



# SEPARATION REPORT

ポリマー系充填剤TSKgel Phenyl-5 PW RPを用いた  
逆相クロマトグラフィーによるタンパク質の分離  
(分析から分取まで)

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 分析カラムでの応用例	1
3. 分取カラムの溶離条件の検討	5
4. おわりに	8

## 1. はじめに

TSKgel Phenyl-5 PW RPは親水性樹脂であるゲルろ過クロマトグラフィー用充填剤TSKgel G5000PWにPhenyl基を高密度に導入した逆相クロマトグラフィー(RPC)用充填剤です。TSKgel Phenyl-5 PW RPは、1000 Åと非常に大きなポアサイズを有しており、一般に市販されているポアサイズ300 Å前後のタンパク質分離用ミリカ系充填剤に比べ、低分子量タンパク質から高分子タンパク質まで高分離能で分離できます。

表-1に示すように、TSKgel Phenyl-5 PW RPを用いたタンパク質の分離が数多く報告されており、膜タンパク質や高分子量タンパク質の精製や、試料の純度チェック等に应用されています。

本報では、TSKgel Phenyl-5 PW RPを用いたタンパク質分離について分析カラムでの応用例と、試料の大量調整を目的とした分取カラムの溶離条件の検討について報告致します。なお、TSKgel Phenyl-5 PW RP分析カラムについては、詳細の報告がセパレーションレポートNo.36に、またタンパク質、ペプチドのRPCについては、No.63、65、66、69にも詳しい報告があります。スケールアップについては、No.52を参照下さい。

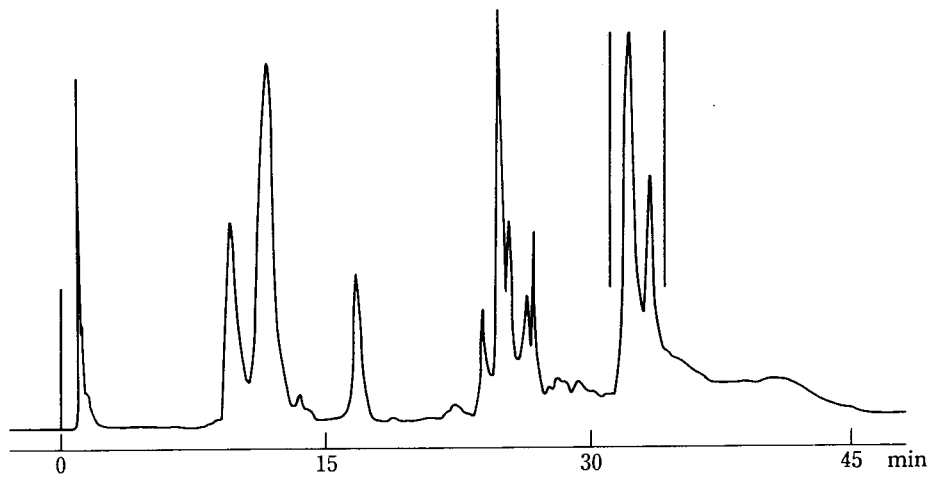
## 2. 分析カラムでの応用例

表-1で示したようにタンパク質のRPCでは、タンパク質の分子量が20,000以上の時、特にポアサイズの大きいTSKgel Phenyl-5 PW RPが他の充填剤に比べ効果的と言えるようです。図-1~4に、ヒマメレクチン(RCA, MW: 30,000)、フェレドキシン-NADP-還元酵素(MW: 33,000)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(MW: 45,000) およびヒト血清アルブミン(MW: 67,000)のクロマトグラムを示します。それぞれ、ピークの同定はアフィニティクロマトグラフィーによって精製された試料を用いて行いました。図-1のRCAの分離では、RCAのカラムへの吸着がやや強いため、溶離液中のイオンペア試薬(TFA)濃度を一般的な濃度(0.05~0.1%)より若干下げる(0.02%)ことによって、より良い結果が得られています。図-4の中で、ヒト血清アルブミンは、約17分に溶出する大きなピークであり、他のピークを示すために拡大してあります。以上のようにTSKgel Phenyl-5 PW RPを用いて、分子量20,000以上のタンパク質の分離が良好に行えることがわかります。

