



TOSOH

SEPARATION REPORT

超高性能イオン交換クロマトグラフィ用充填カラム TSKgel DEAE-NPRおよびTSKgel SP-NPRについて (タンパク質の分離)

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 基本的性質	1
3. カラム使用上の注意	6
4. 応用例	6
5. おわりに	9

1. はじめに

液体クロマトグラフィの高速化、高分離能化は、最初、粒子径数十 μm のガラスビーズ表面に固定相を薄くコーティングしたペリキュラー型充填剤で達成されました。その後、小粒子径の多孔性充填剤の優位性が確認され、以来高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 用にはほとんどすべての分離モードにおいて多孔性充填剤が使用されてきました。一方非多孔性充填剤は充填剤にポア (穴) がないので、試料ピークの広がり小さく抑えることができます。そのため、分離に関しては非多孔性充填剤の方が優れていると言えます。

最近、Ungerらは、粒子径 $1.5\mu\text{m}$ の非多孔性シリカゲルを用いたタンパク質のアフィニティクロマトグラフィ、逆相クロマトグラフィおよび疎水性クロマトグラフィを検討し^{1)~5)}、非多孔性充填剤の有効性を見出しました。また他の研究者もその有用性を報告しています。

本稿では、当社で開発された非多孔性イオン交換体 TSKgel DEAE-NPR および TSKgel SP-NPR の基本的性質と使用上の注意点、さらにタンパク質分離への応用について報告いたします。

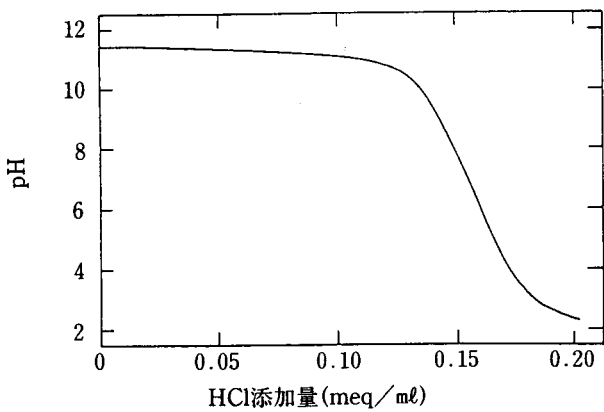


図-1 TSKgel DEAE-NPRの滴定曲線

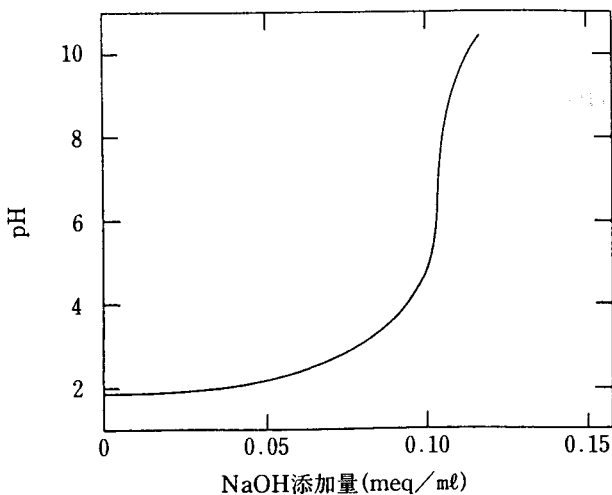


図-2 TSKgel SP-NPRの滴定曲線

2. 基本的性質

(1) 交換容量とタンパク質結合量

図-1 および図-2 に TSKgel DEAE-NPR および TSKgel SP-NPR の滴定曲線を示します。これらの総交換容量は膨潤ゲル 1 ml 当たりそれぞれ約 0.15 および 0.10 meq に調節されています。また、pKa は、それぞれ 11.2 および 2.3 付近です。したがって TSKgel DEAE-NPR では、pH 11 以下で、TSKgel SP-NPR では pH 2.5 以上でタンパク質の分離が可能です。

タンパク質結合量は、TSKgel DEAE-NPR は、ウシ血清アルブミン、TSKgel SP-NPR はヘモグロビンを用いてそれぞれ測定したところ、ともに約 5 mg/ml でした。

