



SEPARATION REPORT

高性能群特異性アフィニティクロマトグラフィ用充填カラムについて

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 基本的性質	1
3. タンパク質等の分離の応用例	3
4. おわりに	13

1. はじめに

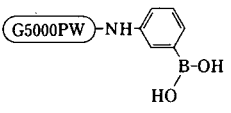
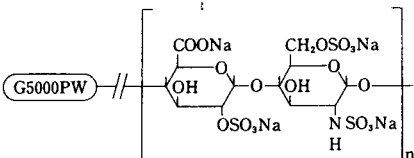
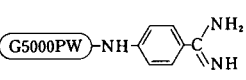
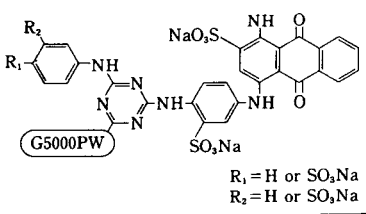
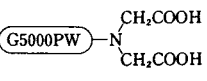
最近、タンパク質、核酸等の生体高分子における分離精製において液体クロマトグラフィの発展は目覚ましく、イオン交換クロマトグラフィ(IEC)や逆相分配クロマトグラフィ(RPC)では、数分間で分離が可能になってきています。このように充填剤の超高性能化が進む中で分離機構のユニークさで最近注目を浴びているのがアフィニティクロマトグラフィ(AFC)です。AFCは汎用性のある充填剤と違いタンパク質等の精製に特に有効です。

ここでは、高性能AFC用充填剤として開発されたTSKgel Boronate-5PW、TSKgel Heparin-5PW、TSKgel ABA-5PW、TSKgel Blue-5PW、TSKgel Chelate-5PWの基本的性質およびその応用例を示します。

2. 基本的性質

本レポートで紹介する高性能AFC用充填剤TSKgel Boronate-5PW、TSKgel Heparin-5PW、TSKgel ABA-5PW、TSKgel Blue-5PW、TSKgel Chelate-5PWは、すべて高性能ゲル透過クロマトグラフィ用充填剤TSKgel G5000PWにリガンドとして、それぞれm-アミノフェニルボロン酸、ヘパリン、p-アミノベンズアミジン、チバクロンブル-F3G-A、イミノジ酢酸が固定化されています。これらの充填剤は、親水性ポリマーを基材としておりポアサイズも約1000Åと大きいので高分子量のタンパク質にも適用できます。表1に各種充填剤の構造と適用試料を示します。

表1 各種充填剤に適用できる生体成分

カラム	適用試料
TSKgel Boronate-5PW 	<ul style="list-style-type: none"> 糖タンパク質(アミラーゼ、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ等) セリンプロテアーゼ¹⁾(トリプシン、キモトリプシン、ズブチリン等) RNA (t-RNA²⁾等) カテコールアミン²⁾・ヌクレオシド
TSKgel Heparin-5PW 	<ul style="list-style-type: none"> 血液凝固因子³⁾(アンチトロンビンIII、トロンピン、FactorVII等) 制限酵素 リパーゼ・リポプロテイン・リパーゼ³⁾・コラーゲナーゼ等 血栓溶解タンパク質⁴⁾
TSKgel ABA-5PW 	<ul style="list-style-type: none"> 血液凝固因子⁵⁾(トロンピン、FactorX等) トリプシン類似プロテアーゼ(トリプシン、エンテロキナーゼ⁶⁾、カリクレイン、ウロキナーゼ等) 血栓溶解タンパク質⁴⁾
TSKgel Blue-5PW  <p>R₁ = H or SO₃Na R₂ = H or SO₃Na</p>	<ul style="list-style-type: none"> NAD(P)依存性酵素(乳酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素等) アルブミン インターフェロン 血栓溶解タンパク質⁴⁾
TSKgel Chelate-5PW 	<ul style="list-style-type: none"> 血清タンパク質(α₂-マクログロブリン等) 膜タンパク質(セパレーションレポートNo.050参照) レクチン(RCA、ConA等) ペプチド⁷⁾ 抗体(IgG等) 血栓溶解タンパク質⁴⁾

(1) TSKgel Boronate-5PWについて

TSKgel Boronate-5PWは図1で示す様に、糖タンパク質等を吸着します。これは、フェニルホウ酸がアルカリ性領域において、四面体構造をとり、これが糖のシス-ジオールと結合することにより吸着が起こるといわれています。1)

このように、TSKgel Boronate-5PWはアルカリ性領域でタンパク質等を吸着するので、吸着緩衝液にはアルカリ領域で緩衝能があるHEPESやモルフォリン等が適当です。さらに、Mg²⁺はタンパク質の吸着を強める作用があるために、吸着緩衝液に添加することが望まれます。しかし、トリス等のアミン系の緩衝液は、吸着を阻害するために吸着緩衝液としては不適当です。

溶出緩衝液には、ソルビトールやリボース等の糖アルコール、あるいはトリス等のアミンを吸着緩衝液に加えたものが使用できます。さらに、溶離液のpHを下げることもタンパク質の溶出には効果的です。

(2) TSKgel Heparin-5PWについて

TSKgel Heparin-5PWは表1で示したヘパリン(繰り返し二糖構造をもつムコ多糖)を導入した充填剤です。

このTSKgel Heparin-5PWは固定化したヘパリンのスルホン酸基やカルボキシル基の陰イオン基およびヘパリン自体の立体構造によって血液凝固因子等を吸着すると考えられます。したがって吸着緩衝液には中性領域に緩衝能があるリン酸緩衝液等が適当です。また、溶出には、塩やヘパリンを含む緩衝液を使用します。

(3) TSKgel ABA-5PWについて

TSKgel ABA-5PWには表1に示したp-アミノベンズアミジンが固定化されています。p-アミノベンズアミジンは、トリプシン類似プロテアーゼの阻害剤としての働きを持ち、この作用により吸着が起こります。

