



SEPARATION REPORT

TSKgel Ether- 5 PWによるタンパク質の疎水クロマトグラフィ —— TSKgel Phenyl- 5 PWとの比較 ——

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. TSKgel Ether- 5 PWとTSKgel Phenyl- 5 PWの比較	1
2-1 基本構造および溶離条件	1
2-2 標準タンパク質の分離	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によるタンパク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-5 PW は親水性樹脂を基材とした充填剤で、多くのタンパク質に対して優れた分離能を示しています。

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用充填剤としてタンパク質の分離に有効であることが知られています。しかし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す。

この欠点を改良するため親水性樹脂 TSKgel G5000 PW 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用充填剤 TSKgel Ether-5 PW を開発しました。ここでは TSKgel Ether-5 PW を用いタンパク質の分離を TSKgel Phenyl-5 PW と比較しながら紹介します。

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

2-1 基本構造および溶離条件

TSKgel Ether-5 PW 及び TSKgel Phenyl-5 PW 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 M の硫酸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-5 PW 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。

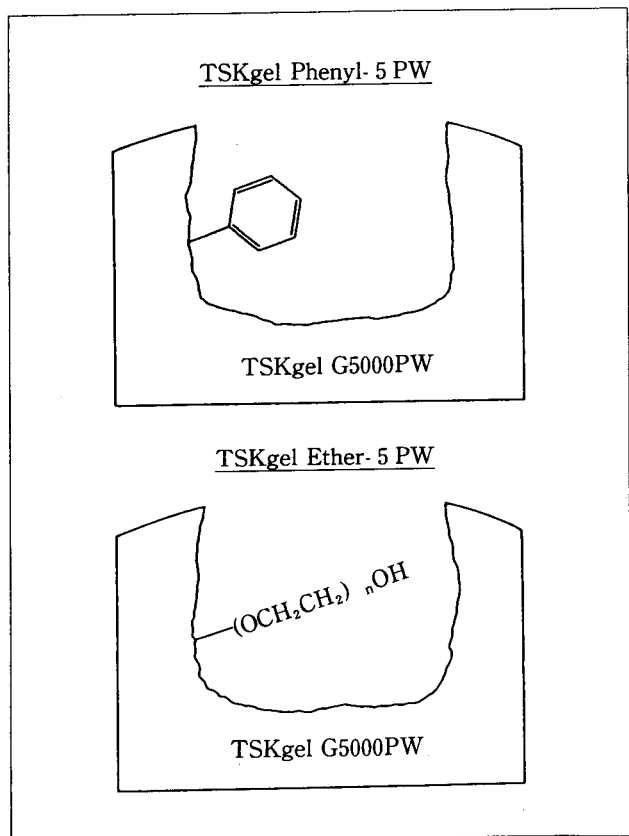


図 1 TSKgel Phenyl-5 PW と TSKgel Ether-5 PW の基本構造

2-2 標準タンパク質の分離

同一の溶離条件下での標準タンパク質混合物の分離例を図2に示します。すべてのタンパク質はTSKgel Phenyl-5PWよりもTSKgel Ether-5PWを用いた時の方が早く溶出されました。従ってTSKgel Ether-5PWを用いた場合、タンパク質の溶出位置を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。

タンパク質の分離能を表1に示します。溶出されるタンパク質のピーク幅はどちらのカラムでも同じですが、TSKgel Phenyl-5PWではより広い溶出量範囲にタンパク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の方が良くなります。しかし一方TSKgel Ether-5PWの方が分離能が良い場合もあります。次にその具体例について応用例で紹介いたします。

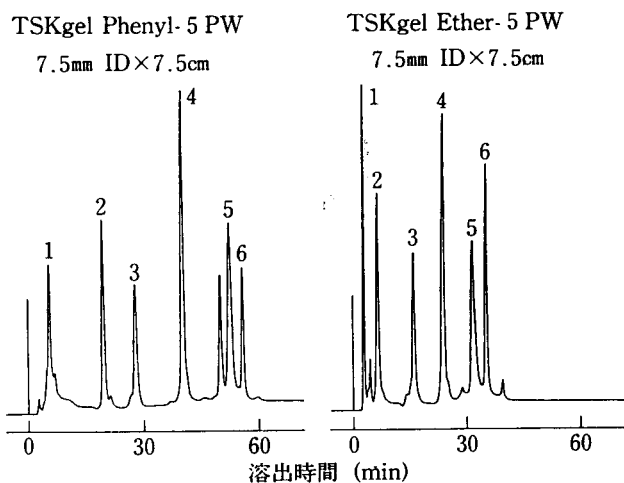


図2 標準タンパク質の分離

溶離液；A0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) + 2 M硫酸
 B0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)
 A→Bリニアグラジェント (60分)

