKgel Ether-5PW の基本構造

2-2. 標準たんぱく質の分離

同一の溶離条件下での標準たんぱく質混合物の分離例を図2に示します。すべてのたんぱく質はTSKgel Phenyl-5PWよりもTSKgel Ether-5PWを用いたの方が早く溶出します。従ってTSKgel Ether-5PWを用いた場合、たんぱく質の溶出位置をTSKgel Phenyl-5PWの溶出位置と同じにするためには、より高い塩濃度が必要です。

たんぱく質の分離能の比較を表1に示します。溶出するたんぱく質のピーク幅に差は見られませんが、TSKgel Phenyl-5PWではより広い溶出量範囲にたんぱく質が溶出されるので、分離能は一般的にはTSKgel Ether-5PWよりもTSKgel Phenyl-5PWの方が高くなります。一方TSKgel Ether-5PWの方が高い分離能を示す場合もあります。次項に具体的な応用例を紹介します。

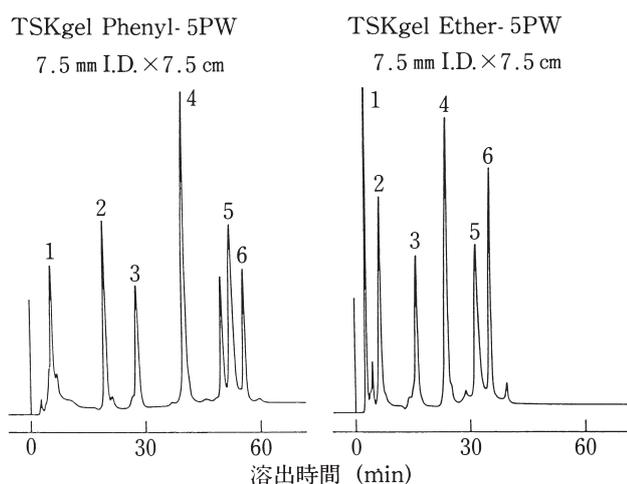


図2 標準たんぱく質の分離

溶離液：A 0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) +
2 mol/L 硫酸アンモニウム
B 0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0)
A→B リニアグラジエント (60分)

流速：1 mL/min

温度：25℃

検出：UV (280 nm)

1. チトクロムC
2. ミオグロビン
3. リボヌクレアーゼ
4. リゾチーム
5. α -キモトリプシン
6. α -キモトリプシノーゲン

表1 分離能の比較

たんぱく質	分離能	
	TSKgel Phenyl-5PW	TSKgel Ether-5PW
ミオグロビン/ リボヌクレアーゼ	5.8	7.7
リボヌクレアーゼ /リゾチーム	8.6	6.2
リゾチーム/ α -キモトリプシン	7.5	4.6
α -キモトリプシン/ α -キモトリプシノーゲン	2.0	2.4
平均値	6.0	5.2

2-3. 応用例

ウシ血清アルブミン及び β -ラクトグロブリンは、TSKgel Phenyl-5PW ではブロードなピークとなり溶出します。また α -ラクトアルブミンや α -アミラーゼはカラムから溶出しないあるいは、低回収率となります。これらのたんぱく質を TSKgel Ether-5PW を用いて分離した結果を図3から図6に示します。ウシ血清アルブミン及び β -ラクトグロブリンはシャープなピークとして溶出が確認できました。 α -ラクトアルブミンはカラムから溶出され、しかもシャープなピークで、また、 α -アミラーゼもよりシャープなピークとして溶出されるとともに、高い酵素活性回収率を示しました。これらの結果から、TSKgel Ether-5PW は TSKgel Phenyl-5PW に比べ、より親水性であるために、TSKgel Phenyl-5PW を用いた時起こるたんぱく質の部分変性が抑えられたものと考えられます。

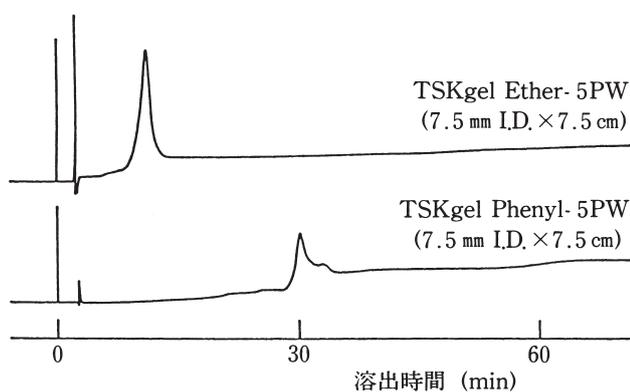


図3 牛血清アルブミンの分離

溶離液：A：0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) +
1.5 mol/L 硫酸アンモニウム

