



TOSOH

# SEPARATION REPORT

## TSKgel Phenyl-5PW RPについて

### —— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 基本的性質	1
2-1 化学的安定性	1
2-2 ポアサイズ	2
2-3 タンパク質の溶出位置と分離能	3
2-4 タンパク質回収率	3
3. 溶離条件の影響	4
3-1 イオンペア試薬の種類	4
3-2 有機溶媒の種類	5
3-3 流速及びグラジエント時間	7
3-4 試料負荷量	8
4. タンパク質分離への応用	8
5. おわりに	10

## 1. はじめに

逆相クロマトグラフィによるタンパク質の分離は、数年前から盛んに検討されるようになり、最近ではほぼ確立されています。充填剤には、ポアサイズの大きいアルキル基化学結合型の多孔性シリカゲルが使用されており、短時間で高分離能が得られています。しかしながら、良い分離を得るためには、pHの低い酸性溶離液が多用されるため、化学的安定性の乏しいシリカゲルは、タンパク質の逆相クロマトグラフィにおいて大きな欠点を有しています。化学的に安定な多孔性ポリスチレン樹脂を使用したタンパク質の逆相クロマトグラフィも行われていますが、高分子量タンパク質に対して高分離能が得られず、特に回収率が低いという欠点があります。

TSKgel Phenyl-5PW RPは、これらの欠点を改良するために親水性樹脂ベースの高速ゲル涙過用充填剤 TSKgel G5000PWに相当量のフェニル基を導入した世界で最初の樹脂ベースのタンパク質分離用の逆相クロマトグラフィカラムです。ここでは、TSKgel Phenyl-5PW RPの基本的性質、溶離条件の影響、及びタンパク質分離への応用例について紹介します。

## 2. 基本的性質

### 2-1 化学的安定性

図1にTSKgel Phenyl-5PW RPの化学的安定性を検討した結果を示します。0.5N NaOH水溶液、及び20%CH<sub>3</sub>COOH水溶液を流速0.2ml/minで2週間カラムに通液した後のタンパク質の分離において、クロマトグラムにはほとんど変化が見られません。このように樹脂ベースのTSKgel Phenyl-5PW RPは優れた化学的安定性を有しています。

図2は、化学的安定性を利用したカラムのアルカリ洗浄の一例を示した図です。タンパク質の逆相クロマトグラフィでは、分離を行った後、ブランクグラジェントを行いますと未回収のタンパク質ピークがしばしば観察されます。このような場合、化学的安定性に欠けるシリカベースカラムでは、カラムの洗浄に、洗浄効果の大きいアルカリが使用出来ないために、ブランクグラジェントのくり返しによって“ゴーストピーク”を除去する方法がよく用いられていますが、時間がかかりすぎるという問題があります。TSKgel Phenyl-5PW RPでは、タンパク質の分離を行った直後にグラジェント最終溶離をカラム

に流したまま、0.05—0.2NのNaOHとアセトニトリルの混合液をサンプルループより数回注入することによって、短時間でカラムを洗浄することができます。図2では卵アルブミンのゴーストピークがきれいに洗浄されていることがわかります。

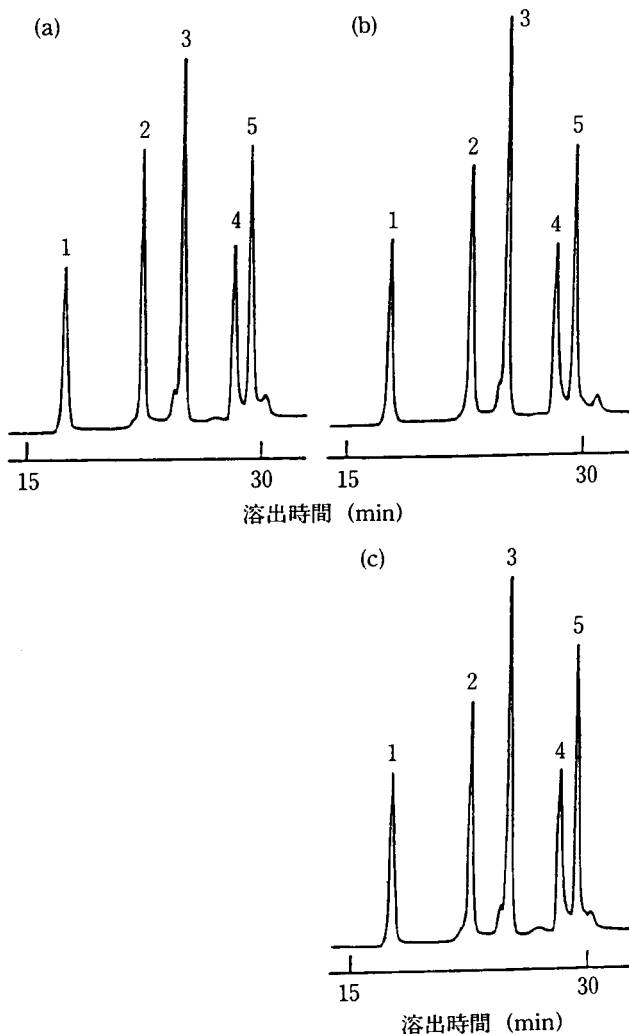


図1 化学的安定性

試料：1. リボヌクレアーゼ、 2. チドクロムC、  
3. リゾチーム、 4. 牛血清アルブミン、  
5. ミオグロビン 各10 $\mu$ g

溶離条件：溶離液； 5%アセトニトリル (含0.05% TFA)

60分 → 80%アセトニトリル  
リニアグラジェント (含TFA)

流速：1ml/min

検出：UV (220nm)

- a) 新カラムによるクロマトグラム
- b) 0.5N NaOHを0.2ml/minで2週間流した後のクロマトグラム
- c) 20%酢酸を0.2ml/minで2週間流した後のクロマトグラム

