



TOSOH

SEPARATION REPORT

高性能・高吸着容量イオン交換クロマトグラフィー用カラム TSKgel SuperQ-5 PWとその応用

——目 次——

	ページ
1. はじめに	1
2. TSKgel SuperQ-5PWの基本的性質	1
2-1 総イオン交換容量	1
2-2 タンパク質吸着容量	1
2-3 化学的安定性	1
2-4 回収率	1
2-5 分離能	2
3. 分離能への溶離条件の影響	3
3-1 試料負荷量の影響	3
3-2 測定流速の影響	5
3-3 グラジエント時間の影響	5
3-4 試料溶液中の塩濃度の影響	5
4. 応用例	7
4-1 モノクローナル抗体の分離	7
4-2 卵白の分離	7
4-3 ウレアーゼの分離	7
4-4 リポキシダーゼの分離	7
5. TSKgel SuperQ-5PWからTSKgel SuperQ- Toyopearl 650 へのスケールアップ	8
6. おわりに	9

1. はじめに

タンパク質の分離、精製的手段としてイオン交換クロマトグラフィーは、その操作性、適用範囲の広さから幅広く利用されています。今回、新しく開発したTSKgel SuperQ-5PWはTSKgel G5000PWに四級アンモニウム基を導入した強アニオン交換体であり、従来のイオン交換体に比べ高い吸着容量及び回収率と優れた分離能を有しています。ここでは、TSKgel SuperQ-5PWの基本的性質及びタンパク質分離への応用例を紹介いたします。

2. TSKgel SuperQ-5PWの基本的性質

2-1 総イオン交換容量

TSKgel SuperQ-5PWは、水系GPC用充填剤TSKgel G5000PWに4級アンモニウム基を導入した強アニオン交換体で、総イオン交換容量は 0.15 ± 0.02 meq/ml-gelです。

2-2 タンパク質吸着容量

表-1は、分子量の異なるタンパク質の吸着容量をカラムに通液した状態（動的吸着容量）で調べた結果です。TSKgel SuperQ-5PWの牛血清アルブミン（BSA）での吸着容量は、現行のTSKgel DEAE-5PWが 40 ± 5 mg/ml-gelであるのに対し約2倍強の 100 ± 20 mg/ml-gelです。また、高分子量のタンパク質に対しても高い吸着容量を有しています。吸着されたタンパク質の脱着は0.5M NaClを含む50mMトリス塩酸バッファ（pH 8.6）で行いましたが、いずれのタンパク質も回収率は100%でした。

表-1 TSKgel SuperQ-5PWにおけるタンパク質の動的吸着容量

タンパク質	吸着容量 (mg/ml) *
IgG	15
BSA	100
Trypsin inhibitor	136

* 動的吸着容量は、前端分析法より求めた。
カラムサイズ；7.5mm I.D.×7.5cm、流速；1.0ml/min、
試料；20mg/ml

2-3 化学的安定性

表-2に、TSKgel SuperQ-5PWを0.5N NaOH及び0.5N HCl中に25℃で10日間浸せきしたときのイオン交換容量及び牛血清アルブミンの吸着容量を示します。10日経過後、0.5N NaOH及び0.5N HCl中ともにイオン交換容量及び牛血清アルブミンの吸着容量に変化は見られませんでした。次に、カラムで0.5N NaOH水溶液を通液、洗浄を繰り返し行いました。0回及び15回目のクロマトグラムを図-1に示します。

結果からわかるようにTSKgel SuperQ-5PWカラムを0.5N NaOH水溶液で通液、洗浄してもカラムの性能（溶出容量及び分離能）には低下は見られませんでした。またタンパク質の吸着容量にも変化は見られませんでした。したがって、TSKgel SuperQ-5PWは酸、アルカリに対して安定であり、タンパク質の粗精製試料や細胞培養液などを分離した後のカラムの汚染に対して酸、アルカリによる洗浄、再生またはCIP (Clean in place) を行うことができます。

2-4 回収率

カラムを50mMトリス塩酸バッファ（pH 8.6）で30分平衡化した後、各種タンパク質を注入し吸着させ、1分後、0.5M NaClを含む50mMトリス塩酸バッファ（pH 8.6）で脱着した溶出液を分光光度計（吸光度280nm）で測定し、回収率を求めました。結果を表-3に示します。現行のTSKgel DEAE-5PWと同様にいずれのタンパク質も回収率は定量的でした。

表-2 アルカリおよび酸浸せき（25℃、10日間）におけるTSKgel SuperQ-5PWの化学的安定性

イオン交換体	溶液	イオン交換容量	
		浸せき前	浸せき後
TSKgel SuperQ-5PW	0.5N HCl	0.15	0.15
TSKgel SuperQ-5PW	0.5N NaOH	0.15	0.14

イオン交換体	溶液	BSA吸着容量	
		浸せき前	浸せき後
TSKgel SuperQ-5PW	0.5N HCl	111	111
TSKgel SuperQ-5PW	0.5N NaOH	111	112

2-5 分離能

表-4に、各種イオン交換体におけるタンパク質(オブアルブミン/トリプシンインヒビター) の分離能の比較を示します。表から明らかなように、TSKgel SuperQ-5PWは、非常に高い分離能を示しています。そのため、より短いグラジエント時間でも高分離能が得られます。

図-2に標準タンパク質4種類、カーボニックアンヒドラーゼ(牛赤血球)、トランスフェリン(ウシ)、オブアルブミン(ニワトリ卵)、トリプシンインヒビター(大豆)を分離したクロマトグラムを示します。

