



TOSOH

# SEPARATION REPORT

## TSKgel Chelate- 5 PWについて

### —— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 基本的性質	1
2-1 タンパク質の溶出位置と分離能	1
2-2 タンパク質回収率	2
3. タンパク質分離への応用	3
3-1 大豆リポキシダーゼの精製	3
3-2 酵母リンゴ酸デヒドロゲナーゼの精製	4
4. 溶離条件の影響	4
4-1 流速とグラジエント時間の影響	4
4-2 pHの影響	5
4-3 試料負荷量	5
5. おわりに	6

## 1. はじめに

金属キレートアフィニティクロマトグラフィによるタンパク質の分離は、1975年にPoraths<sup>(1)</sup>によって紹介されて以来、多くのタンパク質に応用され<sup>(2)</sup>、今日ではタンパク質分離の標準手段となりつつあります。

金属キレートアフィニティクロマトグラフィは、特に重金属とタンパク質の親和力の有無によってタンパク質を分離する有用な方法です。しかしながら、重金属に対し親和性を有するタンパク質群を更に効率よく分離することは難しいとされています。また、充填剤にアガロース誘導体を用いた従来のカラムでは、良い分離を得るためには低速度溶離法が使用されるため、分析時間が長くなるという欠点があります。もし、これらの欠点が改良されれば、金属キレートアフィニティクロマトグラフィは、タンパク質分離の手段としてもっとも威力を発揮するでしょう。

TSKgel Chelate-5 PWは、これらの欠点を改良するために大孔径の親水性樹脂ベースの高速ゲル透過用充填剤 TSKgel G5000PW<sup>(3)</sup>にイミノジ酢酸を導入（膨潤ゲル1 ml当たりイミノジ酢酸20 $\mu$ mol（導入）した高性能金属キレートアフィニティクロマトグラフィ用充填剤です。図1にその構造を示しました。ここでは、TSKgel Chelate-5 PWを用いたタンパク質分離への応用例と溶離条件の影響について紹介します。

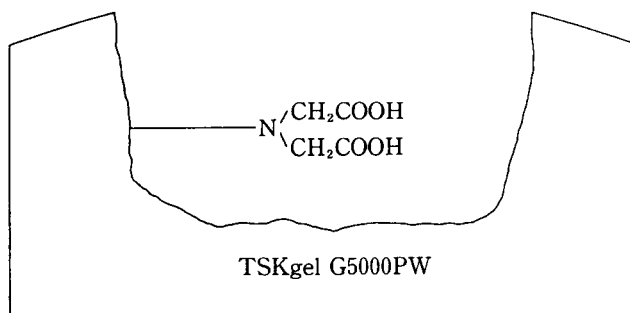


図1 TSKgel Chelate-5PWの基本構造

## 2. 基本的性質

### 2-1 タンパク質の溶出位置と分離能

図2に亜鉛に対して親和性のある3種の市販品のタンパク質混合物をTSKgel Chelate-5 PWで分離したクロマトグラムを示します。3種のタンパク質ともかなり鋭いピークとして溶出しています。このことより、TSKgel Chelate-5 PWを用いた金属キレートアフィニティクロマトグラフィが高性能イオン交換クロマトグラフィ、逆相クロマトグラフィ、疎水クロマトグラフィに匹敵する分離能を有することを示しています。

