



SEPARATION REPORT

TSKgel Chelate-5PWを用いた高性能金属キレートアフィニティ クロマトグラフィーによるタンパク質の分離

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 分離条件の検討	1
3. 応用例	4
4. おわりに	7

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ー (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography: IMAC) は、1975年Porathらにより初めて生体成分への応用がなされて以来、広く使用されています。IMACにおいて、充填剤に配位された金属イオンは、ペプチドやタンパク質の表面に存在するヒスチジン残基のイミダゾール基やシステイン残基のチオール基と結合するほか、カルシウム結合部位やリン酸基とも結合します。そのため、IMACはアフィニティクロマトグラフィーと言えども、かなり汎用性のある分離モードと言えます。TSKgel Chelete-5 PWは、高性能IMAC用充填カラムであり、表-1に示すように、多数の応用例が既に報告されています。

本報では、IMACを行う際の分離に関する金属イオンや溶離条件についての検討結果と応用例について報告します。また、TSKgel Chelete-5 PWの基本的性質については、セパレーションレポートNo.45をご参照下さい。

2. 溶離条件の検討

1) 金属イオン

図-1は異なる金属を配位したカラムを用いて、リボスクレアーゼAおよびトランスフェリンをpHグラジエントで溶出した際のクロマトグラムを示したものです。Cu²⁺を配位させた場合、トランスフェリンは溶出されませんでした。強固に吸着したトランスフェリンを溶出させるには、50mMEDTA溶液を使用し金属と一緒に溶出させる必要があります。また、Ni²⁺とZn²⁺は共にタンパク質を溶出させますが、Zn²⁺の方がピーク形状がシャープで良好な結果が得られています。Co²⁺、Fe²⁺では、試料は全く吸着されませんでした。この結果、タンパク質を吸着させる強さは、Cu²⁺>Ni²⁺>Zn²⁺>Co²⁺、Fe²⁺であることがわかります。

(注) pHグラジエントを行う際には、図-1に示したように、緩衝域の異なるバッファー (HEPES、MES、酢酸) の等モル混合液をNaOH水溶液でpH 8及び4に合わせたものを溶離液とし、グラジエントを行うと、直線性のあるpHグラジエントが行えます。

表-1 TSKgel Chelete-5 PWを用いた文献

No.	試料	配位金属	概要	No.	試料	配位金属	概要
1	標準タンパク質 リポキナーゼ リンゴ酸脱水素酵素	Cu ²⁺ 、Zn ²⁺	基本的溶離条件を詳細に検討(セパレーションレポートNo.45)した。	7	標準タンパク質 血清アルブミン モノクローナル抗体(マウス腹水)	Cu ²⁺ 、Ni ²⁺ 、 Zn ²⁺	溶離条件を検討した。(イミダゾールを用いた溶出法)
2	プラスミノーゲン アクチベーター (t-PA)	Zn ²⁺	t-PAの精製にTSK-GELの各種AFCカラムを使用。TSKgel Chelate-5 PWが、最も回収率が高い。	8	ペプチド (約30種)	Cu ²⁺ 、Ni ²⁺ 、 Zn ²⁺	各種ペプチドの分離を検討した。I残基のみ異なる同族ペプチドも良好に分離であった。
3	血清タンパク質	Zn ²⁺	その他の分離モード (SEC、IEC、HIC) と分離を比較。IMACが新しい分離法になることを示唆。	9	プラスミノーゲン アクチベーター (t-PA)	Zn ²⁺	ヒト卵巣組織の培養上清からt-PAを分離精製した。TSKgel ABA-5PWも使用した。
4	ミトコンドリア膜タンパク質	Zn ²⁺	界面活性剤存在下で膜タンパク質を分離した。(セパレーションレポートNo.50)	10	ペプチド、 タンパク質	Cn ²⁺ 、Zn ²⁺	IMACの総説
5	センダイウイルス 膜タンパク質	Zn ²⁺	各種分離モードで膜タンパク質 (F、HN) を分離を検討した。	11	ペプチド (約60種)	Cu ²⁺ 、Ni ²⁺ 、 Zn ²⁺	各種ペプチドの溶出挙動をpHグラジエント及びイミダゾール溶出法で調べ相関関係を詳細に検討した。
6	リゾチーム、オ ブアルブミン BSA	Cu ²⁺	前端分析法を用い、タンパク質の吸着容量を検討した。	12	ズブチリシン	Cu ²⁺	遺伝子組み換えによって得られた1アミノ酸残基変異体を分離、タンパク質の構造の変化を検討した。

