



SEPARATION REPORT

TSK-GELを用いたゲル濾過(サイズ排除) クロマトグラフィーによるペプチドの分離

—— 目 次 ——

	ページ
1 はじめに	1
2 実施例	3
3 おわりに	6

1. はじめに

高性能ゲル濾過(サイズ排除)クロマトグラフィー(GFCまたはSEC)を用いたペプチドの分離は操作が簡単で、ペプチドの分子量の推定手段として使用できるだけでなく、ペプチドやタンパク質分解産物としてのペプチド断片の精製手段の1つとして、逆相クロマトグラフィー(RPC)やイオン交換クロマトグラフィー(IEC)と併用されています。またGFCでの溶出パターンの比較から病態を推察するという臨床応用もなされています。

表-1に、TSK-GELを用いたGFCによるペプチド分離に関する主な文献とその概要を示します。各著者とも、

溶離液を工夫して分離を行っており、GFCに用いられる溶離液が分離性能やフラクションの後処理に影響することがわかります。一般的にGFCによるペプチドの分離では、充填剤にはシリカ系TSK-GELのSWタイプの方が、樹脂系のTSK-GEL PWタイプよりも多用されていますが、今回、それら充填剤の高性能品(TSKgel G2000SW_{XL}およびTSKgel G2500PW_{XL})について、ペプチドの分離を比較検討しましたので報告します。なお、ペプチドの分離に高い分離能を持つRPCについては、セパレーションレポートNo.63、65、69に詳しい報告がありますので、参照下さい。