## 2-2 ポアサイズ

図3は、TSKgel Phenyl-5PW RPとシリカベースのタンパク質分離用充填剤、TSKgel TMS-250の走査型電子顕微鏡によるポアサイズの比較を示したものです。黒い部分がポアを表わしています。TSKgel Phenyl-5PW RPでは、市販品のシリカベース充填剤のポアサイズ(250-330Å)より明らかに大きい約1000Åのポアを有していることがわかります。従って、TSKgel Phenyl-5PW RPは高分子量タンパク質に対して十分なポアを有し、高分離能が得られます。

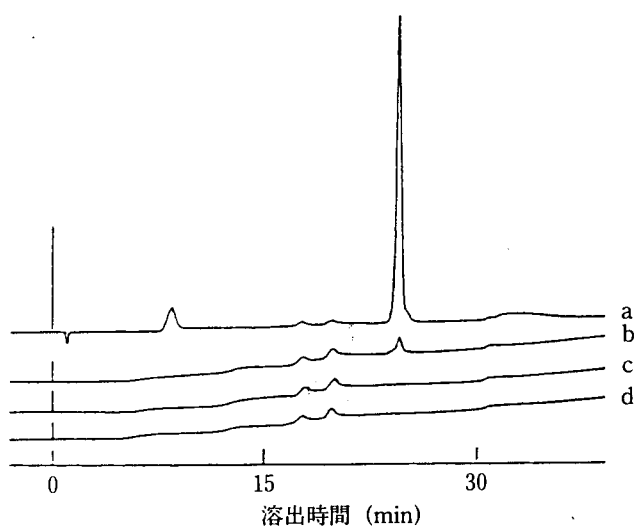


図2 アルカリ洗浄の例

試料：オブアルブミン (50 $\mu$ g)

溶離条件：溶離液；5%アセトニトリル (含0.05% TFA)

2分 → 20%アセトニトリル  
リニアグラジェント (含0.05%TFA)

32分 → 80%アセトニトリル  
リニアグラジェント (含0.05%TFA)

流速：1ml/min

検出：UV (220nm)

- a) 上記溶離条件におけるクロマトグラム
- b) 分離a)後の同様グラジェントのブランククロマトグラム
- c) 分離a)後 (0.2N NaOH/アセトニトリル=40/60)で洗浄後のクロマトグラム
- d) 分離a)前のグラジェントのベースライン

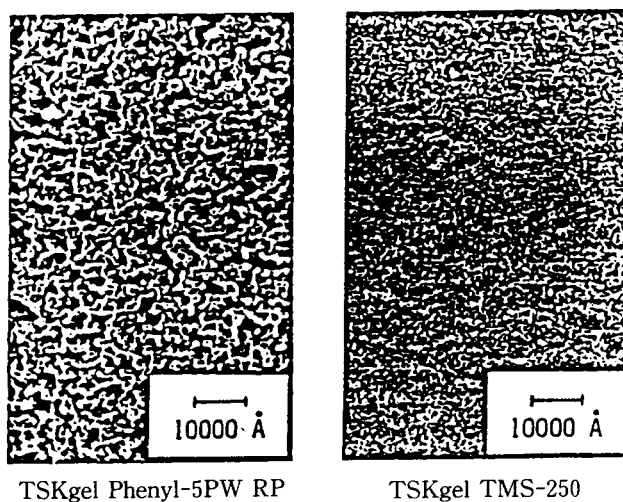


図3 走査型電子顕微鏡写真

### 2-3 タンパク質の溶出位置と分離能

表1に、各種市販品のタンパク質を、TSKgel Phenyl-5PW RPの標準的溶離条件で分離を行った時のタンパク質の溶出容量とピーク幅を同じ溶離条件で得られたシリカベースのTSKgel TMS-250の溶出容量とピーク幅と比較した結果を示します。溶出容量は、2つのカラムでほとんど同じ結果が得られていますがTSKgel Phenyl-5PW RPの方がわずかに早く溶出する傾向があります。これはTSKgel Phenyl-5PW RPがシリカベースのTSKgel TMS-250よりも充填剤の疎水度がわずかに小さいことを示唆しています。

ピークのシャープ性をピーク幅で比較して見ると、分子量4万以下のタンパク質に対しては、2つのカラムでほとんど同じ結果が得られています。しかし、分子量4万以上では、ポアサイズの大きいTSKgel Phenyl-5PW RPがピーク幅が小さくなり、シャープなピークが得られています。従って、TSKgel Phenyl-5PW RPは、高分子量タンパク質の分離に対しても問題なく使用することが出来、高分離能が得られます。

表1 溶出量とピーク幅

タンパク質	分子量	溶出容量 (ml)		ピーク幅 (ml)	
		TSKgel Phenyl-5PW RP	TSKgel TMS-250	TSKgel Phenyl-5PW RP	TSKgel TMS-250
チトクロムC	12,400	22.9	23.4	0.43	0.42
リボスクレアーゼ	13,700	18.1	19.1	0.50	0.43
リゾチーム	14,000	25.5	25.7	0.49	0.48
$\alpha$ -ラクトアルブミン	16,000	27.2	27.8	0.39	0.38
ミオグロビン	16,900	29.0	29.9	0.46	0.46
トリプシン	23,000	25.6	26.4	0.48	0.42
トリプシノーゲン	24,000	25.3	26.3	0.56	0.49
炭酸脱水酵素	30,000	29.9	30.9	0.51	0.55
オプアルブミン	43,000	34.6	35.1	0.54	0.63
牛血清アルブミン	67,000	28.0	27.8	0.48	0.66
コンアルブミン	70,000	28.2	28.0	0.48	0.86
トランスフェリン	80,000	27.1	27.0	0.37	0.52
フォスフォリラーゼB	94,000	35.6	35.1	0.71	0.98
アルドラーゼ	158,000	28.3	29.5	0.60	0.73

