

順相液体クロマトグラフィーによるペプチド分離法の開発

東ソー分析センター 吉田 達成
笠原 泉司

1. はじめに

ペプチドの液体クロマトグラフィー (HPLC) は、生体の抽出液からペプチド類を分離・精製する手段として、大変有用である。中でも逆相液体クロマトグラフィー (RPLC) は、ペプチド分離に要求される (1) 高分解能である (2) 操作が容易である (3) 分離後ペプチドの単離が容易の3つの条件を満たしているため、最も多用されている。しかし、親水性の高いペプチドを保持することができないため、これらを取り扱うことができない。このようなペプチドに対してはイオン交換クロマトグラフィーが使用されるが、これは上記の要求項目 (3) の要件を欠いているため問題がある。上記要求3項目を満足するクロマトグラフ法の開発が求められている。

そこで、逆相法では取り扱うことができないような親水性の高いペプチドの分離が可能であり、且つペプチド分離に要求される上記3つの項目を満足するペプチドの順相液体クロマトグラフィー (NPLC) を開発したので報告する。

2. 操作

2.1 試薬

アセトニトリル (ACN) はHPLCグレード品 (半井化学製) を用い、トリフルオロ酢酸 (TFA) は和光純薬製をそのまま用いた。水はMilli-Qシステムで精製したものをを用いた。ペプチドは、Sigma、プチド研究所 (大阪) の市販標準品を用いた。ペプチド消化物試料はConcanavalinAをトリプシンで酵素消化したものをを用いた。

2.2 装置

HPLCシステムは、東ソー製8020シリーズ、送液ポンプCCPM-、UV-8020検出器、AS-8020オートサンプラー、CO-8020カラムオープン、SC-8020データ処理装置を用いた。カラムは東ソー製、TSKgel Amide-80、TSKgel ODS-80Ts (25cm x 0.46cm i.d.) を用いた。

2.3 分離方法 (クロマトグラフ測定)

分離条件を種々検討の結果、以下に示す条件に決定した。

NPLC : A液 (初期溶液) には水 - ACN (3 : 97, v/v)、B液 (展開溶液) には水 - ACN (45 : 55, v/v) で、0.1% TFAを添加したものをを用いた。ペプチドはA液100%からB液100%への70分グラジエント (0.6% water / min) で溶出させた。

RPLC : A液 (初期溶液) には水 - ACN (95 : 5, v/v)、B液 (展開溶液) には水 - ACN (45 : 55, v/v) で、0.1% TFAを添加したものをを用いた。ペプチドはA液100%からB液100%への83.3分グラジエント (0.6% water / min) で溶出させた。

移動相の流量は1.0ml / min、検出は215nm、カラムオープン温度40 で測定を行った。

3. 結果・考察

このNPLCは、極性固定相を用い、また、移動相の極性 (水の比率) を増加させることでペプチドを溶出させることから、順相法に属すると考えられる [1-5]

市販標準ペプチドを用いて、RPLCとNPLCとの選択性の違いを観察した。図1 (上) はRPLCで分離したクロマトグラムであり、親水性の高いペプチド1, 5, 8はほとんど保持がない。図1 (下) はNPLCで分離

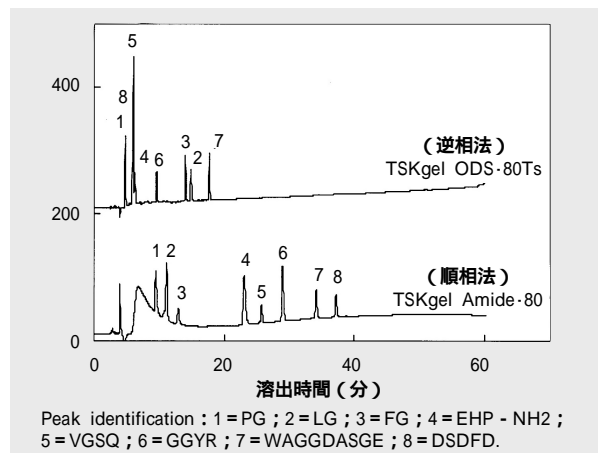


図1 NPLCとRPLCとの比較クロマトグラム

したクロマトグラムであるが、これら親水性のペプチド1, 5, 8は良く保持され、完全に分離されている。このようにNPLCは、RPLCで分離が困難或いは不可能なペプチド混合物を分離することができる。また、この選択性の違いは、ただ単純に逆の関係にないことも興味深い[6-7]