流速；1 ml/min

温度；25°C

検出；UV (280nm)

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

タンパク質	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-5 PWではブロードなピークとして溶出されます。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されなかったり、回収率が低かったりします。これらのタンパク質をTSKgel Ether-5 PWを用いて分離しました。その結果を図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されました。 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 -アミラーゼは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-5 PWでは基材がTSKgel Phenyl-5 PWに比べ、より親水性であるために、TSKgel Phenyl-5 PWを用いた時起こるタンパク質の部分変性が抑えられるものと考えられます。

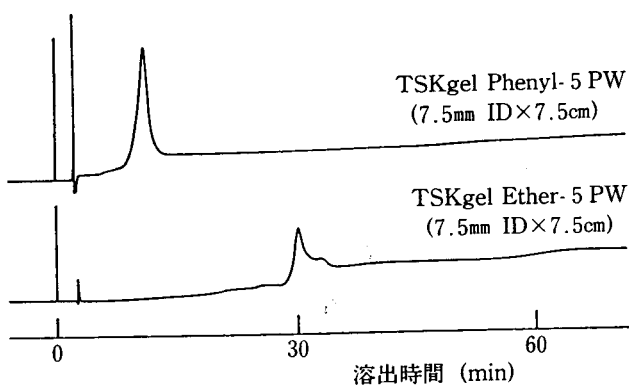


図3 牛血清アルブミンの分離

溶離液；A：0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) + 1.5M硫酸

B：0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)

A→Bリニアグラジェント (60分)

他の溶離条件；図2に同じ

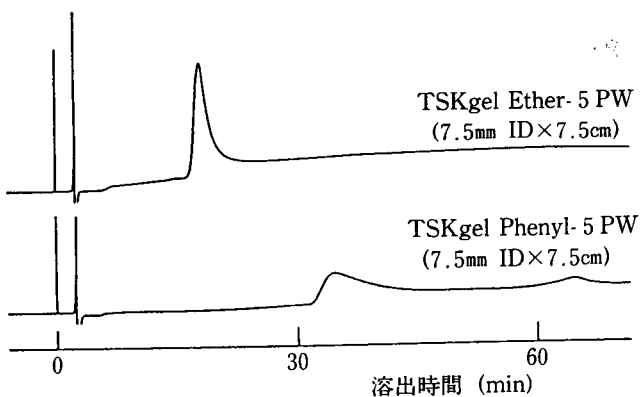


図4 β -ラクトグロブリンの分離

溶離条件；図2に同じ

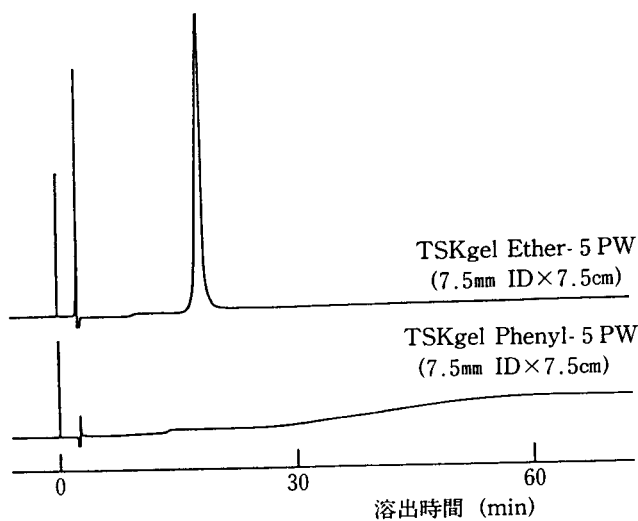


図5 α -ラクトアルブミンの分離

溶離条件；図3に同じ

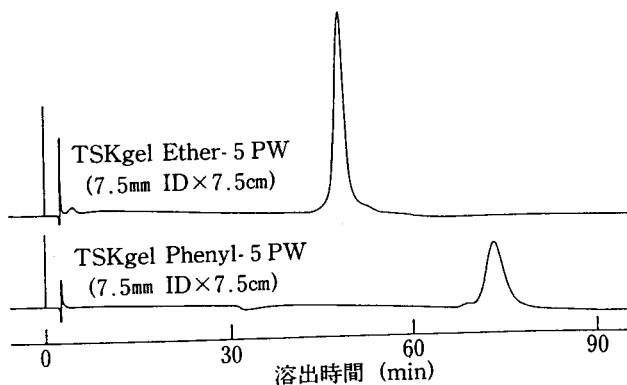


図6 α -アミラーゼの分離

溶離液；A：0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) + 1.1M硫酸ナ

トリウム

B：0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)