表-1 TSKgel Phenyl-5 PW RPを用いた文献

文献No	試料	概要	文献No	試料	概要
1	乳酸デヒドロゲナーゼ ホスホグルコースイソメラーゼ (MW:120K) ヒト成長ホルモン、ウレアーゼ (MW:480K)	TSKgel Phenyl-5 PW RP を用いた基本的分離条件等 を検討した。	8	24種類のペプチド及びタン パク質 (MW: ~66K)	各種逆相カラムでの分離評 価。分子量が30000以上では TSKgel Phenyl-5 PW RP が最も優れている。
2	ヒト赤血球膜タンパク質	ポアサイズ300Åの逆相カ ラムと比較し、TSKgel Phe- nyl-5 PW RP (1000Å) が 最も良い結果を与えた。	9	インシュリン (MW: 6 K) ヒト成長ホルモン (22K) ヒト血清アルブミン (68K)	微量試料での回収率を検討 した。
3	$\alpha$ -アミラーゼ (MW: 50K)	疎水クロマトグラフィー (TSKgel Ether-5 PW) で分取精製した試料の純度 をチェックした。	10	センダイウイルス膜タンパク質	膜タンパク質分離の総説
4	水溶性タンパク質 膜タンパク質 (センダイウイルス)	各種逆相カラムを評価した 結果、TSKgel Phenyl-5 PW RPが良好であった。	11	アンチトロンビンIII (MW: 65K) トロンビン (MW: 55K)	アフィニティクロマトグラ フィー (TSKgel Heparin- 5 PW)で精製した試料の純 度チェックに使用した。
5	センダイウイルス膜タンパク質 (MW: 50K, 68K)	TSKgel Phenyl-5 PW RP ほか、TSK-GELを用いて精 製した。	12	赤血球バンド3タンパク質 の加水分解物 (MW: 8500)	アミノ酸配列解析のための 最終精製に使用した。
6	ヒト成長ホルモン (hGH) (MW: 22K)	各種逆相カラムで分離評価 した。TSKgel Phenyl-5 PW RPが全てのhGH分子 種の分離に優れている。	13	赤血球膜タンパク質 (MW: 10K~200K)	TSKgel Phenyl-5 PW RP はシリカ系逆相カラム(C4) より優れており分子量 10,000~200,000の膜タン パク質の分離に使用できる。
7	乳酸デヒドロゲナーゼ (MW: 3.5K)	ヒドロキシアパタイト (TSKgel HA-1000) で精 製した試料の純度チェッ クに使用した。	14	水溶性タンパク質 (MW: 3.5K~66K)	水溶性タンパク質の疎水性 と逆相カラムへの保持時間 の関係を検討した。
			15	$\alpha$ -amidating enzyme (MW: 92K)	精製された試料の純度チェ ックに使用した。