1. リボスクレアーゼA
2. トランスフェリン
3. カーボニックアンヒドラーゼ

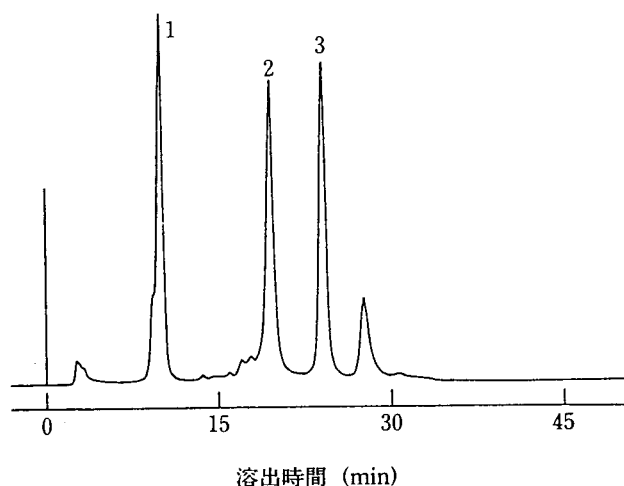


図2 標準タンパク質の分離（金属添加）

溶離液； A：0.02M トリス-HCl 緩衝液（pH8.0）+  
0.5M NaCl

B：A + 0.2M グリシン

A→B リニアグラジエント（60min）

添加金属； Zn<sup>2+</sup>

流速； 1.0ml/min

温度； 25℃

検出； UV（280nm）

図3に3種のタンパク質混合物を亜鉛を添加していないTSKgel Chelate-5 PWで分離したクロマトグラムを示します。3種のタンパク質とも素通りの位置に溶出しています。したがってTSKgel Chelate-5 PWと非特異的吸着するタンパク質は、ほとんどなく、TSKgel Chelate-5 PWは、重金属に対して親和性のあるタンパク質を選択的に分離する非常に優れた手段であるといえます。

## 2-2 タンパク質回収率

表1にTSKgel Chelate-5 PWカラムから溶出されたタンパク質の回収率を示します。分子量13,700ダルトンの牛膵臓リボクレアーゼAから分子量80,000ダルトンの人血清トランスフェリンまで5種のタンパク質について、タンパク質回収率85%以上と非常に高い値を示しています。

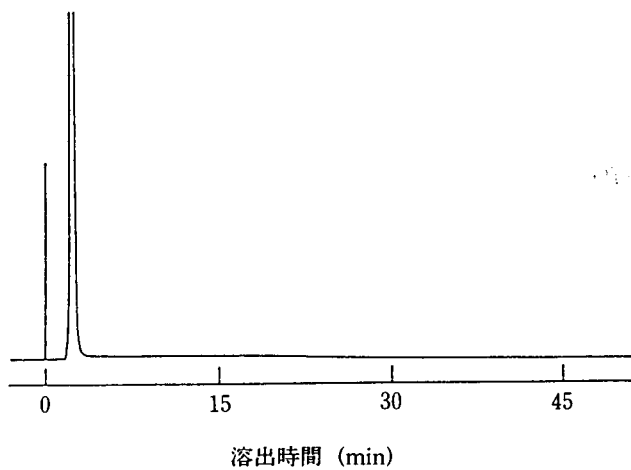


図3 標準タンパク質の分離（金属無添加）

溶離条件；金属無添加を除き図2に同じ

表1 タンパク質の回収率

タンパク質	回収率 (%)
リボスクレアーゼA	93
ミオグロビン	93
カーボニックアンヒドラーゼ	86
トランスフェリン	100
乳酸脱水素酵素	95

### 3. タンパク質分離への応用

#### 3-1 大豆リポキシダーゼの精製

図4にTSKgel Chelate-5PWを用いて、大豆リポキシダーゼを分離したクロマトグラムを示します。図中、2つの垂線ではさまれた30分付近に溶解するピークにリポキシダーゼ活性が見いだされたため、この画分を分取し、活性回収率、比活性を測定したところ活性回収率90%、クロマトの前後で比活性は7.5倍上昇していました。

図5と図6に、このリポキシダーゼ活性画分を高性能イオン交換クロマトグラフィと逆相クロマトグラフィで分離したクロマトグラムを示します。2つのクロマトグラムとも、1つの主ピークといくつかの非常に小さなピークが観測されます。イオン交換クロマトグラフィの主ピークを、酵素活性測定によりリポキシダーゼのピークと同定しました。