* 文献名等は、最後のページに掲載してあります。

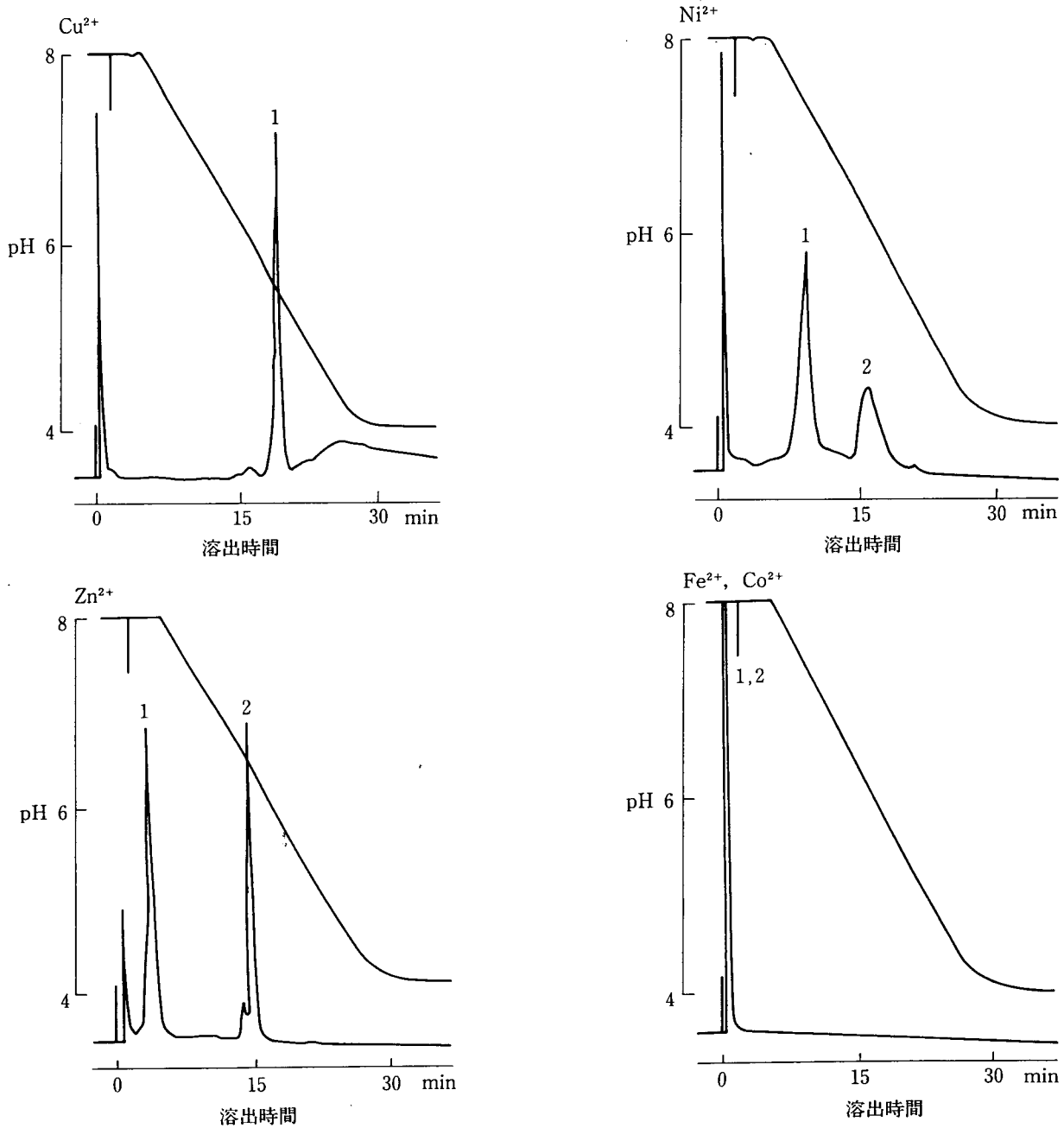


図-1 タンパク質分離におけるイオンの影響

試料; 1. リボスクレアーゼA (ウシ)