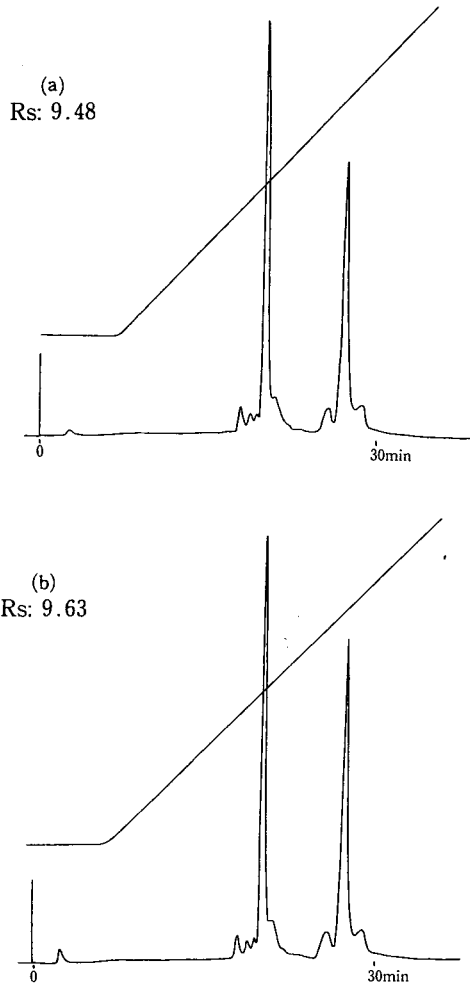


図-1 TSKgel SuperQ-5PWにおける化学的安定性
(0.5N NaOHによるCIP洗浄)

カラム; TSKgel SuperQ-5PW 7.5mm I.D. × 7.5cm

溶離液; A: 50mM トリス-HCl (pH 8.6)

B: A + 0.5M NaCl

A → B リニアグラジエント (60分)

流速; 1.0ml/min

温度; 25°C

検出; UV (280nm)

試料; オブアルブミン (1mg)、

トリプシンインヒビター (1mg)、100μl

カラム洗浄; 0.5N NaOHを1.0ml/minでカラム容積の10倍量通液し、そのままカラムを封入、放置(1日)。翌日、カラムを蒸留水でカラム溶出液が中性になるまで洗浄。その後バッファーでカラムを平衡化し、タンパク質の分離能測定。

(a) 0日目 (カラム洗浄前)

(b) 15日目 (カラム洗浄15回後)

表-3 TSKgel SuperQ-5PWにおけるタンパク質の回収率

Protein	Recovery (%)
Thyroglobulin	101
IgG	106
Bovine serum albumin	101
Hemoglobin	99
Ovalbumin	106
β-Lactoglobulin	105
Trypsin inhibitor	100
Myoglobin	101

Each protein of 0.4mg was applied to Super Q-5PW column (7.5mm I.D. × 7.5cm) in 0.05M tris-HCl buffer (pH 8.6) and the absorbed protein was desorbed in 0.05M tris-HCl buffer (pH 8.6) containing 0.5M NaCl

表-4 各種イオン交換体における分離能の比較

Column	Column size	Resolution (OVA/STI)
TSKgel SuperQ-5PW	7.5mm I.D. × 7.5cm	11.05 (8.44)*
	5mm I.D. × 5cm	8.10
TSKgel DEAE-5PW Glass	5mm I.D. × 5cm	5.58
A社 パーフェュージョンQタイプ	6.4mm I.D. × 3cm	4.61
A社 Qタイプ	5mm I.D. × 5cm	5.85

溶離条件は図-1に順ずる。

*: 30分リニアグラジエント

3. 分離能への溶離条件の影響

3-1 試料負荷量の影響

試料にオブアルブミン (ニワトリ卵) とトリプシンインヒビター (タイズ) 及びβ-ラクトグロブリン (Bovine Milk) を用い、注入量を変えて試料負荷量を調べました。結果を図-3、図-4に示します。この実験における最大試料負荷量の150mg及び100mgでも、タンパク質は十分吸着分離されています。試料によって異なりますが、ピークの形状や溶出位置が大きく変化しない試料負荷量はオブアルブミンとトリプシンインヒビターの混合物で約100mg、β-ラクトグロブリンで約40mgでした。

次に、各種イオン交換体における大量試料負荷時における分離の比較を図-5に示します。カラム容量1mlに対し、40mgのタンパク質試料を負荷した場合、TSKgel Super Q-5PWのみが、正常なクロマトグラムを示しています(図-2参照)。その他のイオン交換体では、試料のオーバーロードによる偽ピークの出現が顕著となっています。

以上のように、TSKgel SuperQ-5PWでは、100mg以上のタンパク質負荷(カラムサイズ:7.5mmI.D.×7.5cm)でも十分な保持と分離能が得られます。そのため分析カラムサイズで、セミ分取が行えます。

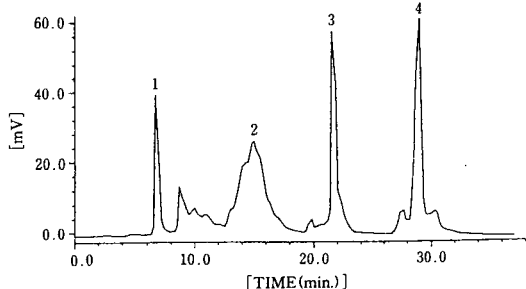


図-2 タンパク質混合物の分離

条件は、図-1に同じ

ただし 試料; 1. カーボニックアンヒドラーゼ (2 mg)
2. トランスフェリン (4 mg)
3. オブアルブミン (5 mg)
4. トリプシンインヒビター (5 mg)
注入量100 μ l