従ってTSKgel Chelate-5PW金属キレートアフィニティクロマトグラフィだけで、多くの不純物を含んでいる市販粗リポキシダーゼよりかなり純度の高いリポキシダーゼを得ることが可能です。

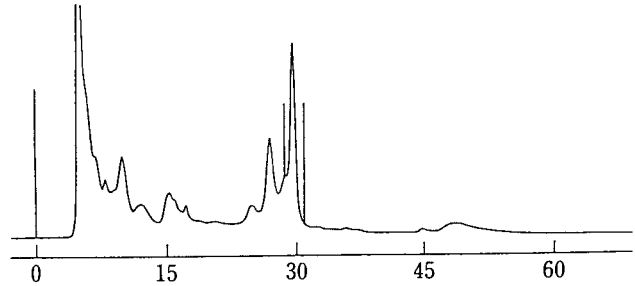


図4 市販大豆リポキシダーゼの分離

溶離条件；流速を除き図2と同じ

流 速；0.5ml/min

試 料 量；0.5mg

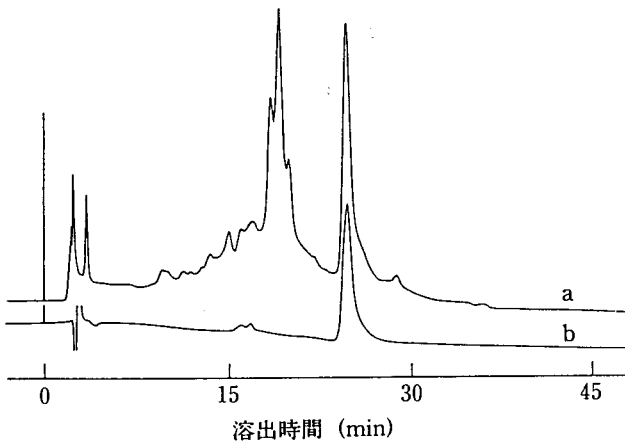


図5 イオン交換クロマトグラフィによる粗及び精製リポキシダーゼの分離

a：粗リポキシダーゼ

b：図4による精製リポキシダーゼ画分

カラム；TSKgel DEAE-5PW (7.5mm ID×7.5cm)

溶離液；A：0.02M トリス-HCl緩衝液 (pH8.0)

B：A+0.5M NaCl

A→B リニアグラジェント (60min)

流 速；1.0ml/min

温 度；25°C

検 出；UV (280nm)

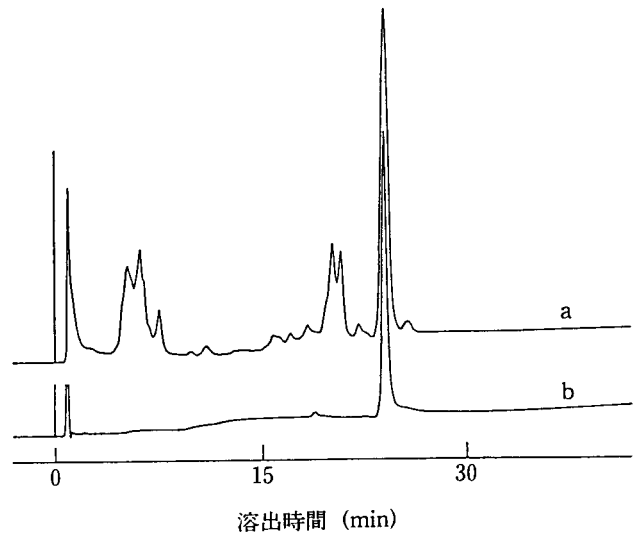


図6 逆相クロマトグラフィによる粗及び精製リポキシダーゼの分離

a：粗リポキシダーゼ

b：図4による精製リポキシダーゼ画分

カラム；TSKgel Phenyl-5PW 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

リアグラジェント(2min) リニアグラジェント(48min)