2. トランスフェリン (ヒト) (各 $20\mu\text{g}$)

カラム; TSKgel Chelate-5 PW Glass 5 mmID \times 5cm

溶離液; A: 20mM HEPES-MES-酢酸緩衝液

(pH8.0)+0.5M NaCl

B: 20mM HEPES-MES-酢酸緩衝液

(pH4.0)+0.5M NaCl

A \rightarrow B リニアグラジエント (30分)

流速; 0.8ml/min

検出; UV (280nm)

温度; 25 $^{\circ}\text{C}$

金属イオン; 飽和 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+}

2) 溶出液

図-2にタンパク質の溶出にイミダゾールを用いた場合のクロマトグラムを示します。金属イオンとして Cu^{2+} を配位させた場合でも、トランスフェリンは溶出されており、イミダゾールがこの濃度(1~20mM)では、図-1の、pHグラジエント(pH 8~4)よりも溶出力が強いことがわかります。

尚、イミダゾールは0 mMからグラジエントを開始すると、分離中に大きな溶媒ピークが出現するため、1 mMからのリニアグラジエントを用いています。

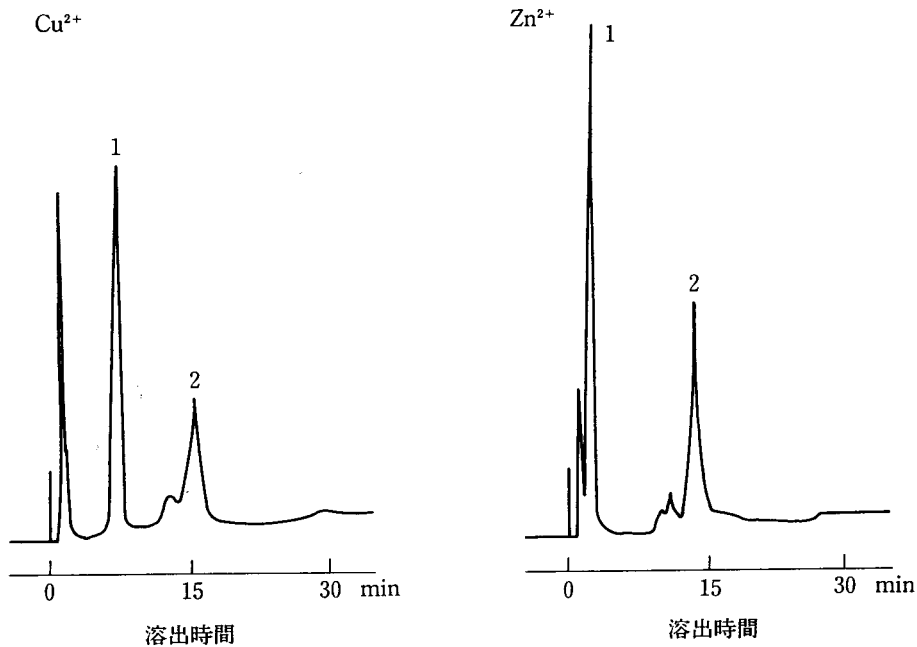


図-2 イミダゾールを溶離液に用いたタンパク質の分離

試料; 1. リボヌクレアーゼA (ウシ)

2. トランスフェリン (ヒト) (各 $20\mu\text{g}$)

カラム; TSKgel Chelate-5 PW Glass 5mmID \times 5cm

溶離液; A: 20mM HEPES-NaOH緩衝液 (pH8)

+ 1 mMイミダゾール+0.5M NaCl

B: 20mM HEPES-NaOH緩衝液 (pH8)

+ 20mMイミダゾール+0.5M NaCl

A \rightarrow B リニアグラジエント (30分)

流速; 0.8ml/min

検出; UV (280nm)