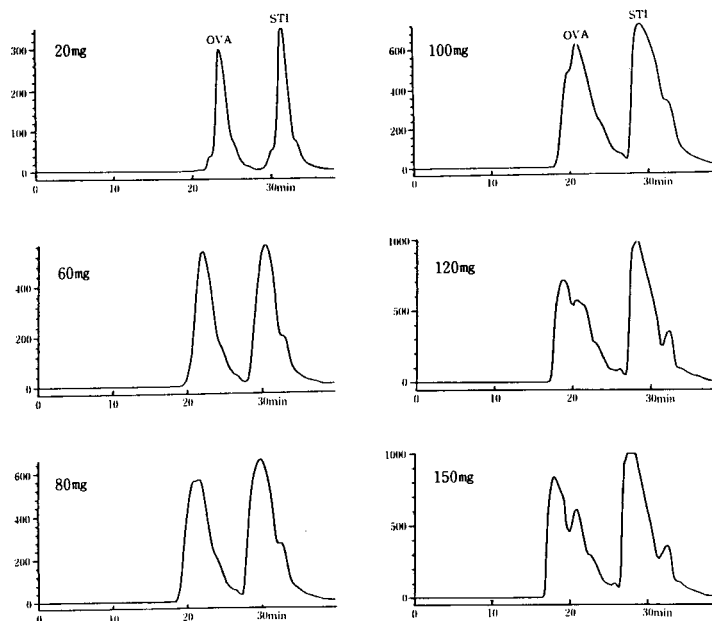


図-3 TSKgel SuperQ-5PWを用いたタンパク質分離における試料負荷量の影響(1)

カラム; TSKgel SuperQ-5PW 7.5mmI.D.×7.5cm

溶離液; A: 50mM トリス-HCl (pH8.3)

B: A+0.5M NaCl

A→Bリニアグラジエント (60分)

流速; 1.0ml/min

温度; 25°C

検出; UV (280nm)

試料; オブアルブミン、トリプシンインヒビター
(各10mg/ml)、2~7.5ml

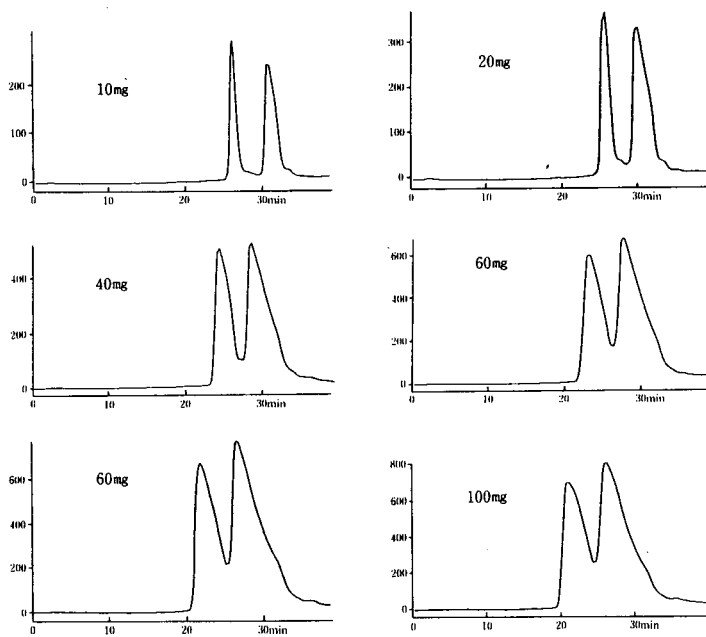


図-4 TSKgel SuperQ-5PWを用いたタンパク質分離における試料負荷量の影響(2)

カラム ; TSKgel SuperQ-5PW 7.5mmI.D.×7.5cm
 溶離液 ; A : 20mM ピペラジンバッファー (pH6.0)
 B : A+0.3M NaCl
 A→Bリニアグラジエント (60分)
 流速 ; 1.0ml/min
 温度 ; 25℃
 検出 ; UV (280nm)
 試料 ; β-ラクトグロブリン (20mg/ml)、0.5~5 ml

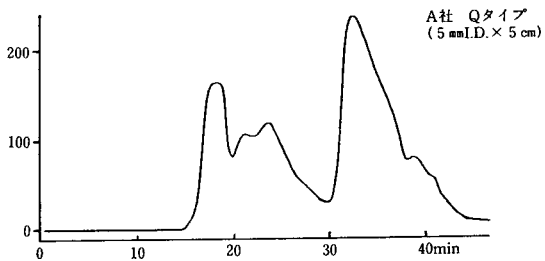
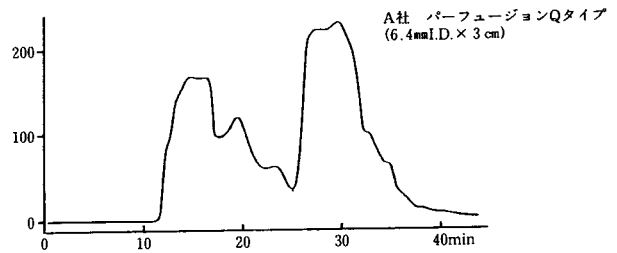
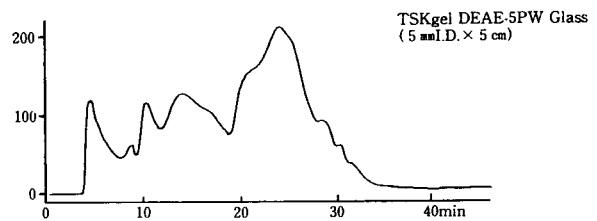
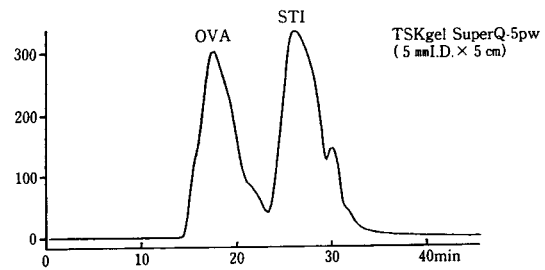