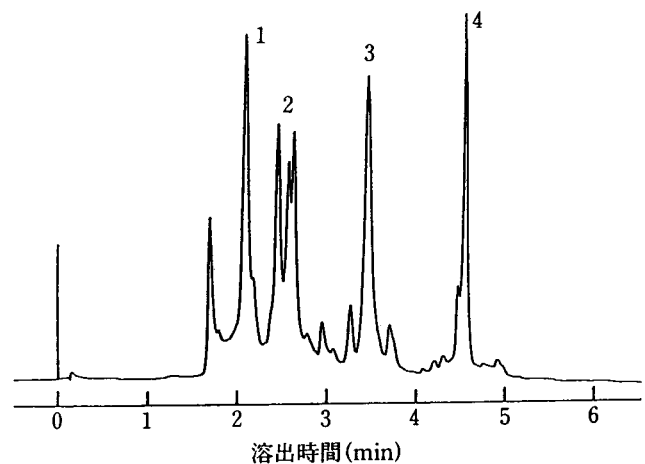


図-3 TSKgel DEAE-NPR による標準タンパク質混合物の分離

カラム; TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm

溶離液; A: 20mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 8.0)

B: A + 0.5M NaCl

A→B リニアグラジエント (10分)

流速; 1.5ml/min

温度; 25°C

検出; UV (280nm)

試料; 1. コンアルブミン 2. トランスフェリン

3. オブアルブミン 4. トリプシンインヒビター

(2)標準タンパク質の分離

図-3(前ページ)および図-4に標準タンパク質のTSKgel DEAE-NPRおよびTSKgel SP-NPRによる分離例を示します。いずれも約5分で良好に分離されています。溶離条件を変更すれば、多少分離能の低下をもたらしますが、さらに早く溶出させることも可能です。次に非多孔性充填剤と従来の多孔性充填剤との分離の比較を行いました。図-5および図-6にTSKgel DEAE-NPRとTSKgel DEAE-5PW、TSKgel SP-NPRとTSKgel SP-5PWでのタンパク質の分離を、それぞれの標準溶離条件で行った場合の比較を示します。TSKgel DEAE-NPRおよびTSKgel SP-NPRの方が、多孔性イオン交換体であるTSKgel DEAE-5PWやTSKgel SP-5PWよりも非常に短い分離時間(約6分の1)で高い分離能が得られます。

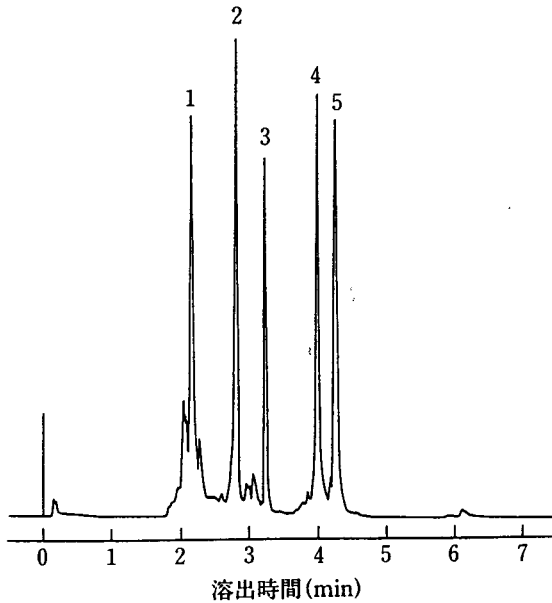


図-4 TSKgel SP-NPRによる標準タンパク質混合物の分離

カラム; TSKgel SP-NPR 4.6mmID×3.5cm

溶離液; A: 20mM酢酸緩衝液(pH5.0)

B: A+0.5M Na₂SO₄

A→Bリニアグラジエント(10分)

流速; 1.5ml/min

温度; 25°C

検出; UV(280nm)

