

非多孔性イオン交換体を用いたタンパク質の 超高性能イオン交換クロマトグラフィ

三 井 あか ね
北 村 隆 司
加 藤 芳 男

High-Performance Ion-Exchange Chromatography of Proteins on Non-Porous Ion-Exchanger

Akane MITSUI
Takashi KITAMURA
Yoshio KATO

Porous packing materials have been employed with great success for a long time in liquid chromatography. On the other hand, non-porous packings have been examined and demonstrated to be useful only recently.

Now, we have developed anion and cation exchangers, TSKgel DEAE-NPR and TSKgel SP-NPR, which are prepared by introducing diethylaminoethyl groups or sulfopropyl groups onto non-porous spherical hydrophilic resins of 2.5 μm in diameter. We report herein the characteristics of these new packings and several applications to protein separation.

1. はじめに

液体クロマトグラフィの高速化, 高分離能化は, 最初, 粒子径数十 μm のガラスビーズ表面に固定相を薄くコーティングしたペリキュラー型充てん剤で達成された。しかしその後, 小粒子径の多孔性充てん剤の優位性が確認され, 以来高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 用充てん剤の開発には, ほとんどすべての分離モードにおいて多孔性充てん剤が使用されてきた。現在最も高性能化が進んでいる逆相クロマトグラフィでは, 粒子径 3 μm の多孔性シリカゲルも実用化され, 数分で分析可能となっている。しかし, 最近, Unger らは粒子径 1.5 μm の非多孔性シリカゲルを用いたタンパク質のアフィニティクロマトグラフィ, 逆相クロマトグラフィ及び疎水性クロマトグラフィを検討し^{1), 2), 3), 4), 5)}, 非多孔性充てん剤がカラム内でのピークの拡がりを小さくするのに有効であることを見出した。また, 他の研究者もその有用性

を報告している^{6), 7), 8)}。

そこで今回, 粒子径約 2.5 μm の非多孔性親水性樹脂の表面にジエチルアミノエチル基またはスルホプロピル基を導入したタンパク質分離用イオン交換体, TSKgel DEAE-NPR 及び TSKgel SP-NPR を開発した。ここでは, これらの充てん剤の基本的性質とタンパク質分離への応用について検討した結果を報告する。

2. 実 験

測定は, ポンプに CCPM, 検出器に UV-8000 紫外可視検出器 (ともに東洋曹達工業製) を用い 280 nm または 220 nm (逆相クロマトグラフィ) で検出し, すべて 25°C の恒温室で行った。カラムの充てんは, 内径 4.6 mm 長さ 3.5 cm のステンレスカラムに, ポンプを用いてスラリー法で行った。

試料にはすべて市販品を使用した。 α -キモトリプシン (ウシ膵臓), α -キモトリプシンノーゲン A (ウシ膵

臓), コンアルブミン (ニワトリ卵白, 鉄非含有), チトクロームc (ウマ心臓), フェリチン (ウマ脾臓), γ -グロブリン (ヒト), ヘモグロビン (ヒト血液), リゾチム (ニワトリ卵白), リボヌクレアーゼA (ウシ脾臓), チログロブリン (ウシ), トランスフェリン (ヒト), トリプシンインヒビター (大豆) 及びトリプシノーゲン (ウシ脾臓) は Sigma 社製を用いた。卵アルブミン (ニワトリ卵) 及びプロテインA (黄色ブドウ球菌) は生化学工業製を使用した。ウシ血清アルブミンは和光純薬製, ヒトヘモグロビスタンダードは Bio-Rad 社製及びプロテインA (遺伝子組み換え大腸菌) は Repligen 社製を使用した。

3. 結果と考察

(1) 基本的性質

(1) 交換容量とタンパク質結合量

Fig. 1 及び Fig. 2 に DEAE-NPR 及び SP-NPR の滴定曲線を示す。これらの総交換容量は膨潤ゲル 1 ml 当りそれぞれ約0.15及び0.10 meq に調節されている。また pKa はそれぞれ11.2及び2.3付近である。したが