\*文献名等は、最後のページに掲載してあります。



溶出時間

図-1 TSKgel Phenyl-5PW RP分析カラムを用いた粗抽出ヒマママレクチン (RCA) の分離

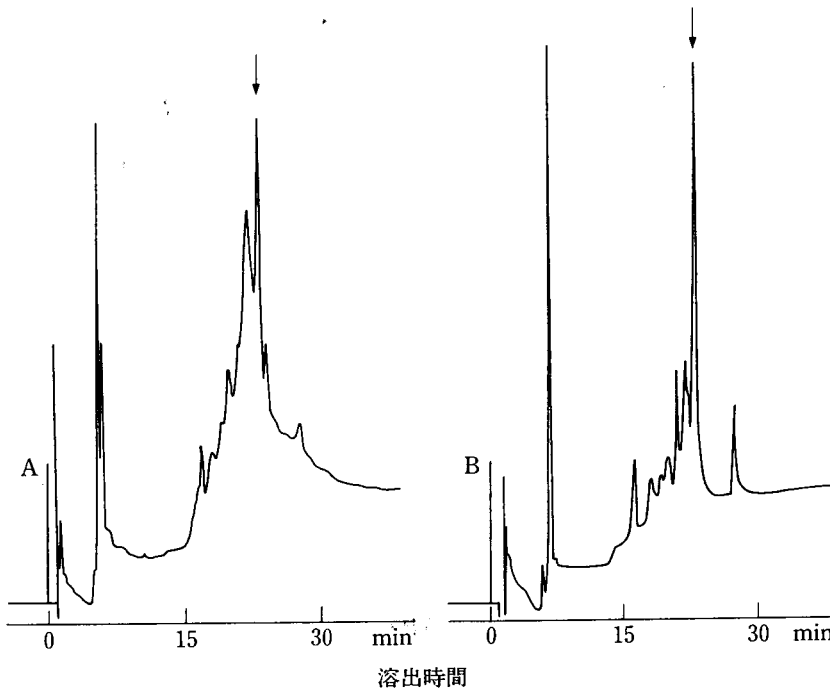
試料; 粗抽出ヒマママレクチン (200 $\mu$ g in 20 $\mu$ l)  
 カラム; TSKgel Phenyl-5PW RP 4.6mmID $\times$ 7.5cm  
 溶離液; A: 0.02%TFA+5%アセトニトリル  
 B: 0.02%TFA+60%アセトニトリル  
 A $\rightarrow$ Bリニアグラジエント (44分)

流速; 1.0ml/min

温度; 25 $^{\circ}$ C

検出; UV (220nm)

RCAのピークは精製品の溶出位置から決定した。



溶出時間

図-2 TSKgel Phenyl-5PW RP分析カラムを用いたハウレンソウ葉抽出フェレドキシン・NADP・還元酵素の分離

試料; A: ハウレンソウ葉抽出硫安分画物 (100 $\mu$ l)  
 B: AをTSKgel AF-レッドトヨノパール650MLで粗精製した画分

カラム; TSKgel Phenyl-5PW RP4.6mmID $\times$ 7.5cm

溶離液; A: 0.05%TFA+5%アセトニトリル

B: 0.05%TFA+80%アセトニトリル

A $\xrightarrow{2分}$ A/B (75/25)  $\xrightarrow{30分}$ A/B (25/75)

流速; 1.0ml/min

温度; 25 $^{\circ}$ C

検出; UV (220nm)

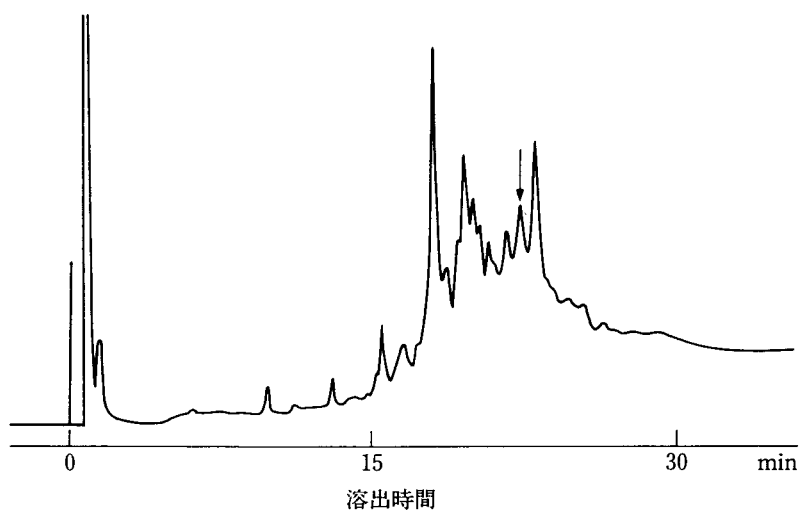


図-3 TSKgel Phenyl-5 PW RP分析カラムを用いた  
ラット肝抽出物中のグルタチオン・S・トランス  
フェラーゼの分離

試料；ラット肝抽出液 (5  $\mu$ l)