試料; 1: トリプシノーゲン

2: α-キモトリプシノーゲン

3: リボヌクレアーゼ

4: リゾチーム

5: チトクロムC

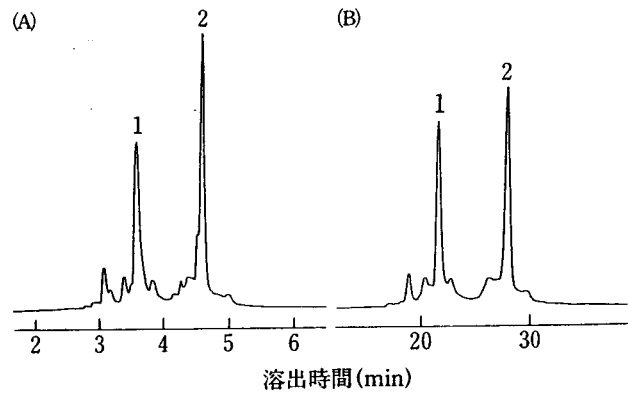


図-5 TSKgel DEAE-NPRとTSKgel DEAE-5PWの比較

(A) カラム; TSKgel DEAE-NPR

4.6mmID×3.5cm

溶離条件; 図-3に同じ

(B) カラム; TSKgel DEAE-5PW

7.5mmID×7.5cm

溶離条件; グラジエント時間及び流速を除き図-3に同じ

グラジエント時間; 60分

流速; 1.0ml/min

試料(A、B共); 1. オブアルブミン

2. トリプシンインヒビター

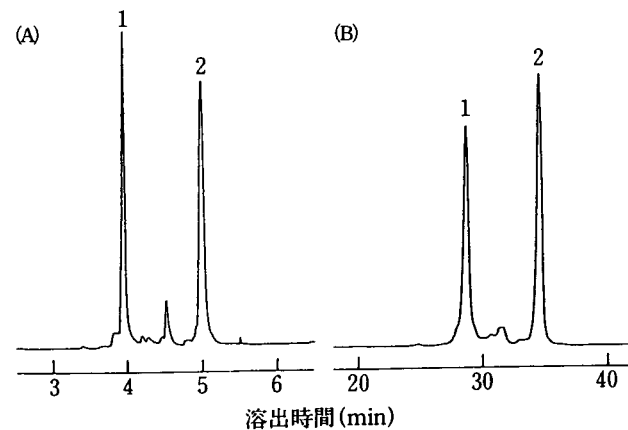


図-6 TSKgel SP-NPRとTSKgel SP-5PWの比較

(A) カラム; TSKgel SP-NPR 4.6mmID×3.5cm

溶離条件; 図-4に同じ

(B) カラム; TSKgel SP-5PW 7.5mmID×7.5cm

溶離条件; グラジエント時間及び流速を除き図-4に同じ

グラジエント時間; 60分

流速; 1.0ml/min

試料(A、B共); 1. α-キモトリプシノーゲン

2. リボヌクレアーゼ

(3)分離能の流速依存性

図-7にTSKgel DEAE-NPRの分離能への流速の影響を示します。流速の増加とともに分離能は徐々に向上していますが、1.0ml/min以上では分離能の流速依存性が小さくなっています。流速の増加につれて溶出時間は、わずかつ短くなり分離時間が短縮できますが、溶離液による試料の希釈も大きくなります。これらのことを考慮すると、流速は1.0~1.5ml/minが最適であると言えます。またTSKgel SP-NPRでも同様の結果を得ています。

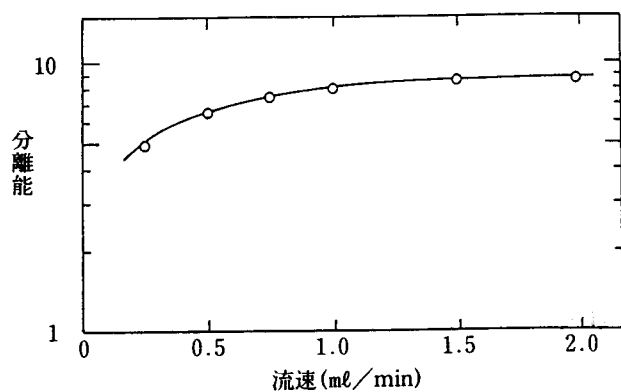


図-7 TSKgel DEAE-NPRを用いたタンパク質の分離における分離能の流速依存性

カラム; TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
溶離条件; 図-3に同じ(流速を除く)

流速; 0.25~2.0ml/min

試料; オブアルブミン、トリプシンインヒビター

分離能; 上記2つのタンパク質のピーク幅と溶出容量から算出

(4)分離能のグラジエント時間依存性

図-8にTSKgel DEAE-NPRの分離能へのグラジエント時間の影響を示します。グラジエント時間の延長とともに分離能が向上していますが、10分以上では分離能のグラジエント時間依存性が小さくなっています。グラジエント時間を長くすると、分離時間が長くなり、また試料の希釈が大きくなります。以上を考慮すると、グラジエント時間は5~10分が最適と思われます。またTSKgel SP-NPRでも同様の結果が得られています。

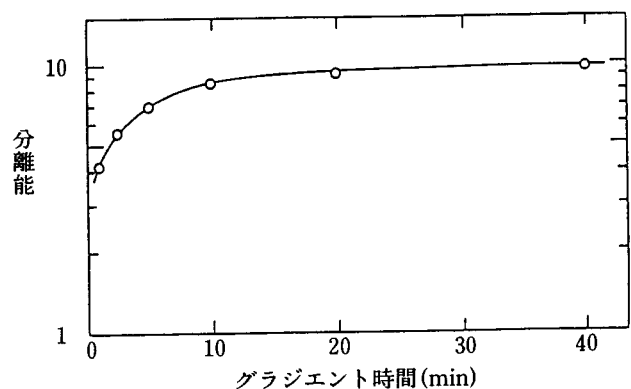


図-8 TSKgel DEAE-NPRを用いたタンパク質分離における分離能のグラジエント時間依存性

カラム; TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
溶離条件; 図-3に同じ(グラジエント時間を除く)

