



SEPARATION REPORT

TSK-GELによる膜タンパク質の分離

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. ゲル濾過クロマトグラフィによる分離	1
3. イオン交換クロマトグラフィによる分離	2
4. 疎水クロマトグラフィによる分離	6
5. 逆相分配クロマトグラフィによる分離	8
6. 金属キレートアフィニティクロマトグラフィによる分離	8
7. HPLCモードの組み合わせによるチトクロムb ₅ の精製	10
8. おわりに	11

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いたタンパク質の分離例が報告されて約10年がたちました。その間の進歩はめざましく、現在、HPLCは水溶性タンパク質を精製する技術として最も重要なものとなっています。HPLCは膜タンパク質にも応用され、数多くの報告例があります(1-53)。しかしクロマトグラフィの条件は限られており、いまだ分離条件に関する検討はなされていません。本稿では、さまざまなHPLCモードを用い、膜タンパク質のクロマトグラフィの条件について検討しました。現在、可溶性タンパク質の分離に応用されているHPLCモード、すなわちゲル濾過クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、疎水クロマトグラフィ、逆相分配クロマトグラフィ、金属アフィニティクロマトグラフィを用いて膜タンパク質の分離について検討した結果を報告します。

2. ゲル濾過クロマトグラフィによる分離

図-1にゲル濾過クロマトグラフィにおける界面活性剤の濃度の影響を示します。ラット肝ミクロゾーム膜タンパク質の粗抽出試料を種々の濃度のオクタエチレングリコールデシルエーテル ($C_{12}E_8$) を含む溶離液で分離しました。 $C_{12}E_8$ 濃度を下げると溶出されるピークは小さく、やや広がります。ピークが小さくなることは回収率の低下を意味し、広がることは分離能の低下を示しています。 $C_{12}E_8$ 濃度が0.05%以上では、ほとんど分離は変わりません。従って高い回収率と分離能を得るためには、少なくとも0.05%の $C_{12}E_8$ を添加することが必要です。同様な傾向がヒト胎盤ミトコンドリア膜タンパク質についてもみられます。異なる種類の界面活性剤では、必要な濃度はかなり違い、オクチルグルコシドと3-[(3-クロロアミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート (CHAPS) の場合には1%程度と、かなりの高濃度が必要です。エマルゲン-911とトリトンX-100の場合は0.1%以上および0.2%以上の濃度が必要です。

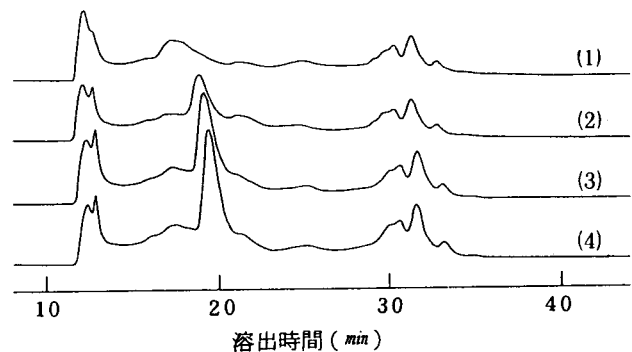


図-1 ゲル濾過クロマトグラフィによる分離(1)

試料; ラット肝ミクロゾーム膜タンパク質(0.1 mg)

カラム; TSKgel G3000SW 7.5mmID×60cm

溶離液; 50mMリン酸緩衝液(pH7.0)+0.2MNaCl
+20%グリセロール+界面活性剤

界面活性剤; (1)0.005% $C_{12}E_8$

(2)0.01% $C_{12}E_8$

(3)0.025% $C_{12}E_8$

(4)0.05% $C_{12}E_8$

流速; 1.0ml/min

検出; UV(280nm)

図-2に界面活性剤の種類の影響を示します。ラット肝ミクロゾーム膜タンパク質の粗抽出試料を、種々の異なる界面活性剤を含む溶離液で分離したクロマトグラムを示します。界面活性剤が異なるとかなり異なる溶出パターンが得られます。エマルゲン-911とトリトンX-100の場合は、溶出時間15分から20分の間にかかなり大きな正および負のピークが現れます。これらの結果から最も良い界面活性剤を特定することはできませんが試料や成分により、界面活性剤の種類を変えることで分離が改善される可能性があります。

NaCl濃度は0.1から0.4Mまで変化させましたが、溶出パターンはほとんど変化しません。グリセロール濃度は0から20%まで変化させましたが、同様に溶出パターンには影響ありません。したがって、タンパク質の安定化にグリセロールが必要ならばこの濃度範囲内で溶離液に添加することができます。流速は、0.8ml/minから0.4ml/minに減少させると分離能が少し向上します。

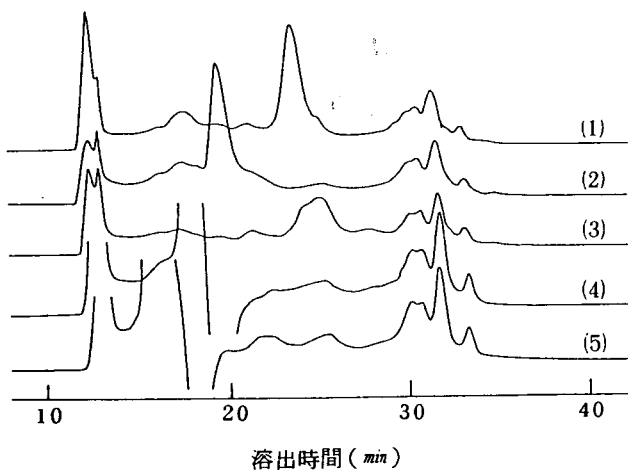


図-2 ゲル濾過クロマトグラフィによる分離(2)

試料；図-1に同じ

溶離条件；含有界面活性剤種類濃度を除き図-1に同じ

界面活性剤；(1)1.2%オクチルグルコシドを溶離液に含む

(2)0.05% $C_{12}E_8$ "

(3)1% CHAPS "

(4)0.1% エマルゲン-911 "

(5)0.2% トリトンX-100 "

検出；UV(280nm or 246nm)