B：0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0)

A → B リニアグラジエント (60分)

他の溶離条件：図2に同じ

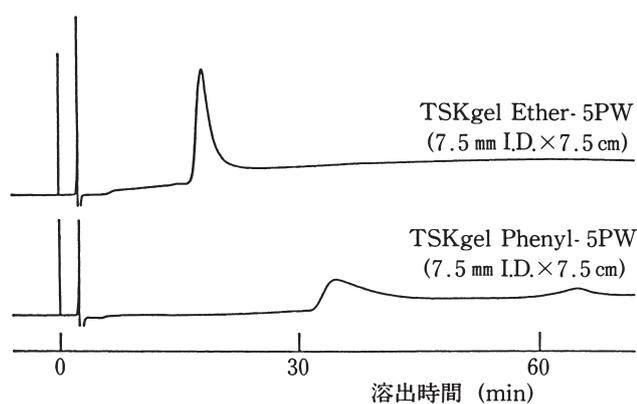


図4 β -ラクトグロブリンの分離

溶離条件：図2に同じ

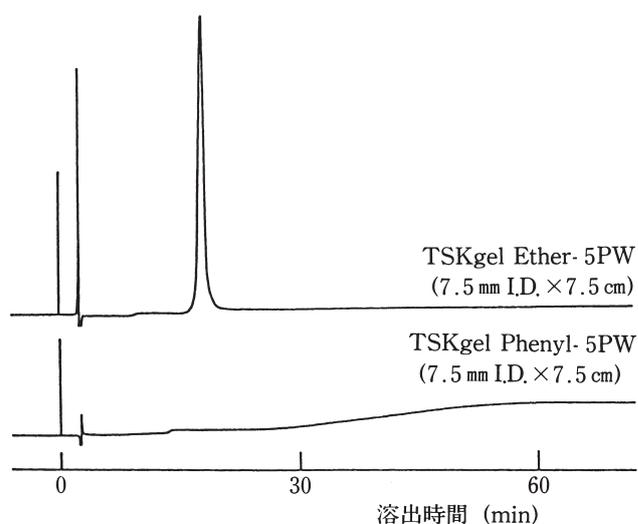


図5 α -ラクトアルブミンの分離

溶離条件：図3に同じ

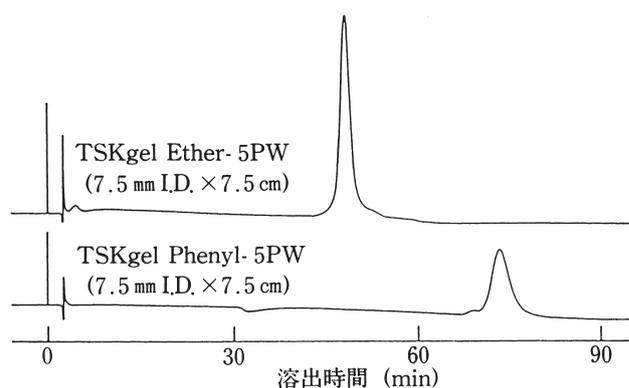


図6 α -アミラーゼの分離

溶離液：A：0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) +
1.1 mol/L 硫酸ナトリウム

B：0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0)

A → B リニアグラジエント (60分)

他の溶離条件：図2に同じ

酵素活性の回収率：TSKgel Phenyl-5PW 60%

TSKgel Ether-5PW 104%

図7に TSKgel Ether-5PW 及び TSKgel Phenyl-5PW を用いて得たヒト血清の分離クロマトグラムを示します。TSKgel Ether-5PW による分離では、18ないし20分に溶出される2つのピークがアルブミン、22分のピークがトランスフェリン、28ないし40分の広いピークが γ -グロブリンと、免疫的に同定されました。一方 TSKgel Phenyl-5PW の場合、アルブミンはテーリングして、他のたんぱく質とうまく分離されませんでした。