グラジエント時間; 1~40分

分離能; 図-7と同様にして算出

(5) 試料負荷量

数種の精製タンパク質を用い、最大試料負荷量の検討を行いました。図-9にTSKgel DEAE-NPRにおけるオブアルブミンとトリプシンインヒビターの分離能への試料負荷量の影響を示します。10 μ g(各5 μ g)までは一定の分離能が得られていますが、それ以上では分離能の低下が見られます。次に、三種の精製タンパク質を用いて試料負荷量に対するピーク幅の変化を調べました(図-10)。5 μ gまでは一定のピーク幅が得られていますが、それ以上の負荷量ではピーク幅が徐々に広がりました。これらのことにより、精製タンパク質の最大試料負荷量は約5 μ gであると言えます。またTSKgel SP-NPRでも同様な結果を得ています。さらに不純物の多い粗製タンパク質に対しても、試料負荷量の検討を行いました。試

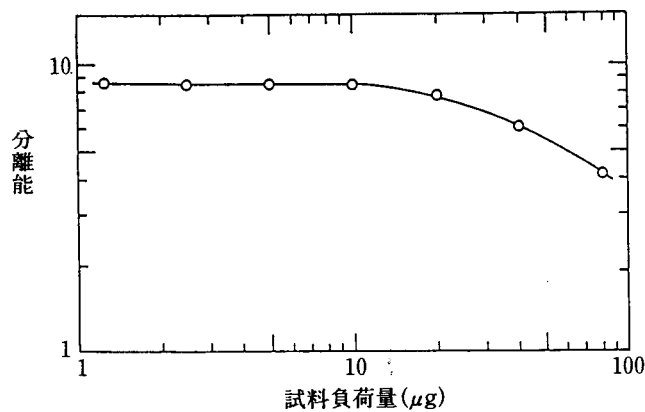


図-9 TSKgel DEAE-NPRを用いたタンパク質分離における分離能の試料負荷量依存性

カラム; TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID \times 3.5cm
 溶離条件; 図-3に同じ
 試料および分離能; 図-7に同じ

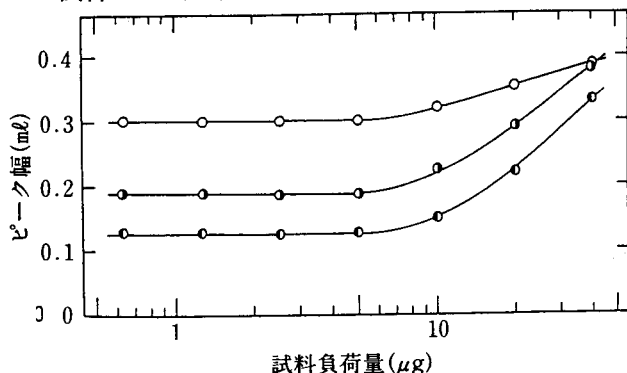


図-10 TSKgel DEAE-NPRを用いたタンパク質分離における試料負荷量のピーク幅への影響

カラム; TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID \times 3.5cm
 溶離条件; 図-3に同じ
 試料; ○— コンアルブミン
 ●— オブアルブミン
 ■— トリプシンインヒビター

料には市販粗製リポキシダーゼを用いました。試料量50 μ gと200 μ gのクロマトグラムを図-11 (TSKgel DEAE-NPR) および図-12 (TSKgel SP-NPR) に示します。いずれも試料量50 μ gと200 μ gとでパターンに大きな差はなく良好に分離されています。しかし200 μ g以上になると分離能は低下しました。したがって粗製タンパク質の最大試料負荷量は、不純物の割合により変動は予想されますが、約200 μ gであると考えられます。

以上、精製タンパク質および粗製タンパク質の最大試料負荷量について述べましたが、これらはいずれも従来の多孔性充填剤と比較してかなり小さい値 (TSKgel DEAE-5PWおよびTSKgel SP-5PWの約100分の1) となっています。