A→B リニアグラジェント (60分)

他の溶離条件；図2に同じ

酵素活性の回収率；TSKgel Phenyl-5 PW 60%

TSKgel Ether-5 PW 104%

図7にTSKgel Ether-5 PW及びTSKgel Phenyl-5 PWを用いたヒト血清の分離を示します。TSKgel Ether-5 PWの分離では、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-5 PWの場合、アルブミンはテーリングして、他のタンパク質とうまく分離されませんでした。

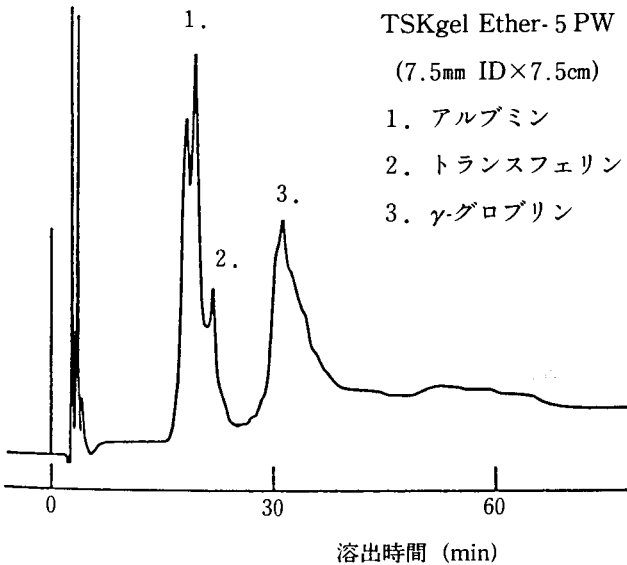
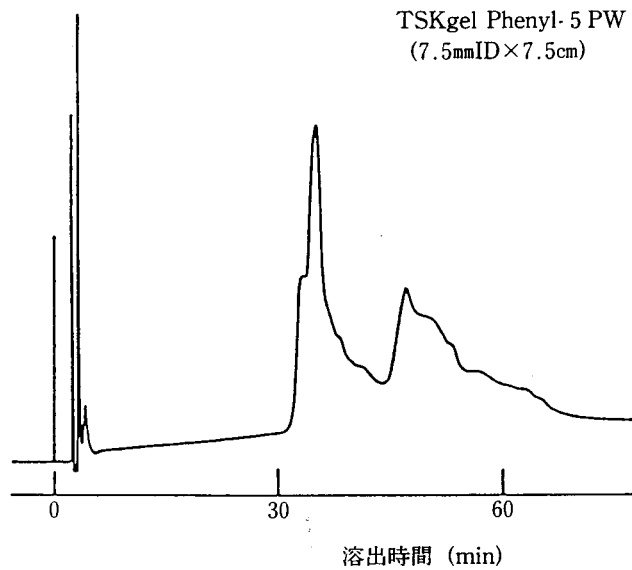


図7 ヒト血清の分離

溶離液；A：0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)+1.7M硫酸
B：0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)
A→B リニアグラジェント (60分)

他の溶離条件；図2に同じ

TSKgel Ether-5 PW分取用カラムを用いてヒト血清からアルブミンの大量精製を行いました。図8に16mlのヒト血清 (タンパク質量約1.2g) の分離を示します。ヒト血清は試料負荷量が16mlまでは、同一な分離パターンが得られました。免疫拡散法により測定しますと、アルブミンの回収率は92%でした。図9に純度検定のため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-5 PWによる1段階の疎水クロマトグラフィにより非常に純度の高いアルブミンが得られました。