A → B → C

流 速；1.0ml/min

温 度；25°C

検 出；UV (220nm)

### 3-2 酵母リンゴ酸デヒドロゲナーゼの精製

図7にTSKgel Chelate-5PWを用いて酵母リンゴ酸デヒドロゲナーゼを分離したクロマトグラムを示します。図中、2つの垂線ではさまれた25分付近に溶出するピークにリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性が見い出されたため、この画分を分取し、活性回収率、比活性を測定したところ活性回収率は95%と非常に高く、クロマト前後で比活性は3.9倍上昇していました。他の分離モードによる高性能液体クロマトグラフィによって、この画分を高純度のリンゴ酸デヒドロゲナーゼと同定しました。

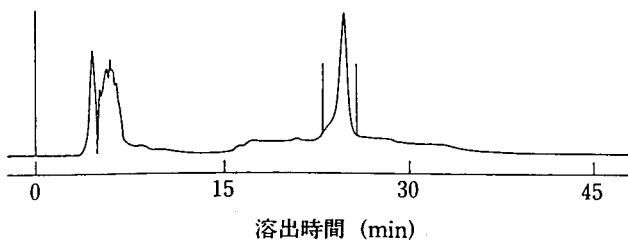


図7 市販酵母リンゴ酸デヒドロゲナーゼの分離

分離条件；図4に同じ

試料量；0.1mg

### 4. 分離条件の影響

#### 4-1 流速とグラジエント時間の影響

図8に流速とグラジエント時間の分離能への影響を示します。高分離能を得るためには、長時間のグラジエントが必要です。しかし、非常に低流速の場合を除いては、この効果は、120分以上のグラジエントでは減少してしまいます。長時間のグラジエントで分離すると分離時間が長くなるため、60~120分間のグラジエントが分離能と分離時間とのちょうど良い妥協点です。

図8より流速0.5ml/minで最高の分離能が得られることがわかります。流速の上昇は、分離時間を短縮はしますが、分離中の試料をより希釈することになります。したがって流速0.5ml/min付近が適当です。

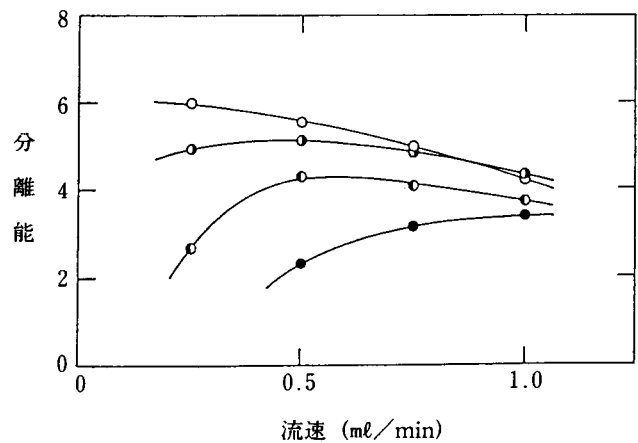


図8 分離能への流速、グラジエント時間の影響

分離能；トランスフェリンとカーボニックアンヒドラーゼの分離能

分離条件；流速、グラジエント時間を除いて図2に同じ

グラジエント時間；●—30min

●—60min

●—120min

○—240min

#### 4-2 pHの影響

図9に、溶離液のpHをpH7.0~pH9.0の範囲で変化させて2種のタンパク質混合物を分離したクロマトグラムを示します。図9ではタンパク質は低いpHでより強くカラムに保持されています。しかし一般に、タンパク質やアミノ酸と重金属との親和力はpHが低くなるほど減少することが知られています。<sup>(1,4,5)</sup>おそらくpHの減少に伴うグリシンと重金属との親和力の減少がタンパク質と重金属との親和力の減少を上回るためと思われます。