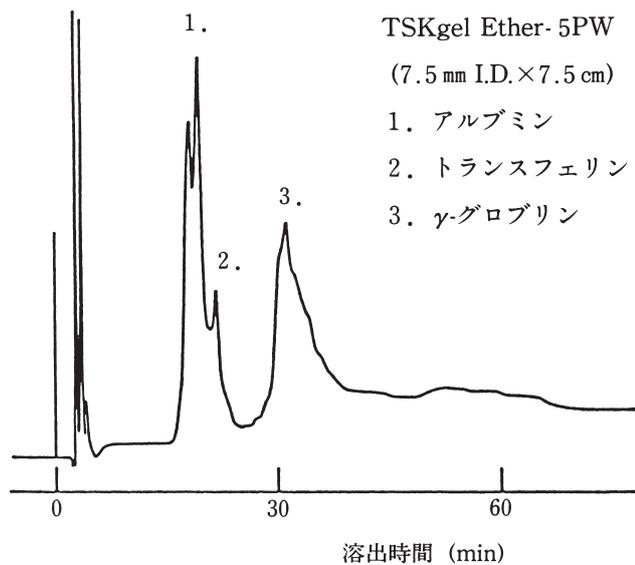
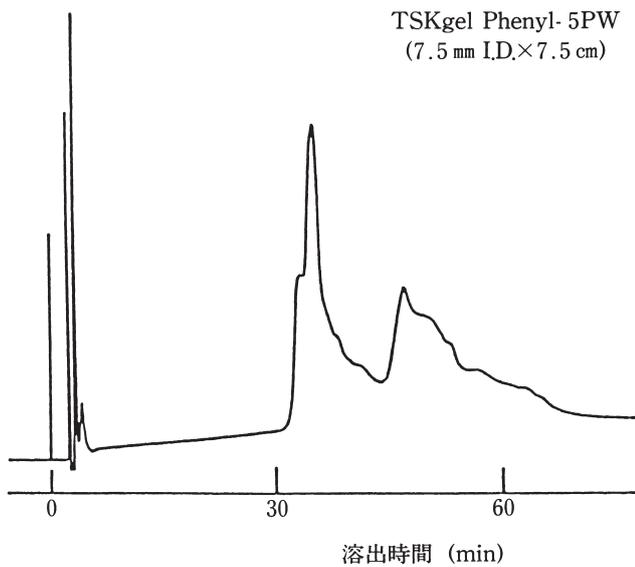


図7 ヒト血清の分離

溶離液：A：0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) +
1.7 mol/L 硫酸アンモニウム
B：0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0)
A → B リニアグラジエント (60分)

他の溶離条件：図2に同じ

さらに、TSKgel Ether-5PW 分取用カラムを用いてヒト血清からアルブミンの精製を試みました。図8に16 mLのヒト血清 (たんぱく質量約1.2 g) の分離を示します。ヒト血清は、試料負荷量が16 mLまでは同一な分離パターンが得られました。免疫拡散法によるアルブミンの回収率は92%でした。図9に純度検定の際の免疫電気泳動図を示します。アルブミンに相当する1本のバンドだけが見られ、TSKgel Ether-5PW による1段階の疎水クロマトグラフィーにより非常に純度の高いアルブミンが得られました。

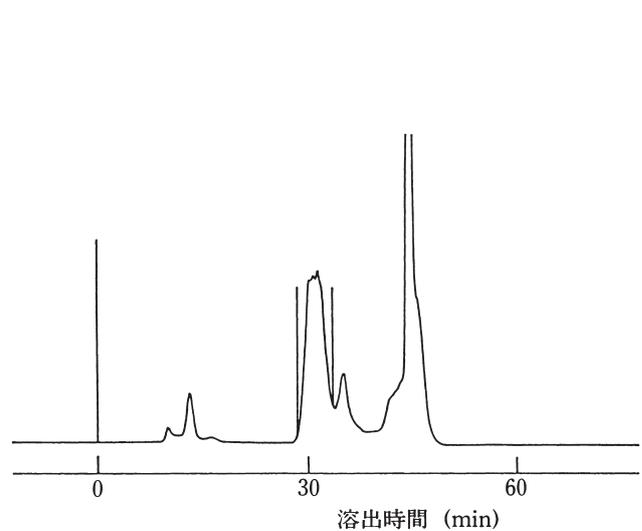


図8 ヒト血清アルブミンの精製

カラム：TSKgel Ether-5PW 55 mm I.D. × 20 cm

試料量：16 mL (1.2 g タンパク質)

溶離液：A：0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) +

1.7 mol/L 硫酸アンモニウム

B：0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) +

0.68 mol/L 硫酸アンモニウム

C：0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0)

リニアグラジエント (36分) ステップグラジエント

A → B → C

流速：40 mL/min

温度：25℃

検出：UV (280 nm)

アルブミンの回収率：92%

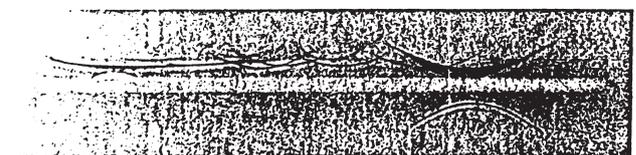


図9 アルブミンの免疫電気泳動図

図 10 に TSKgel Ether-5PW 分取用カラムを用いた粗抽出 α -アミラーゼの分離を示します。 α -アミラーゼは、試料負荷量が 1.5 g まで分離能は低下しませんでした。酵素活性の回収率も 90 % と高く良好でした。