使用法としては一般に、トリス等のアルカリ性領域に緩衝能がある緩衝液で吸着させpHを下げることでタンパク質を溶出させます。

(4) TSKgel Blue-5PWについて

TSKgel Blue-5PWは表1で示したチバクロンブルーF3G-Aを固定化した充填剤です。このチバクロンブルーは補酵素NADと立体構造が極めて類似しているため、NAD(P)依存性酵素を特異的に吸着します。またスルホン酸基を持っているためイオンの吸着も起こります。

使用法としては吸着緩衝液にpH 6~8(ビス-トリス、トリス、リン酸ナトリウム等)の緩衝液が適当です。また、溶出には1~3Mの塩や基質、NAD等を加えた緩衝液で行うことができます。

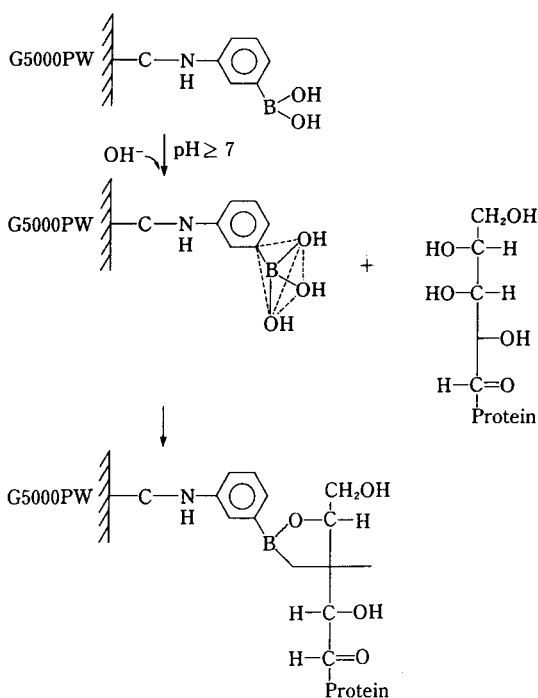


図1 糖タンパク質の吸着機構

(5) TSKgel Chelate-5PWについて

TSKgel Chelate-5PWは、イミノジ酢酸が導入されています。イミノジ酢酸は金属イオンを配位的にとらえるために金属をあらかじめ吸着させておくことにより金属に対して親和性のあるタンパク質を分離できます。⁸⁾ 使用法としては、あらかじめ金属をカラムに飽和させた後、金属とタンパク質が結合しやすい中性領域(pH 7~8)の緩衝液で平衡化して目的タンパク質を吸着させます。溶出は、グリシンを加えることによって行えます。⁸⁾ ただしグリシンは、溶出力が強く金属も溶出させるのでUV(280nm)に吸収のある金属はカラムに飽和して使うことはできません。また、一回ごとに金属をEDTAで洗い流し再度金属を飽和再生しなければなりません。これに対して吸着緩衝液に、リン酸緩衝液を用いタンパク質の溶出にイミダゾールを用いれば金属はほとんど漏れることはありません。そのため、一回ごとにカラムを再生する必要はありません。しかし、金属に対して親和性の強いタンパク質は、溶出しないことがありますので注意する必要があります。

3. タンパク質等の分離の応用例

(1) TSKgel Boronate-5PWによる応用

図2にヌクレオシドの分離を示します。ヌクレオシドはリボース糖の2、3位のシス-ジオールと核酸塩基の差によって分離します。ポアサイズが大きいため若干ピークは広がっていますが4種類のヌクレオシドはきれいに分離しています。

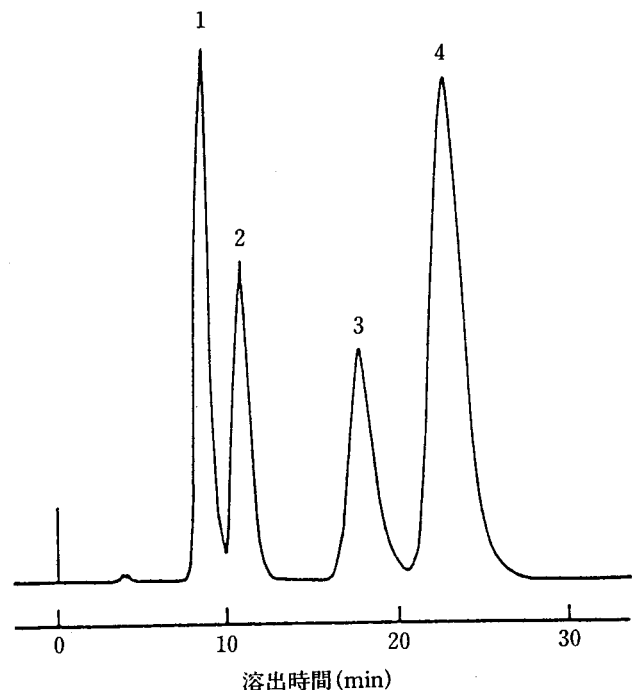


図2 TSKgel Boronate-5PWによるヌクレオシドの分離

カラム； TSKgel Boronate-5PW (7.5 mm ID×7.5 cm)

溶離液； 0.1M リン酸緩衝液(pH8.0)

流速； 1.0 ml/min

検出； UV(260nm)

試料； 1. シチジン 2. ウリジン

3. グアノシン 4. アデノシン

次に図3、4に糖タンパク質、図5にトリプシンの分離を示します。図3、4からペルオキシダーゼやグルコースオキシダーゼのような糖タンパク質はシャープに分離しているのに対し、図5のようにトリプシンのようなセリンプロテアーゼはブロードなピークを示しているのがわかります。これは、糖タンパク質がタンパク質表面の糖の作用で吸脱着するのに対し、セリンプロテアーゼは内部構造の特異部位(オキシアニオン部位)で吸脱着が起きるためであると考えられています。¹⁾ また、グルコースオキシダーゼは未吸着分にも活性がみられることから2種類以上の成分の存在が考えられます。このようにTSKgel Boronate-5PWはシス-ジオールを持つ糖タンパク質等の精製に極めて有効な手段であると思われます。