溶離条件：溶離液；5%アセトニトリル (含0.05%TFA)  $\xrightarrow[60分]{リニアグラジェント}$  80%アセトニトリル (含0.05%TFA)

流速：1 ml/min

検出：UV (220nm)

### 2-4 タンパク質回収率

表2に、TSKgel Phenyl-5PW RPカラムから回収されるタンパク質の回収率を検討した結果を示します。TSKgel Phenyl-5PW RPの標準的溶離条件で分離を行った時、トリプシノーゲン、卵アルブミン及びフォスフォリラーゼBを除いては、すべて80%以上の高い回収率が得られています。比較的回収率の低い試料に対して、グラジェント時間を60分から30分にして分離を行った結果、回収率が向上しました。又、グラジェント時間を60分のまま、TFA濃度0.05%から0.02%にして分離を行った場合も回収率の向上が見られました。このように、回収率の低い試料に対しては、溶離条件を適当に調節することによって回収率を改良することが可能です。しかし、これらの溶離条件の変化は、分離に対しても影響を与えるので分離の目的によって溶離条件を設定する必要があります。

表2 タンパク質の回収率

タンパク質	回収率 (%)		
	A	B	C
チトクロムC	82	86	89
リボヌクレアーゼ	94		
リゾチーム	87		
$\alpha$ -ラクトアルブミン	84		
ミオグロビン	84		
トリプシン	84		
トリプシノーゲン	78	84	90
炭酸脱水酵素	83	88	90
オプアルブミン	72	88	89
牛血清アルブミン	93		
コンアルブミン	93		
トランスフェリン	89		
フォスフォリラーゼB	78	98	89
アルドラーゼ	86		

溶離条件:

溶離液; A) 5%アセトニトリル(含0.05%TFA)

60分 → 80%アセトニトリル  
リニアグラジェント (含0.05%TFA)

B) 5%アセトニトリル(含0.05%TFA)

30分 → 80%アセトニトリル  
リニアグラジェント (含0.05%TFA)

C) 5%アセトニトリル(含0.02%TFA)

60分 → 80%アセトニトリル  
リニアグラジェント (含0.02%TFA)

流速: 1 ml/min

検出: UV (220nm)

### 3. 溶離条件の影響

#### 3-1 イオンペア試薬の種類

図4に、低分子量タンパク質の分離に対して、逆相クロマトグラフィで最も多く使用されているTFAの濃度の影響を検討した結果を示します。TFA濃度が高くなるとタンパク質の溶出位置は遅くなる傾向を示しますが、0.05%と0.1%の濃度では溶出パターンにはほとんど変化が見られません。一方、TFA濃度を低くすると0.02%でリゾチームは2つのブロードなピークで溶出されます。又、リゾチーム以外の他のタンパク質もわずかにピークが広がっています。

一般に、逆相クロマトグラフィでは、多量の有機溶媒と、低いpHによって、タンパク質が変性された状態で分離されます。リゾチームの場合、TFA濃度を下げることによって部分的な変性が生じ未変性ピーク(早く溶出しているピーク)と変性ピーク(遅く溶出しているピーク)の2つに分かれたと推測出来ます。

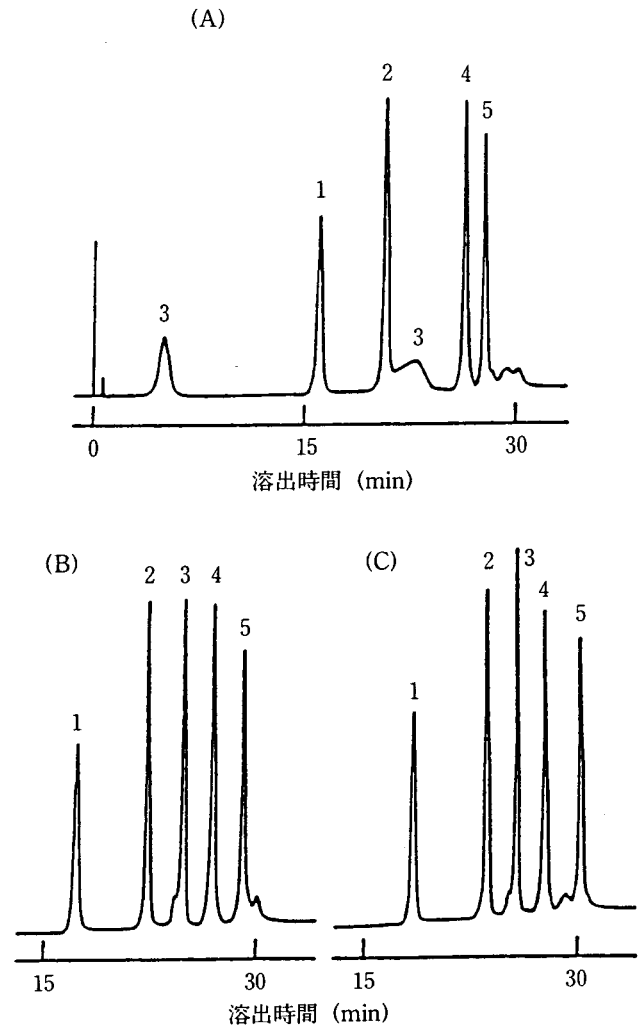


図4 低分子量タンパク質分離におけるTFA濃度の影響

試料: 1. リボヌクレアーゼ、 2. チトクロムC、  
3. リゾチーム、 4.  $\alpha$ -ラクトアルブミン、  
5. ミオグロビン (各10 $\mu$ g)

溶離条件: 溶離液; 5%アセトニトリル(含TFA)  
60分 → 80%アセトニトリル  
リニアグラジェント (含TFA)