3. イオン交換クロマトグラフィによる分離

図-3にイオン交換クロマトグラフィにおける界面活性剤の濃度の影響を示します。ラット肝ミクロゾーム膜タンパク質の粗抽出試料を種々の濃度のオクチルグルコシドを含む溶離液で分離しました。オクチルグルコシドの濃度を0.8%以下に減らした場合、回収率が減少します。しかし0.8%以上では分離は変わりません。図-4および図-5にもイオン交換クロマトグラフィにおける界面活性剤濃度の影響を示します。ラット肝ミクロゾーム膜タンパク質の粗抽出試料を種々の濃度の $C_{12}E_8$ 存在下で分離しました。 $C_{12}E_8$ 濃度を下げると、わずかにですが、この場合もピーク面積が減少します。さらに図-5から明らかのように、界面活性剤濃度を下げると膜タンパク質は遅れて溶出し、ピークも広がります。同様な傾向が実験した全ての界面活性剤で観察されました。またヒト胎盤ミトコンドリアの膜タンパク質の場合も同様です。したがって、一般的には、膜タンパク質のイオン交換クロマトグラフィにおいては、界面活性剤の種類により異なりますが、一定レベル以上の濃度の界面活性剤を溶離液に添加するのがよいと考えられます。それ以下の濃度では界面活性剤濃度を下げていくと、膜タンパク質は広いピークとして遅れて溶出し、回収率は下がります。界面活性剤の分離に関する限界濃度は、オクチルグルコシドでは約0.8%、 $C_{12}E_8$ 、エマルゲン-911、トリトンX-100では約0.2%です。CHAPSは十分な濃度では開始溶離液に溶けませんのでイオン交換クロマトグラフィでの検討は行っていません。

図-6に界面活性剤の種類の違いによる影響を示します。 $C_{12}E_8$ 、エマルゲン-911、トリトンX-100では同様な結果が得られましたが、 $C_{12}E_8$ はエマルゲン-911やトリトンX-100に比べピークがよりシャープになります。オクチルグルコシドの場合やや回収率が低くなります。従って、ここで調べた界面活性剤の中で、高い分離能と回収率の得られる最も良いものは、 $C_{12}E_8$ と考えられます。

グラジエント時間、緩衝液の種類と塩、溶出pH、グリセロール濃度および流速の影響は可溶性タンパク質の場合と同様です(54、55)。一般的には、グラジエント時間を長くしたり流速をあげると、少しですが分離能は上がります。緩衝液と塩、溶離液のpHおよびグリセロール濃度を変えると溶出パターンも変化します。これらのことから溶離条件を調整することで分離が向上する可能性があります。さらに膜タンパク質はより高いpHやグリセロール濃度を下げると、やや溶出が遅れます。

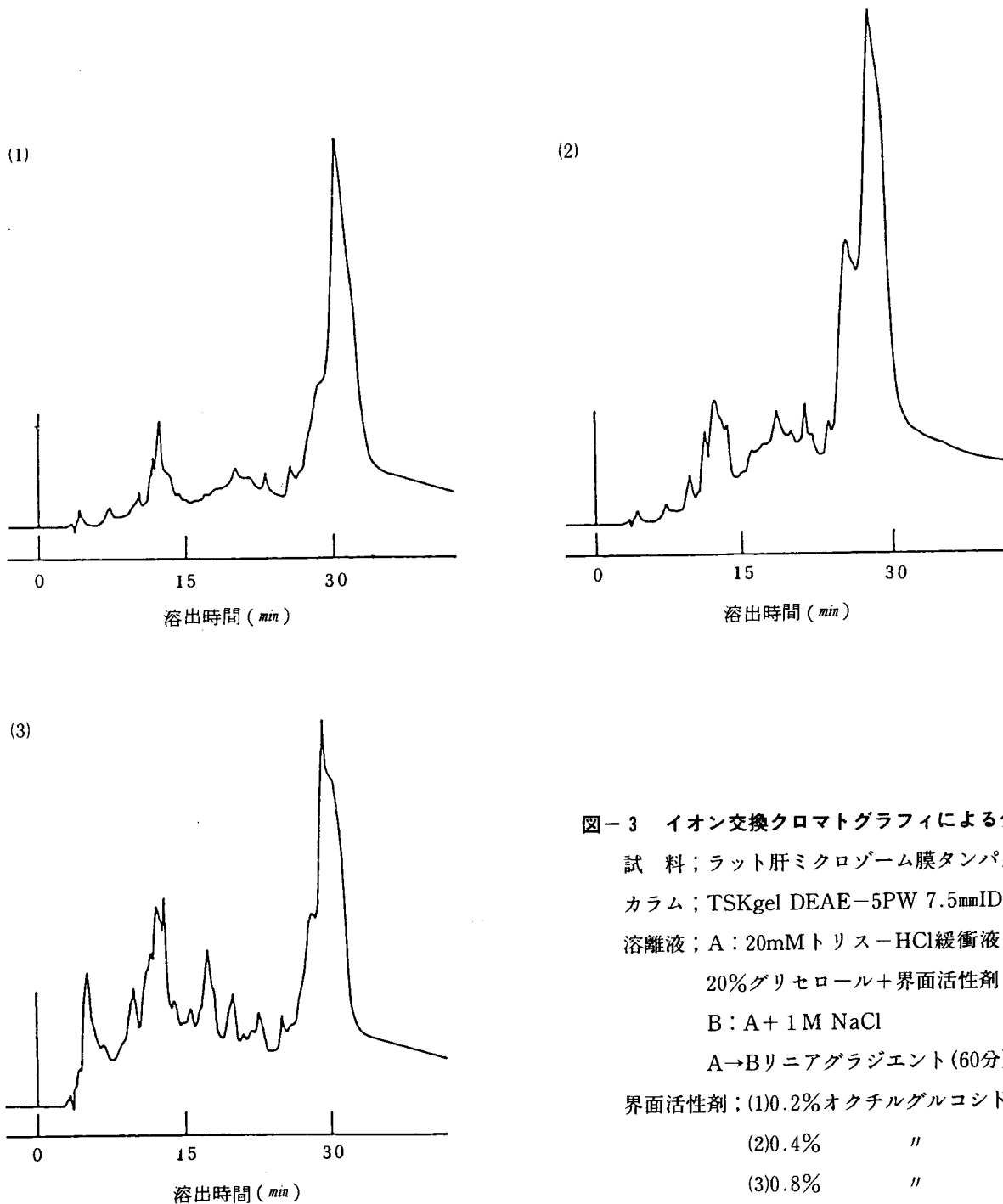


図-3 イオン交換クロマトグラフィによる分離(1)

試料；ラット肝ミクロゾーム膜タンパク質(2mg)