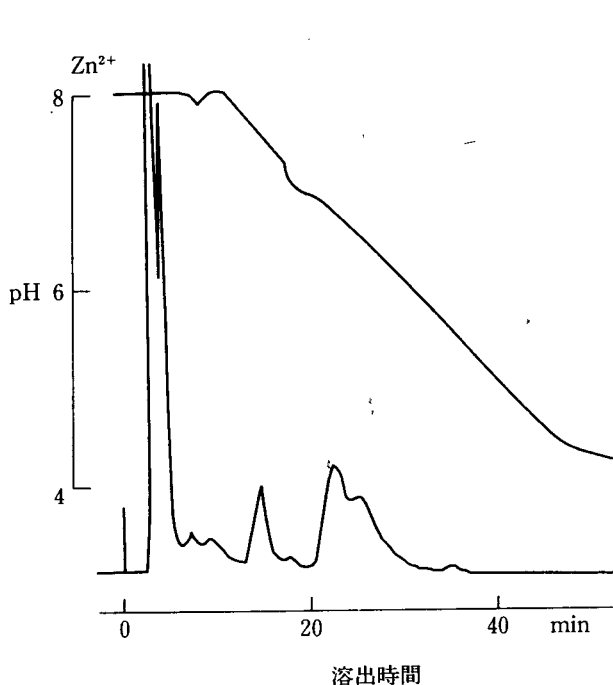
温度; 25 $^{\circ}\text{C}$

金属イオン; 飽和 Cu^{2+} 、 Zn^{2+}

3. 応用例

1) 粗トリプシンの分離

図-3に粗トリプシンの分離を示します。配位金属に Zn^{2+} を用いた場合、トリプシンはカラムに吸着されずに溶出しますが、タンパク質の結合力の強い Cu^{2+} を配位させると良好な結果が得られます。その場合、トリプシンは約22分に溶出し、活性回収率は85.2%でした。



2) モノクローナル抗体の分離

図-4にマウス腹水からのモノクローナル抗体 (IgG_1) の分離を示します。金属に Zn^{2+} を使用し、pHグラジエント溶出を行うと、モノクローナル抗体は約32分に溶出し、不純物のアルブミン (約20分に溶出) やトランスフェリン (約35分に溶出) から良好に分離されていることがわかります。

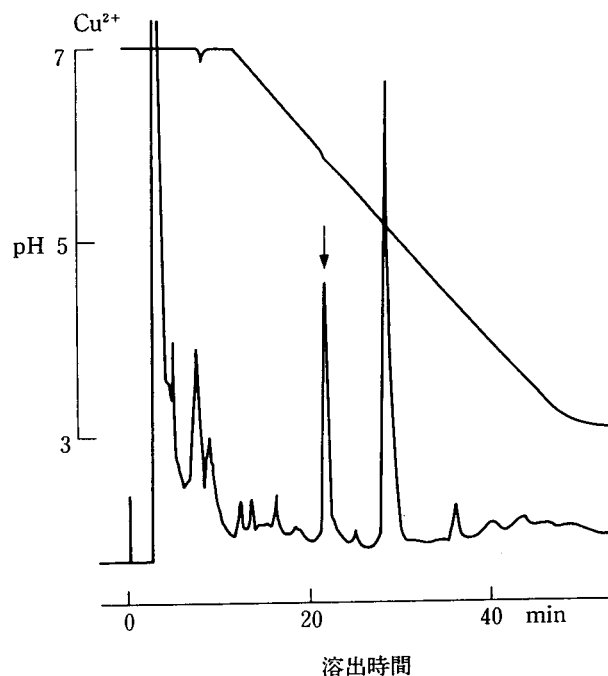


図-3 粗トリプシンの分離

試料; 粗トリプシン (1 mg in 100 μ l)

カラム; TSKgel Chelate-5PW Glass 8mmID \times 7.5cm

溶離液; A: 20mM HEPES-MES-酢酸緩衝液

+0.5mM NaCl

Zn^{2+} 配位カラム:

A (pH8) \rightarrow A (pH4) リニアグラジエント (40分)

Cu^{2+} 配位カラム:

A (pH7) \rightarrow A (pH3) リニアグラジエント (40分)