カラム；TSKgel Phenyl-5 PW RP4.6mmID $\times$ 7.5cm

分離条件；図-2に同じ、ただしTFA濃度0.1%

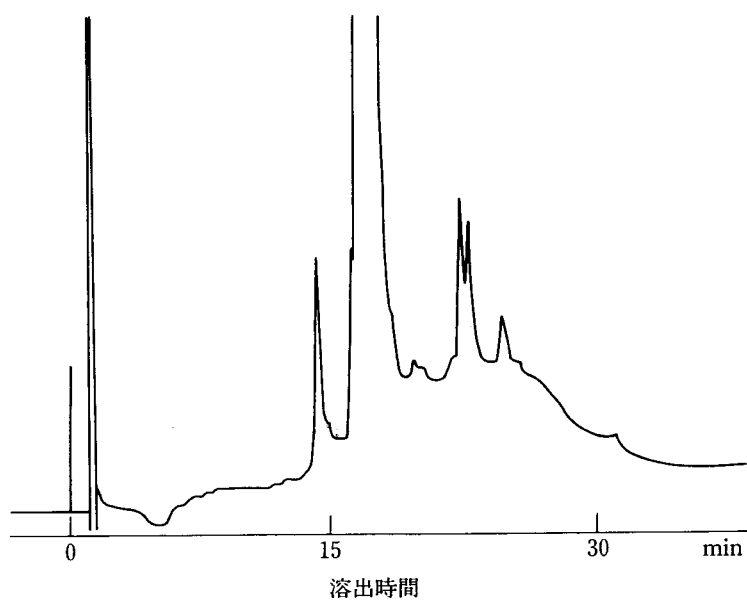


図-4 TSKgel Phenyl-5 PW RP分析カラムを用いた  
ヒト血清の分離

試料；ヒト血清 (200  $\mu$ g in 100  $\mu$ l)

カラム；TSKgel Phenyl-5 PW RP4.6mmID $\times$ 7.5cm

分離条件；図-2に同じ

### 3. 分取カラムの溶離条件の検討

RPCは、一般的に他の分離モードに比べ高い分離能を有しますが、溶離液に有機溶媒を用いるため、タンパク質は失活してしまう恐れがあります。しかし、失活しにくいタンパク質や、失活変性 (denature) しても、通常の溶液中に戻すと、元来の立体構造に復帰 (renature) できるようなタンパク質には、RPCによる分取精製が適用できます。また、アミノ酸配列を解析するための高純度

標品を得る目的として分取用RPCカラムを用いることもできます。さらに、RPCでは、溶離液に揮発性の有機溶媒が使用できるため試料の濃縮が容易に行え、イオン交換クロマトグラフィーのように脱塩という後処理も必要ありません。

このようにRPCを用いたタンパク質の分取精製は応用範囲が広いと、TSKgel Phenyl-5 PW RP分取用カラム (21.5mmID×15cm) の溶離条件の検討を行いました。

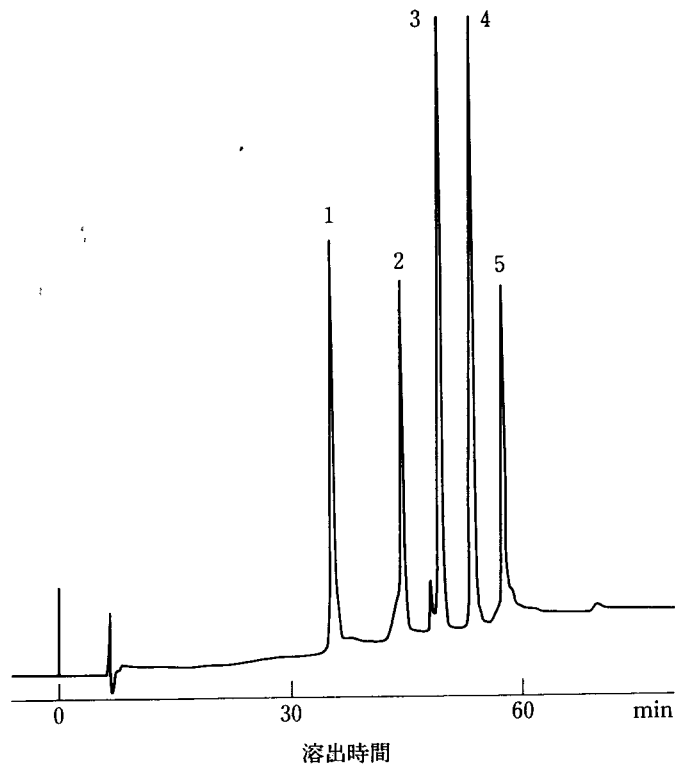


図-5 TSKgel Phenyl-5 PW RP分取カラムを用いたタンパク質混合物の分離

試料; 1. リボスクレアーゼ  
2. チトクロムC  
3. リゾチーム  
4.  $\alpha$ -ラクトアルブミン  
5. ミオグロビン (各 1 mg in 0.5ml)