カラム；TSKgel DEAE-5PW 7.5mmID×7.5cm

溶離液；A：20mM トリス-HCl 緩衝液(pH8.0) +
20%グリセロール + 界面活性剤

B：A + 1M NaCl

A→B リニアグラジエント(60分)

界面活性剤；(1)0.2% オクチルグルコシド

(2)0.4% "

(3)0.8% "

流速；1.0ml/min

検出；UV(280nm)

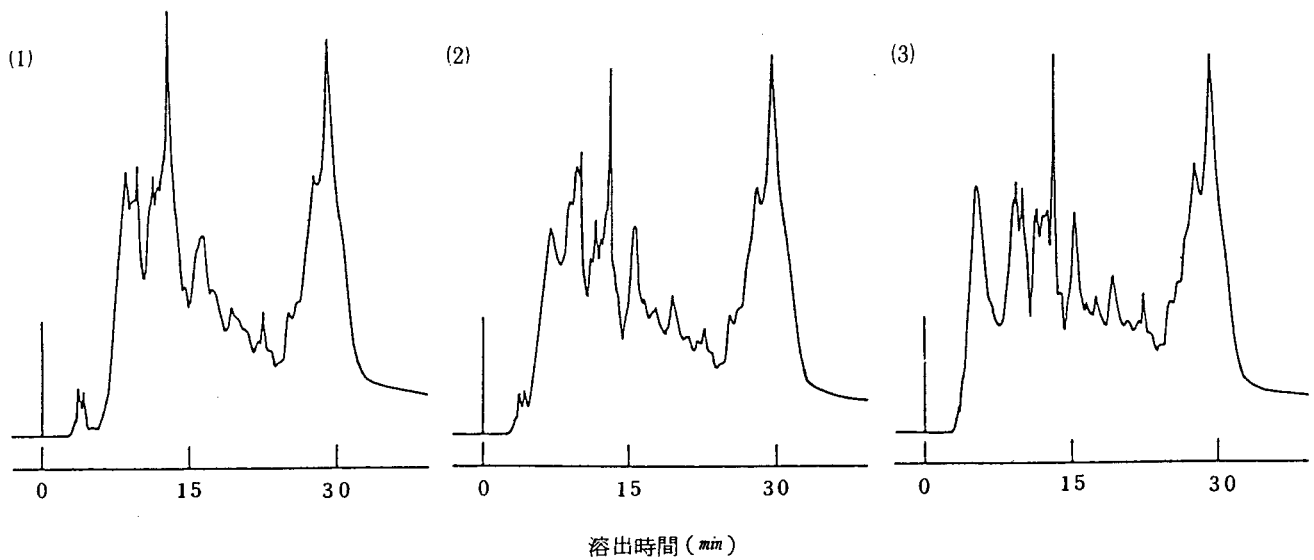


図-4 イオン交換クロマトグラフィによる分離(2)

試料；図-3に同じ

溶離条件；界面活性剤を除き図-3に同じ

界面活性剤；(1)0.05% $C_{12}E_8$

(2)0.1% $C_{12}E_8$

(3)0.2% $C_{12}E_8$

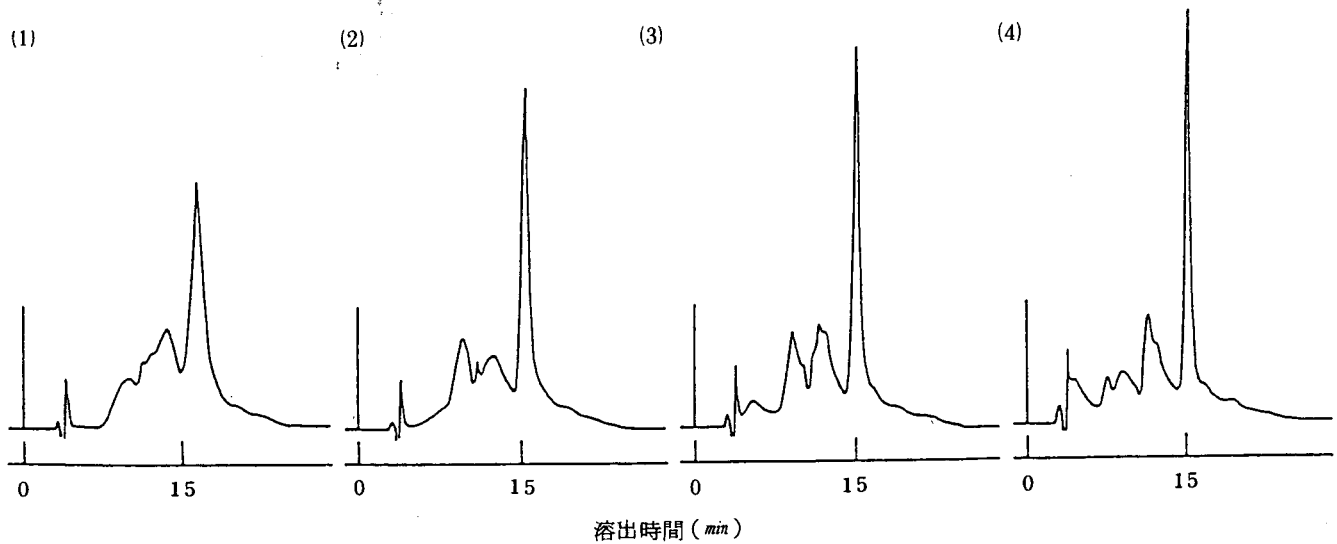


図-5 イオン交換クロマトグラフィによる分離(3)

試料；図-3に同じ

溶離条件；検出及び界面活性剤を除き図-3に同じ

検出；VIS(417nm)