表一 TSK-GELを用いたGFC (SEC) によるペプチドの分離に関する主な文献

文献No.	カラム	試料	溶離条件および概要
1	TSKgel G2000SW	尿毒症患者体液中のペプチド	50mMリン酸緩衝液 (pH7.2) + 0.3%SDS 正常人と患者の血清のGFCによる分離比較
2	TSKgel G2000SW	標準ペプチド (MW200~10,000)	0.15Mリン酸緩衝液 (pH7.4) + 1MNaCl + 20%メチルセル ソルブ + 1%SDS 約50種のペプチドの溶出挙動を詳細に研究
3	TSKgel G3000PW	標準ペプチド (MW300~)	0.1%TFA + 45%アセトニトリル PWカラムで11種のペプチドの溶離条件の検討
4	TSKgel G2000SW TSKgel G3000SW	標準ペプチド (MW255~)	6 Mグアニジン塩酸 較正曲線の直線性を検討
5	TSKgel G2000SW	標準ペプチド (MW255~9,700)	0.1Mギ酸 ペプチドの脱塩の検討
6	TSKgel G2000SW	心房のnatriuretic peptide	10mMTFA + 0.2M NaCl + 30%アセトニトリル 3 K~ 5 K、13Kの活性ペプチドの分離
7	TSKgel G3000SW	トロポニンI-CNBr断片 (MW1,437~4,050)	0.2Mギ酸ナトリウム + 6 M尿素 + 0.1%TFA 次のIECに直接導入できる溶離条件での分離
8	TSKgel G2000SW	β -チュブリン消化物 (3~30残基ペプチド)	10mM酢酸アンモニウム (pH6.8) RPCとの併用による分離精製
9	TSKgel G2000SW	標準ペプチドおよび カゼイン加水分解物	0.05Mリン酸緩衝液 (pH2.5) + 0.1%TFA + 35%メタノール ペプチドの溶離条件の検討
10	TSKgel G2000SW TSKgel G3000SW	標準ペプチド、タンパク質	0.1%TFA + 0.25M NaCl 37種の試料について、分子量、アミノ酸残基の性質と溶出 位置の関係を検討
11	TSKgel G2000SW	異常フィブリノーゲンの消化物	10mMリン酸緩衝液 + 6 Mグアニジン塩酸 + 1 mM EDTA ペプチドの精製と分子量推定 (MW1,535~2,473)
12	TSKgel G2000SW	コラーゲン α 2 (IV)鎖消化物	0.1%TFA + 酢酸アンモニウム GFC + RPCでペプチドの精製
13	TSKgel G2000SW	標準ペプチドおよび ミオグロビンCNBr断片	0.1%TFAまたは50mM KH_2PO_4 (pH6.5) + 0.5MKCl + 8 M尿素など ペプチドの溶出挙動、充填剤との相互作用について検討
14	TSKgel G2000SW	β -エンドルフィン β -リポトロピン	50mMリン酸緩衝液 (pH5.8) + 20%アセトニトリル RPCでは分離不可能なペプチドのGFCでの分離
15	TSKgel G2000SW	6-ホスホ-2-キナーゼのトリプシン 消化物等	20mMリン酸緩衝液 (pH6.0) + 6 Mグアニジン塩酸 ラベル化された酵素活性部位を含むペプチドの分離
16	TSKgel G2000SW	α -グリアジン消化物	6 Mグアニジン塩酸 (pH4.95) RPCで精製したペプチドの分子量推定 (MW300~3,000)
17	TSKgel G2000SW	アミノアシルtRNA合成酵素のペプチ ド断片	酢酸/アセトニトリル/ H_2O = 2/3/5 活性部位を含むペプチドの分離
18	TSKgel G2000SW	ヒトリンパ球中好性刺激ペプチド	0.1%TFA ペプチド (10K) の精製、酸性条件下で分離・回収率良好
19	TSKgel G2000SW	アセチルコリン受容体の活性部位ペプ チド断片	10%酢酸 + 8 M尿素 アフィニティラベルされたペプチド断片の精製、分子量推 定
20	TSKgel G2000SW	ウシミルクホエータンパク質の加水分 解物	0.1%TFA + 35%メタノール 試料加水分解物のアレルギー作用への影響に関する研究
21	TSKgel G2000SW	ペプチド各種	HPLCによるペプチド分離法に関する総説 GFC, RPC, IECの使い分け、組み合わせ等についても言及
22	TSKgel G2000SW	ヘモグロビン消化物	10mM酢酸アンモニウム (pH6.0) パイロットスケールで生産された試料のペプチド消化物 (MW1,000~22,000) の分離
23	TSKgel G2000SW	ヒトneutrophil peptide (MW3,715)	50mMグリシン (pH2) + 0.1M NaCl RPCとの併用で精製、アミノ酸配列解析
24	TSKgel G3000PW	Cyt.P _{450sc} -アドレノドキシンの複合体 のペプチド断片	0.1%TFA + 30%アセトニトリル 複合体形成部位のペプチドの分離精製、PWカラムでの分離

2. 実施例

1) 標準ペプチドの分離

表-2に各種標準ペプチドの溶出容量を、図-1に較正曲線を示します。なお、溶離液には、45%アセトニトリルを含む0.1%TFA溶液を用いています。試料の溶出は、全体的にTSKgel G2000SW_{XL}の方がTSKgel G2500PW_{XL}よりも遅くなっています。また、ミオグロビン(MW17,800)は、TSKgel G2000SW_{XL}では、充填剤のポア内部に入っていますが、TSKgel G2500PW_{XL}では、ミオグロビンは、ポアから排除され、ポイド容積に溶出しています。その結果TSKgel G2500PW_{XL}のペプチドの排除限界はこ

の溶離液条件下では分子量約8,000と考えられ、シリカ系充填剤であるTSKgel G2000SW_{XL}の方が低分子量領域から高分子量領域まで幅広い分画範囲を持つことがわかります。