流速; 1.0ml/min

温度; 25 $^{\circ}$ C

金属イオン; 飽和 Zn^{2+} 、 Cu^{2+}

活性回収率(Cu^{2+}); 85%

3) 酵母酵素抽出液

図-5に酵母酵素抽出液 (yeast enzyme concentrate) を分離した例を示します。IMACにより、金属に親和性のないタンパク質等がカラムに吸着されないため、図中に示したグルコース・6・リン酸脱水素酵素 (G6PDH) やアルコール脱水素酵素 (ADH) は、イオン交換体による分離よりも高い精製度が高い活性回収率で得られています。

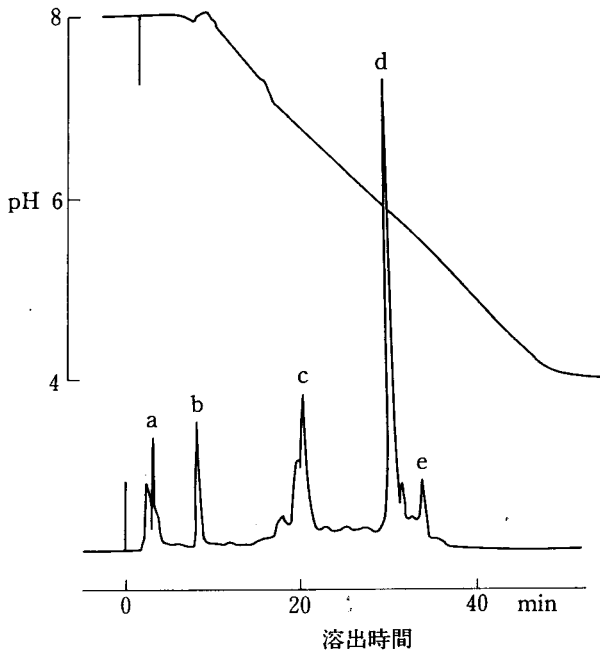


図-4 モノクローナル抗体 (マウス腹水) の分離

試料; 抗ニワトリ14K レクチン (IgG、マウス腹水 50 μ l)

カラム; TSKgel Chelate-5 PW Glass
8 mmID \times 7.5cm

溶離液; A : 20mM HEPES-MES-酢酸緩衝液 (pH8.0)+0.5mM NaCl

B : 20mM HEPES-MES-酢酸緩衝液 (pH4.0)+0.5mM NaCl

A \rightarrow B リニアグラジェント (40分)

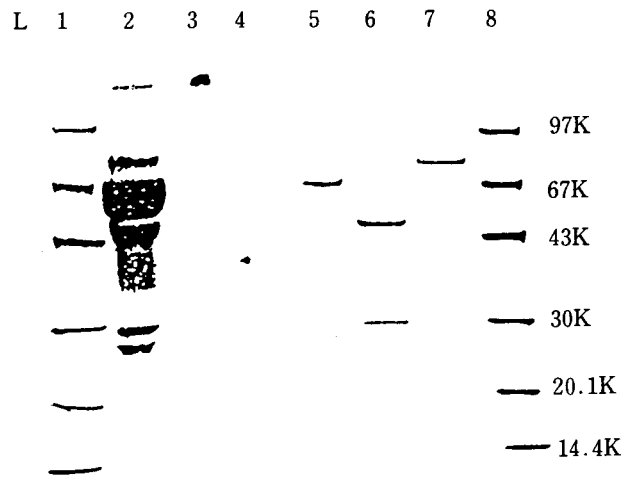
流速; 1.0ml/min

温度; 25 $^{\circ}$ C

金属イオン; 飽和Zn²⁺

SDS-PAGE

レーン1: 分子量マーカー レーン5: ピークc
レーン2: マウス腹水 レーン6: ピークd
レーン3: ピークa レーン7: ピークe
レーン4: ピークb レーン8: 分子量マーカー