界面活性剤；(1)0.05% $C_{12}E_8$

(2)0.1% $C_{12}E_8$

(3)0.2% $C_{12}E_8$

(4)0.4% $C_{12}E_8$

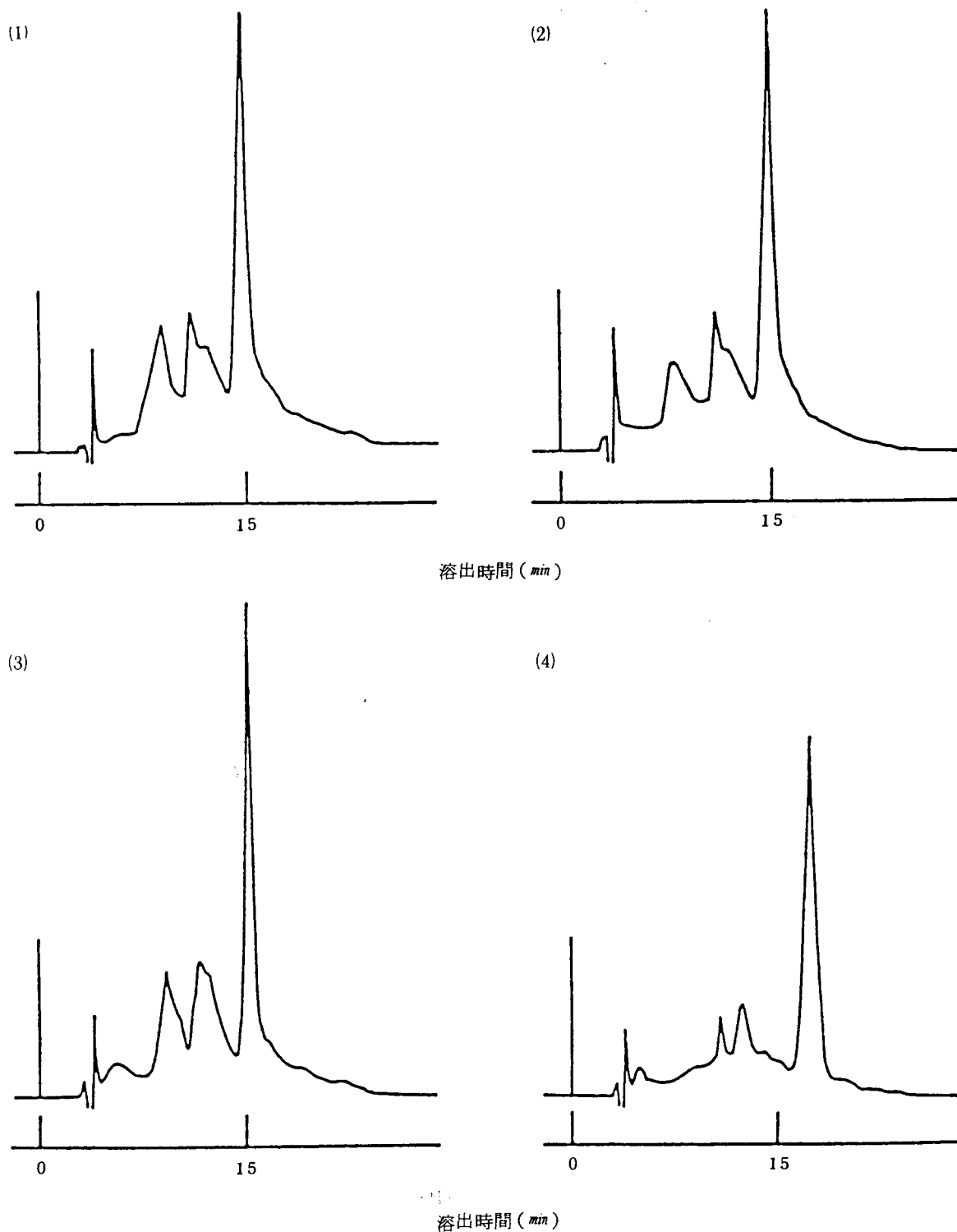


図-6 イオン交換クロマトグラフィによる分離(4)

試料；図-3に同じ

溶離条件；検出及び界面活性剤を除き図-3に同じ

検出；VIS(417nm)

界面活性剤；(1)0.2% トリトンX-100

(2)0.2% エマルゲン-911

(3)0.2% $C_{12}E_8$

(4)0.8% オクチルグルコシド

4. 疎水クロマトグラフィによる分離

図-7に開始緩衝液における硫酸濃度の影響を示します。ラット肝ミクロゾーム膜タンパク質の粗抽出試料を0.4%オクチルグルコシドを含む溶離液中で、硫酸濃度を1.0、1.5および2.25Mから0へのグラジエントで分離しました。開始緩衝液の硫酸濃度が2.25Mの場合は、試料中の成分の大部分はカラムに保持されます。しかし硫酸濃度が1.5Mの場合は、ほぼ半分がカラムのボイド容積に溶出されます。硫酸濃度が1.0Mの場合は大部分の成分がカラムに保持されずに溶出されます。したがって一般的には膜タンパク質をカラムに保持させるには開始緩衝液に2M程度の硫酸を添加することが必要です。

図-8に疎水クロマトグラフィにおける界面活性剤の濃度の影響を示します。膜タンパク質は疎水クロマトグラフィでも同様に、通常、界面活性剤濃度が増えれば高い回収率で、より鋭いピークとして溶出されます。したがって界面活性剤は十分高い濃度に溶離液に添加するのがよいと考えられます。しかし開始緩衝液には高濃度の硫酸が含まれているので、界面活性剤の添加濃度はむしろ低濃度に限定されます。そのため一般的には、界面活性剤は、溶かすことのできる最大濃度しておくのが望ましいと考えられます。また最終緩衝液にも界面活性剤を添加し、界面活性剤をグラジエント溶出の全工程にできるだけ含ませるのがよいと言えます。開始緩衝液の硫酸濃度が2.25Mの場合、オクチルグルコシドは0.4%まで開始緩衝液に溶け、最終緩衝液には0.8%溶けます。この場合、グラジエント溶出中でも界面活性剤の沈殿は起こりません。図-8はラット肝ミクロゾーム膜タンパク質の粗抽出試料のクロマトグラムですが、開始緩衝液に0.4%、最終緩衝液に0.4%または0.8%のオクチルグルコシドを添加したもののクロマトグラムの比較を示します。

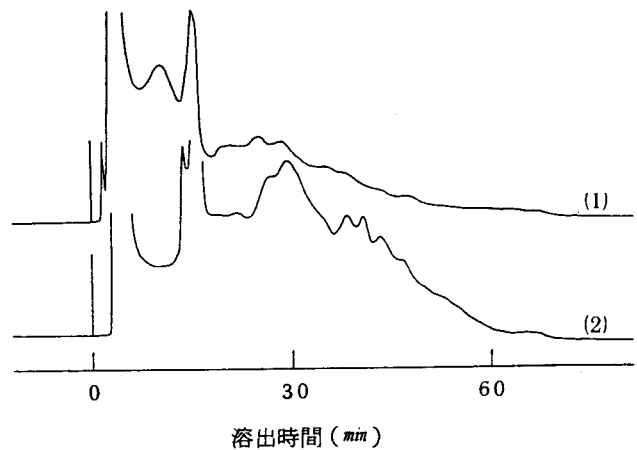


図-7 疎水クロマトグラフィによる分離(1)