次に実試料へ応用とした。タンパク質消化物を試料に用い、RPLCとNPLCとを組み合わせた2次元HPLCによるペプチドマッピングを検討した。試料にはConcanavalin Aの酵素消化物(ペプチド数17)を用いた。まずRPLCを用いて分離を行い、13のフラクションを得た。このクロマトグラムを図2-1に示す。そ

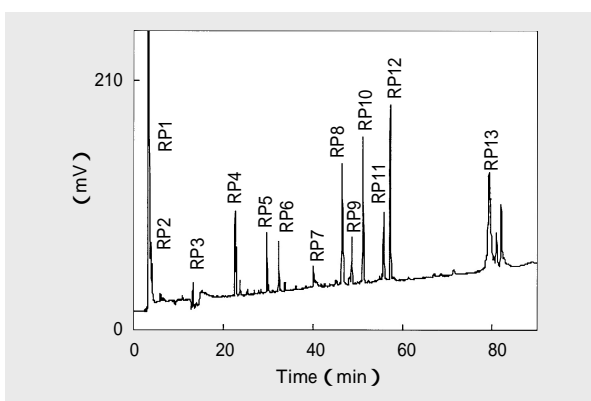


図2-1 2次元HPLC (1st, RPLC)

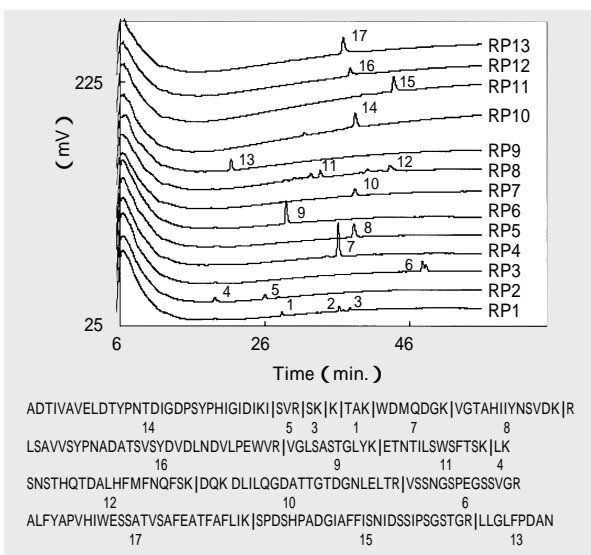


図2-2 2次元HPLC (2nd, NPLC)

の各フラクションを順次 NPLCに供した。このクロマトグラムを図2-2に示す。RPLC分離ではほとんど保持のなかったRP1, RP2は、NPLCによって、RP1からはTAK, DQK, SKの3つのペプチドに、RP2からはLK, SVRの2つのペプチドに分解することができた。また、RP8はRPLCではシングルピークであったが、NPLCでは2つのペプチドと不純物とに分離することができた[1]。このように、2次元HPLCを用いることで、17種類のペプチド全てを分離することができた。このNPLCは、RPLCでは保持のない画分や分離不可能であったペプチドを、分離することが可能である。

4. ま と め

TSKgel Amide-80カラムと水 - ACN - TFA系移動相を用いるペプチドの順相液体クロマトグラフィーを開発した。この方法は、逆相液体クロマトグラフィーでは保持できない親水性のペプチドをよく保持し、分離することができる。また、この方法でのペプチドの溶出順序と逆相法によるそれとは、ただ単純に逆の関係ではなく、選択性に大きな違いが観察された。

この選択性の違いを利用して、逆相法と組み合わせた2次元液体クロマトグラフィーを行うことにより、逆相法だけでは分離できなかったペプチド混合物を完全に分離することができた。今回開発した順相液体クロマトグラフィーは、逆相法と組み合わせることにより更に有用なペプチドの分離法となることを明らかにした。

5. 文 献

1. T.Yoshida, *Anal.Chem.*, 69, 3038 - 3043 (1997)
2. T.Yoshida and T.Okada, *J.Chromatogr. A*, 841, 19 - 32 (1999)
3. J.C.Linden, and C.L.Lowhead, *J.Chromatogr.*, 105, 125 - 133 (1975)
4. A.J.Alpert, *J.Chromatogr.*, 499, 177 - 196 (1990)
5. J.Yu and Z.E.Rassi, *J.High Resolution Chromatogr.*, 17, 773 - 778 (1994)
6. T.Yoshida, *J.Chromatogr.*, A, 808, 105 - 112 (1998)
7. T.Yoshida, T.Okada, T.Hobo and R.Chiba, *Chromatographia*, 52, 418 - 424 (2000)