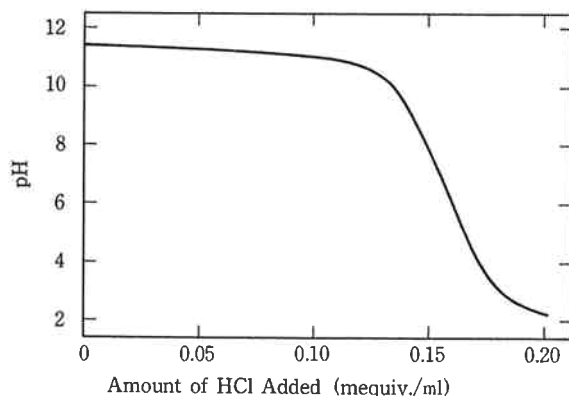


Fig. 1 Titration curve of TSKgel DEAE-NPR

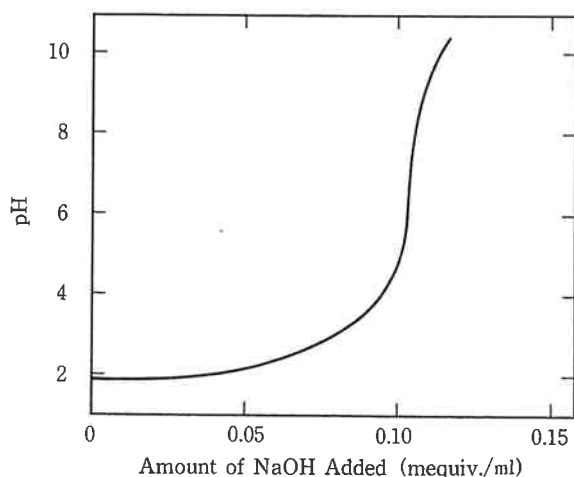


Fig. 2 Titration curve of TSKgel SP-NPR

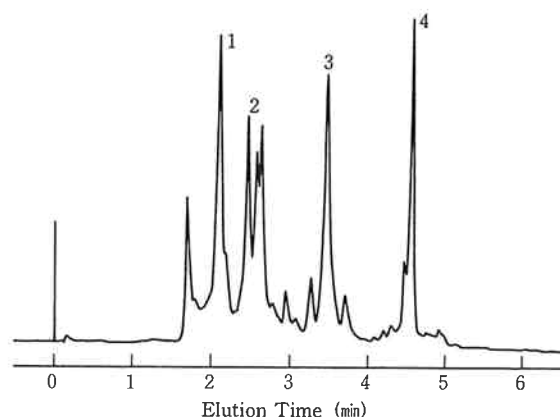


Fig. 3 Separation of a protein mixture on TSKgel DEAE-NPR

A mixture of conalbumin (1), transferrin (2), ovalbumin (3) and trypsin inhibitor (4) was separated with a 10-min linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) at a flow rate of 1.5 ml/min.

って, DEAE-NPR では pH 11 以下で, SP-NPR では pH 3 以上でタンパク質の分離が可能である。

タンパク質結合量は, DEAE-NPR はウシ血清アルブミン⁽¹⁾, SP-NPR はヘモグロビン⁽²⁾を用いてそれぞれ測定したところ, ともに約 5 mg/ml であった。

(2) 標準的溶離条件によるタンパク質の分離

Fig. 3 及び Fig. 4 にタンパク質混合物の DEAE-NPR 及び SP-NPR による分離例を示す。いずれも約5分で良好に分離溶出されている。溶離条件を変更すれば, 多少分離能の低下をもたらすが, さらに早く溶出させることも可能であった。次に非多孔性充てん剤と従来の多孔性充てん剤との分離の比較を行った。Fig. 5 及び6に DEAE-NPR と TSKgel DEAE-5PW⁽³⁾, SP-NPR と TSKgel SP-5PW⁽³⁾でのタンパク質分離をそれぞれの標準的溶離条件で比較したクロマトグラムを示す。DEAE-NPR 及び SP-NPR の方が多孔性イオン交換体である DEAE-5PW 及び SP-5PW よりも非常に短い分析時間(約6分の1)で高い分離能が得られている。

(1) pH 8.0 の 0.02 M トリシュー塩酸緩衝液中で測定した。

(2) pH 6.0 の 0.02 M リン酸塩緩衝液中で測定した。

(3) ポアサイズ約 1000 Å の多孔性親水性樹脂の表面にジエチルアミノエチル基 (DEAE-5PW) またはスルホプロピル基 (SP-5PW) を導入した粒子径約 10 μ m の HPLC 用充てん剤を 75 \times 7.5 mm I.D. のステンレスカラムに充てんしたもの。