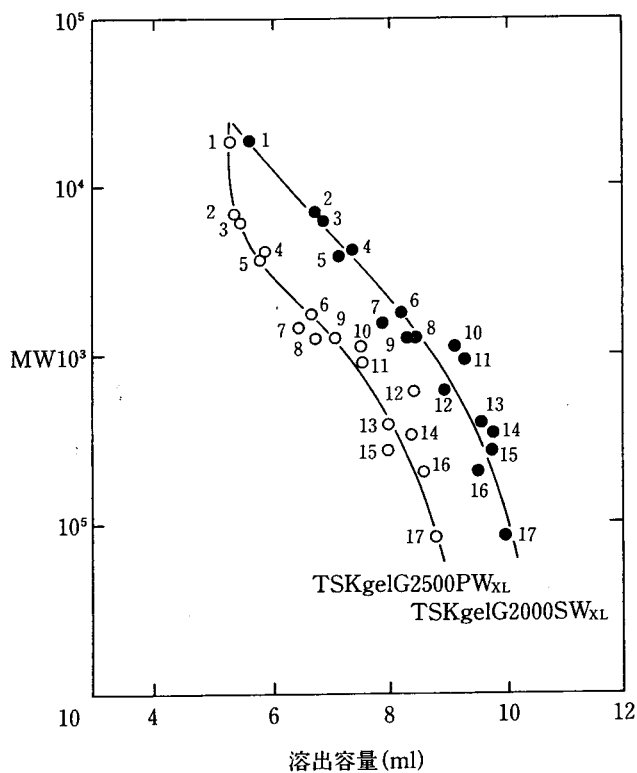
一方、分子量が約3,000以下であれば較正曲線を比較した場合TSKgel G2500PW_{XL}でもTSKgel G2000SW_{XL}とほぼ同じ傾きを示し、分離範囲がよく似ていることがわかります。しかし、個々のペプチドの溶出容量を比較すると、微妙に異なっており(特にLeu-エンケファリン)、分離に関して充填剤との相互作用(イオンの、疎水的相互作用等)が影響していると考えられます。

表-2 TSKgel G2500PW_{XL}および
TSKgel G2000SW_{XL}を用いたペプチドの溶出容量

ペプチド	MW	溶出容量(ml)	
		TSKgel G2500PW _{XL}	TSKgel G2000SW _{XL}
Glycine	75	8.8	10.0
Alanyl-valine	188	8.6	9.5
Glycylglycylglycylglycine	246	8.0	9.7
Glutathione	307	8.4	9.8
TRH	362	8.0	9.6
Leucine-Enkepharin	555	8.5	9.0
DSIP	848	7.6	9.3
Oxytocin	1,007	7.6	9.2
LH-RH	1,182	7.1	8.3
Bradykinin potentiator B	1,182	6.7	8.4
Substance P	1,347	6.5	7.9
Bombesin	1,619	6.7	8.2
Glucagon	3,482	5.9	7.2
Big gastrin	3,849	5.9	7.4
Insulin	5,807	5.5	6.9
Aprotinin	6,500	5.4	6.7
Myoglobin	17,800	(5.35)*	5.6

溶離液:0.1%TFA+45%アセトニトリル *排除された
流速:1.0ml/min

図-1 TSKgel G2500PW_{XL}および
TSKgel G2000SW_{XL}の較正曲線



カラム ; TSKgel G2500PW_{XL}、TSKgel G2000SW_{XL}

7.8mmID×30cm

溶離液 ; 0.1%TFA+45%アセトニトリル

流速 ; 1.0ml/min

温度 ; 25°C

検出 ; UV (215nm)

試料 ; 1. ミオグロビン (17,800) 2. アプロチニン (6,500)
3. インシュリン (5,807) 4. ビッグガストリン (3,849)

5. グルカゴン (3,482) 6. ボンベシン (1,619)
7. サブスタンスP (1,347) 8. ブラジキニン-ポテンシエーターB (1,182)
9. LH-RH (1,182) 10. オキトシン (1,007)
11. DSIP (848) 12. ロイシン-エンケファリン (555)
13. TRH (362) 14. グルタチオン (307)
15. グリシン 4量体 (246) 16. グリシン (75)