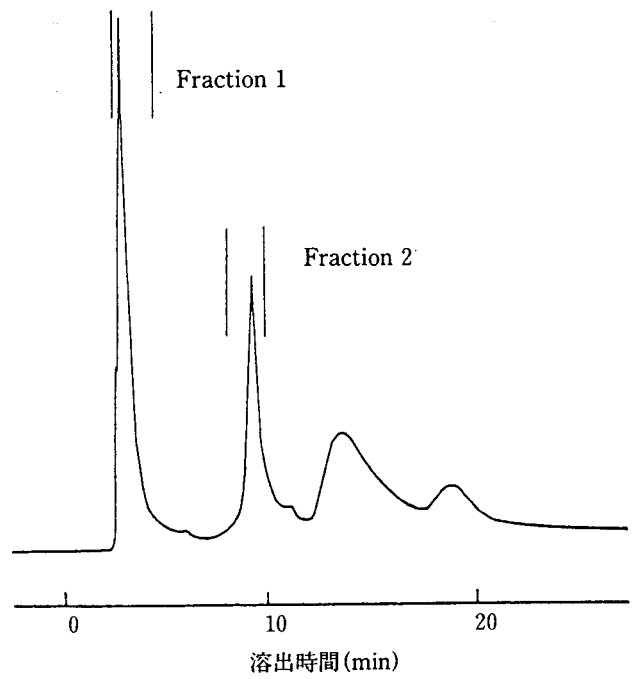


図4 TSKgel Boronate-5PWによるグルコースオキシダーゼの分離

分離条件；図3に同じ

試料；グルコースオキシダーゼ(クロカビ)

活性回収率；Fraction 1 45% Fraction 2 37%

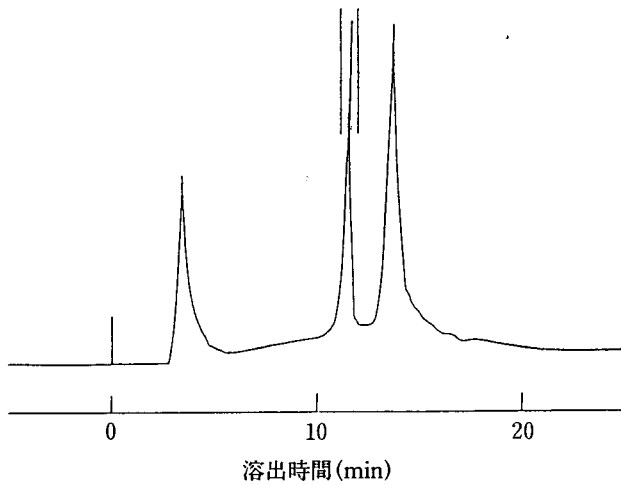


図3 TSKgel Boronate-5PWによる西洋ワサビペルオキシダーゼの分離

カラム；TSKgel Boronate-5PW (7.5mmID×7.5cm)

溶離液；A：20mM HEPES-NaOH + 10mM MgCl₂ (pH8.5)

B：20mM HEPES-NaOH + 100mM Sorbitol (pH8.5)

A→Bリニアグラジエント (30min)

流速；1.0 ml/min

検出；UV (280nm)

試料；西洋ワサビペルオキシダーゼ

活性；垂直部分

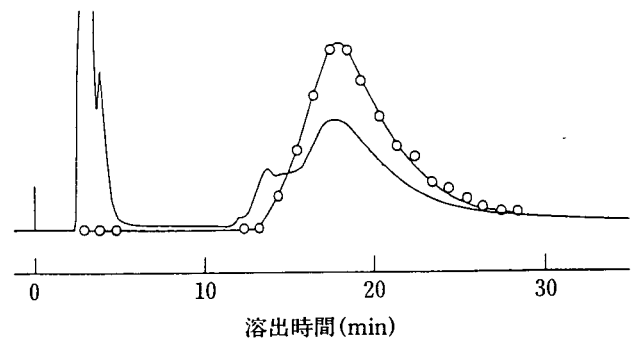


図5 TSKgel Boronate-5PWによるトリプシンの分離

カラム；TSKgel Boronate-5PW (7.5mmID×7.5cm)

溶離液；A：20mM HEPES-NaOH + 50mM MgCl₂ (pH8.5)

B：20mM HEPES-NaOH + 100mM Sorbitol (pH8.5)

A→Bリニアグラジエント (60min)

流速；1.0 ml/min

検出；UV (280nm)

—○—○—○— 活性曲線

試料；トリプシン(ブタ膵臓)

活性回収率；94%

(2) TSKgel Heparin-5PWによる応用例

ヘパリンは、分子中にスルホン酸基やカルボキシル基を持つためにカチオン交換作用を持っています。図6にカチオン交換カラムである、TSKgel SP-5PWとTSKgel Heparin-5PWで5種類の塩基性タンパク質の分離の比較を示します。図からもわかるように、TSKgel

Heparin-5PWではヘパリンに対して親和性の高いリボヌクレアーゼAだけ溶出が遅れています。他のタンパク質は、TSKgel Heparin-5PWで若干溶出が早くなっていますが、TSKgel SP-5PWとはほぼ同様の分離を示しています。