SDS-PAGE

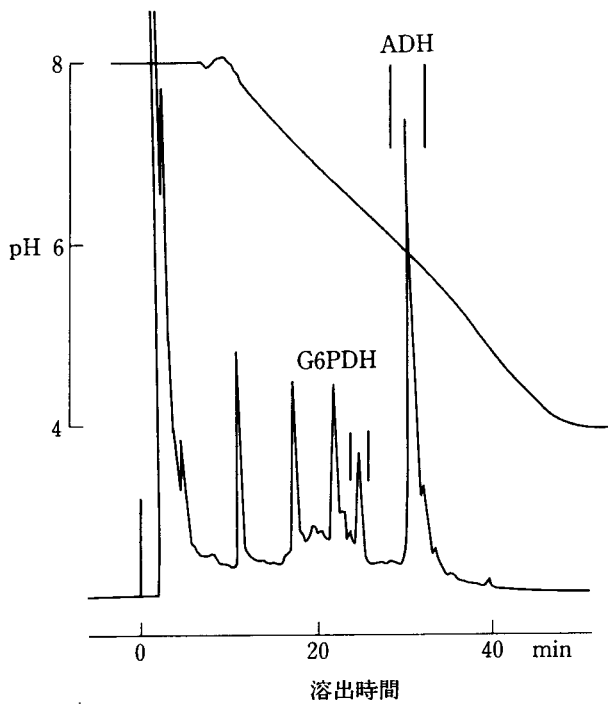


図-5 酵母酵素抽出液の分離

試料；酵母酵素抽出液 (2 mg in 100 μ l)

カラム；TSKgel Chelate-5 PW Glass

8 mmID \times 7.5cm

溶離液；図-4に同じ

流速；1.0ml/min

温度；25 $^{\circ}$ C

検出；UV (280nm)

金属イオン；飽和Zn²⁺

酵素	回収率	精製度
G6PDH	90.0%	\times 8.71
ADH	96.6%	\times 3.87

4) ペクチナーゼの分離

ペクチナーゼ (エンドポリガラクトナーゼ) は、植物細胞の細胞融合の際に高等植物の中葉を形成する細胞間結合物質であるペクチン質を分離し、個々の細胞を遊離 (マセレーション) します。図-6は市販ペクチナーゼを分離した例ですが、酵素は約20分に溶出され、その他不純物は、ほとんどすべてカラムに吸着されず溶出しています。この結果から、高純度のペクチナーゼがIMACで非常に簡単に精製できることが示唆されています。

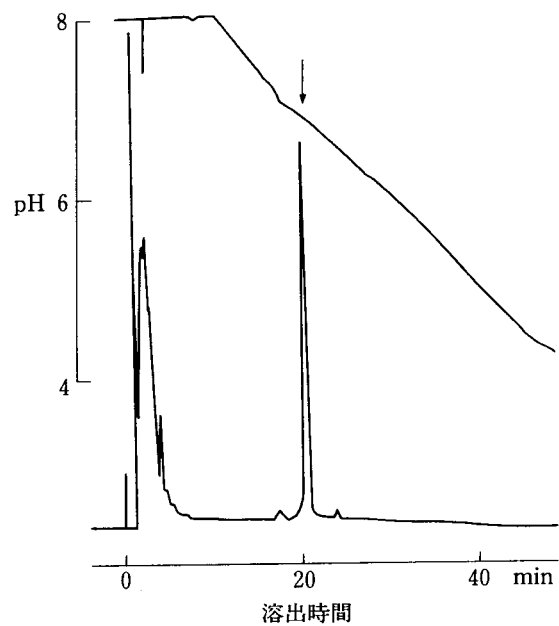


図-6 市販ペクチナーゼの分離

試料；市販ペクチナーゼ (1 mg in 100 μ l)

カラム；TSKgel Chelate-5 PW Glass

8 mmID \times 7.5cm

溶離液；図-3に同じ

流速；1.0ml/min

温度；25 $^{\circ}$ C

検出；UV (280nm)