図-5 大量試料負荷における各種イオン交換体での分離比較

カラム ; TSKgel SuperQ-5PW (5 mmI.D.×5 cm)
 TSKgel DEAE-5PW Glass (5 mmI.D.×5 cm)
 A社 パーフェュージョンQタイプ (6.4mmI.D.×3 cm)
 A社 Qタイプ (5 mmI.D.×5 cm)
 カラム容積は全て1.0ml
 溶離液 ; A : 50mM トリス-HCl (pH8.3)
 B : A+0.5M NaCl
 A→Bリニアグラジエント (60分)
 流速 ; 0.8ml/min
 温度 ; 25℃
 検出 ; UV (280nm)
 試料 ; オブアルブミン (20mg)、
 トリプシンインヒビター (20mg)、注入量 2 ml

3-2 測定流速の影響

グラジエント時間を一定にし、測定流速を0.25、0.5、1.0ml/minと変えてオブアルブミンとトリプシンインヒビターを分離したクロマトグラムを図-6に示します。調べた流速範囲では流速が速いほど分離時間が短く（溶出が早く）、高分離能が得られます。

3-3 グラジエント時間の影響

測定流速を一定（1.0ml/min）にし、30分、60分、120分とグラジエント時間を変えてオブアルブミンとトリプシンインヒビターを分離したクロマトグラムを図-7に示します。グラジエント時間が長いほど高分離能が得られますが、グラジエント時間を長くすると分析に要する時間が長くなり、また、試料の希釈が大きくなります。したがってグラジエント時間は30~60分が適当と思われる。

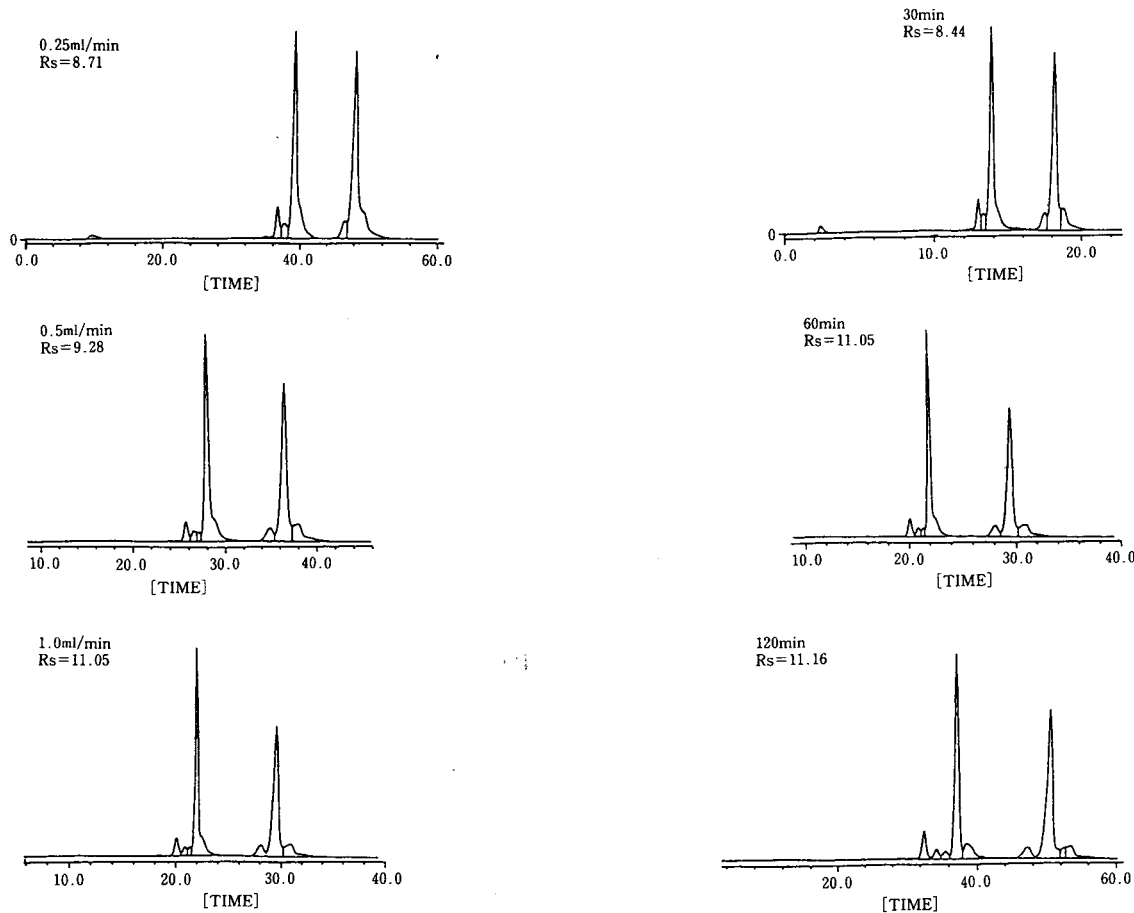


図-6 タンパク質分離における流速の影響
カラム；TSKgel SuperQ-5PW 7.5mmI.D.×7.5cm
条件は図-1に同じ
ただし 流速；0.25、0.5、1.0ml/min

3-4 試料溶液中の塩濃度の影響

試料にオブアルブミンとトリプシンインヒビターを用い塩を含む50mMトリス塩酸バッファー（pH8.6）で溶解し、試料溶液中の塩を0.1M、0.2M、0.3Mと変えてその溶液をカラムに注入しタンパク質の溶出挙動を調べました。図-8にTSKgel SuperQ-5PWの試料溶液中の塩濃度を変えたときのクロマトグラムを示します。図からもわかるように0.1M NaClではタンパク質の溶出に変化は見られませんが、0.2M以上になると素通り（Vo）付近にピークが見られタンパク質が漏れ始めてきて、塩濃度が上がるにつれてオブアルブミンとトリプシンインヒビターのピーク面積が小さくなってきます。図-9に試料溶液中の塩濃度を0.1M NaClにして負荷量を0.2~10mgまで変化させたときのクロマトグラムを示します。塩濃度が0.1M NaClでは負荷量を上げてても分離は低下せずVo付近のタンパク質の溶出も見られません。したがってTSKgel SuperQ-5PWの試料溶液中の塩濃度は0.1M以下を推奨します。