A) 0.02%TFA B) 0.05%TFA

C) 0.1%TFA

流速: 1 ml/min

検出: UV (220nm)

図5は、同様に高分子量タンパク質に対してTFA濃度の影響を検討した結果を示します。この場合、TFA濃度は、溶出位置及びピーク幅よりもタンパク質回収率への影響が大きいことが観察されました。卵アルブミンのピークは、TFA濃度を高くすると非常に小さくなり極端に回収率が低下します。一方、TFA濃度を低くすると卵アルブミンの回収率は向上しますが、ピーク幅はわずかに広くなります。従って、この様な試料に対して良い結果を得るためには、TFA濃度を0.05%にするか、あるいは、グラジェント初期溶離液のTFA濃度を0.1%、最終溶離液のTFA濃度を0.02%にしたアセトニトリルとTFA濃度のグラジェント溶液が望ましいと思われる。

次に、他のイオンペア試薬についても同様な検討を行い、TFAと同様な濃度の影響が観察されました。

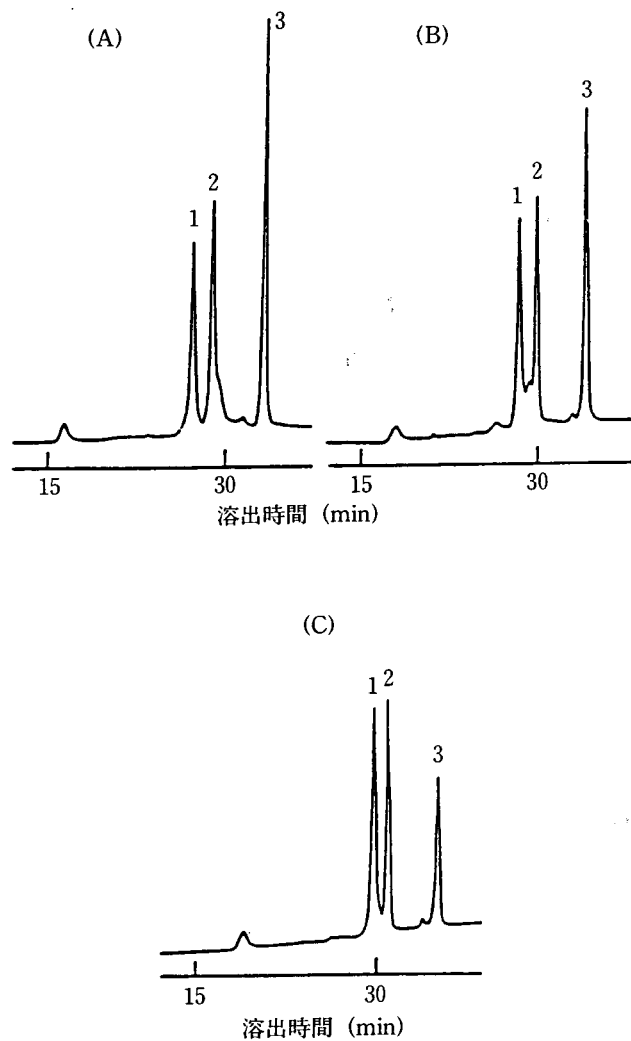


図5 高分子量タンパク質分離におけるTFA濃度の影響  
 試料：1. アルドラーゼ (30 $\mu$ g)、2. 炭酸脱水酵素 (5 $\mu$ g)、3. オブアルブミン (15 $\mu$ g)  
 溶離条件：図4に同じ

表3は、ここで用いた試料に対して各種イオンペア試薬最適濃度を示しました。リン酸を用いた場合、濃度50mM以上では、卵アンブミンの回収率が著しく低下し、150mM以下では、ミオブロビンのピークがブロードになりました。従って、リン酸の最適濃度を示すのは難しいですが、一般的には100mM前後が適当かと思われます。さらにリン酸とメタンスルホン酸では、タンパク質の溶出位置への濃度の影響は非常に小さく、又、メタンスルホン酸の場合、卵アルブミンの回収率及び低分子量タンパク質のピーク幅への濃度の影響は小さいことが観察されました。

表3 イオンペア試薬の最適濃度

イオンペア試薬	最適濃度
三フッ化酢酸 (TFA)	0.05%
五フッ化酢酸 (HFBA)	0.05%
過塩素酸	5mM
リン酸	100mM
メタンスルホン酸	0.05%

図6、7は、各種イオンペア試薬の最適濃度で低分子量及び高分子量タンパク質の分離を行った結果を示します。以上の検討結果から、タンパク質の逆相クロマトグラフィで、最も多く使用されるTFAは、TSKgel Phenyl-5PW RPについても、一般的なイオンペア試薬と言えます。しかしながら、親水性のイオンペア試薬であるリン酸、メタンスルホン酸は、それぞれ200mM、0.05%以下の濃度で用いた時リゾチームのピークに観察されるように、部分的な変性状態で分離されます。従って、未変性状態でのタンパク質の分離が要求される場合には、これらのイオンペア試薬は有効であろうと思われます。

### 3-2 有機溶媒の種類

図8、9に、有機溶媒の種類について検討した結果を示します。図8は、低分子量タンパク質の分離に、有機溶媒として、アセトニトリルとイソプロパノールを用いて検討した結果を示した図です。シリカベースカラムを用いた逆相クロマトグラフィでは、タンパク質の溶出力は、アセトニトリルよりもイソプロパノールの方が大きいことが観察されています。しかしながらTSKgel Phenyl-5PW RPではどちらの場合もタンパク質はほとんど同じ位置に溶出されました。これは樹脂ベースのTSKgel Phenyl-5PW RPと、シリカベースの充填剤との