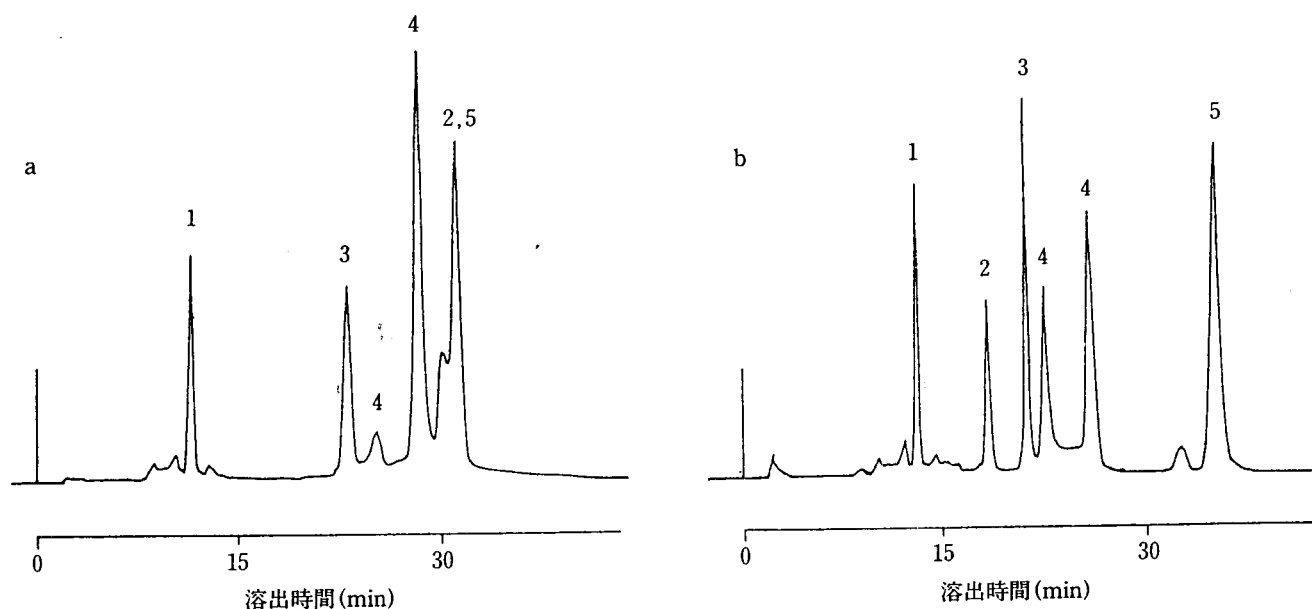


図6 TSKgel Heparin-5PWおよびSP-5PWを用いた塩基性タンパク質の分離

カラム； a：TSKgel Heparin-5PW (7.5mmID×7.5cm)

b：TSKgel SP-5PW (7.5mmID×7.5cm)

溶離液； A：20mM リン酸緩衝液 (pH7.0)

B：A + 0.5M NaCl

A→Bリアグラジエント (60min)

流速；1.0 ml/min

検出；UV (280nm)

試料；1. トリプシノーゲン

2. リボヌクレアーゼA

3. α -キモトリプシノーゲンA

4. チトクロムC

5. リゾチーム

また、図7に血液凝固因子の一つであるトロンビンの分離を示します。図中の垂線部分の酵素活性回収率は87%と高く、また、図8の逆相分配クロマトグラフィによる純度検定からも、トロンピンが非常によく精製されていることがわかります。

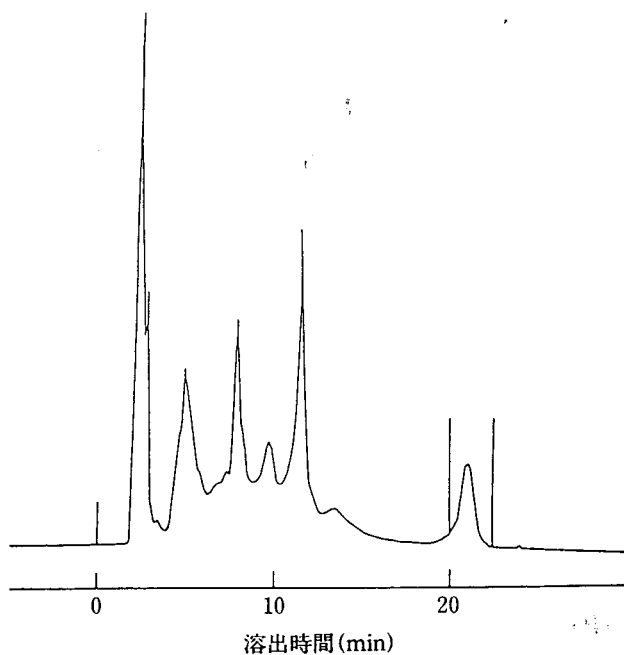


図7 TSKgel Heparin-5PWによるトロンビンの分離
 カラム；TSKgel Heparin-5PW(7.5mmID×7.5cm)
 溶離液；A：20mM リン酸緩衝液(pH7.5)
 B：A+2M NaCl
 A→Bリニアグラジエント(60min)
 流速；1.0 ml/min
 検出；UV(280nm)
 試料；トロンピン(ウシ)
 活性回収率；87.3%(垂線部分)