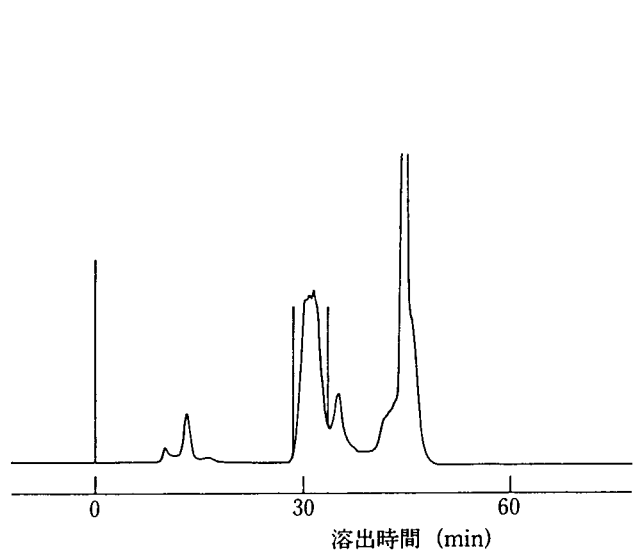


図8 ヒト血清アルブミンの精製

カラム；TSKgel Ether-5 PW 55mm ID×20cm

試料量；16ml (1.2gタンパク質)

溶離液；A：0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)+1.7M硫酸

B：0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)+0.68M硫酸

C：0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)

リニアグラジェント (36分) ステップグラジェント

A → B → C

流速；40ml/min

温度；25°C

検出；UV (280nm)

アルブミンの回収率；92%

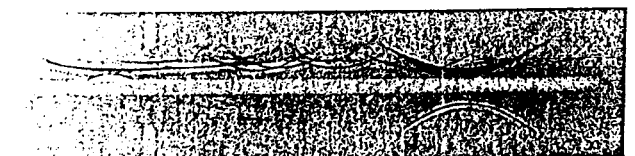


図9 アルブミンの免疫電気泳動図

図10にTSKgel Ether-5 PW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1.5gまでは分離能は低下しませんでした。酵素活性の回収率は90%と高く良好でした。 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、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30g)を処理することができます。

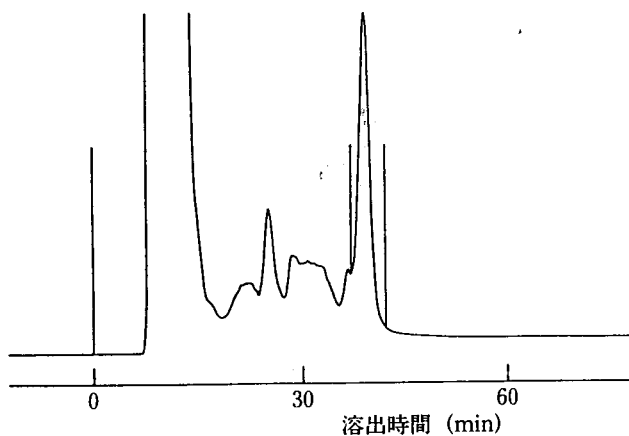


図10 粗 α -アミラーゼの精製

カラム; TSKgel Ether-5 PW

55mm ID×20cm

試料量; 1.5g

溶離液; A: 0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) + 0.66M硫酸ナトリウム

B: 0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)

A→B リニアグラジエント (36分)

流速; 40ml/min

温度; 25°C

検出; UV (280nm)

酵素活性回収率; 90%

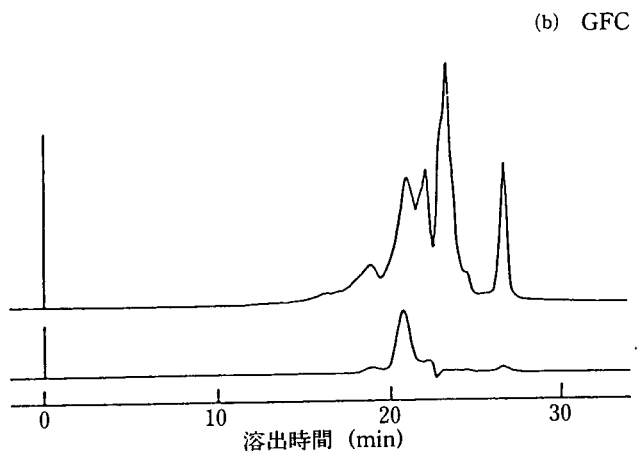
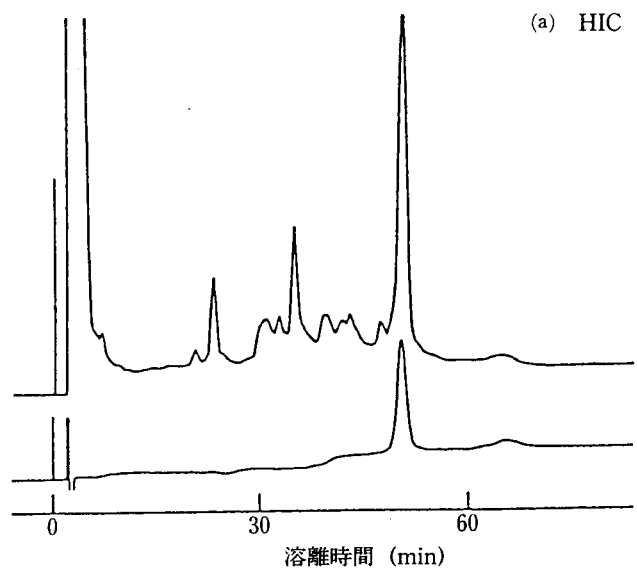