試料；図-3に同じ

カラム；TSKgel Ether-5PW

7.5mmID×7.5cm

溶離液；(1)A：0.1Mトリス-HCl緩衝液(pH7.5)
+1.5M硫酸+0.4%オクチルグルコシド+20%グリセロール

B；0.1Mトリス-HCl緩衝液(pH7.5)
+0.4%オクチルグルコシド+20%グリセロール

(2)A；0.1Mトリス-HCl緩衝液(pH7.5)
+2.25M硫酸+0.4%オクチルグルコシド+20%グリセロール

B；0.1Mトリス-HCl緩衝液(pH7.5)
+0.4%オクチルグルコシド+20%グリセロール

(1)、(2)共A→Bリアグラジエント(60分)

流速；0.1ml/min

検出；UV(280nm)

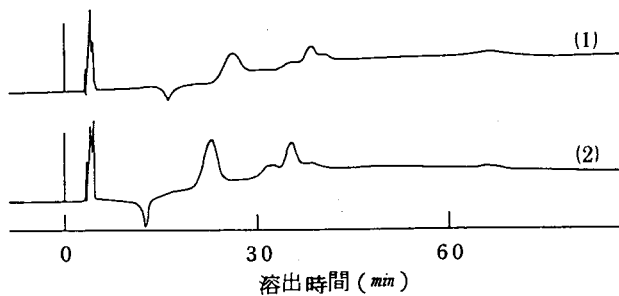


図-8 疎水クロマトグラフィによる分離(2)

試料; 図-3に同じ

溶離液; (1) A: 0.1M トリス-HCl 緩衝液 (pH7.5)
+ 2.25M 硫酸 + 0.4% オクチルグル
コシド + 20% グリセロール

B: 0.1M トリス-HCl 緩衝液 (pH7.5)
+ 0.4% オクチルグルコシド + 20%
グリセロール

(2) A: (1)に同じ

B: 0.1M トリス-HCl 緩衝液 (pH7.5)
+ 0.8% オクチルグルコシド + 20%
グリセロール

(1)、(2)共に A→B リニアグラジエント (60
分)

流速; 1.0ml/min

検出; VIS (417nm)

最終緩衝液中のオクチルグルコシド濃度を0.4%から0.8%に増やすと、膜タンパク質は高い回収率で、ピーク幅も狭く、より早く溶出されます。C₁₂E₈は、2Mの硫酸を含む開始緩衝液には0.01%、最終緩衝液には0.04%溶けませんが、沈殿の問題はありません。

図-9に界面活性剤の種類別の効果を示します。界面活性剤の種類が違えば溶出パターンも異なります。従って界面活性剤の種類を変えれば分離が向上する可能性があります。しかしここで検討したものの中でオクチルグルコシドとC₁₂E₈だけが有効でした。エマルゲン-911とトリトンX-100を用いた場合には、膜タンパク質は、界面活性剤濃度を最大にしてもピークが広がります。CHAPSを用いた場合には膜タンパク質をカラムに保持するのは困難でした。

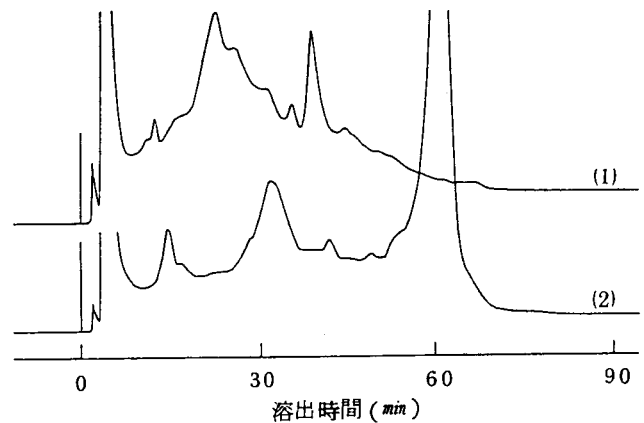


図-9 疎水クロマトグラフィによる分離(3)

試料; 図-3に同じ

溶離液; (1) A: 0.1M トリス-HCl 緩衝液 (pH7.5)
+ 2.25M 硫酸 + 0.4% オクチルグル
コシド + 20% グリセロール

B: 0.1M トリス-HCl 緩衝液 (pH7.5)
+ 0.8% オクチルグルコシド + 20%
グリセロール

(2) A: 0.1M トリス-HCl 緩衝液 (pH7.5)
+ 2 M 硫酸 + 0.01% C₁₂E₈ + 20% グ
リセロール

B: 0.1M トリス-HCl 緩衝液 (pH7.5)
+ 0.04% C₁₂E₈ + 20% グリセロール

(1)、(2)共に A→B リニアグラジエント (60
分)

流速; 1.0ml/min

検出; UV (280nm)

5. 逆相分配クロマトグラフィによる分離

図-10にTFA濃度0.1%の溶離液中で行ったラット肝ミクロゾーム膜タンパク質の粗抽出試料のクロマトグラムを示します。TFA濃度が0.05%の場合は少し異なるクロマトグラムが得られます。これらのことから膜タンパク質の分離に逆相分配クロマトグラフィが使用できることがわかります。しかし逆相分配クロマトグラフィでは通常、タンパク質の変性や失活が問題とならない場合に利用できます。

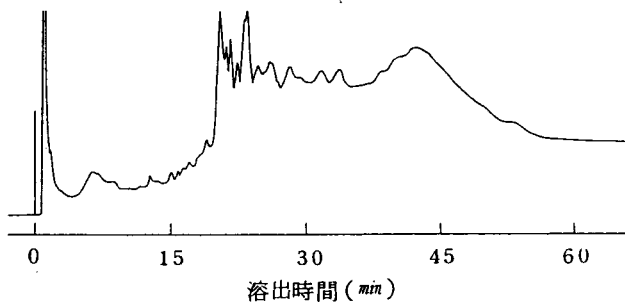


図-10 逆相分配クロマトグラフィによる分離

試料；ラット肝ミクロゾーム膜タンパク質(0.6 mg)