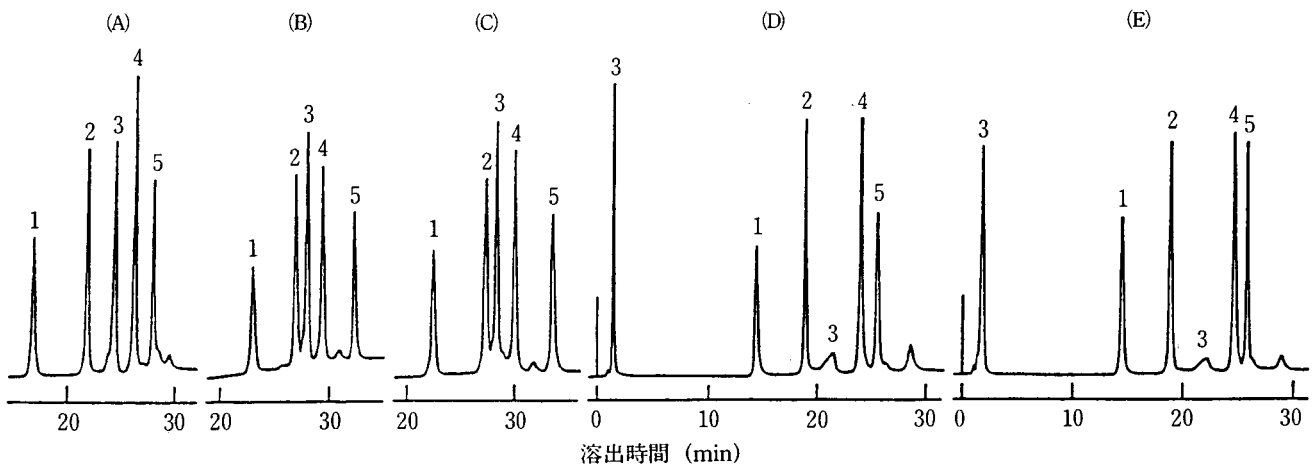


図6 イオンペア試薬最適濃度での低分子量タンパク質分離

試料：図4に同じ

溶離条件：溶離液；5%アセトニトリル(含イオンペア試薬)  $\xrightarrow{60分}$  リニアグラジェント  $\rightarrow$  80%アセトニトリル(含イオンペア試薬)

イオンペア試薬；A) 0.05%TFA、B) 0.05%HFBA、C) 5mM過塩素酸、D) 100mMリン酸、E) 0.05%メタンスルホン酸

流速：1 ml/min

検出：UV (220nm)

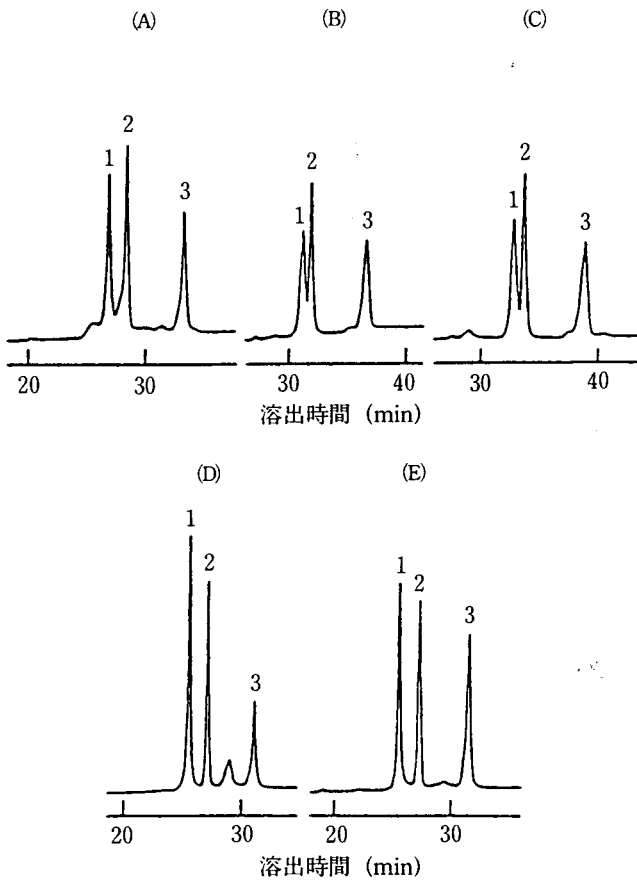


図7 イオンペア試薬最適温度での高分子量タンパク質分離

試料：図5に同じ

溶離条件：図6に同じ

流速：0.5 ml/min

検出：UV (220nm)

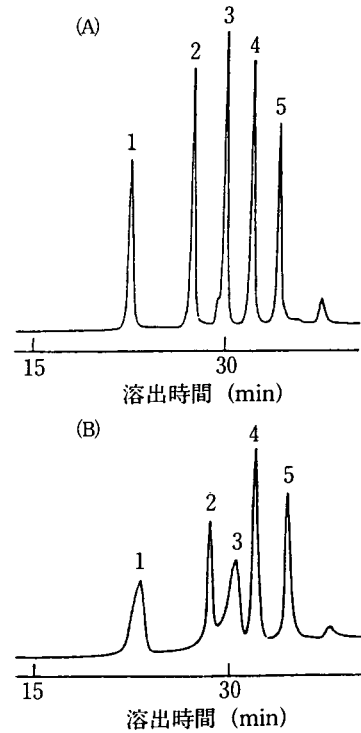


図8 有機溶媒の種類の影響 (1)

試料：図4に同じ

溶離条件：溶離液；A) 5%アセトニトリル (含0.05% TFA)

$\xrightarrow{60分}$  リニアグラジェント  $\rightarrow$  80%アセトニトリル (含0.05%TFA)

B) 5%イソプロパノール (含0.05% TFA)

$\xrightarrow{60分}$  リニアグラジェント  $\rightarrow$  80%イソプロパノール (含0.05%TFA)