図-2、3に標準ペプチドの分離に関するTSKgel G2500PW_{XL}とTSKgel G2000SW_{XL}の比較を示します。図から明らかなように全般的にTSKgel G2000SW_{XL}の方がピークのシャープ性、分離帯の広さに優れているため、分離能が高くなっています。一方、TSKgel G2500PW_{XL}では、ペプチドの分子量が約1,000以下の場合、微妙な充填剤との相互作用のため図-2のオキシトシン(MW1,007)/Leu-エンケファリン(MW555)、図-3のTRH(MW362)/グリシン(MW75)では、TSKgel G2000SW_{XL}よりも分

離能が高くなっています。

このように全般的にはTSKgel G2000SW_{XL}が高い分離能を持ちますが、分子量1,000以下のペプチドでは、TSKgel G2500PW_{XL}が良い結果をもたらす場合があります。またTSK-GEL SWタイプ等のシリカ系充填剤は耐アルカリ性がないため、アルカリ条件下での分離やカラムの洗浄をNaOH等で行いたい場合は、樹脂系のTSK-GEL PWタイプが良いと考えられます。

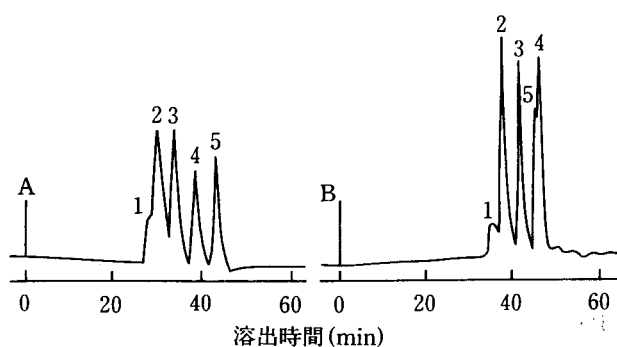


図-2 ペプチド混合物の分離(1)

カラム ; A. TSKgel G2500PW_{XL} 7.8mmID×30cm
B. TSKgel G2000SW_{XL} 7.8mmID×30cm

溶離条件; 図-1に同じ(但し、流速0.2ml/min)

試料 ; 1. アプロチニン 2. ビッグガストリン
3. ボンベシン 4. オキシトシン 5. ロイシン-エンケファリン(各約2.5μg in 40μl)

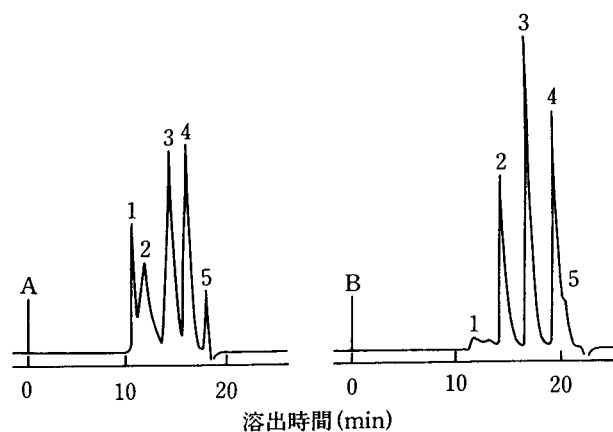


図-3 ペプチド混合物の分離(2)

カラム ; A. TSKgel G2500PW_{XL} 7.8mmID×30cm
B. TSKgel G2000SW_{XL} 7.8mmID×30cm

溶離条件; 図-1に同じ(但し、流速0.5ml/min)

試料 ; 1. ミオグロビン 2. グルカゴン 3. LH-RH 4. TRH 5. グリシン
4. TRH、5. グリシン

2) タンパク質の消化物の分離

図-4に遺伝子産物であるプロテインAのTPCK-トリプシン消化物の分離を示します。タンパク質の消化物のような分子量の異なる多数のペプチド種を含む試料では2-1)で示したように、分離帯の広いTSKgel G2000SW_{XL}の方が、やや優れた分離を示しています(この同一試料のRPCでの分析は、セパレーションレポートNo.69に示してあり、PRCでは約60のペプチドのピークが確認できます)。