図-7 タンパク質分離におけるグラジエント時間の影響
カラム；TSKgel SuperQ-5PW 7.5mmI.D.×7.5cm
条件は図-1に同じ
ただしグラジエント時間；30、60、120分

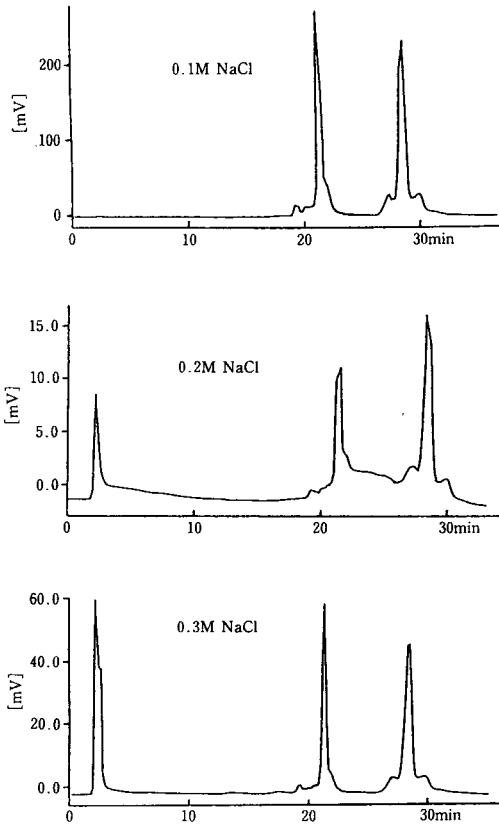


図-8 試料溶液中の塩濃度の影響(1)

カラム ; TSKgel SuperQ-5PW 7.5mm I.D. × 7.5cm
 溶離液 ; A : 50mM トリス-HCl (pH8.3)

B : A + 0.5M NaCl

A → B リニアグラジエント (60分)

流速 ; 1.0ml/min

温度 ; 25°C

検出 ; UV (280nm)

試料 ; オブアルブミン、トリプシンインヒビター
 (各0.5mg in 500μℓ)

試料中の塩濃度は0.1、0.2、0.3M NaCl

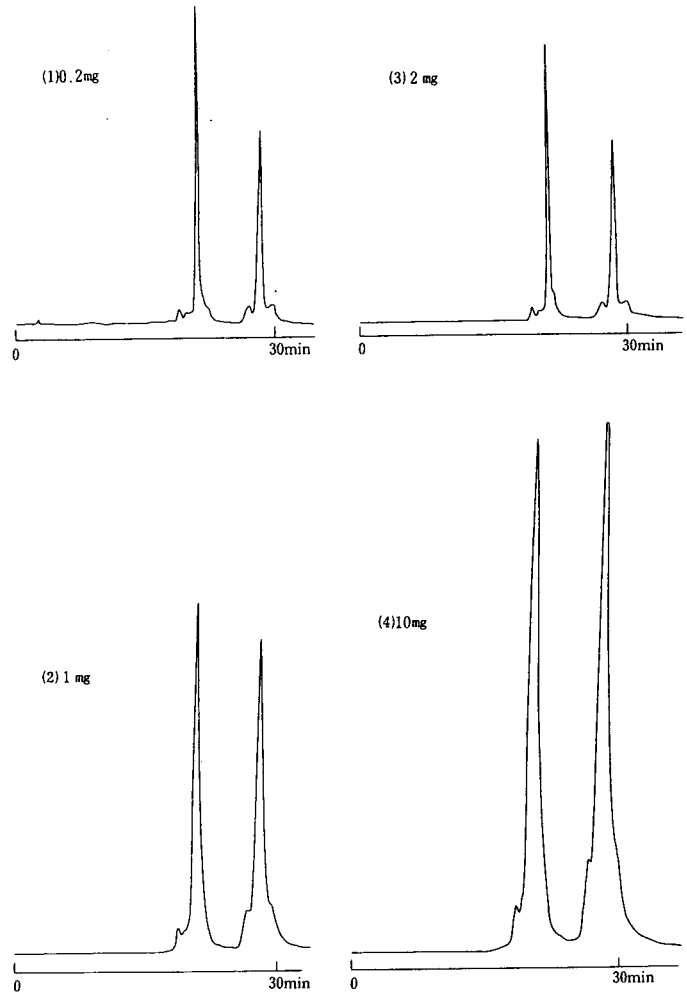


図-9 試料溶液中の塩濃度の影響(2)

条件は図-7に同じ

ただし、試料は(1)各1mg/ml、100μℓ

(2)各2mg/ml、500μℓ

(3)各10mg/ml、100μℓ

(4)各10mg/ml、500μℓ

試料中の塩濃度は、0.1M NaCl

4. タンパク質の分離 (応用例)

4-1 モノクローナル抗体の分離

図-10、図-11にマウス腹水中からそれぞれ異なるモノクローナル抗体 (IgG₁) を、試料注入量を変えて分離した例を示します。試料注入量は100 μ lから5,000 μ lまで変化させました。図-10では、注入量1000 μ lまで、ほぼ同じクロマトグラムが得られています。また得られたモノクローナル抗体画分をサイズ排除クロマトグラフィー (TSKgel G3000SW_{XL}) で純度検定したところ、共に純度92%と高純度な標品が得られていることがわかりました。また注入量5,000 μ lでは、若干不純物ピークの混入が見られますが、良好な分離が得られています。尚、得られたモノクローナル画分の純度は89%でした。