ピーク幅とピーク間距離もpHに依存し、pHの減少とともに広がりますが、最高の分離度は、pH7.5~8.0で得られます。

#### 4-3 試料負荷量

TSKgel Chelate-5 PWの試料負荷量を市販リポキシダーゼを用いて検討しました。図10に試料負荷量を2 mgまで上昇させて分離したクロマトグラムを示します。試料負荷量2 mgでもピークがやや幅広くなることを除けば、0.2mgの時とはほぼ同様の分離が得られます。

他のモードのタンパク質の高速液体クロマトグラフィ<sup>(6-8)</sup>で観測されるのと同様に、リポキシダーゼに関しては、TSKgel Chelate-5 PWでは、最高の分離能を維持したまま最高2 mgまでの試料添加が可能です。

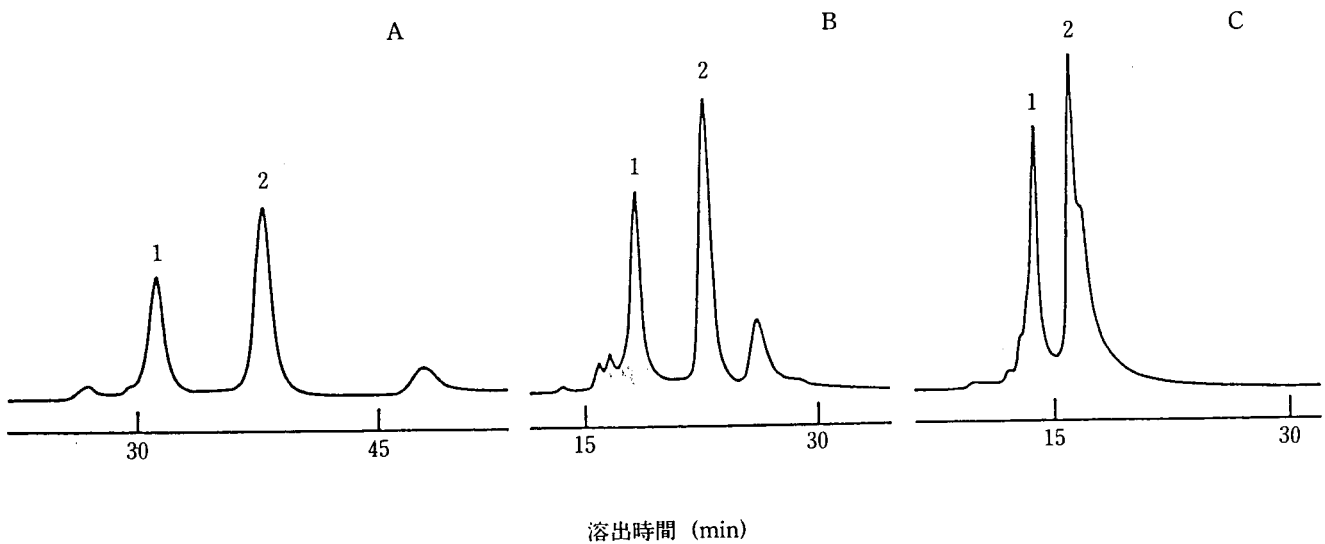


図9 pHの影響

溶離条件；pHを除いて図2に同じ

A：pH7.5

B：pH8.0

C：pH8.5

1. トランスフェリン

2. カーボニックアンヒドラーゼ

## 5. おわりに

以上紹介しましたように、TSKgel Chelate-5PWは、タンパク質の金属キレートアフィニティクロマトグラフィに最適です。亜鉛と親和力を有するタンパク質を迅速に高分離能でしかも高回収率で分離できました。更にTSKgel Chelate-5PWは、1000 Åのポアサイズを有しているため、高分子量のタンパク質にも使用できます。また、TSKgel Chelate-5PWは化学的に非常に安定のため、0.5M塩化ナトリウムまたは20%酢酸中で10日間定温で浸漬させても、固定化したイミノジ酢酸の量は変わりません。したがって、TSKgel Chelate-5PWを用いた金属キレートアフィニティクロマトグラフィは、タンパク質分離の重要な手法のひとつとなると期待されます。