金属イオン；飽和Zn²⁺

4. おわりに

以上、IMACの分離の検討を行ってきましたが、IMACの使用法を表-2にまとめます。

表-2 IMACの一般的溶離条件

<p>〔金属イオンの種類〕</p> <p>1. Zn²⁺</p> <p>第1選択。試料の吸着はあまり強くありませんが分離は良好です。ただし分離後毎回金属イオンの添加が必要です。</p> <p>2. Cu²⁺</p> <p>試料の吸着力が強いため、Zn²⁺で吸着の弱い試料に適用できます。吸着が強過ぎて溶出しにくい試料はEDTAで溶出します。</p>	<p>〔溶出法〕</p> <p>1. pHグラジエント溶出</p> <p>0.5M NaClを含む20mM HEPES-MES-酢酸 (pH 8) および (pH 4) (pHはNaOHにて調整) によるリニアグラジエント (30~60分) を用います。</p> <p>2. イミダゾール溶出法</p> <p>0.5M NaClを含む、トリス系でないバッファー (リン酸やMESバッファー) を用い、イミダゾール1~20 mMのリニアグラジエント (30~60分) を用います。</p> <p>3. EDTA溶出法</p> <p>カラムに強固に結合した試料 (特にCu²⁺を用いた場合) は、0.5M NaClを含む20mM EDTA溶液で金属イオンをカラムから除去することにより、溶出させます。</p>
<p>〔金属イオンの添加〕</p> <p>金属イオンを蒸留水に溶かし、試料注入バルブを利用してカラムに添加してください。Cu²⁺の場合、最大結合量の50%程度にとどめてください。Zn²⁺の場合、飽和させてもかまいませんが、一般に飽和させたカラムは試料の溶出時に金属イオンが漏出します。</p> <p>充填剤への金属イオンの最大結合量は1 mlあたり約20μmolです。</p> <p>(例) カラムサイズ7.5mmID×7.5cmの場合</p> <ul style="list-style-type: none">・ 飽和 100mM金属イオン水溶液1 ml添加して下さい。・ 50% 30mM金属イオン水溶液1mlを添加して下さい。 <p>(注) 金属イオンはZn²⁺の場合、試料を分離する毎に、Cu²⁺の場合、4~5回の分離に1回添加して下さい。</p>	

参考文献

- 1 High-performance metal chelate affinity chromatography of proteins. Y.Kato, K.Nakamura and T.Hashimoto, *J.Chromatogr.*, 354(1986)511
- 2 High-performance chromatographic method for the purification of tissue-type plasminogen activator. O.Matsuo, Y.Tanbara, K.Okada, H.Fukao, H.Bando, T.Sakai, *J.Chromatogr.*, 369(1986)391
- 3 Ion-exchange and hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography of proteins. D.Josic, W.Hofman and W.Peutter, *J.Chromatogr.*, 371(1986)43
- 4 High-performance liquid chromatography of membrane proteins. Y.Kato, T.Kitamura, K.Nakamura, A.Mitsui, Y.Yamasaki and T.Hashimoto *J.Chromatogr.*, 391(1987)395
- 5 Purification strategies for sendai virus membrane proteins. G.W.Welling, K.Slopsema and S.W.Wester, *J.Chromatogr.*, 397(1978)165
- 6 Interaction of protein with immobilized Cu^{2+} . Quantitation of adsorption capacity, adsorption isotherm and equilibrium constants by frontal analysis. M.Belew, T.-T.Yip, L.Andersson and J.Porath, *J.Chromatogr.*, 403(1987)197
- 7 High-performance analytical applications of immobilized metal ion affinity chromatography. M. Belew, T.T.Yip, L.Andersson and R.Ehrnstrom, *Anal. Biochem.*, 164(1987)457
- 8 High-performance immobilized metal ion affinity chromatography of peptides: Analytical separation of biologically active synthetic peptides. Y. Nalagawa, T.-T.Yip, M.Belew and J.Porath, *Anal. Biochem.*, 168(1988)75
- 9 Characterization of plasminogen activator produced by an established cell line from human ovary, C.Matsuo, H.Fukao and O.Matsuo, *J. Cell. Physiol.*, 134(1988)253
- 10 High-performance immobilized-metal-ion affinity chromatography of peptides and proteins. J. Porath, *J.Chromatogr.*, 443(1988)3
- 11 Evaluation of the interaction of peptides with Cu (II), Ni(II), and Zn(II) by high-performance immobilized metal ion affinity chromatography. T.-T.Yip, Y.Nakagawa and J.Porath, *Anal. Biochem.*, 183(1989)159
- 12 Immobilized-metal affinity and hydroxyapatite chromatography of genetically engineered subtilisin. R.M.Chicz and F.E.Regnier, *Anal. Chem.*, 61(1989)1742