分離後の α -アミラーゼ画分の純度は 4 種の分離モードの HPLC で調べました (図 11)。クロマトグラム中の 1 つの大きなピークが α -アミラーゼに相当し、いずれのモードにより得たクロマトグラムからも純度の高い標品が得られていることがわかります。

以上ヒト血清及び粗抽出 α -アミラーゼの分離は、開始バッファーによる再生を含めて 1 時間以内に完了しますので、試料は 1 時間ごとにカラムに注入できます。繰り返し試料を注入すれば 1 日で非常に大量の試料 (約 30 g) を処理することができます。

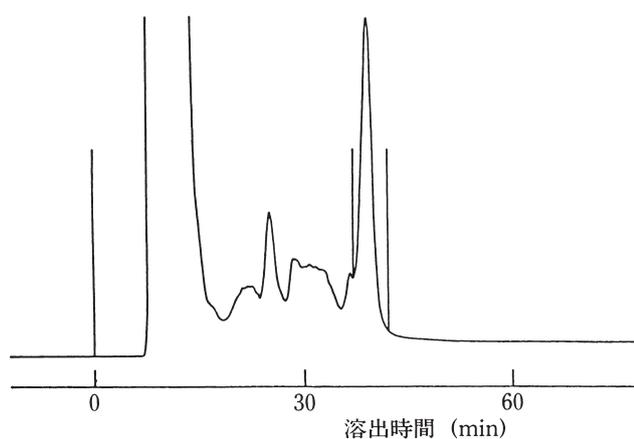


図 10 粗 α -アミラーゼの精製

カラム：TSKgel Ether-5PW

(55 mm I.D. \times 20 cm)

試料量：1.5 g

溶離液：A：0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) +
0.66 mol/L 硫酸ナトリウム

B：0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0)

A \rightarrow B リニアグラジエント (36分)

流 速：40 mL/min

温 度：25 $^{\circ}$ C

検 出：UV (280 nm)

酵素活性回収率：90 %

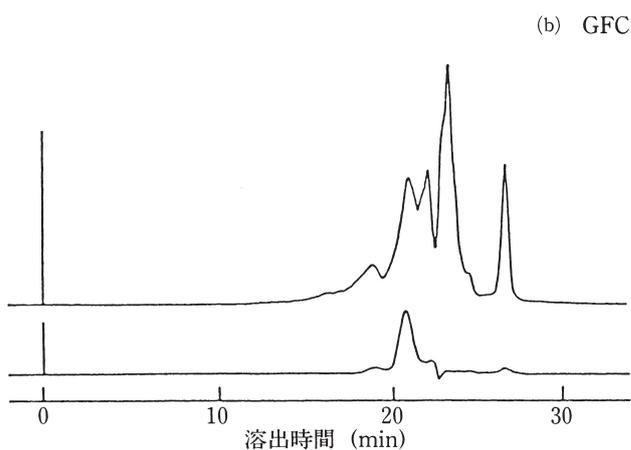
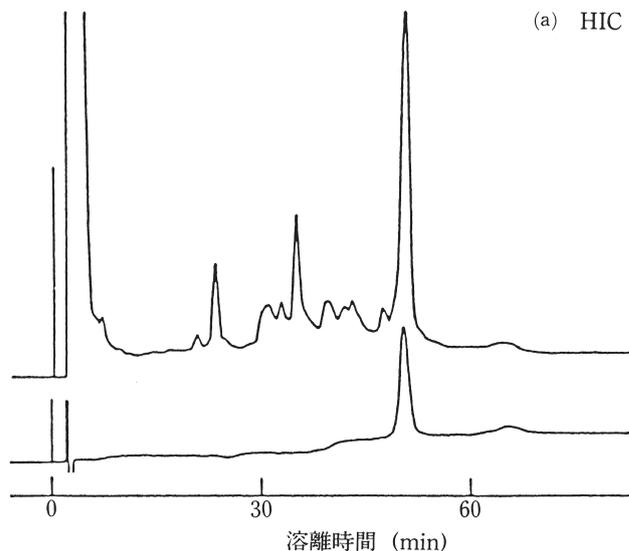


図 11 図 10 による精製 α -アミラーゼの純度測定

(a) HIC

カラム：TSKgel Ether-5PW (7.5 mm I.D. \times 7.5 cm)