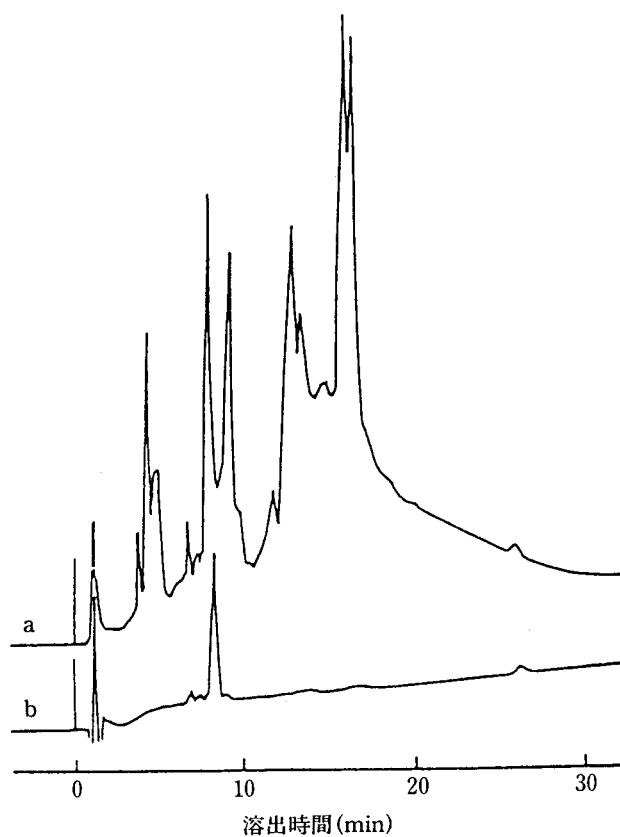


図8 逆相分配クロマトグラフィでのトロンビンの純度検定
 カラム；TSKgel Phenyl-5PW RP
 (4.6mmID×7.5cm)
 溶離液；A：5%アセトニトリル in 0.05% TFA
 B：20%アセトニトリル in 0.05% TFA
 C：80%アセトニトリル in 0.05% TFA
 A→B→Cリニアグラジエント
 (2min) (48min)
 流速；1.0 ml/min
 検出；UV(215nm)
 試料；a.粗トロンピン
 b.図10垂線部分フラクション

図9に人血漿からのアンチトロンビンIIIの分離精製を示します。これも図10の逆相分配クロマトグラフィによる純度検定から、アンチトロンビンIIIがよく精製されていることがわかります。このように、TSKgel Heparin-5PWは血液凝固因子の精製に非常に有効な手段であることがわかります。

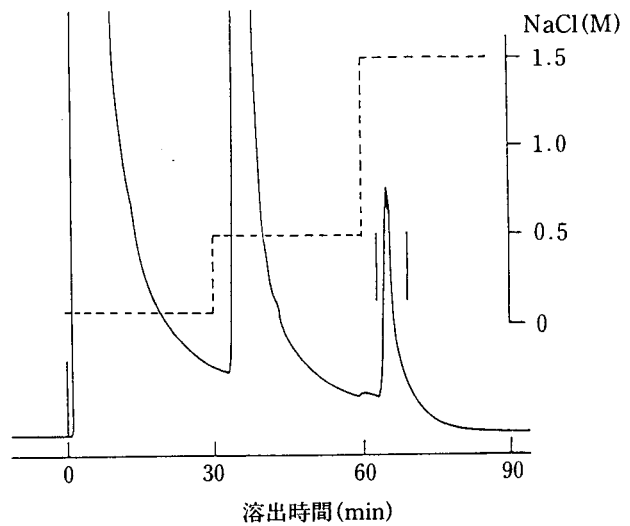


図9 TSKgel Heparin-5PWによるアンチトロンビンIIIの精製

カラム；TSKgel Heparin-5PW (7.5mmID×7.5cm)

溶離液；A：20mM Tris-HCl+0.15M NaCl (pH7.5)

B：20mM Tris-HCl+0.5M NaCl (pH7.5)

C：20mM Tris-HCl+1.5M NaCl (pH7.5)

A ステップグラジエント B (30min)

B ステップグラジエント C (30min)

流速；1.0 ml/min

検出；UV (280nm)

試料；人血漿 (500μl)

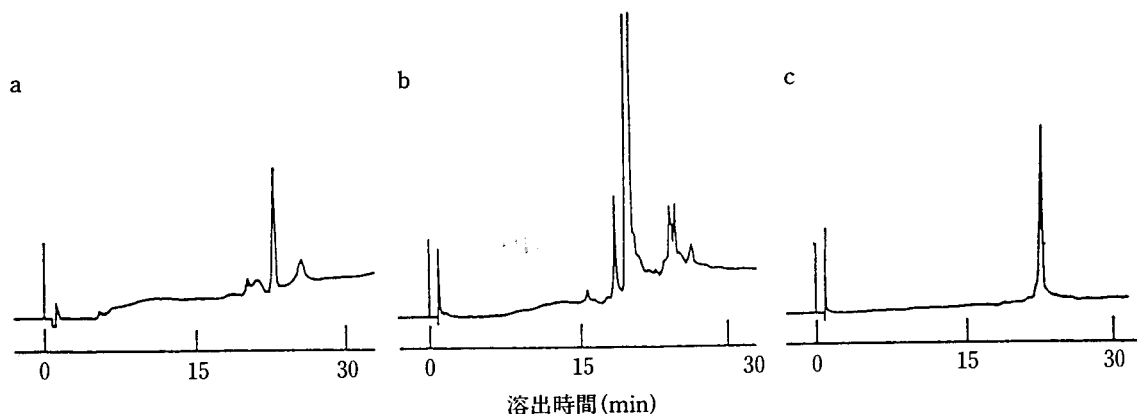


図10 逆相クロマトグラフィでのアンチトロンビンIIIの純度検定

溶離条件；図8に同じ

試料；a：図-12の垂線部分のフラクション

b：人血漿

c：市販精製アンチトロンビンIII

(3) TSKgel ABA-5PWによる応用例

図11にトリプシンの精製を示します。粗トリプシンが20倍以上精製されています。図12に示したフラクションの逆相分配クロマトグラフィから、フラクション2にはほとんど不純物がなく、よく精製されているのがわかります。図13にはウロキナーゼの分離を示します。上段に