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

溶離液；A：5%アセトニトリルin 0.1%TFA
B：20%アセトニトリルin 0.1%TFA
C：80%アセトニトリルin 0.1%TFA
A→Bリニアグラジエント(2分)→Cリニアグラジエント(48分)

流速；1.0ml/min

検出；UV(220nm)

6. 金属キレートアフィニティクロマトグラフィによる分離

図-11に金属キレートアフィニティクロマトグラフィによるヒト胎盤ミトコンドリア膜タンパク質の分離例を示します。分離には0.4%の $C_{12}E_8$ を含む溶離液を用いています。 $C_{12}E_8$ 濃度が0.2%以下の場合には他のHPLCの分離モードの場合と同様、膜タンパク質は溶出が遅れピークが広くなり回収率も下がります。オクチルグルコシド、エマルゲン-911またはトリトンX-100を $C_{12}E_8$ の代わりに用いた場合には1%程度の高濃度を用いてもピークは小さくなります。従って膜タンパク質の分離に金属キレートアフィニティクロマトグラフィを用いる場合、まず最初に0.4%またはそれ以上の濃度の $C_{12}E_8$ を用いるのがよいと考えられます。

溶離液のpHを7.5から8.5の間で変化させた場合、低いpHではタンパク質は早く溶出し、ボイド容積に溶出する成分が増加します。グリセロール濃度が0ないし20%の間では分離に影響はありません。

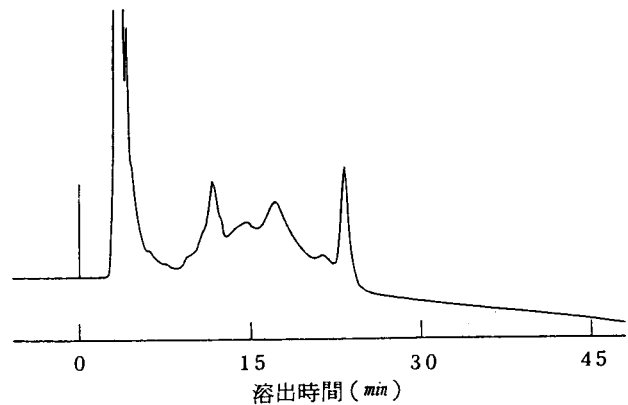


図-11 群特異性(金属キレート)アフィニティクロマトグラフィによる分離

試料；ヒト胎盤ミトコンドリア膜タンパク質(0.5 mg)

カラム；TSKgel Chelate-5 PW
7.5mmID×7.5cm

溶離液；A：20mMトリス-HCl緩衝液(pH8.0)+
0.5MNaCl+0.4% $C_{12}E_8$ +20%グリセ
ロール

B：A+0.2Mグリシン

A→Bリニアグラジエント(60分)

流速；1.0ml/min

検出；UV(280nm)

7. HPLCモードの組み合わせによるチトクロム b_5 の精製

以上に示しましたように種々のHPLCモードが膜タンパク質の分離に応用できることがわかります。従って異なるHPLCモードの組み合わせが膜タンパク質の精製に非常に有効です。そこでチトクロム b_5 をHPLCの組み合わせで精製した例を示します。ラット肝ミクロゾーム膜タンパク質の粗抽出試料を最初にイオン交換クロマトグラフィで分離します。その結果を図-12に示します。417 nm吸光度で示されるクロマトグラムで約15分に溶出されるピークにチトクロム b_5 は含まれており、これを集めます。この分画を続いてゲル濾過カラムで分離します。その結果を図-13に示します。417 nmの吸光度で示される約19分に溶出されるピークがチトクロム b_5 であり、これを集めます。図-14に、これらフラクションのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による純度チェックの結果を示します。一段階のイオン交換クロマトグラフィによりチトクロム b_5 の純度は非常に上がっています。さらにゲル濾過クロマトグラフィ後では、チトクロム b_5 分画は主バンドの他にわずかな夾雑物のバンドが見られるだけです。これらの結果から、チトクロム b_5 がイオン交換クロマトグラフィとゲル濾過クロマトグラフィのわずか2つの方法で、可溶化ラット肝ミクロゾーム粗抽出液から、かなりの純度で精製できることがわかります。

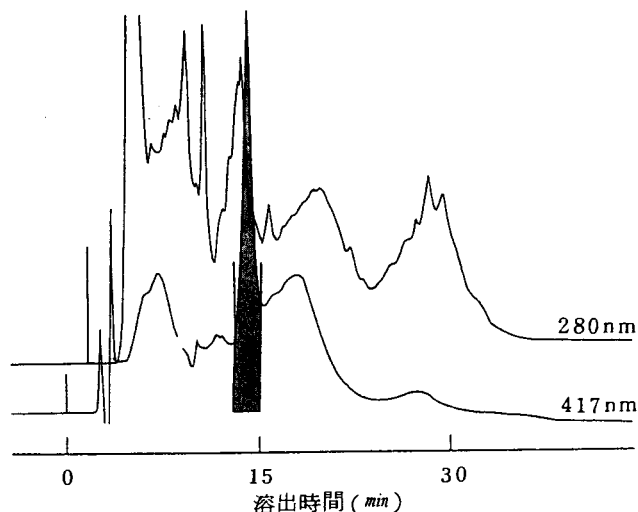


図-12 イオン交換クロマトグラフィによる分離

試料；粗ラット肝ミクロゾーム膜タンパク質(2 mg)

溶離条件；図-5(4)に同じ

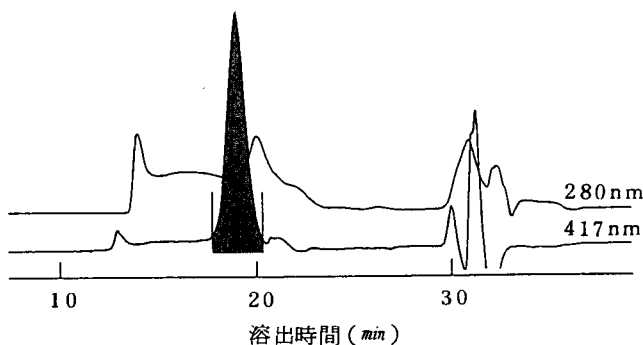


図-13 ゲル濾過クロマトグラフィによる図-12フラクション画分の分離

溶離条件；界面活性剤濃度を除き図-1に同じ

界面活性剤；0.4% $C_{12}E_8$



図-14 図-13フラクション画分 (チトクロム b_5) の SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動図