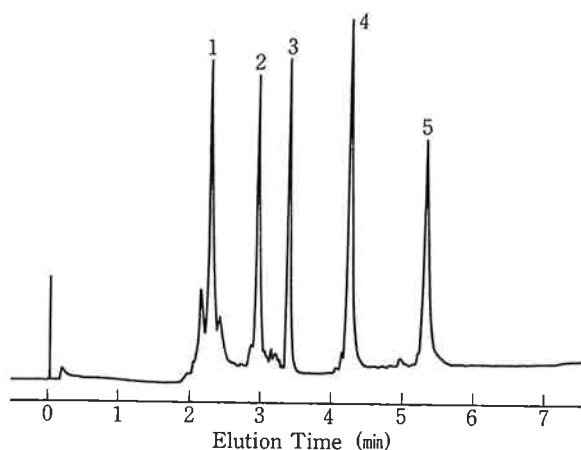


Fig. 4 Separation of a protein mixture on TSKgel SP-NPR

A mixture of trypsinogen (1), α -chymotrypsinogen A (2), ribonuclease A (3), cytochrome c (4) and lysozyme (5) was separated with a 10-min linear gradient of sodium sulfate from 0 to 0.5 M in 20 mM acetate buffer (pH 5.0) at a flow rate of 1.5 ml/min.

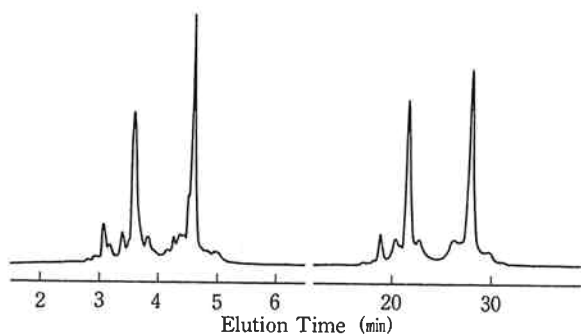


Fig. 5 Comparison of TSKgel DEAE-NPR and DEAE-5PW

A mixture of ovalbumin (first peak) and trypsin inhibitor (second peak) was separated on DEAE-NPR (left) and DEAE-5PW (right). Elution conditions as in Fig. 3 except the gradient time was 60 min and flow rate was 1.0 ml/min on DEAE-5PW. The size of DEAE-5PW column was 75 \times 7.5 mm I.D.

(3) 分離能の流速依存性

Fig. 7 に DEAE-NPR の分離能への流速の影響を示している。流速の増加とともに分離能は徐々に向上しているが、1 ml/min 以上では分離能の流速依存性が小さくなっている。流速の増加につれて溶出時間はわずかず短くなり分析時間が単縮できるが、溶離液による希釈

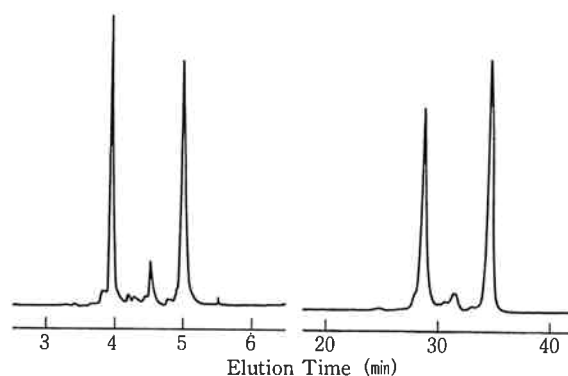


Fig. 6 Comparison of TSKgel SP-NPR and SP-5PW

A mixture of α -chymotrypsinogen A (first peak) and ribonuclease A (second peak) was separated on SP-NPR (left) and SP-5PW (right) with a 10-min (SP-NPR) or 60-min (SP-5PW) linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in 20 mM 2[N-morpholino]ethanesulfonic acid-NaOH buffer (pH 6.0) at a flow rate of 1.5 ml/min (SP-NPR) or 1.0 ml/min (SP-5PW). The size of SP-5PW column was 75 \times 7.5 mm I.D.