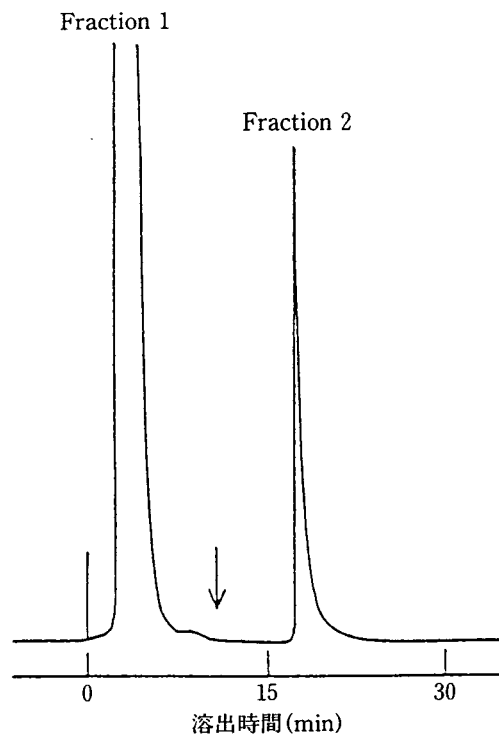


図11 TSKgel ABA-5PWによるトリプシンの精製
カラム；TSKgel ABA-5PW (7.5mmID×7.5cm)
溶離液；A：50mM Tris-HCl+0.5M NaCl+
2mM CaCl₂ (pH8.0)
B：50mM Glycine-HCl+0.5M NaCl+
2mM CaCl₂ (pH2.8)
A→Bステップグラジエント (矢印で切替)
流速；1.0 ml/min
検出；UV (280nm)
試料；粗トリプシン(ブタ膵臓、10mg)

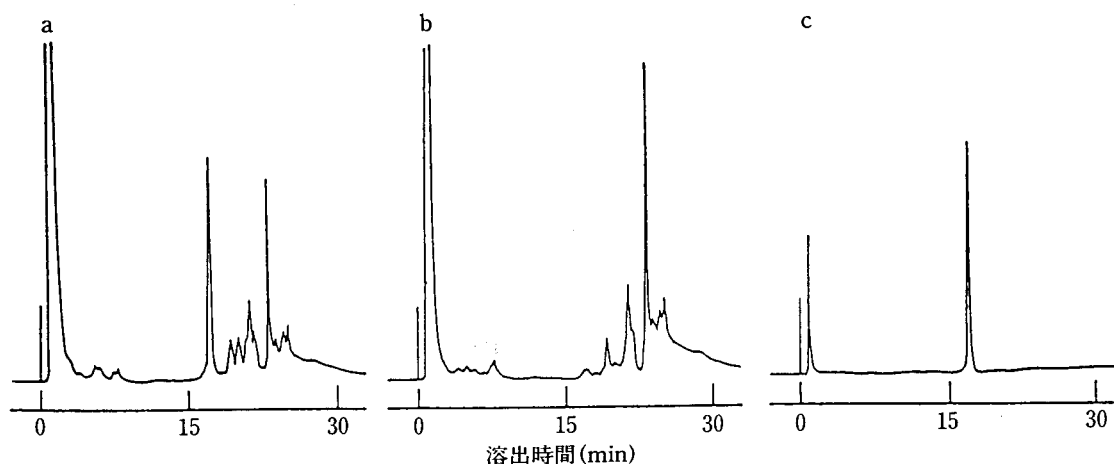


図12 逆相クロマトグラフィでのトリプシンの純度検定

溶離条件；図8に同じ

試料；a：粗トリプシン

b：図11フラクション1

c：図11フラクション2

活性回収率；99%(フラクション2)

は、UV(280nm)の吸収による検出を、下段には、合成基質を用いてポストカラム反応で酵素活性の蛍光検出を示します。蛍光検出は感度もよく非常にシャープなピークが得られています。図14のFactor Xaも同様な方法で検

出されました。このように、TSKgel ABA-5PWはトリプシン類似プロテアーゼの分離精製に非常に有効な手段です。

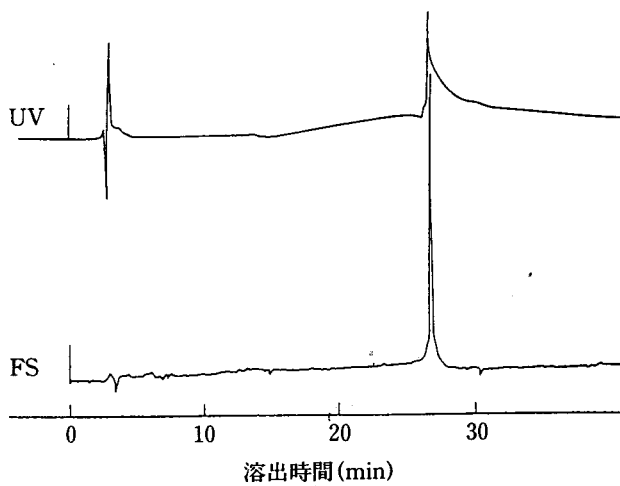


図13 TSKgel ABA-5PWによるウロキナーゼ(人血清)の分離

カラム；TSKgel ABA-5PW(7.5mmID×7.5cm)

溶離液；A：20mM Tris-HCl+0.5M NaCl
(pH8.0)

B：20mM Glycine-HCl+0.5M NaCl
(pH3.0)

A→Bステップグラジエント(12min)

流速；1.0 ml/min

基質溶液；0.02mM Glt-Gly-Arg-MCA
in(50mM トリス-HCl+100mM NaCl+
10mM CaCl₂(pH8.0))

基質溶液流速；0.5 ml/min

反応温度；25°C

検出；UV 280nm(上段)

FL Ex：365nm(下段)

Em：460nm

試料；ウロキナーゼ(人血清)

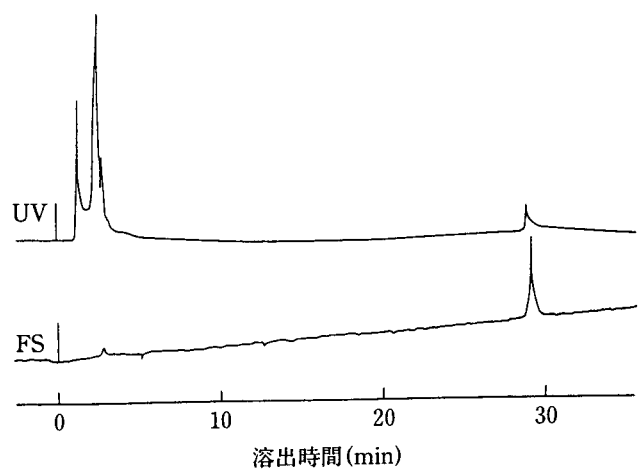


図14 TSKgel ABA-5PWによるFactor Xaの分離

溶離条件；基質溶液を除き図-13に同じ

基質；0.02mM Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA

試料；Factor Xa(人血清)