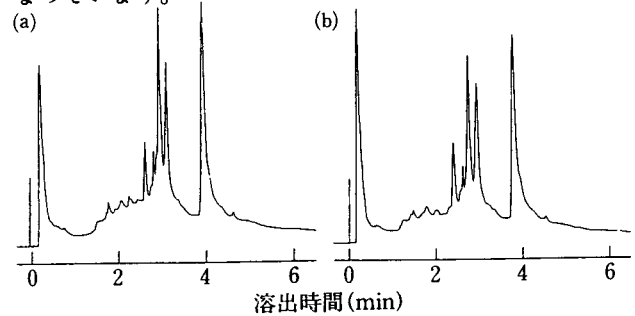


図-11 TSKgel DEAE-NPRを用いた粗製リポキシダーゼの分離

カラム; TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID \times 3.5cm
 溶離条件; 図-3に同じ
 試料量; 粗製リポキシダーゼ (a) 50 μ g (b) 200 μ g

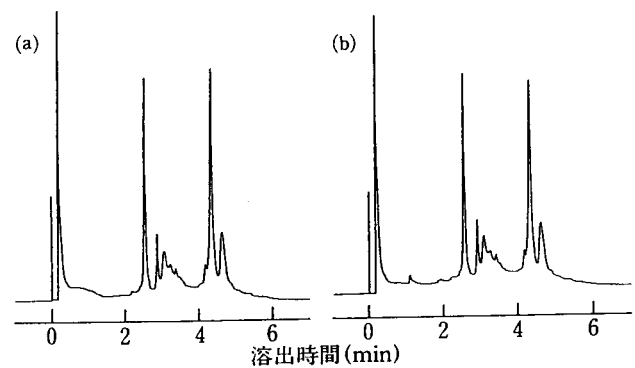


図-12 TSKgel SP-NPRによる粗製リポキシダーゼの分離

カラム; TSKgel SP-NPR 4.6mmID \times 3.5cm
 溶離液; A: 20mM酢酸緩衝液 (pH4.5)
 B: A+0.5M Na₂SO₄
 A \rightarrow Bリニアグラジエント(10分)

流速; 1.5ml/min
 温度; 25 $^{\circ}$ C
 検出; UV(280nm)

試料量; 粗製リポキシダーゼ (a) 50 μ g (b) 200 μ g

(6) タンパク質回収率

表-1および表-2にTSKgel DEAE-NPRおよびTSKgel SP-NPRのタンパク質の回収率を示します。すべて負荷量は5 μ gで標準溶離条件での回収率を測定しました。TSKgel DEAE-NPRおよびTSKgel SP-NPRで、ほぼ90%以上の高い回収率が得られています。

表-1 TSKgel DEAE-NPRによるタンパク質の回収率

タンパク質	回収率(%)
チログロブリン	100
フェリチン	99
γ -グロブリン	104
ウシ血清アルブミン	102
ヘモグロビン	91
オブアルブミン	103
β -ラクトグロブリン	101
トリプシンインヒビター	98

カラム; TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID \times 3.5cm

溶離条件; 図-3に同じ

試料; 各種タンパク質(5 μ g)

回収率; 溶出ピークの面積から算出

(7) カラムの圧力損失

TSKgel DEAE-NPRおよびTSKgel SP-NPRは、粒子径2.5 μ mという微細粒子を使用しているため圧力損失の問題が考えられます。しかし非多孔性であるため多孔性充填剤よりも機械的強度が大きく、流速1.5ml/minで流したときの圧力損失は、TSKgel DEAE-NPR、TSKgel SP-NPRともに100~150kg/cm²であり、使用上問題はありませぬ。

表-2 TSKgel SP-NPRによるタンパク質の回収率

タンパク質	回収率(%)
ヘモグロビン	88
α -キモトリプシノーゲンA	95
α -キモトリプシン	100
トリプシノーゲン	87
リゾチーム	96
リボヌクレアーゼA	95
チトクロムC	93

カラム; TSKgel SP-NPR 4.6mmID \times 3.5cm

溶離液; A: 20mMリン酸緩衝液(pH7.0)

B: A+0.5M NaCl

A \rightarrow Bリニアグラジエント(10分)

流速; 1.5ml/min

温度; 25 $^{\circ}$ C

検出; UV(280nm)

試料; 各種タンパク質(5 μ g)

回収率; 溶出ピークの面積から算出

3. カラム使用上の注意

非多孔性イオン交換体 TSKgel DEAE-NPR および TSKgel SP-NPR は微量試料でも分離分析できる、非常に高性能の充填カラムです。しかし一方では、カラムの汚れに対しても非常に敏感です。したがって、これらのカラムを効率良く使用するためには、カラムの保守に対して、従来の多孔性充填剤・カラムよりも、一層の注意が必要です。

(1) 緩衝液

カラムは試料中の汚れからくる汚染のほか、緩衝液に使用した水や試薬中の不純物により汚染されます。したがって水には超純水、HPLC用蒸留水、注射用蒸留水などを使用し、試薬類はHPLC用グレードまたは特級品を使用し、緩衝液はフィルター (0.22 μ m または 0.45 μ m) で濾過したものをご使用ください。