化学的性質のわずかな違いによるものと思われます。一方、ピークのシャープ性については、イソプロパノールではブロードなピークが得られました。特に、リボヌクレアーゼ、リゾチームのピークに対して顕著でした。イソプロパノールはアセトニトリルよりもタンパク質の変性に対して温和であることが知られていますが、イソプロパノールを用いた時のピークの拡がりは、おそらくタンパク質の部分的な変性状態に起因していると思われます。

図9は、同様に低分子量タンパク質の分離に対するアセトニトリルとメタノールの分離への影響を検討した結果を示した図です。溶出位置は異なりますが、メタノールの場合イソプロパノールと同様にブロードなピークが得られました。従って、通常の逆相クロマトグラフィによるタンパク質の分離では、アセトニトリルが最も一般的な有機溶媒と思われます。

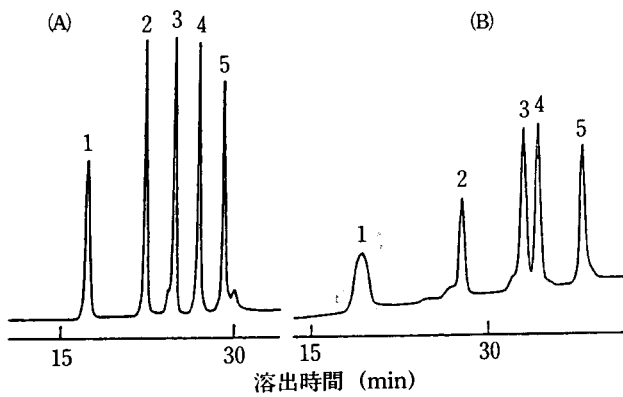


図9 有機溶媒の種類の影響 (2)

試料：図4に同じ

分離条件：溶離液；A) 5%アセトニトリル (含0.05% TFA)

60分 → 80%アセトニトリル  
リニアグラジェント (含0.05% TFA)

B) 5%メタノール (含0.05% TFA)

60分 → 80%メタノール  
リニアグラジェント (含0.05% TFA)

流速：1 ml/min

検出：UV (220nm)

### 3-3 流速及びグラジェント時間

図10は、分離能への流速の影響を検討した結果を示した図です。グラジェント時間が一定の場合、分離能は流速依存性を示し、流速が0.25-0.5 ml/minまでは、流速の影響が大きく流速が速いほど分離は良くなります。し

かし、0.5 ml/min以上では、ほとんど同じ分離を示し、流速の影響は非常に小さいことがわかります。従って、試料の希釈度を考慮すると最適流速範囲は0.5-1.0 ml/minと思われます。又、有機溶媒として、アセトニトリルの代わりにイソプロパノールを用いた場合も同様な結果が得られました。特に、イソプロパノールのような粘度の高い有機溶媒の使用が必要とされる場合には、流速は0.5 ml/minが適当と思われます。

図11に、分離能へのグラジェント時間の影響を検討し

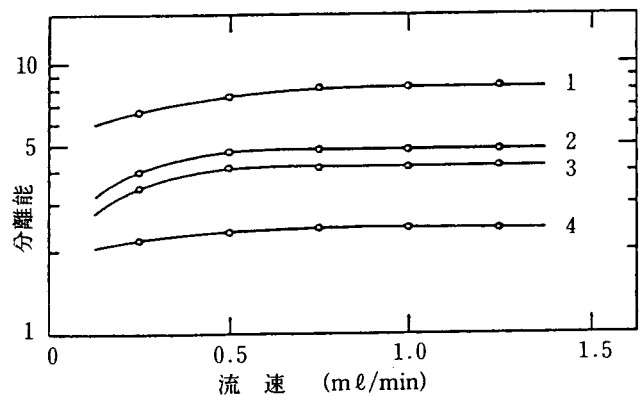


図10 流速の影響

試料：1. リボヌクレアーゼとチトクロムC

2. チトクロムCとリゾチーム

3. リゾチームと $\alpha$ -ラクトアルブミン

4. アルドラーゼと炭酸脱水酵素

分離条件：溶離液；図1に同じ

流速：0.25-1.25 ml/min

検出：UV (220nm)

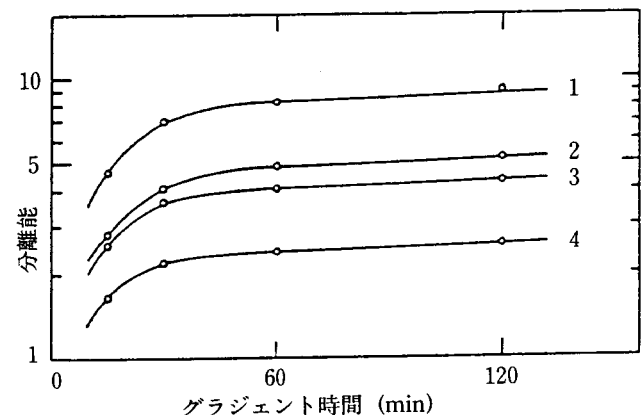


図11 グラジェント時間の影響

試料：図10と同じ

分離条件：溶離液；グラジェント時間を除いて図1に同じ

グラジェント時間：15-120分

流速：1 ml/min

検出：UV (220nm)



た結果を示します。流速が一定の場合、分離能はグラジエント時間依存性を示し、時間が長いほど高分離能が得られます。しかし、30分以上ではその依存性が小さくなっており、グラジエント時間が長くなれば分析時間もそれだけ長くなり、又、回収率が低下する傾向があることを考慮すれば、一般的には、グラジエント時間は30—60分が適当と言えます。