(4) TSKgel Blue-5PWによる応用例

図15に酵母酵素濃縮物の分離を示します。それぞれの酵素は、特異的相互作用の差によって分離しています。図中には5種類の酵素しか示していませんが、他にも数種の脱水素酵素が混在しています。図16に、先に示した酵母と起源が違う小麦胚芽由来のグルタチオンリダクターゼの分離を示します。グルタチオンリダクターゼは、

吸着力が強いため高いpHで分離でき、不純物との分離もよく、シャープなピークとして溶出しています。また、TSKgel Blue-5PWはアルブミンに対して強い親和性を示すため、アルブミンの除法等にも使用できます。このようにTSKgel Blue-5PWは、各種ヌクレオチド依存性酵素の分離・精製に有効です。

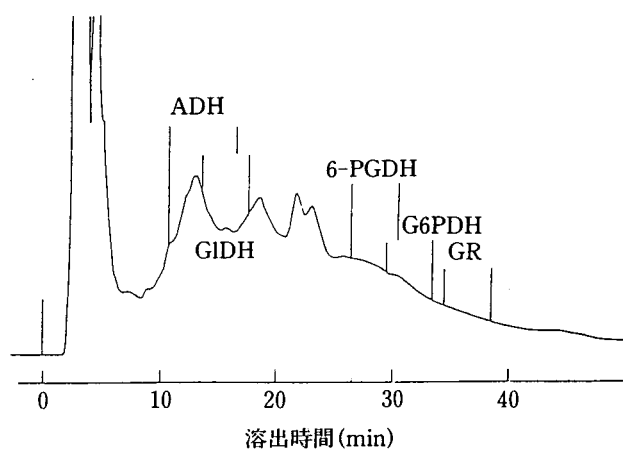


図15 TSKgel Blue-5PWによる酵素酵母濃縮物の分離

カラム；TSKgel Blue-5PW (7.5mmID×7.5cm)

溶離液；A：20mM Bis-tris-HCl+5mM MgCl₂
(pH6.4)

B：A+1M NaCl

A→Bリニアグラジエント (60min)

流速；1.0 ml/min

検出；UV (280nm)

試料；酵母酵素濃縮物 (yeast enzyme concentration)

活性回収率；アルコール脱水素酵素 (ADH)；94%

グルタメート脱水素酵素 (G1DH)；90%

6-ホスホグルコネート脱水素酵素 (6-PGDH)；64%

グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH)；115%

グルタチオンリダクターゼ (GR)；57%

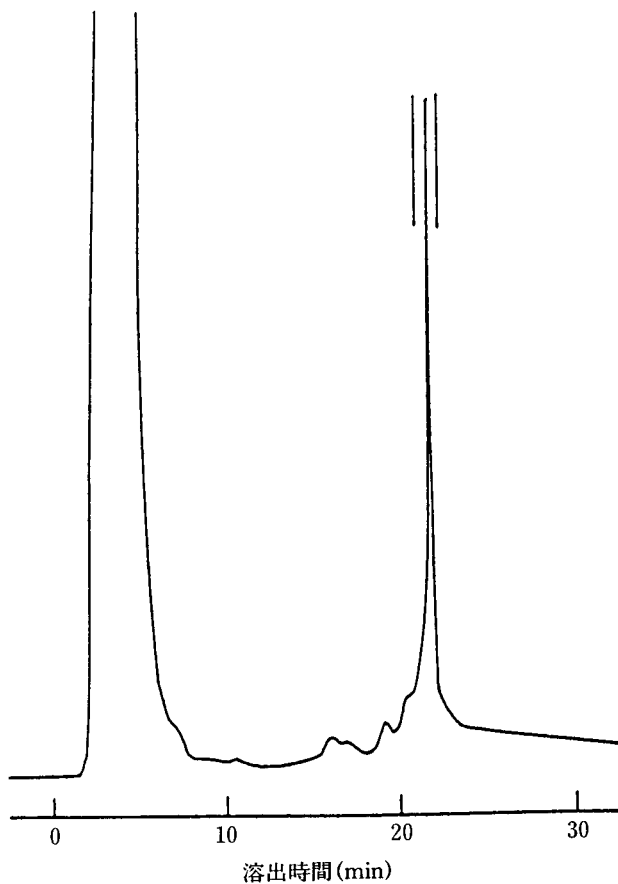


図16 TSKgel Blue-5PWによるグルタチオンリダクターゼの分離

カラム；TSKgel Blue-5PW (7.5mmID×7.5cm)

溶離液；A：20mM Tris-HCl (pH7.5)

B：A+1M KCl

A→Bリニアグラジエント (30min)

流速；1.0 ml/min

検出；UV (280nm)

試料；グルタチオンリダクターゼ (小麦胚芽)

活性回収率；47%

(5) TSKgel Chelate-5PWによる応用例

TSKgel Chelate-5PWの応用例はセパレーションレポートNa045に示してありますが、ここでは先のレポートと異なった、試料での分離を示します。

図17に、粗RCAの分離を示します。RCA120に若干、肩が見られますがRCA60とRCA120は、完全に分離しています。また、図18に2回結晶の市販エラスターゼの分離を示します。

離を示します。

ここに示した分離では、溶出にイミダゾールを用いているため金属がほとんど漏れません。そのためCu²⁺のようにUV(280nm)に吸収がある金属でもカラムに飽和させて使用でき、金属を補充することなく、数回使用することができます。

