



TOSOH

SEPARATION REPORT

高性能疎水クロマトグラフィ用カラム TSKgel Phenyl-5PWとその応用

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. TSKgel Phenyl-5PWの基本的性質	1
1) リガンド量及び溶離条件	1
2) 化学的安定性	1
3) 蛋白質結合量	1
4) 溶出量の初期硫酸濃度依存性	2
5) 酵素の活性回収率	2
6) 試料負荷量	2
3. TSPgel Phenyl-5PWによる蛋白質の分離	3
4. おわりに	4

1. はじめに

疎水クロマトグラフィは、疎水性基を有する充填剤と蛋白質の疎水性部分との疎水的結合が個々の蛋白質によって異なることを利用して蛋白質を分離する方法である。この種の充填剤としては、アガロース誘導体に疎水性基を導入したもの、又、シリカゲルに疎水性基を化学結合したものが現在市販されている。特に、最近では後者の充填剤を用いて行なう逆相分配クロマトグラフィによる蛋白質の分離が盛んになり、HPLCとしての優れた特長を有している。しかしながら、溶離液に多量の有機溶媒が使用されるため蛋白質が変性しやすく、又、基材のシリカゲルが化学的に不安定なため、高いpH領域で使用出来ないという欠点がある。

一方、アガロース系充填剤では、基材の機械的強度が小さく高速、高圧下で使用出来ず高分離能が得られない欠点がある。

これらの欠点を改良するため、親水性樹脂を基材とした高性能疎水クロマトグラフィ用充填剤TSKgel Phenyl-5PWを開発した。ここでは、TSKgel Phenyl-5PWの基本的性質及び蛋白質分離への応用例を紹介する。

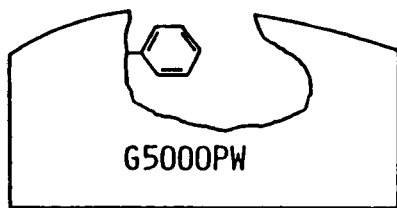
2. TSKgel Phenyl-5PWの基本的性質

2-1 リガンド量及び溶離条件

TSKgel Phenyl-5PWは、水系GFC用充填剤TSKgel G5000PWに約100 μ mol/ml -gelのフェニル基が導入されている。図-1にTSKgel Phenyl-5PWの模式構造と標準的な溶離条件を示す。

TSKgel Phenyl-5PW for Use in Hydrophobic Interaction Chromatography of Proteins

図-1



Typical Eluting Condition

Gradient elution of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration from 1 - 2 M to 0 in common buffer solution

2-2 化学的安定性

表-1に、TSKgel Phenyl-5PWの化学的安定性の検討結果を示す。TSKgel Phenyl-5PWは通常の酸、アルカリに対して優れた化学的安定性を有するため、広いpH範囲で問題なく使用することが出来る。又、カラムの洗浄にも酸、アルカリが使用出来るという利点がある。

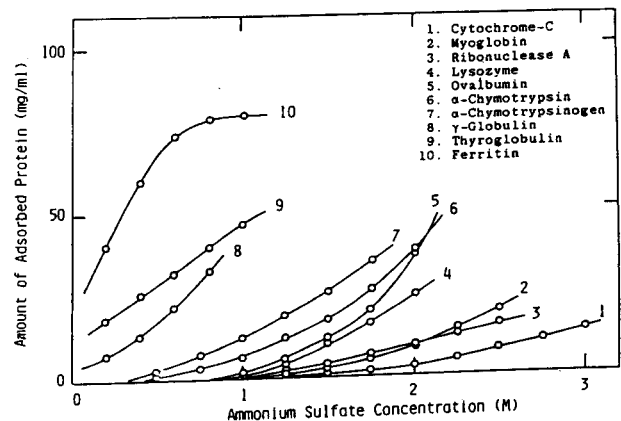
表-1

Change In Phenyl Group Content of TSKgel Phenyl-5PW during the Exposure in Alkaline or Acid Solution for 10 Days at 25°C.