カラム; TSKgel Phenyl-5 PW RP21.5mmID×15cm  
溶離液; A: 0.05%TFA+5%アセトニトリル  
B: 0.05%TFA+60%アセトニトリル  
A→Bリアグレジエント (88分)

流速; 6 ml/min  
温度; 25°C  
検出; UV (220nm)

### 3-1 流速

図-5に分取カラムを用いた標準タンパク質のクロマトグラムを示します。また図-6にタンパク質分離における分離能の流速依存性を示します。分離能の流速依存性は、流速6 ml/min以上ではあまり見られず、6~8 ml/minが最適流速と考えられます。

### 3-2 グラジエント時間

図-7に、分離能のグラジエント時間依存性を示します。分離能は、グラジエント時間が長くなるにつれて向上しますが、試料の希釈、実用的な分析時間を考慮しますと、グラジエント時間は80分前後が最適と思われる。

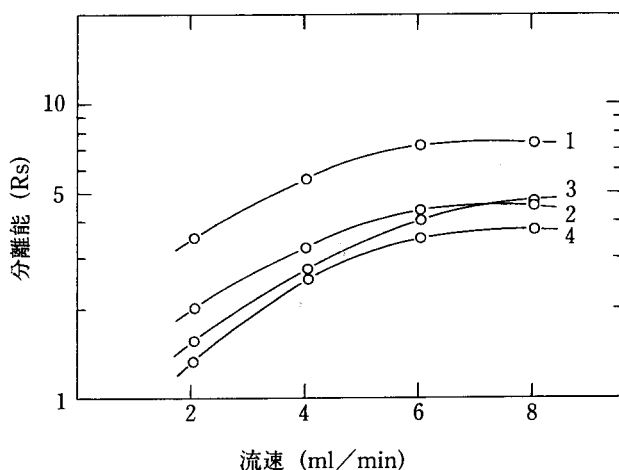


図-6 TSKgel Phenyl-5 PW RP分取カラムを用いたタンパク質の分離における分離能の流速依存性

カラム; TSKgel Phenyl-5 PW RP21.5mmID×15cm  
 溶離液; A: 0.05% TFA + 5% アセトニトリル

B: 0.05% TFA + 60% アセトニトリル

A→Bリニアグラジエント (44分)

流速; 2~8 ml/min

温度; 25°C

検出; UV (220nm)

分離能(Rs); 1. リボヌクレアーゼ/チトクロムC

2. チトクロムC/リゾチーム

3. リゾチーム/α-ラクトアルブミン

4. α-ラクトアルブミン/ミオグロビン

試料量; 各1 mg

### 3-3 試料負荷量

図-8に粗ウレアーゼを用いた試料負荷量の分離に及ぼす影響を示します。試料負荷量は20mgでも、5 mgの場合とほぼ同様な分離が得られており、分離能を変えない試料負荷量は、粗試料で約20mgと考えられます。また精製標準品の試料負荷量は約1.5mgです。図-9に分析カラムと分取カラムの分離の比較を示します。分析カラムの方がやや良い分離能が得られていますが、分取カラムでもほぼ同様な溶出パターンが得られています。