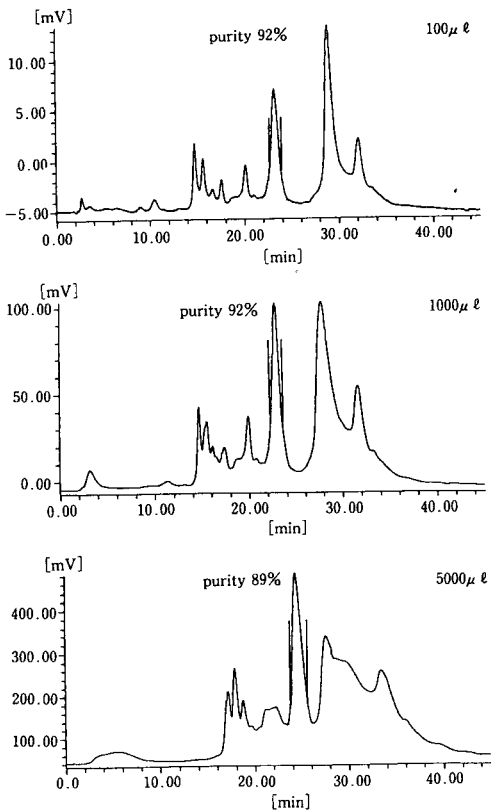


図-10 マウスモノクローナル抗体A (IgG₁) の分離

カラム; TSKgel SuperQ-5PW 7.5mm I.D. × 7.5cm

溶離液; A: 20mM トリス-HCl (pH8.5)

B: A + 0.5M NaCl

A → B リニアグラジエント (60分)

流速; 1.0ml/min

温度; 25°C

検出; UV (280nm)

試料; マウス腹水 (×3)、バッファーで希釈後、マイシヨリディスクでろ過

注入量100、1,000、5,000 μ l

※ IgG₁画分の純度は、サイズ排除クロマトグラフィーによるピーク面積より求めた。

図-11の別のモノクローナル抗体の分離では、マウス腹水中の不純物も、非常に良好に分離できており、注入量5,000 μ lでも、得られたモノクローナル抗体の純度は、94%と、分析レベルと同様な高純度のものが得られています。そのためこの試料については、さらに大量の試料注入も可能と思われます。

4-2 卵白の分離

標準的な溶離条件でニワトリの卵白を分離した例を図-12に示します。

4-3 ウレアーゼの分離

市販のウレアーゼ (Jack Beans) を分離した例を図-13に示します。

4-4 リボキシダーゼの分離

市販の粗リボキシダーゼ (大豆) の分離例を図-14に示します。

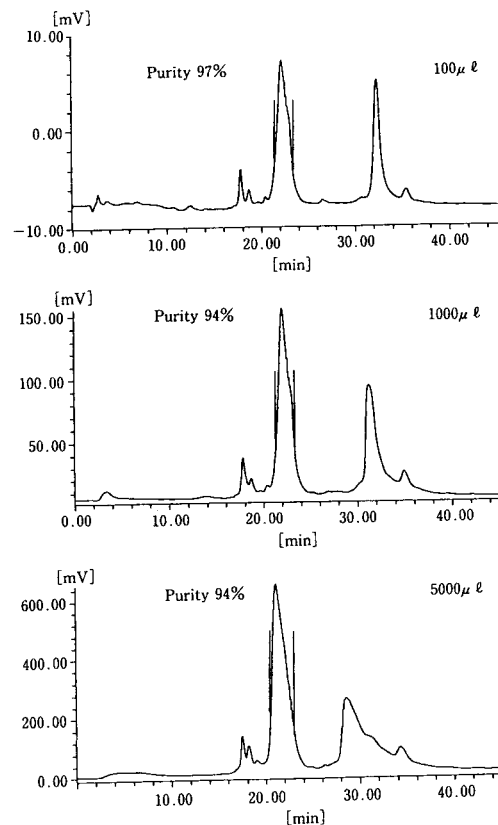


図-11 マウスモノクローナル抗体B (IgG₁) の分離

条件は、図-9と同じ

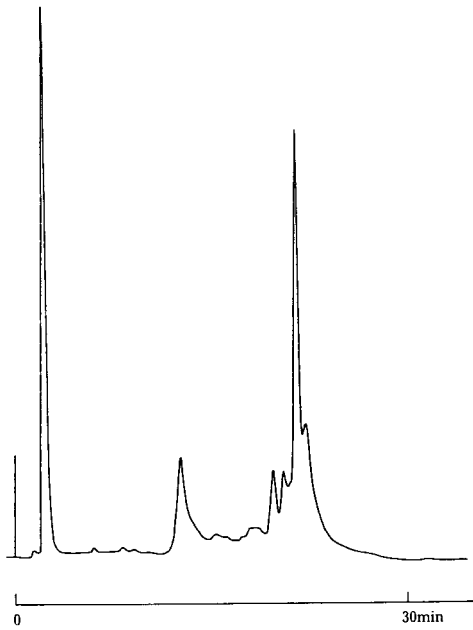


図-12 ニワトリ卵白 (Egg white) の分離
 カラム ; TSKgel SuperQ-5PW 7.5mm I.D.×7.5cm
 溶離液 ; A : 50mM トリス-HCl (pH8.6)
 B : A+0.5M NaCl
 A→Bリニアグラジエント (60分)
 流速 ; 1.0ml/min
 温度 ; 25°C
 検出 ; UV (280nm)
 試料 ; ニワトリ卵白、1 mg/ml、100 μ l

5. TSKgel SuperQ-5PWからTSKgel Super Q-トヨパール650へのスケールアップ

TSKgel SuperQ-5PWを用いた大量試料の分離精製に関しては分取カラム (カラムサイズ21.5mm I.D.×15cm) が用意されています。しかしさらに大量の試料分離や、工業的精製が目的の場合、HPLC用カラムより中速クロマトグラフィー (MPLC) 用充填剤を用いた方が、有利な場合があります。