### 3-4 試料負荷量

図12、13に、タンパク質分離への試料負荷量の影響を検討した結果を示します。図12は、タンパク質のピーク幅の試料負荷量依存性を示した図ですが、一定のピーク幅が得られる時の最大試料負荷量は、試料によって異なりますが、ここで用いた試料では20—100 $\mu$ gでした。これは、非常に精製された単一成分の試料に対する最大試料負荷量を表わします。図13は、粗精製の試料を用いた場合の試料負荷量の検討結果ですが、クロマトグラムの比較から明らかなように、成分数の多いクルードな試料では、試料負荷量が1mgまでほとんど同じ分離が得られています。このように、最大試料負荷量は、試料中の成分数によって異なってきます。これらの結果は、ポアサイズの大きいシリカベースのカラムで得られる結果と良く一致しています。

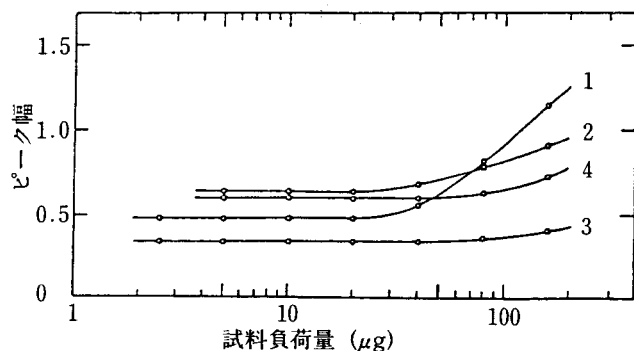


図12 試料負荷量の影響

試料：1. リゾチーム、 2. オブアルブミン、 3. トランスフェリン、 4. アルドラーゼ、  
 注入量 各20 $\mu$ g  
 濃度 0.0125—0.8%

溶離条件：図2に同じ

### 4. タンパク質分離への応用

図14は、粗精の人成長ホルモンの分離を示した図です。人成長ホルモンは、比較的疎水性の大きいタンパク質であることが知られていますが、良い分離と高い回収率が得られています。

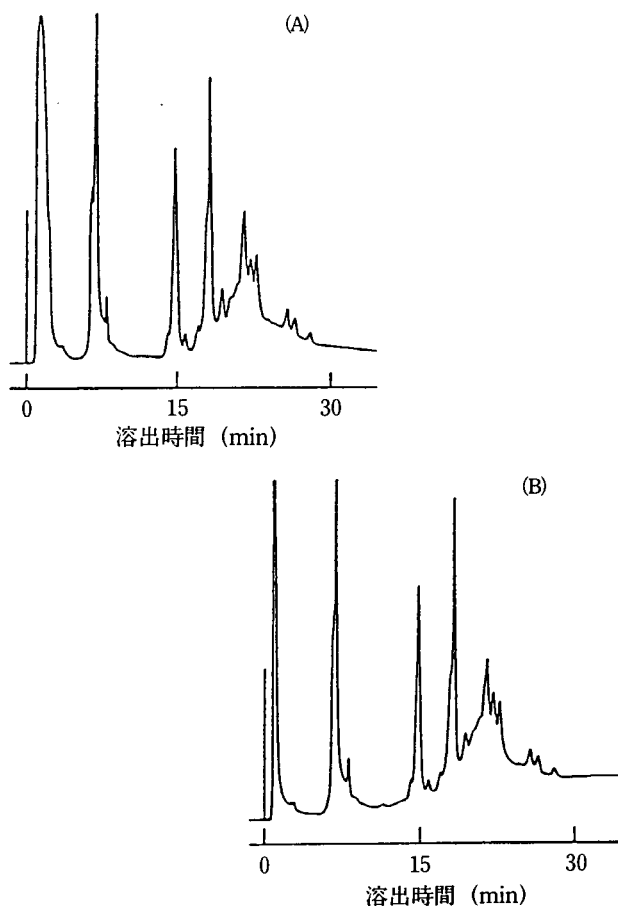


図13 粗精試料における試料負荷量の影響

試料：A) 1mg粗ウレアーゼ  
 B) 0.1mg粗ウレアーゼ

溶離条件：図2に同じ

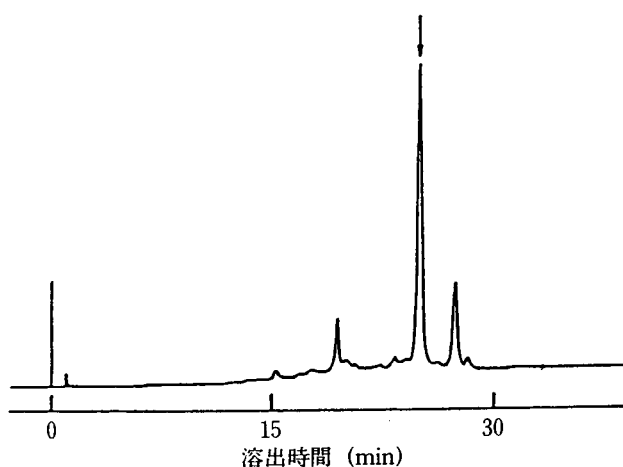


図14 粗人成長ホルモンの分離

試料：粗人成長ホルモン  
 溶離条件：図2に同じ

図15、16に、分子量約12万の粗精のLDHとホスホグルコースイソメラーゼの分離を示します。どちらも、シャープなピークで他の不純物から良く分離されています。

図17に、分子量約30万のコラーゲンの分離を行った時のTSKgel TMS-250とのクロマトグラムの比較を示します。TSKgel Phenyl-5PW RPの方が良い分離が得られています。このように、高分子量タンパク質の分離に対しては、市販品のシリカベースカラムよりもポアサイズの大きいTSKgel Phenyl-5PW RPが良い分離を与えます。