(2) HPLCシステム

カラム内への微粒子や不純物の進入を防ぐため、カラムと送液ポンプの間にラインフィルター (0.22 μ m または 0.45 μ m) を取り付けてください。使用中にシステムの圧力損失が150kg/cm²以上 (流速1.0ml/minで) に上昇した場合は、ラインフィルターが目づまりを起こしていると考えられるので、交換してください。

(3) 洗浄再生

カラムの分離能低下の原因の1つに、試料中の不純物の充填剤への吸着による劣化が考えられます。この場合、カラムをアルカリ等の溶液で洗浄すると、回復することがあります。詳細については、カラムに添付されている取扱説明書を参照してください。

4. 応用例

(1) タンパク質の純度チェック

図-13に起源の異なる二種のプロテインAのTSKgel DEAE-NPRによるクロマトグラムを示します。Repligen社製の遺伝子組み換え大腸菌産物のプロテインAは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、また生化学工業社製の黄色ブドウ球菌由来のプロテインAは、ディスク電気泳動で、それぞれシングルバンドしか確認されていない高純度タンパク質として市販されています。しかし図に示すように、いずれの試料においても複数のピークがみられます。このことはTSKgel DEAE-NPRによるイオン交換クロマトグラフィーで電気泳動よりも高い分離能が得られることを示唆しています。また分離時間が約5分と非常に短いことから、TSKgel DEAE-NPRやTSKgel SP-NPRによるタンパク質の分離は、電気泳動法に代わる純度チェックや製品の品質管理の手段として有用であると考えられます。

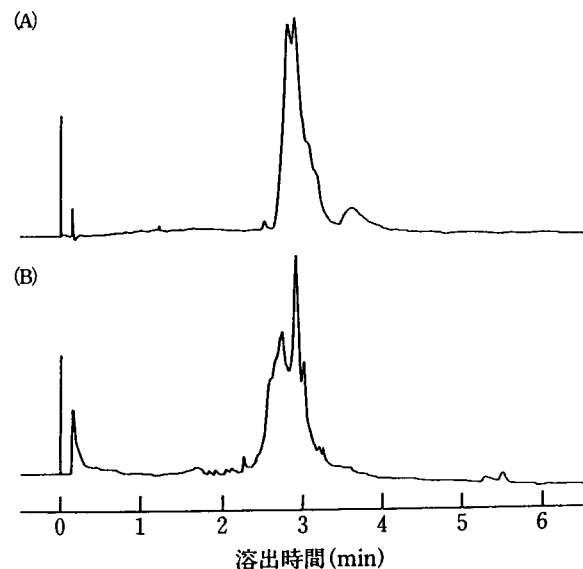


図-13 TSKgel DEAE-NPRを用いた市販精製プロテインAの分離

カラム; TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
分離条件; 図-3に同じ

試料; (A)大腸菌遺伝子組み換え産物(Repligen社)
(B)*Staphylococcus aureus*産物(生化学工業社)

次に図-14にTSKgel DEAE-NPRによる市販精製 α -キモトリプシンの純度チェックを示します。 α -キモトリプシンは等電点8.5の塩基性タンパク質ですが、溶離液にpH10.3の1,3-ジアミノプロパン-塩酸緩衝液を使用し、 α -キモトリプシンにマイナスの電荷を帯びさせるとTSKgel DEAE-NPRに吸着し、分離が可能でした。クロマトグラムには、不純物と思われるピークおよびショルダーが見られました。 α -キモトリプシンと思われるメインピークをフラクションしたところ、活性回収率は80%でした。同フラクションはTSKgel Phenyl-5PW RPによる逆相分配クロマトグラフィで純度検定し、高純度であることが確認されました。

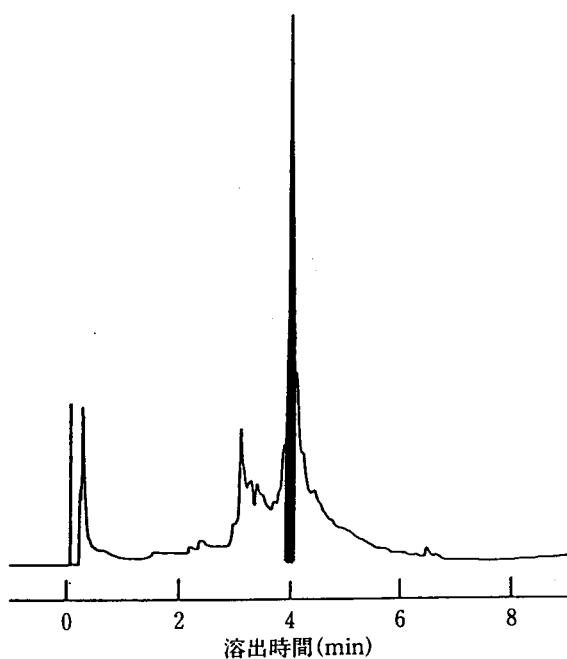


図-14 TSKgel DEAE-NPRによる α -キモトリプシンの分離

カラム；TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
 溶離液；A：20mM 1,3-ジアミノプロパン-HCl
 緩衝液(pH10.3)
 B：A+0.5M NaCl
 A→Bリニアグラジエント(20分)