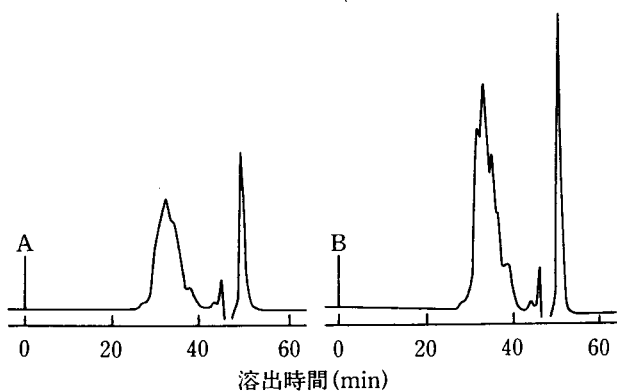


図-4 タンパク質消化物の分離

カラム ; A. TSKgel G2500PW_{XL} 7.8mmID×30cm
B. TSKgel G2000SW_{XL} 7.8mmID×30cm

分離条件 ; 図-1に同じ (但し、流速0.2ml/min)

検出 ; UV (215nm)

A : 0.64ABS/FS B : 0.32ABS/FS

試料 ; 組み換えプロテインA-TPCKトリプシン消化物

(20 μ g in 20 μ l)

3. おわりに

表-3にGFCを用いたペプチドの分離に関するTSK-GELの使い分け、特長について示します。一般的にはTSKgel G2000SW_{XL}が最適と考えられますが、耐アルカリ性やペプチドの分子量を考慮して、TSKgel G2500PW_{XL}やTSKgel G3000PW_{XL}も使用することができます。

表-3 ゲル濾過(サイズ排除)クロマトグラフィーを用いたペプチドの分離におけるTSK-GELの使い分け

TSK-GEL	ペプチド、タンパク質の分子量分画範囲	特長
TSKgel G2000SW _{XL}	100 — 100,000*	第一選択カラム 幅広い分離帯で 高分離能
TSKgel G2500PW _{XL}	100 — 5,000	低分子量ペプチド用 耐アルカリ性あり
TSKgel G3000PW _{XL}	1,000 — 50,000	高分子量ペプチド用 耐アルカリ性あり

*推定値

参考文献

- 1 Analysis of middle molecular peptides in normal and uremic body fluids by high-performance gel chromatography, H.Mabuchi and H. Nakahashi, J. Chromatogr., 224(1981)322
- 2 Estimation of molecular weights of peptides by determination of height equivalent to a theoretical plate in size-exclusion chromatography, Y.Shioya, H.Yoshida and T.Nakajima, J.Chromatogr., 240(1982)341
- 3 High-performance gel-permeation chromatography of polypeptides in a volatile solvent : Rapid resolution and molecular weight estimations of proteins and peptides on a column of TSK-G3000-PW, G.D. Swergold and C.S.Rubin, Anal. Biochem., 131(1983) 295
- 4 Molecular weight determination of peptides by high-performance gel permeation chromatography, W. O.Richter, B.Jacob and P.Schwandt, Anal. Biochem., 133(1983)288
- 5 Desalting of peptides by high-performance gel permeation chromatography, W.O.Richter and P. Schwandt, J.Chromatogr.,288(1984)212
- 6 Radioimmunoassay for α -human and rat atrial natriuretic polypeptide K.Nakao, A.Sugawara, N. Morii, M.Sadamoto, M.Suda, J.Soneda, T.Ban, M. Kihara, U.Yamori, M.shimokura, Y.Kiso and H. Imura Biochem. Biophys. Res. Comm. 124(1984)815
- 7 General method for the separation of cyanogen bromide digests of proteins by high-performance liquid chromatography ; Rabbit skeletal troponin I, C.T.Mant and R.S.Hodges, J.Chromatogr., 326(1985) 349
- 8 Amino-acid sequence of β -tubulin from Physarum polycephalum myxamoebae, M.S.-Wowra, L. Clayton, P.Dawson, K.Gull and M.Little, Eur. J. Biochem., 161(1986)669
- 9 High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive, M.A.Vijayakshmi, L.Lemieux and J. Amiot, J.Liquid Chromatogr.,9(1986)3559
- 10 High-performance gel permeation chromatography of proteins and peptides on columns of TSK-G-2000-SW and TSK-G3000-SW : A volatile solvent giving separation based on charge and size of polypeptides, G.B.Irvine and C.Shaw, Anal. Biochem., 155(1986)141
- 11 Fibrinogens Kawaguchi and Osaka : An amino acid substitution of A α arginine-16 to cysteine which forms an extra interchain disulfide bridge between the two A α chains, T.Miyata, S.Terukina, M.Matsuda, A.Kasamatsu, Y.Takeda, T.Murakami and S. Iwanaga, J.Biochem., 102(1987)93
- 12 Construction of a model for the aggregation and cross-linking region(7S domain) of type IV collagen based upon an evaluation of the primary structure of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains in this region, B.Siebold, R. Qian, R.W.Glanville, H.Hofmann, R.Deutzmann and K.Kuhn, Eur. J.Biochem., 168(1987)569
- 13 Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides : Requirement for peptide standards to monitor column performance and nonideal behaviour, C.T.Mant, J.M.R.Parker and R.S. Hodges, J.Chromatogr., 397(1987)99