A：粗ラット肝ミクロゾーム膜タンパク質

B：図-12イオン交換クロマトグラフィフラクション画分

C：図-13ゲル濾過フラクション画分

別のHPLCモードの組み合わせも行いました。最初の段階で疎水クロマトグラフィを用います。図-15に疎水クロマトグラフィにより得られたラット肝マイクロゾーム膜タンパク質の粗抽出試料のクロマトグラムを示します。417nmの吸光度で示されるピークを集めます。この分画を透析後、イオン交換クロマトグラフィを行います。その結果を図-16に示します。417nmの吸光度で示されるクロマトグラムから約18分に溶出するピークを集めます。この分画をさらにゲル濾過クロマトグラフィで精製し、チトクロムb₅のピークを集めます。これらチトクロムb₅分画の純度検定を図-17に示しました。疎水クロマトグラフィによる分画には、まだ多くの不純物が含まれていますが、チトクロムb₅の純度は確実に上がっています。さらに次のイオン交換クロマトグラフィにより、その不純物は大幅に除かれ、最後のゲル濾過クロマトグラフィにより、最終的には、チトクロムb₅は、ほぼ単一にまで精製されています。

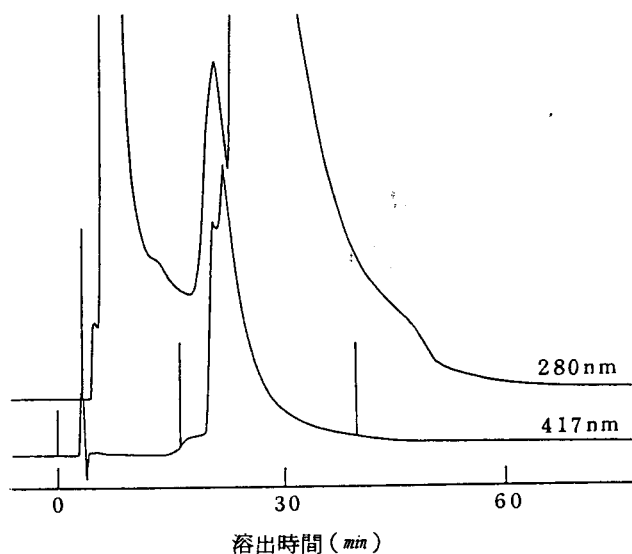


図-15 疎水クロマトグラフィによる分離

試料；粗ラット肝マイクロゾーム膜タンパク質(8.6 mg)

カラム；TSKgel Ether-5PW
7.5mmID×7.5cm

溶離液；A：0.1M トリス-HCl緩衝液(pH7.5) + 1.5M硫酸 + 0.01% C₁₂E₈ + 20%グリセロール

B：0.1M トリス-HCl緩衝液(pH7.5) + 0.04% C₁₂E₈ + 20%グリセロール

Aアイソクラティック(10分) → Bリニアグラジエント(5分) → Bアイソクラティック

流速；1.0ml/min

検出；UV(280nm) VIS(417nm)

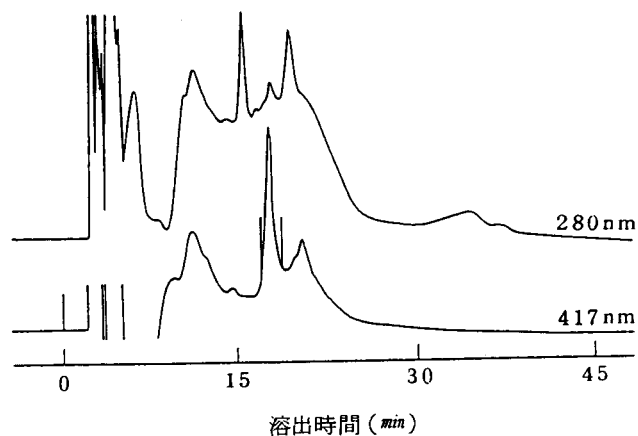


図-16 イオン交換クロマトグラフィによる図-15フラクション画分の分離

溶離条件；図-12に同じ

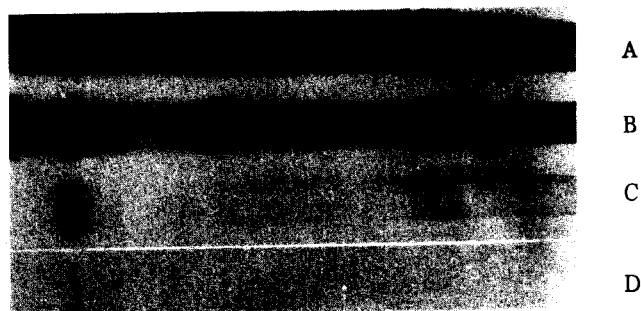


図-17 チトクロムb₅フラクション画分のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動図

A：粗ラット肝マイクロゾーム膜タンパク質

B：図-15疎水クロマトグラフィフラクション画分

C：図-16イオン交換クロマトグラフィ "

D：ゲル濾過クロマトグラフィ "

8. おわりに

本稿で示した全てのHPLCモードは、それぞれの分離モードで利用価値は異なりますが、適当な条件を選ぶことで膜タンパク質の分離に応用することができます。一般的にはイオン交換クロマトグラフィが最も有効と考えられます。逆相分配クロマトグラフィもまた、タンパク質の変性が問題でなければ非常に効果的のようです。得られる結果はクロマト条件により異なります。界面活性剤の種類と濃度が特に大きな影響を与えます。中でも、オクタエチレングリコールドデシルエーテル ($C_{12}E_8$) が万能のようです。界面活性剤濃度が十分高くないと膜タンパク質は遅れて溶出しピークは広がり、回収率も下がります。