流速；1.5ml/min

温度；25°C

検出；UV(280nm)

試料；市販 α -キモトリプシン(5 μ g)

活性回収率；80%

(2)微量タンパク質の分離精製

図-15に分子量10万の市販粗製ヘキソキナーゼ25 μ gのTSKgel DEAE-NPRによる分離のクロマトグラムを示します。4.5分に溶出されたピークに酵素活性がみられ、このピークをフラクションしたところ、活性回収率は85%でした。

図-16に市販粗製カタラーゼ50 μ gのTSKgel DEAE-NPRによる分離のクロマトグラムを示します。カタラーゼ活性は、やや広い分画に溶出されましたが、これは、アイソザイムが分離されたものと思われます。活性回収率は92%でした。図-17にフラクションの逆相分配クロマトグラフィによる純度検定の結果を示します。図には1本のメインピークと溶媒ピークを含む数本の小さなピークが見られ、カタラーゼがかなり精製されていることが示唆されます。

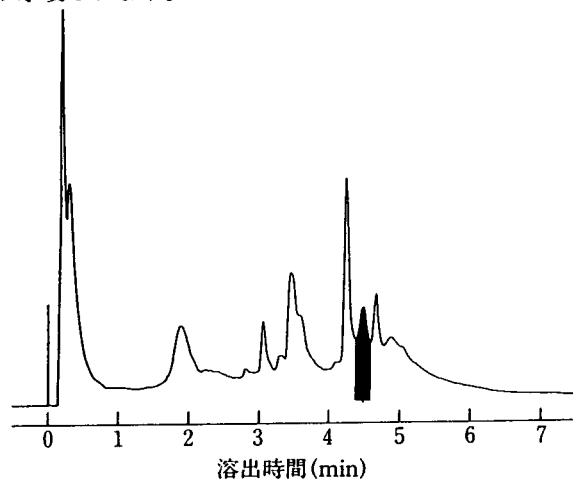


図-15 TSKgel DEAE-NPRによるヘキソキナーゼの分離

カラム；TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
 溶離条件；図-3に同じ

試料；粗製ヘキソキナーゼ(25 μ g)

活性回収率；85%

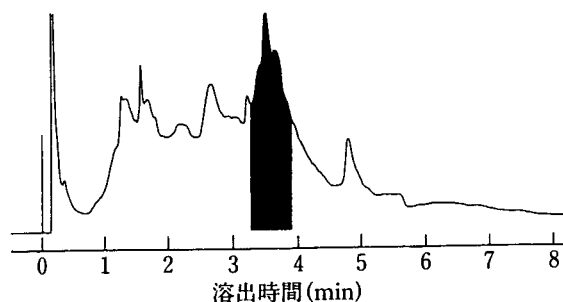


図-16 TSKgel DEAE-NPRによるカタラーゼの分離

カラム；TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm
 溶離条件；図-3に同じ

試料；粗製カタラーゼ(50 μ g)

活性回収率；92%

(3)その他の応用例

図-18にTSKgel SP-NPRによるヒトヘモグロビンスタンダードの分離のクロマトグラムを示します。グリコヘモグロビンの測定は、糖尿病のスクリーニングテストとして、また糖尿病患者の長期血糖コントロールの指標として注目され、すでに臨床検査の項目に上がっています。図に示すように約1.2分にグリコヘモグロビン(HbA_{1c})と思われるピークが溶出し、約2.4分に溶出するヘモグロビン(HbA₀)のピークと良好に分離されています。このように微量試料で短時間に高分離能が得られるTSKgel SP-NPRやTSKgel DEAE-NPRは、リアルタイムの検査報告が要求される臨床検査への応用が可能であると考えられます。