- 14 The combined use of size-exclusion and reversed-phase high-performance liquid chromatography for characterization of β -endorphin processing pathways, A.I. Smith, C.A. Wallace, M.C. Cheng and D.J. Autelitano, *J. Chromatogr.*, 416(1987)255
- 15 Functional homology of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose - 2,6 - bisphosphatase, phosphoglycerate mutase, and 2,3-bisphosphoglycerate mutase, A. Tauler, M.R. El-Maghrabi and S.J. Pilkis, *J. Biol. Chem.*, 262(1987)16808
- 16 Isolation and analysis of peptidic fragments of α -gliadin using reversed phase high-performance liquid chromatography, P. Kocna, P. Fric, M.K. Holaková, J. Slaby, E. Kasárek and W. Th. J. M. Hekkens, *J. Chromatogr.*, 434(1988)429
- 17 Analytical strategy for determination of active site sequences in aminoacyl-tRNA synthetases, C. Beauvallet, C. Hountoundji and J.-M. Cshmitter, *J. Chromatogr.*, 438(1988)347
- 18 Purification and partial biologic characterization of a human lymphocyte derived peptide with potent neutrophil-stimulating activity, J.-M. Schroder, U. Mrowietz and E. Christophers, *J. Immunol.*, 140(1988)3534
- 19 Amino acids of the Torpedo marmorata acetylcholine receptor α subunit labelled by a photoaffinity ligand for the acetylcholine binding site M. Dennis, J. Giraudat, F.K. Hibert, M. Goeldner, C. Hirth, J.Y. Chang, C. Lazure, M. Chretien and J.-P. Changeux, *Biochemistry*, 27(1988)2346
- 20 Immunogenicity and Allergenicity of whey protein hydrolysates, J. Asselin, J. Amiot, S.F. Gauthier, W. Mourad and J. Hebert, *J. Food Sci.*, 53(1988)1208
- 21 Optimization of peptide separations in high-performance liquid chromatography, C.T. Mant and R.S. Hodges, *J. Liquid Chromatogr.*, 12(1989)139
- 22 Identification of peptides from a peptic haemoglobin hydrolysate produced at pilot-plant scale, by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry, J.M. Piot, D. Guillochon, Q. Zhfao, G. Ricart, B. Fournet and D. Thomas, *J. Chromatogr.*, 481(1989)221
- 23 Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family, C.G. Wilde, J.E. Griffith, M.N. Marra, J.L. Snable and R.W. Scott, *J. Biol. Chem.*, 264(1989)11200
- 24 Cross-linking studies of the cholesterol hydroxylation system from bovine adrenocortical mitochondria, I.V. Turko, T.B. Adamovich, N.M. Kirillova, S. A. Usanov and V.L. Chashchin, *Biochim. Biophys. Acta*, 996(1989)37