Solution	Phenyl group content (mmol/ml)	
	Before exposure	After exposure
0.5 N NaOH	0.105	0.104
20 % CH_3COOH	0.105	0.106

2-3 蛋白質結合量

図-2は、TSKgel Phenyl-5PWに疎水的に結合する蛋白質結合量の塩濃度依存性の検討結果である。ほとんどの蛋白質が硫酸濃度の0~2Mの範囲で疎水的結合をはじめ、個々の蛋白質によって結合しはじめときの硫酸濃度が異なる。又、いずれの蛋白質も高塩濃度で結合量が増加し、塩濃度を下げると結合しなくなる。したがって、多くの水溶性蛋白質は、2Mの硫酸濃度でカラムに吸着され、塩濃度のグラジエント溶出を行なうことによってカラムから溶出される。

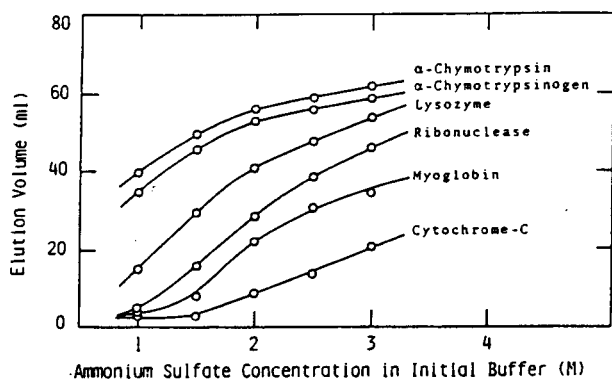


The amount of protein adsorbed on TSKgel Phenyl-5PW in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) containing various concentrations of ammonium sulfate.

図-2

2-4 溶出量の初期硫酸濃度依存性

図-3は、市販の標準蛋白質を用いて、溶離液の初期硫酸濃度を1.0—3.0Mまで変化させて、それぞれの濃度から0Mまでのグラジェント溶出を行なった時の、各蛋白質の溶出量の初期硫酸濃度依存性を検討した結果である。各蛋白質は異なる溶出量でカラムから溶出され、初期硫酸濃度が高くなるほど溶出量が大きくなる。



Dependence of elution volume on ammonium sulfate concentration in initial buffer in high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW.

Proteins were separated with 60 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration from 1 - 3 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 1 ml/min.

図-3

2-5 酵素の活性回収率

表-2は、酵素の活性回収率の検討結果である。TSKgel Phenyl-5 PWの標準的な溶離条件で分離を行なった結果であるが、すべての酵素について80%以上の活性回収率が得られている。このように、TSKgel Phenyl-5PWは、酵素を失活させることなく分離することが出来る。

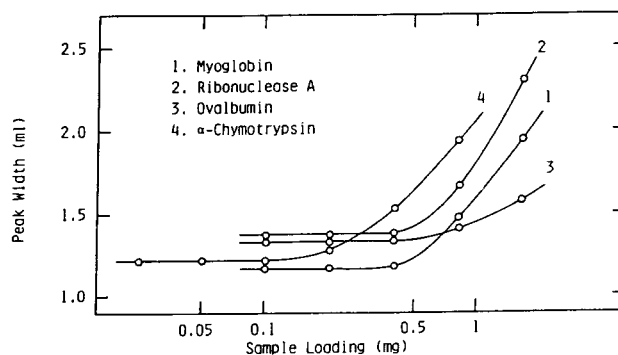
表-2

Recovery of Enzymatic Activity from TSKgel Phenyl-5PW

Enzyme	Recovery (%)
α -Chymotrypsin (0.4 mg)	92
Lipoxidase (1.0 mg)	89
Ferredoxin NADP reductase (3.0 mg)	100
β -Amylase (1.3 mg)	80
Lysozyme (0.2 mg)	90
Lysozyme (0.05 mg)	90

2-6 試料負荷量

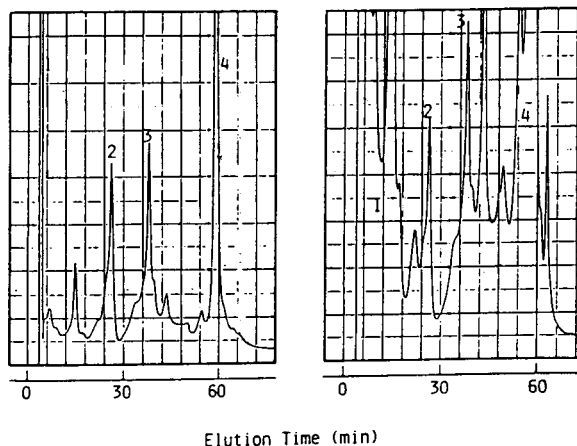
図-4、5は、TSKgel Phenyl-5PWの試料負荷量についての検討結果である。図-4は各試料について負荷量を0.025—1.6mgまで変化させた時のピーク幅 (ml) の試料負荷量依存性の結果を示す。一定のピーク幅を示す最大試料負荷量は試料によって異なり約0.1—0.5mgであった。図-5は、4成分の混合試料を用いて2成分(リボヌクレアーゼ、卵アルブミン)の負荷量を一定にして、他の2成分(ミオグロビン、 α -キモトリプシン)の負荷量を各0.1から0.8mgにふやして分離を行なった時のクロマトグラムである。リボヌクレアーゼと卵アルブミンの分離に対する他の2成分の試料負荷量の影響が小さいことがわかる。したがって、成分数の多い試料では最大試料負荷量は異ってくる。