その他の要因、たとえば流速、グラジエントの傾き、緩衝液と塩の種類、溶離液のpH等の効果は、可溶性タンパク質の場合と同様です。

参考文献

- 1) G. A. Blondin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87** (1979) 1087
- 2) A. N. Kotake and Y. Funae, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77** (1980) 6473
- 3) E. Kusunose, M. Kaku, M. Nariyama, M. Kusunose, K. Ichihara, Y. Funae and A. N. Kotake, *Biochem. Int.*, **3** (1981) 399
- 4) J. Heukeshoven and R. Dernick, *J. Chromatogr.*, **252** (1982) 241
- 5) K. K. Kohli, O. Hernandez and J. D. McKinney, *J. Liq. Chromatogr.*, **5** (1982) 367
- 6) D. Josic, W. Reutter and I. Molner, *Practical Aspects of Modern HPLC*, Walter de Gruyter, New York, 1982, p.109
- 7) H. Michel, *J. Mol. Biol.*, **158** (1982) 567
- 8) T. Konishi, *Methods Enzymol.*, **88** (1982) 202
- 9) M. A. Phelan and K. A. Cohen, *J. Chromatogr.*, **266** (1983) 55
- 10) R. V. D. Zee, S. W.-Wester and G. W. Welling, *J. Chromatogr.*, **266** (1983) 577
- 11) S. D. Power, M. A. Lochrie and R. O. Poyton, *J. Chromatogr.*, **266** (1983) 585
- 12) N. E. Tandy, R. A. Dilley and F. E. Regnier, *J. Chromatogr.*, **266** (1983) 599
- 13) G. W. Welling, G. Groen and S. W.-Wester, *J. Chromatogr.*, **266** (1983) 629
- 14) P. Kärnsäs, J. M.-Lopez and T. Kristiansen, *J. Chromatogr.*, **266** (1983) 643
- 15) G. E. Tarr and J. W. Crabb, *Anal. Biochem.*, **131** (1983) 99
- 16) P. J. Newman and R. A. Kahn, *Anal. Biochem.*, **132** (1983) 215
- 17) S. Maezawa, Y. Hayashi, T. Nakae, J. Ishii, K. Kameyama and T. Takagi, *Biochim. Biophys. Acta*, **747** (1983) 291
- 18) Y. Hayashi, T. Takagi, S. Maezawa and H. Matsui, *Biochim. Biophys. Acta*, **748** (1983) 153
- 19) T. Nakao, T. Fujita and M. Nakao, *J. Biochem.*, **94** (1983) 917
- 20) S. K. Bansal, J. Love and H. L. Gurtoo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117** (1983) 268

- 21) G. W. Welling, J. R. J. Nijmeijer, R. V. D. Zee, G. Groen, J. B. Wilterdink and S. W.-Wester, *J. Chromatogr.*, **297** (1984) 101
- 22) H. Lüdi and W. Hasselbach, *J. Chromatogr.*, **297** (1984) 111
- 23) S. K. Bansal, J. H. Love and H. L. Gurtoo, *J. Chromatogr.*, **297** (1984) 119
- 24) P. Lambotte, J. V. Snick and T. Boon, *J. Chromatogr.*, **297** (1984) 139
- 25) J. N. Kindel, B. Anspach, K. K. Unger, R. Wieser and G. Brunner, *J. Chromatogr.*, **297** (1984) 167
- 26) D. H. Calam and J. Davidson, *J. Chromatogr.*, **296** (1984) 285
- 27) D. Josić, H. Baumann and W. Reutter, *Anal. Biochem.*, **142** (1984) 473
- 28) G. Berger, M. D. Tiede and J. Breton, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **121** (1984) 47
- 29) H. S. V. Walraven, M. Grevesen and R. Kraayenhof, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **9** (1984) 163
- 30) S. D. Power, M. A. Lochrie, K. A. Sevarino, T. E. Patterson and R. O. Poyton, *J. Biol. Chem.*, **259** (1984) 6564
- 31) H. Ikigai, T. Nakae and Y. Kato, *J. Chromatogr.*, **322** (1985) 212
- 32) J. Heukeshoven and R. Dernick, *J. Chromatogr.*, **326** (1983) 91
- 33) G. Winkler, F. X. Heinz, F. Guirakhoo and C. Kunz, *J. Chromatogr.*, **326** (1985) 113
- 34) N. Muto and L. Tan, *J. Chromatogr.*, **326** (1985) 137
- 35) G. W. Welling, G. Groen, K. Slopsema and S. W.-Wester, *J. Chromatogr.*, **326** (1985) 173
- 36) J. L. McGregor, P. Clezardin, M. Manach, S. Gronlund and M. Dechavanne, *J. Chromatogr.*, **326** (1985) 179
- 37) C. S. Ric rd and L. S. Sturman, *J. Chromatogr.*, **326** (1985) 191
- 38) D. D. Muccio and L. J. Delucas, *J. Chromatogr.*, **326** (1985) 243
- 39) L. Tan and N. Muto, *LC, Liq. Chromatogr., HPLC Mag.*, **3** (1985) 522
- 40) H. Matern, *LC, Liq. Chromatogr. HPLC Mag.*, **3** (1985) 994
- 41) Y. Funae and S. Imaoka, *Biochim. Biophys. Acta*, **842** (1985) 119
- 42) Y. Funae, R. Seo and S. Imaoka, *Biochem. Int.*, **11** (1985) 523
- 43) Y. Funae, A. N. Kotake and K. Yamamoto, in H. Parvez, S. Parvez and Y. Kato (Editors), *Progress in HPLC*, Vol. 1, VNU Science Press, Utrecht, 1985, p.59
- 44) D. Josić, W. Schütt, J. V. Renswoude and W. Reutter, *J. Chromatogr.*, **353** (1986) 13
- 45) R. S. Matson and S. C. Goheen, *J. Chromatogr.*, **359** (1986) 285
- 46) S. C. Goheen and T. M. Chow, *J. Chromatogr.*, **359** (1986) 297
- 47) G. W. Welling, K. Slopsema and S. W.-Wester, *J. Chromatogr.*, **359** (1986) 307
- 48) D. Josić, W. Hofmann, B. Wieland, R. Nuck and W. Reutter, *J. Chromatogr.*, **359** (1986) 315
- 49) P. Tempst, D. D.-L. Woo, D. B. Teplow, R. Aebersold, L. E. Hood and S. B. H. Kent, *J. Chromatogr.*, **359** (1986) 403
- 50) Y. Funao, R. Seo and S. Imaoka, *J. Chromatogr.*, **374** (1986) 271
- 51) S. Imaoka and Y. Funae, *J. Chromatogr.*, **375** (1986) 83
- 52) J. R. Deschamps, *J. Liq. Chromatogr.*, **9** (1986) 1635
- 53) R. S. Matson and S. C. Goheen, *LC-GC, Mag. Liq. Gas Chromatogr.*, **4** (1986) 624
- 54) Y. Kato, K. Komiya and T. Hashimoto, *J. Chromatogr.*, **246** (1982) 13
- 55) Y. Kato, K. Nakamura, Y. Yamazaki and T. Hashimoto, *J. Chromatogr.*, **318** (1985) 358