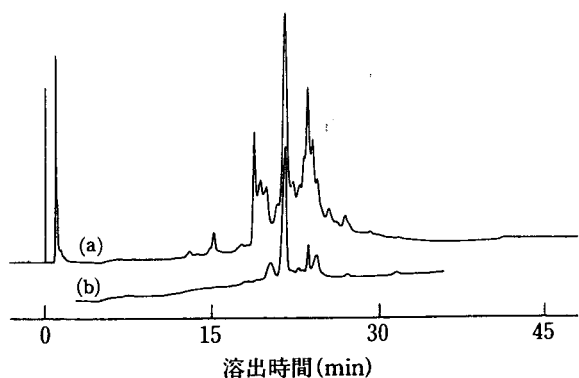


図-17 図-16におけるカタラーゼ画分のTSKgel Phenyl-5PW RPによる純度検定

カラム；TSKgel Phenyl-5PW RP

4.6mmID×7.5cm

溶離液；A：0.05%TFA+5%アセトニトリル

B：0.05%TFA+20%アセトニトリル

C：0.05%TFA+80%アセトニトリル

A→Bリアグラジエント(2分)

B→Cリアグラジエント(48分)

流速；1.0ml/min

温度；25°C

検出；UV(220nm)

試料；(a)粗製カタラーゼ

(b)図-16におけるカタラーゼ画分

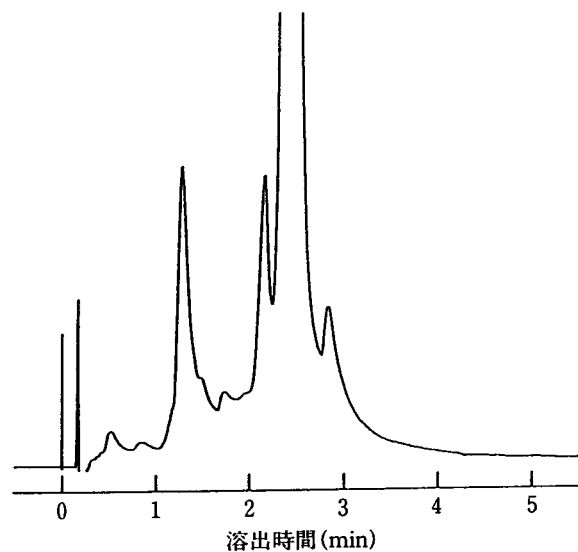


図-18 TSKgel SP-NPRによるヒトヘモグロビンの分離

カラム；TSKgel SP-NPR 4.6mmID×3.5cm

溶離液；A：20mMピストリス-HCl緩衝液(pH 6.0)

B：A+0.2M NaCl

A/B(75/25)→Bリアグラジエント(3分)

流速；1.5ml/min

温度；25°C

検出；VIS(415nm)

試料；ヒトヘモグロビンスタンダード

4. おわりに

非多孔性イオン交換体TSKgel DEAE-NPRおよびTSKgel SP-NPRによるクロマトグラフィにより、微量の試料を、短時間でしかも高分離能で分離することができます。したがって分析時間のスピードが要求される臨床検査や、大量精製における生産過程の工程管理や純度チェックなどへの応用が考えられます。

一方、非多孔性充填剤は、充填剤の表面積が小さいことから、多孔性充填剤に比べ試料負荷量はかなり少なく、大量精製や大量分取には向きません。しかし微量試料でも回収率が高いことから、ホルモンや遺伝子組み換え産物などの微量試料の分取には適していると考えられます。

引用文献

- 1) B. Anspach, K. K. Unger, H. Giesche and M. T. W. Hearn; paper presented at the 4th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides, Baltimore, USA, December 1984, paper 103.
- 2) K. K. Unger, G. Jilge, J. N. Kinkel and M. T. W. Hearn; *J. Chromatogr.*, **359** (1986) 61.
- 3) G. Jilge, R. Janzen, H. Giesche, K. K. Unger, J. N. Kinkel and M. T. W. Hearn; paper presented at the 6th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides, Baden-Baden, FRG, October 1986, paper 202.
- 4) R. Janzen, K. K. Unger, H. Giesche, J. N. Kinkel and M. T. W. Hearn; paper presented at the 6th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides, Baden-Baden, FRG, October 1986, paper 208.
- 5) R. Janzen, K. K. Unger, H. Giesche, J. N. Kinkel and M. T. W. Hearn; paper presented at the 6th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides, Baden-Baden, FRG, October 1986, paper 112.
- 6) D. J. Burke, J. K. Duncan, L. C. Dunn, L. Cummings, C. J. Siebert and G. S. Ott; *J. Chromatogr.*, **353**, 425 (1986).
- 7) D. J. Burke, J. K. Duncan, C. Siebert and G. S. Ott; *J. Chromatogr.*, **359**, 533 (1986).
- 8) L. F. Colwell Jr. and R. A. Hartwick; *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **9**, 304 (1986).