Dependence of peak width on sample loading in high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW.

Proteins were separated with 60 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration from 1.5 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 0.5 ml/min.

図-4



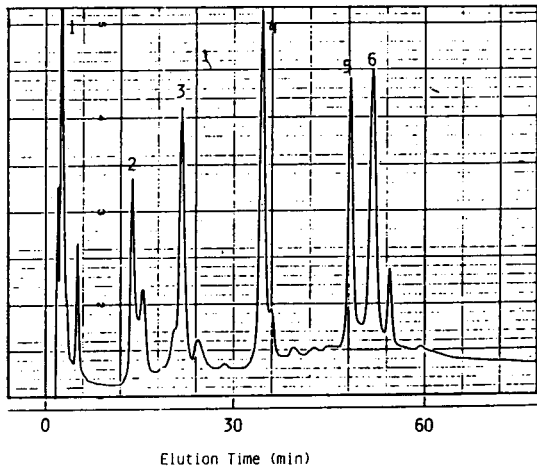
Separation of a protein mixture by high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW.

Column size: 75 x 7.5 mm I.D.
 Sample: 1. Myoglobin (0.1 or 0.8 mg), 2. Ribonuclease (0.2 mg),
 3. Ovalbumin (0.2 mg), 4. α -Chymotrypsin (0.1 or 0.8 mg)
 Elution: 60 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration from 1.5 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)
 Flow rate: 0.5 ml/min Temperature: 25°C Detection: UV absorbance at 280 nm

図-5

3. TSKgel Phenyl-5PWによる蛋白質の分離

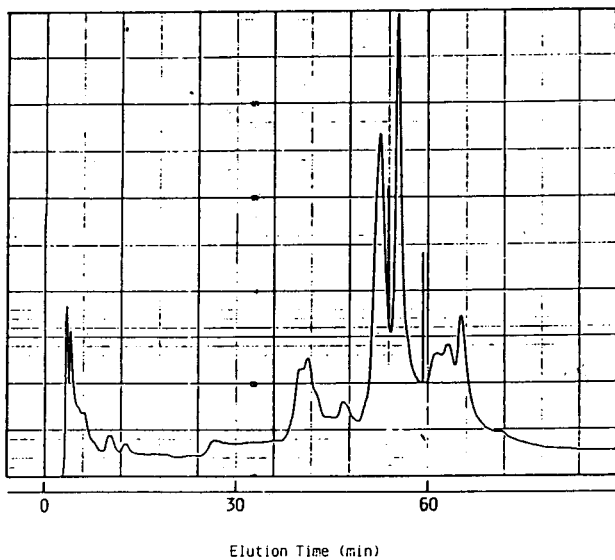
図-6~8に市販の標準蛋白質混合物、リポキシダーゼ、 β -アミラーゼの分離例を示す。図-9、10にホウレン草から抽出したフェレドキシンNADP還元酵素の分離例を示す。



Separation of a protein mixture by high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW

Column size: 75 x 7.5 mm I.D.
 Sample: 1. Cytochrome C, 2. Myoglobin, 3. Ribonuclease, 4. Lysozyme,
 5. α -Chymotrypsinogen, 6. α -Chymotrypsin
 Elution: 60 min linear gradient of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration
 from 1.7 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)
 Flow rate: 1 ml/min Temperature: 25°C
 Detection: UV absorbance at 280 nm