TSKgel SuperQ-5PWの場合、TSKgel SuperQ-トヨパール650を用いてスケールアップが可能です。図-15に、TSKgel SuperQ-5PWとTSKgel SuperQ-トヨパール650S (35 μ m)、SuperQ-トヨパール650M (65 μ m)を同一条件で分離したクロマトグラムを示します。試料の溶出位置は、ほぼ同じであり、TSKgel Super Q-5PWとSuper Q-トヨパール650は、分離選択性がほぼ同じであることがわかります。(分離能は、充填剤の粒子径に反比例します)

次に、SuperQ-トヨパール650Sのグラジエント時間を変え、TSKgel SuperQ-5PWとの分離能を比較しました。その結果を図-16に示します。TSKgel SuperQ-5PW (20分グラジエント) に比べ、SuperQ-トヨパール650Sでは、150分グラジエントにより、不純物ピークの分離もかなりTSKgel SuperQ-5PWに近いものが得られています。

図-17、図-18には、TSKgel SuperQ-トヨパール650Mを用いたスケールアップについて示します。TSKgel SuperQ-トヨパール650Mでは、HPLCに比べ、粒子径がかなり大きい (65 μ m) ため、グラジエント時間を長くしたり、またカラム長さを長くすることにより、分離能をTSKgel SuperQ-5PWに近づけることが可能です。

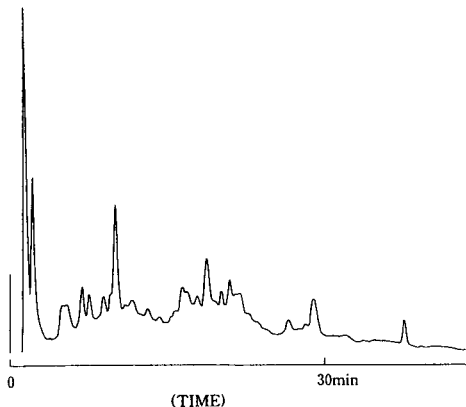


図-13 ウレアーゼ (Jack Beans) の分離
 条件は図-12に同じ
 ただし試料 ; 10mg/ml、100 μ l

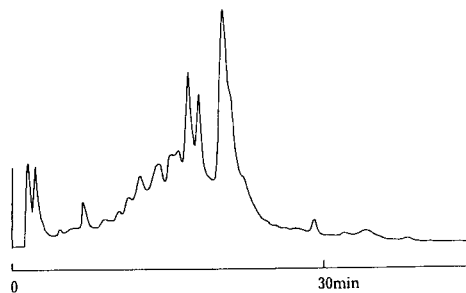


図-14 市販リポキシダーゼの分離
 条件は図-12に同じ
 ただし試料 ; 6 mg/ml、100 μ l

6. おわりに

タンパク質高負荷容量高速イオン交換クロマトグラフィー用充填カラムTSKgel SuperQ-5PWの基本的性質とタンパク質の分離例について紹介しました。TSKgel SuperQ-5PWは、分離能に優れているほか、タンパク質の吸着容量が非常に大きく化学的安定性にも優れているため、分析レベル（分析カラム）での高純度精製やタンパク質の粗抽出試料などの多成分試料からの大量分離・分取分離に最適です。表-5にTSKgel SuperQ-5PWの標準使用条件を示します。また、既に分取精製用ゲルとしてTSKgel SuperQ-Toyopearl 650が上市されており、スケールアップやさらに大量処理や工業的分離精製まで対応できる商品構成となっているため生化学分野での応用、展開が期待されます。

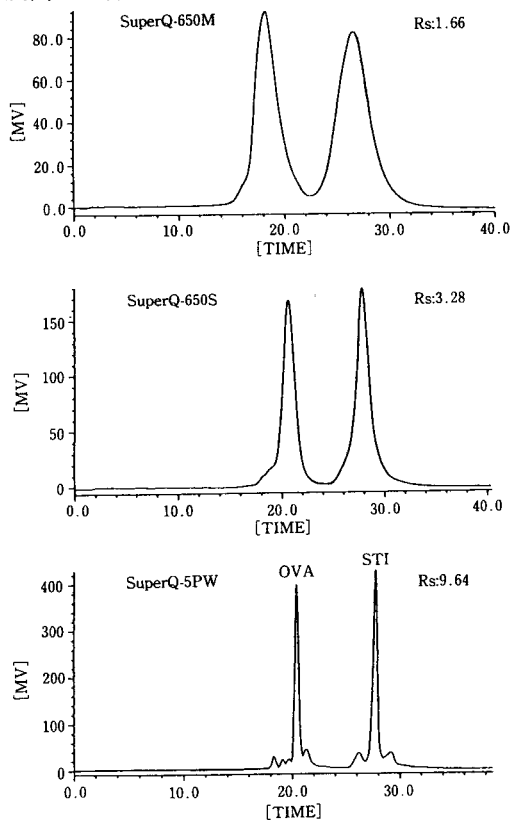


図-15 TSKgel SuperQ-5PWからTSKgel SuperQ-トヨパール650Sへのスケールアップ(1)

カラム；TSKgel SuperQ-5PW (10 μ m)
TSKgel SuperQ-トヨパール650S (35 μ m)
TSKgel SuperQ-トヨパール650M (65 μ m)
全て7.5mmI.D.×7.5cm

溶離液；A：50mM トリス-HCl (pH8.3)
B：A+0.5M NaCl
A→Bリニアグラジエント (60分)

流速；1.0ml/min

温度；25℃

検出；UV (280nm)

試料；オブアルブミン(20mg)、トリプシンインヒビター
(各1mg)