図18にはペプチドの分離例を示しました。比較的分子量の大きいペプチドの分離にもTSKgel Phenyl-5PW RPは使用することが出来ます。

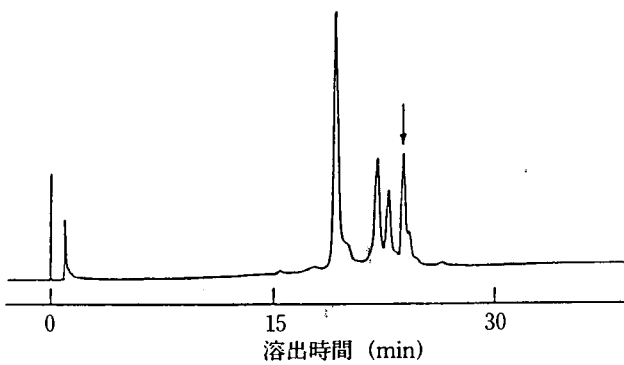


図15 粗乳酸脱水素酵素 (LDH) の分離

試料：粗乳酸脱水素酵素

分離条件：図2に同じ

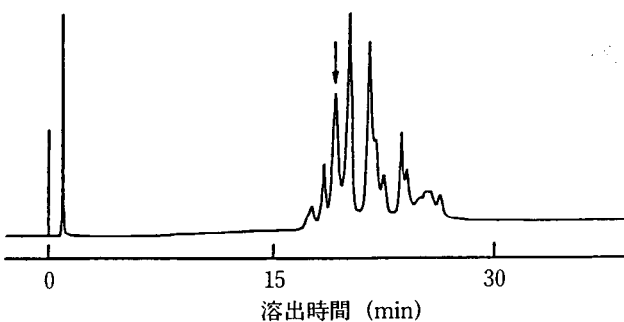


図16 粗フォスフォグルコースイソメラーゼの分離

試料：粗フォスフォグルコースイソメラーゼ

分離条件：図2に同じ

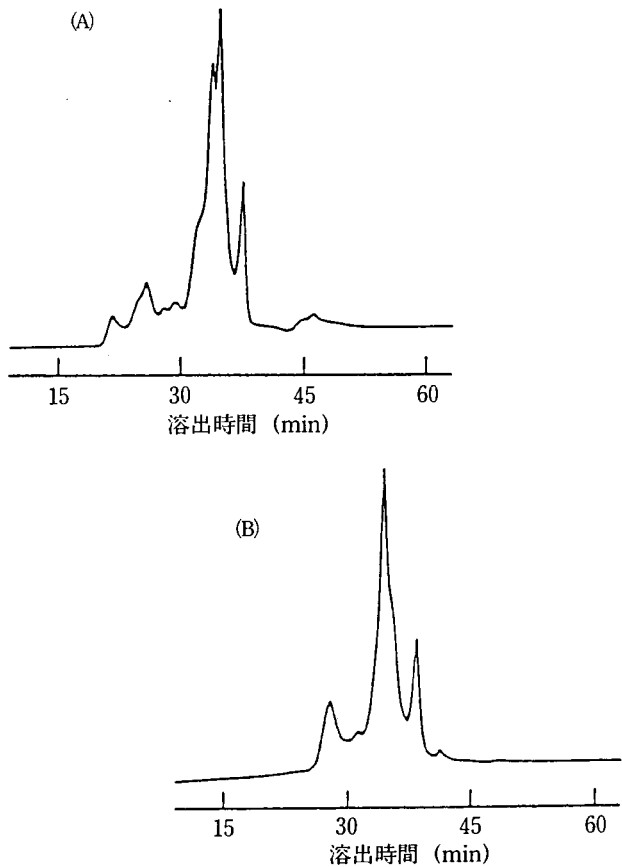


図17 コラーゲン (人胎盤由来タイプVI) の分離

試料：コラーゲン (人胎盤由来タイプVI)

カラム：A) TSKgel Phenyl-5PW RP

B) TSKgel TMS-250

分離条件：溶離液；5%アセトニトリル (含0.05%TFA)

120分 → 80%アセトニトリル  
リアグラジェント (含0.05%TFA)

流速：1 ml/min

検出：UV (220nm)

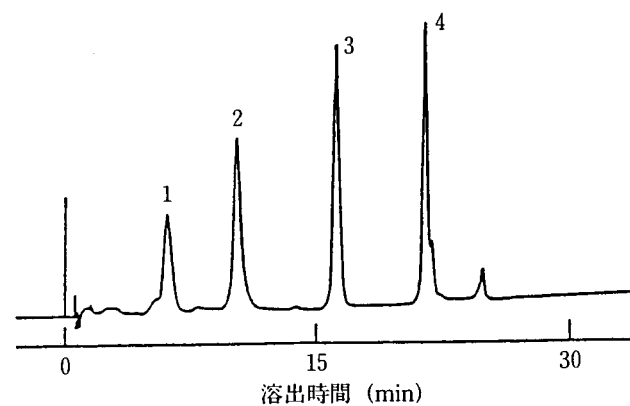


図18 ペプチドの分離

試料：1. アプロチニン (20 $\mu$ g)、2. 副腎皮質刺激ホルモン (10 $\mu$ g)、3. ソマトスタチン (10 $\mu$ g)、4. 牛インスリン (5 $\mu$ g)

分離条件：図1に同じ

## 5. おわりに

以上紹介しましたように、TSKgel Phenyl-5PW RPは、市販品のシリカベースの逆相クロマトグラフィカラムと非常に良く似たクロマト的性質を有しています。さらに、樹脂ベースのTSKgel Phenyl-5PW RPは、優れた化学的安定性と約1000Åのポアサイズを有しているために、カラムの洗浄に酸、アルカリが問題なく使用出来る上に、高分子タンパク質の分離に対して非常に有効です。

ここでは、一般的に使用されている酸性溶離液でのタンパク質の逆相クロマトグラフィについて検討した結果を紹介しましたが、今後は、塩基性溶離液を用いたタンパク質の分離が期待されます。