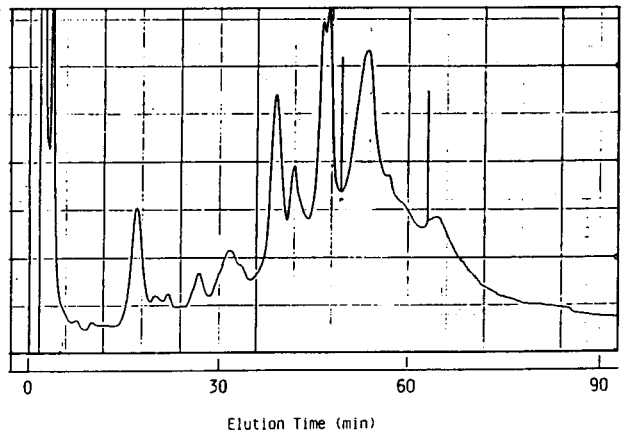
図-6



Separation of commercial lipoxidase by high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW.

Column size: 75 x 7.5 mm I.D. Sample loading: 1 mg in 0.1 ml
 Elution: 60 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration
 from 1.5 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)
 Flow rate: 0.5 ml/min Temperature: 25°C Detection: UV absorbance at 280 nm
 Recovery of enzymatic activity was 89 %.

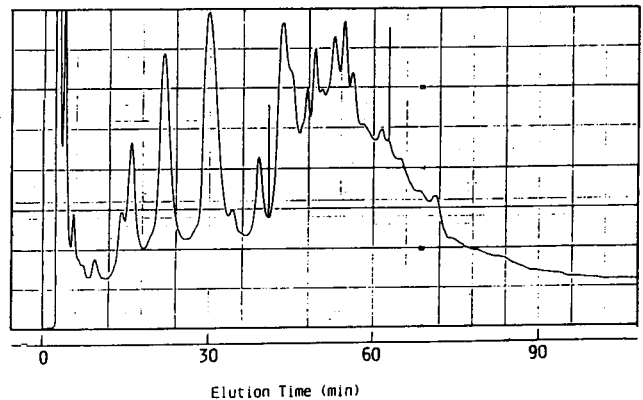
図-7



Separation of commercial α -amylase(barley) by high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW.

Column size: 75 x 7.5 mm I.D. Sample loading: 1.3 mg in 0.1 ml
 Elution: 60 min linear gradient from 0.1 M phosphate buffer containing 1.5 M
 ammonium sulfate(pH 7.0) to 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0) containing
 5 % 2-propanol
 Flow rate: 1 ml/min Temperature: 25°C Detection: UV absorbance at 230 nm
 Recovery of enzymatic activity was 80 %.

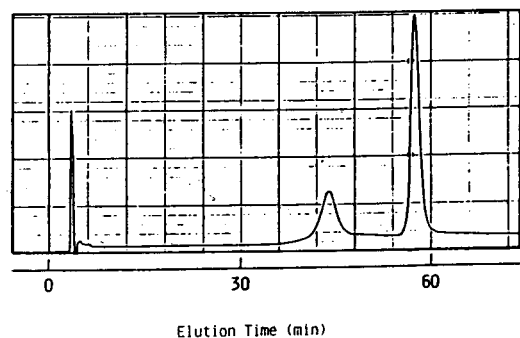
図-8



Separation of crude ferredoxin NADP reductase by high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW.

Column size: 75 x 7.5 mm I.D. Sample loading: 3 mg in 0.1 ml
 Elution: 60 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration from
 1.5 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)
 Flow rate: 0.5 ml/min Temperature: 25°C Detection: UV absorbance at 280 nm
 Recovery of enzymatic activity was 100 %.

図-9



Separation of purified ferredoxin NADP reductase by high-performance hydrophobic interaction chromatography on TSKgel Phenyl-5PW.

Column size: 75 x 7.5 mm I.D. Sample loading: 0.2 mg in 0.1 ml
 Elution: 60 min linear gradient of decreasing ammonium sulfate concentration
 from 1.5 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)
 Flow rate: 0.5 ml/min Temperature: 25°C Detection: UV absorbance at :

図-10

4. おわりに

以上紹介したように、TSKgel Phenyl-5PWによる疎水クロマトグラフィは、蛋白質を変性、失活させることなく短時間で高分離が得られる点に特長がある。又、優れた化学的安定性を有するため広いpH範囲で使用出来ることや、カラムの再生洗浄に酸、アルカリが使用出来るという利点がある。

ここでは、水溶性蛋白質の分離例を紹介したが、膜蛋白質分離への応用も期待される。