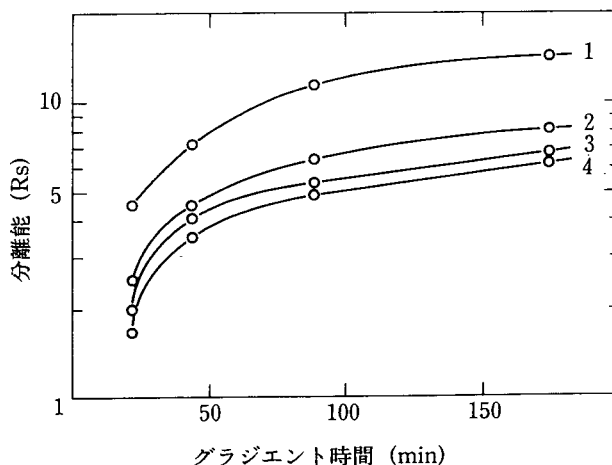


図-7 TSKgel Phenyl-5 PW RP分取カラムを用いたタンパク質分離における分離能のグラジエント時間依存性

カラム; TSKgel Phenyl-5 PW RP21.5mmID×15cm  
 分離条件; 図-6に同じ

ただしグラジエント時間22~176分、流速6 ml/min

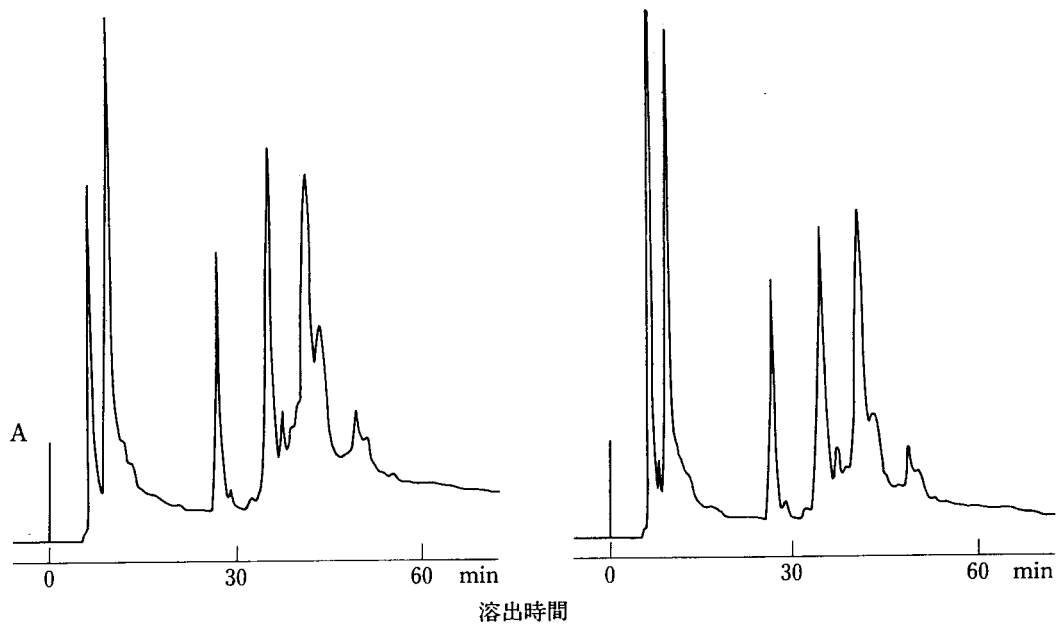


図-8 TSKgel Phenyl-5 PW RP分取カラムを用いた粗ウレアーゼの分離

試料;粗ウレアーゼ(A. 5 mg in 0.25ml、B. 20mg in 1 ml)

カラム; TSKgel Phenyl-5 PW RP21.5mmID×15cm

溶離液; A:0.05%TFA+5%アセトニトリル

B:0.05%TFA+80%アセトニトリル

A<sup>2分</sup>A/B (75/25) <sup>6分</sup>A/B (25/75)

流速; 6 ml/min

温度; 25°C

検出; UV (220nm)