## REFERENCES

- 1 J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson and G. Belfrage, *Nature*, **258** (1975) 598.
- 2 E. Sulgowski, *Trends in Biotechnology*, **3** (1985) 1.
- 3 T. Hashimoto, H. Sasaki, M. Aiura and Y. Kato, *J. Polymer Sci., Polymer Phys. Ed.*, **16** (1978) 1789.
- 4 E. S. Hemdan and J. Porath, *J. Chromatogr.*, **323** (1985) 247.
- 5 E. S. Hemdan and J. Porath, *J. Chromatogr.*, **323** (1985) 255.
- 6 Y. Kato, T. Kitamura and T. Hashimoto, *J. Chromatogr.*, **292** (1984) 418.
- 7 Y. Kato, T. Kitamura and T. Hashimoto, *J. Chromatogr.*, **333** (1985) 93.
- 8 K. Nakamura and Y. Kato, *J. Chromatogr.*, in press.

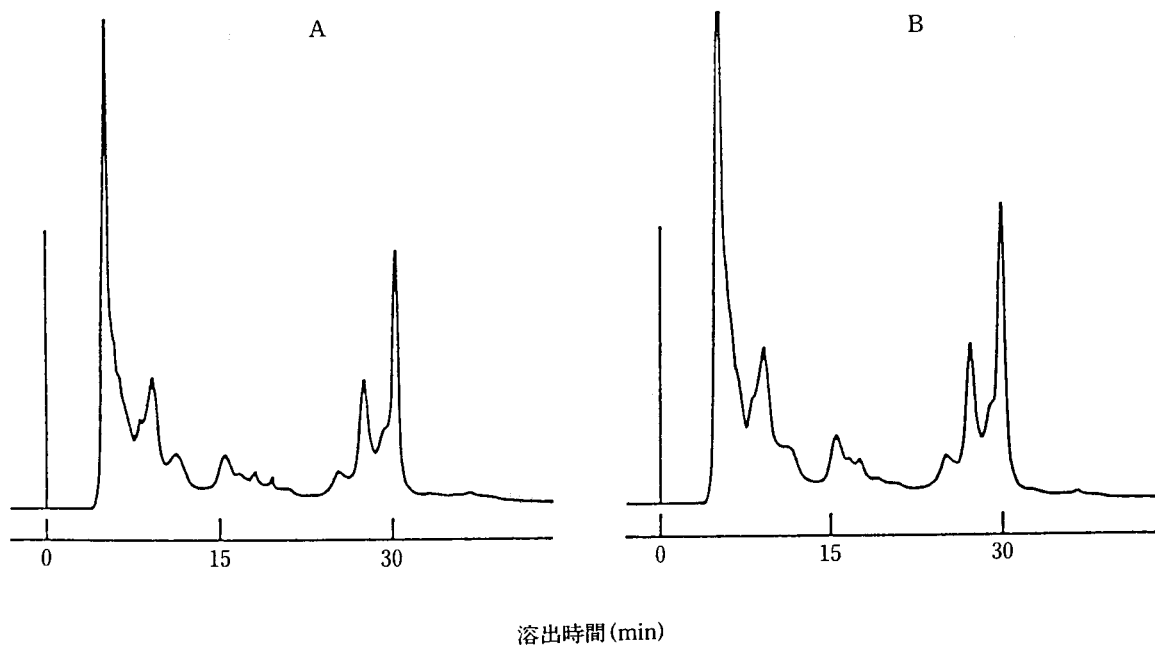


図10 試料負荷量

試料名；市販粗リポキシダーゼ

溶離条件；図4に同じ

試料量；A：0.2mg

B：2.0mg