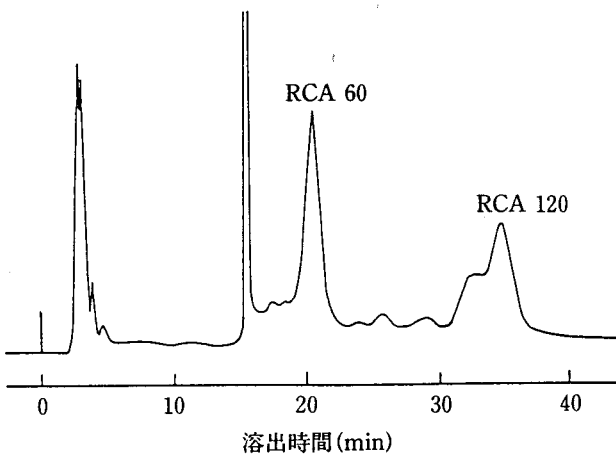


図17 TSKgel Chelate-5PWによる粗ヒマメレクチンの分離

カラム；TSKgel Chelate-5PW (7.5mmID×7.5cm)
溶離液；A：20mM リン酸緩衝液+0.5M NaCl (pH7.0)
B：A+20mMイミダゾール
A→Bリニアグラジエント(30分)

流速；1.0 ml/min

検出；UV(280nm)

添加金属；Cu²⁺

試料；粗ヒマメレクチン(RCA)

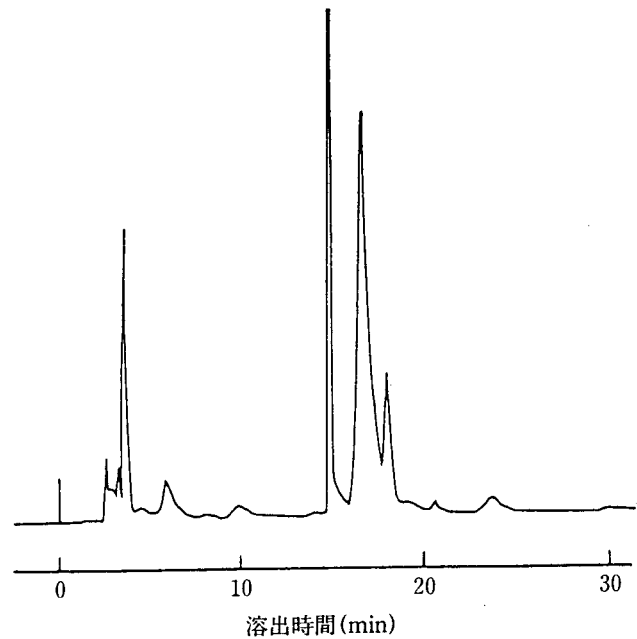


図18 TSKgel Chelate-5PWによるエラスターゼの分離

溶離条件；図17に同じ

試料；2回結晶品エラスターゼ(ブタ膵臓)

図19にはマウスモノクローナル抗体(IgG₁)の分離を示します。溶出には、溶出力の強いグリシンを用いています。図中の垂線部分にIgG₁活性がみられました。このようにTSKgel Chelate-5PWは抗体の精製にも威力を発揮します。

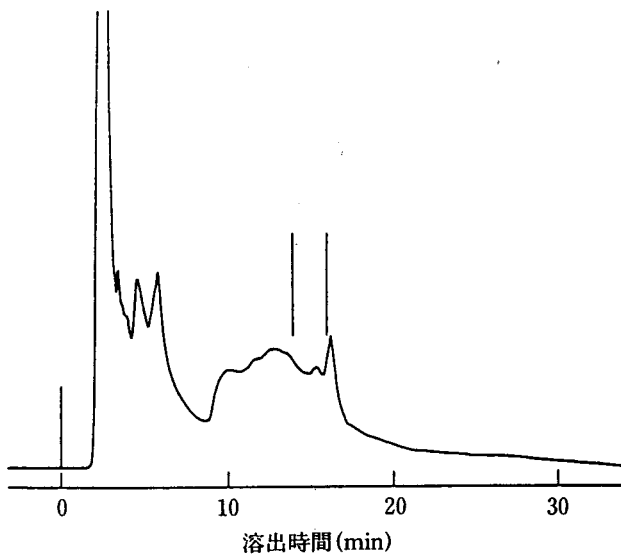


図19 TSKgel Chelate-5PWによるマウスモノクローナル抗体(IgG₁)の分離

カラム ; TSKgel Chelate-5PW (7.5mmID×7.5cm)

溶離液 ; A : 20mM トリス-HCl+0.5M NaCl (pH 8.0)

B : A+0.2Mグリシン

A→Bリニアグラジエント (30分)

流速 ; 1.0 ml/min

検出 ; UV (280nm)

添加金属 ; Zn²⁺

試料 ; マウスモノクローナル抗体 (anti-HLA, A, B, C) を含む組織培養液

4. おわりに

以上、紹介しましたように、それぞれの高性能AFCカラムはタンパク質等を迅速に高回収率で分離精製することができます。また、AFCは他のモードと組み合わせること、今後ますます応用範囲は広がるものと考えられます。

References

1. V.KH. Akparov and V.M. Stepanov, *J.Chromatogr.*, 155(1978)329-336
2. S.Hjerten and D.Yang, *J.Chromatogr.*, 316(1984)301-309
3. K.Nakamura et al., *J.Chromatogr.*, 445(1988)234-238
4. O.Mathuo et al., *J.Chromatogr.*, 369(1986)391-397
5. A.R.Thompson, *Biochim.Biophys. Acta*, 422(1976)200-209
6. D.AW. Grant et al., *Biochem J.*, 155(1976)243-254
7. Y.Nakagawa et al., *Anal.Biochem.*, 168(1988)75-81
8. Y.Kato et al., *J.Chromatogr.*, 155(1976)243-254
9. M.Belew et al., *Anal.Biochem.*, 164(1987)457-465