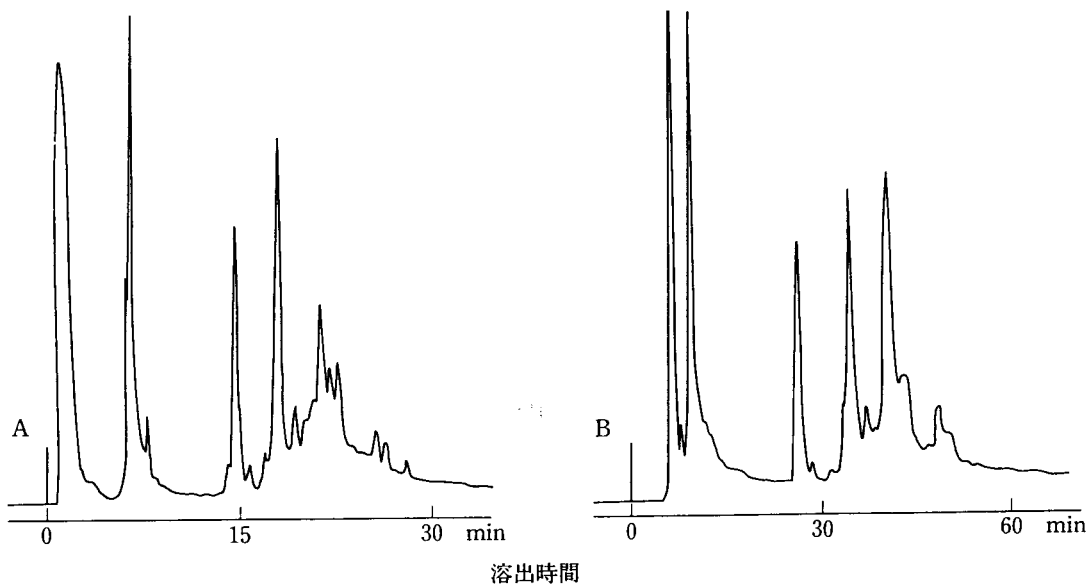


図-9 TSKgel Phenyl-5 PW RPを用いた粗ウレアーゼの分離における分析用カラムと分取用カラムの比較

試料;粗ウレアーゼ (A. 1 mg、B. 20mg)

カラム; TSKgel Phenyl-5 PW RP

A. 4.6mmID×7.5cm

B. 21.5mmID×15cm

分離条件; A. 図-2に同じ

B. 図-8に同じ



#### 4. おわりに

表-2にTSKgel Phenyl-5 PW RP分取カラムの標準溶離条件を示します。また表-3、4に、RPC用TSK-GELの特長および標準的溶離条件を示します。

表-2 TSKgel Phenyl-5 PW RP分取用  
(21.5mmID×15cm)の標準溶離条件

溶離液	TFA-アセトニトリル
流速	6 ~ 8 ml/min
グラジエント時間	60-120min
試料負荷量*	粗試料 約20mg 精製品 約1.5mg

\* 分離能を変えない最大試料負荷量

表-3 PRC用カラムの使い分け

カラム	最適分画範囲	特長
TSKgel ODS-80T <sub>M</sub>	100-6,000	<ul style="list-style-type: none"> <li>●汎用的</li> <li>●高分離能による厳密な分析、試料の純度検定</li> <li>●合成ペプチドの分離分取</li> <li>●ペプチドマッピング</li> <li>●遺伝子組替え産物等のペプチド消化物の分離分析</li> </ul>
TSKgel ODS-120T	6,000-10,000	●TSKgel ODS-80T <sub>M</sub> の補完
TSKgel Octadecyl-4 PW	1,000-20,000	<ul style="list-style-type: none"> <li>●中、高分子量ペプチドの分離に適する</li> <li>●耐アルカリ性があり、カラムの洗浄が容易</li> <li>●吸着特性の異なる塩基性条件下での分離可能</li> </ul>
TSKgel Octadecyl-NPR	1,000-500,000	<ul style="list-style-type: none"> <li>●超高速分離分析(10分以内)が可能</li> <li>●中、高分子量ペプチド、タンパク質の迅速分離に最適</li> <li>●耐アルカリ性があり、カラムの洗浄が容易</li> <li>●吸着特性の異なる塩基性条件下での分離可能</li> <li>●試料負荷量が少ないが、微量試料の分離分取に最適</li> </ul>
TSKgel Phenyl-5 PW RP	10,000-500,000	<ul style="list-style-type: none"> <li>●タンパク質の分離に最適</li> <li>●耐アルカリ性があり、カラムの洗浄が容易</li> </ul>