表-5 TSKgel SuperQ-5PWの標準使用条件

カラムサイズ	7.5mmI.D.×7.5cm
溶離条件	
流速	0.5~1.0ml/min
バッファー	20mM トリス-HCl (pH7.5~pH8.6)
平衡化時間	カラム容量の5倍以上
塩濃度	0~0.5M NaCl (0~0.3M NaClで分離能向上)
グラジエント時間	20~100分
温度	4~25℃
検出	UV
試料	
負荷量	100 μ g~200mg
注入量	100 μ g~10mg
塩濃度	0.1M以下(希釈または透析)
不溶物	フィルター(マイシヨリディスクなど)でろ過

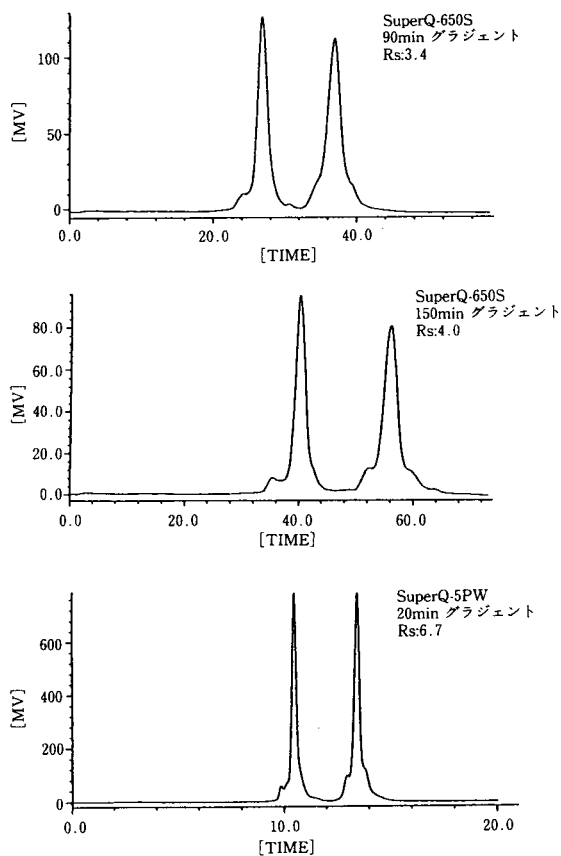


図-16 TSKgel SuperQ-5PWからTSKgel SuperQ-トヨパール650Sへのスケールアップ(2)

条件は図-15に同じ

ただしグラジエント時間は20~150min

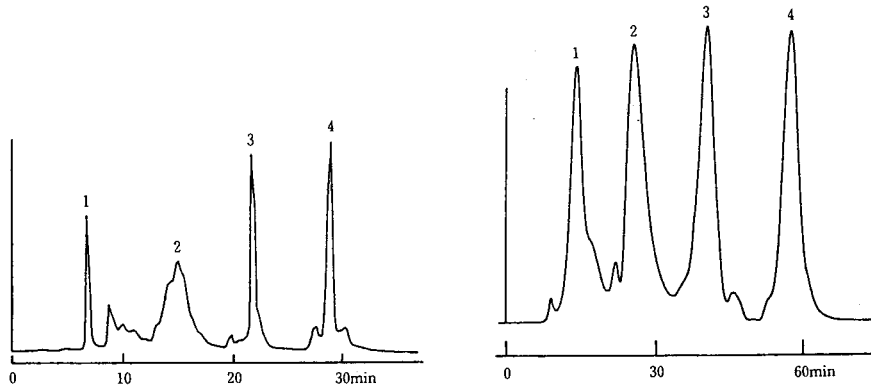


図-17 TSKgel SuperQ-5PWからTSKgel SuperQ-トヨパール650へのスケールアップ(3)

カラム ; (a)TSKgel SuperQ-5PW 7.5mmI.D.×7.5cm
 (b)TSKgel SuperQ-トヨパール650M 16mmI.D.×15cm
 溶離液 ; A : 50mM トリス-HCl (pH8.3)
 B : A+0.5M NaCl
 A→Bリニアグラジエント(a)60分、(b)100分
 流速 ; (a)1.0ml/min (b)2.0ml/min
 温度 ; 25°C
 検出 ; UV (280nm)
 試料 ; 1. カーボニックアンヒドラーゼ
 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
 (試料濃度は図-2に同じ)
 (a)1.6mg (b)5.4mg

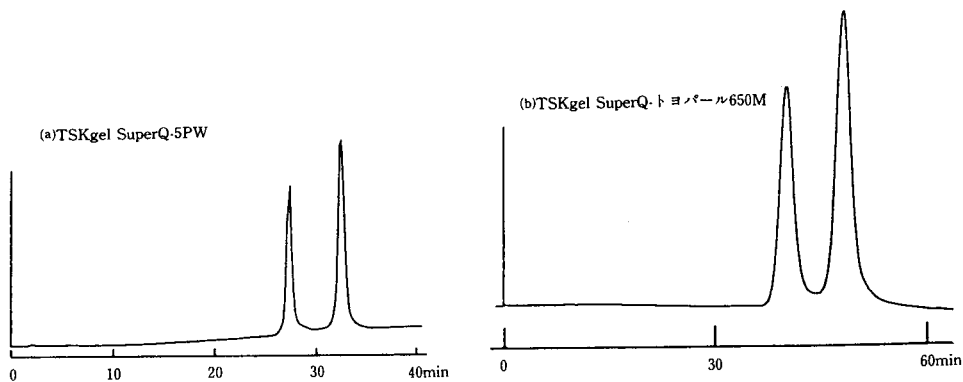


図-18 TSKgel SuperQ-5PWからTSKgel SuperQ-650Mへのスケールアップ(4)

条件は図-17に同じ
 ただし試料 ; β -ラクトグロブリン
 (a) 2 mg (b)50mg