図11 図10による精製 α -アミラーゼの純度測定

(a) HIC

カラム; TSKgel Ether-5 PW 7.5mm ID×7.5cm

溶離液; A: 0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)

+1.1M硫酸ナトリウム

B: 0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)

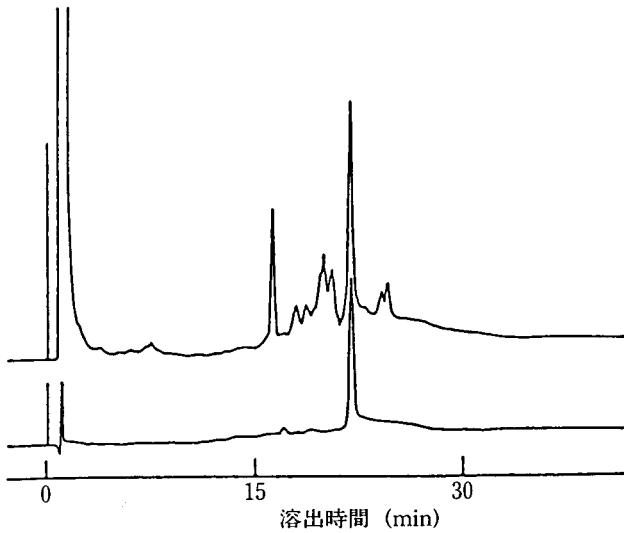
A→B リニアグラジエント (60分)

(b) GFC

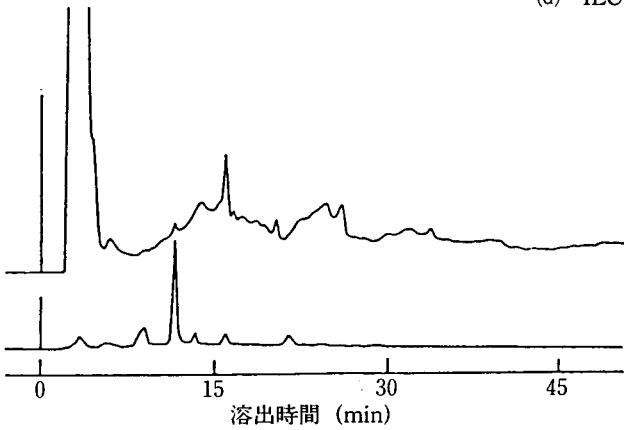
カラム; TSKgel G3000SW 7.5mm ID×60cm

溶離液; 0.05Mリン酸緩衝液 + 0.2M NaCl (pH7.0)

(c) RPC



(d) IEC



(c) RPC

カラム ; TSKgel Phenyl-5 PW RP 4.6mm ID×
7.5cm

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

リニアグラジェント (2分) リニアグラジェント (48分)

A → B → C

(d) IEC

カラム ; TSKgel DEAE-5 PW 7.5mm ID×7.5cm

溶離液 ; A : 0.02Mトリス-HCl緩衝液 (pH8.0)

B : A+0.5MNaCl

A→B リニアグラジェント (60分)

(a)(b)(c)(d)共通

流速 ; 1.0ml/min

温度 ; 25°C

検出 ; UV (280nm)

3. おわりに

TSKgel Ether-5 PWを用いてさまざまなタンパク質が高い分離能と高い回収率で、緩和な条件下でうまく分離できます。

標準的な溶離条件でTSKgel Phenyl-5 PWによる疎水クロマトグラフィを用いた時、部分的に変性を起こすような不安定なタンパク質には、TSKgel Ether-5 PWは特に有用です。また α -アミラーゼのようなかなり疎水性の高いタンパク質の分離にも有用です。しかしTSKgel Ether-5 PW及びTSKgel Phenyl-5 PWの両方で良く分離できるタンパク質に関してはTSKgel Ether-5 PWはTSKgel Phenyl-5 PWに比べ少し分離能が低くなります。さらにTSKgel Ether-5 PWはTSKgel Phenyl-5 PWよりも疎水性が弱いためタンパク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