\* TSKgel Octadecyl-NPRを除き、全て分取用カラムを準備しています。

表-4 RPCカラムを用いる際の溶離条件

	ペプチド	タンパク質
溶離液の種類*		
TFA	0.05~0.2%	0.05~0.1%
HClO <sub>4</sub>	~ 5 mM	~ 5 mM
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	~ 5 mM	100~200mM
溶離液のpH	シリカ系充填剤はpH 2~7.5が望ましい 樹脂系充填剤はpH 2~12が望ましい	
有機溶媒	アセトニトリル、メタノール、イソプロパノールなど	
流速	1.0ml/min (TSKgel Octadecyl-NPR: 1.0~1.5ml/min)	1.0~1.5ml/min (TSKgel Octadecyl-NPR: 1.0~1.5ml/min)
グラジエント:アセトニトリル濃度 (TSKgel Octadecyl-NPR)	1~1.5%/min (6~8%/min)	1~2.5%/min (4~6%/min)
試料負荷量**		
粗試料	0.5~1 mg (TSKgel Octadecyl-NPR: ~50μg)	
精製品	20~100μg (TSKgel Octadecyl-NPR: 0.01~0.5μg)	

\* 樹脂系充填剤はリン酸、炭酸、アンモニア水等の塩基性溶液が使用可能

\*\* 分離能を変えない最大試料負荷量

参考文献

- 1 Resin-based support for reversed-phase chromatography of proteins Y.Kato, T.Kitamura and T. Hashimoto, *J.Chromatogr.*, 333(1985)93
- 2 Reversed-phase high-performance liquid chromatography of red blood cell membran. S.C. Goheen and T.M.Chow, *J.Chromatogr.*, 359(1986) 297
- 3 New resin-based hydrophilic support for high-performance hydrophobic interaction chromatography. Y.Kato, T.Kitamura and T.Hashimoto, *J. Chromatogr.*, 360(1986)260
- 4 Comparison of reversed-phase column materials for high-performance liquid chromatography of proteins. R.V.D.Zee, T.Hoekzema, S.Welling-Wester and G.W.Welling, *J.Chromatogr.*, 368(1986)283
- 5 Purification strategies for sendai virus membrane proteins. G.W.Welling, K.Slopsema and S. Welling-Wester, *J.Chromatogr.*, 397(1987)165
- 6 Reversed-phase high-performance liquid chromatography of human growth hormone. B.S. Welinder, H.H.Sorensen and B.Hansen, *J. Chromatogr.*, 398(1987)309
- 7 High-performance-hydroxyapatite chromatography of proteins. Y.Kato, K.Nakamura and T. Hashimoto, *J.Chromatogr.*, 398(1987)340
- 8 Estimation of molecular weight of peptides and proteins by reversed phase HPLC. H.Nakazawa, *Bunseki Kagaku*, 36(1987)43
- 9 Recovery of polypeptides after reversed-phase high-performance liquid chromatography. B.S. Welinder, H.H.Sorensen and B.Hansen, *J. Chromatogr.*, 408(1987)191
- 10 Column liquid chromatography of integral membrane proteins. G.W.Welling, R.V.D.Zee and S. Welling-Wester, *J.Chromatogr.*, 418(1987)223
- 11 High-performance affinity chromatography of proteins on TSKgel Heparin-5 PW. K.Nakamura, K.Toyoda and Y.Kato, *J.Chromatogr.*, 445(1988)234
- 12 Localization of the pyridoxal phosphate binding site at the COOH-terminal region of erythrocyte band 3 protein. Y.Kawano, K.Okubo, F.Tokunaga, T.Miyata, S.Iwanaga and N.Hamasaki, *J.Biol. Chem.*,263(1988)8232
- 13 High-performance liquid chromatographic separation of membrane proteins isolated from erythrocyte ghosts. B.S.Welinder, H.H.Sorensen and B. Hansen, *J.Chromatogr.*, 462(1989)255
- 14 Correlation of protein retention times in reversed-phase chromatography with polypeptide chain length and hydrophobicity. C.T.Mant, N.E. Zhou and R.S.Hodges, *J.Chromaotgr.*, 476(1989) 363
- 15 Purification and characterization of a peptide C-terminal  $\alpha$ -amidating enzyme from porcine atrium. M.Kojima, K.Mizuno, K.Kangawa and H. Matsuo, *J.Biochem.*, 105(1989)440