溶離液：A：0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) +
1.1 mol/L 硫酸ナトリウム

B：0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0)

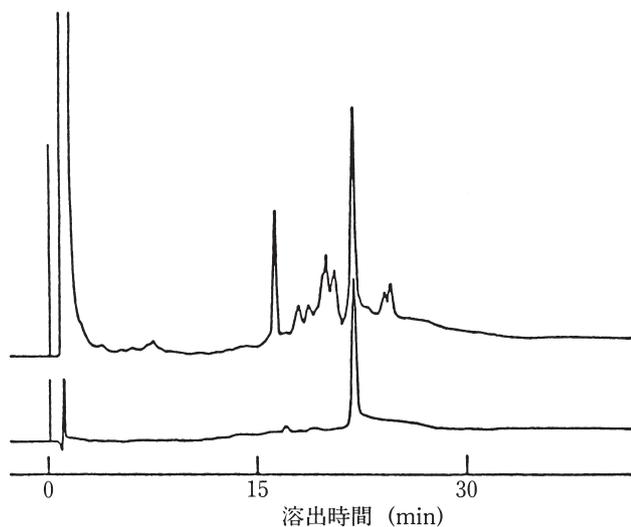
A \rightarrow B リニアグラジエント (60分)

(b) GFC

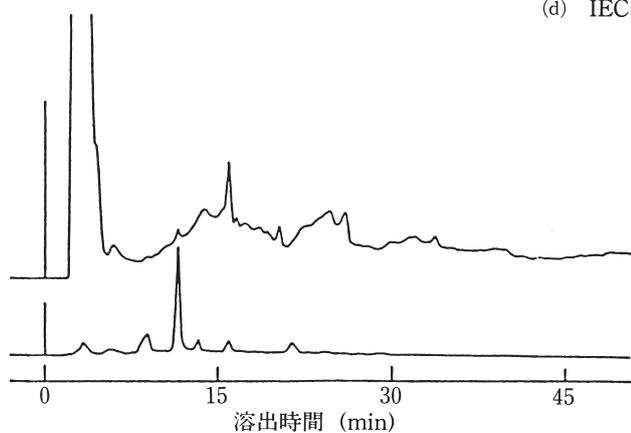
カラム：TSKgel G3000SW (7.5 mm I.D. \times 60 cm)

溶離液：0.05 mol/L リン酸塩緩衝液 +
0.2 mol/L NaCl (pH 7.0)

(c) RPC



(d) IEC



(c) RPC

カラム：TSKgel Phenyl-5PW RP (4.6 mm I.D. × 7.5 cm)

溶離液：A：5 % アセトニトリル in 0.05 % TFA

B：20 % アセトニトリル in 0.05 % TFA

C：80 % アセトニトリル in 0.05 % TFA

リニアグラジエント (2分) リニアグラジエント (48分)

A → B → C

(d) IEC

カラム：TSKgel DEAE-5PW (7.5 mm I.D. × 7.5 cm)

溶離液：A：0.02 mol/L トリス-HCl 緩衝液 (pH 8.0)

B：A + 0.5 mol/L NaCl

A → B リニアグラジエント (60分)

(a)(b)(c)(d) 共通

流速：1.0 mL/min

温度：25 °C

検出：UV (280 nm)

いずれも上段：粗抽出 α -アミラーゼ

下段：TSKgel Ether-5PW による分離能

3. おわりに

TSKgel Ether-5PW は、緩和な条件下、さまざまなたんぱく質を高い分離能と高い回収率で分離することができます。

標準的な溶離条件で TSKgel Phenyl-5PW による疎水クロマトグラフィーを用いた時、部分的に変性を起こすような不安定なたんぱく質に、TSKgel Ether-5PW は特に有用です。 α -アミラーゼのようなかなり疎水性の高いたんぱく質の分離にも有用です。一方で TSKgel Ether-5PW 及び TSKgel Phenyl-5PW の両方で良く分離できるたんぱく質に関しては、TSKgel Ether-5PW は TSKgel Phenyl-5PW に比べ少し分離能が低くなります。さらに TSKgel Ether-5PW は TSKgel Phenyl-5PW に比較して疎水性が低いいため、たんぱく質の吸着にはより高い塩濃度が必要となります。

参考文献

Y. Kato, T. Kitamura and T. Hashimoto, J. Chromatogr., **360** (1986), 260

※ “TSKgel” は東ソー株式会社の登録商標です。



TOSOH

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 バイオエス	☎ (06) 6209-1948	〒541-0043	大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオエス	☎ (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

お問い合わせe-mail tskgel@tosoh.co.jp

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>