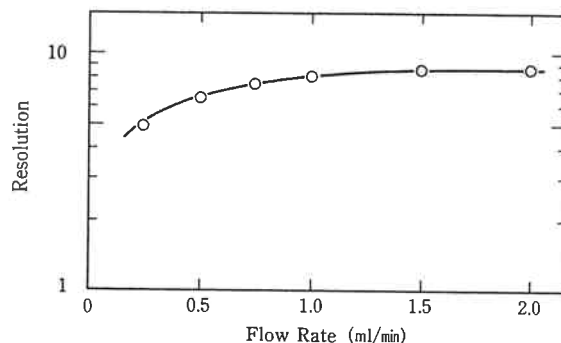


Fig. 7 Dependence of resolution on flow rate in the separation of proteins on TSKgel DEAE-NPR

A mixture of ovalbumin and trypsin inhibitor was separated under the same conditions as in Fig. 3 except the flow rate was varied between 0.25 and 2.0 ml/min. The resolution was calculated from the peak widths and elution volumes of the two proteins.

も大きくなる。これらのことを考慮すると、流速は 1.0-1.5 ml/min が最適であると言える。また、ここには示していないが、SP-NPR でも同様の結果を得ている。

(4) 分離能のグラジエント時間依存性

Fig. 8 に DEAE-NPR の分離能へのグラジエント時間の影響を示している。グラジエント時間の延長とともに分離能が向上しているが、10分以上では分離能のグラジエント時間依存性が小さくなっている。グラジエント時間を長くすると分析時間が当然長くなり、また試料の希釈が大きくなる。以上を考慮すると、グラジエント時間は5-10分が最適と思われる。また、SP-NPR でも同様の結果が得られている。

(5) 試料負荷量

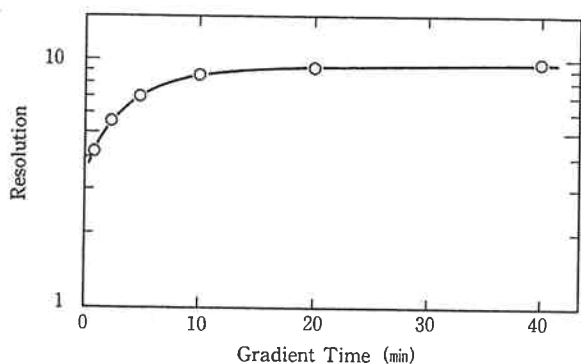


Fig. 8 Dependence of resolution on gradient time in the separation of proteins on TSKgel DEAE-NPR

A mixture of ovalbumin and trypsin inhibitor was separated under the same conditions as in Fig. 3 except the gradient time was varied between 1 and 40 min. Resolutions as in Fig. 7.

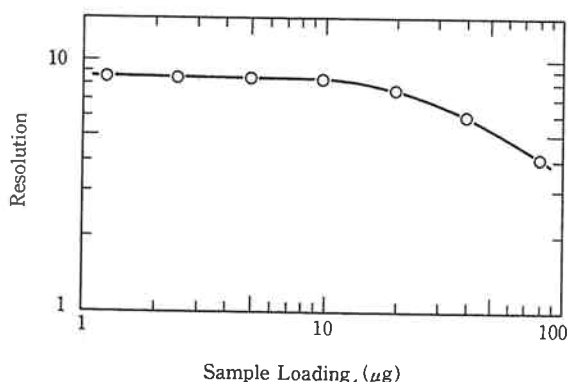


Fig. 9 Dependence of resolution on sample loading in the separation of proteins on TSKgel DEAE-NPR

A mixture of equal amount of ovalbumin and trypsin inhibitor was separated under the same conditions as in Fig. 3. The sample loading was varied between 1.25 to 80 μg . Resolutions as in Fig. 7.

数種のタンパク質を用い、三つの点から最大試料負荷量の検討を行った。まず、Fig. 9 に DEAE-NPR における卵アルブミンとトリプシンインヒビターの分離能への試料負荷量の影響を示している。10 μg (各 5 μg) までは一定の分離能が得られているが、それ以上では分離能の低下がみられる。次に、三種の精製タンパク質を用いて、試料負荷量に対するピーク幅の変化を調べた (Fig. 10)。5 μg までは一定のピーク幅が得られているが、それ以上の負荷量ではピーク幅が徐々に広がった。これらのことより、精製タンパク質の最大試料負荷量は、試料による多少の変動は考えられるが、約 5 μg であると言える。また、SP-NPR でも同様の結果を得ている。さらに、不純物の多い粗製タンパク質の分離パターンでも試料負荷量の検討を行った。試料としては市販の粗製リポキナーゼを用いた。試料量 50 μg と 200 μg のクロマトグラムを Fig. 11 (DEAE-NPR) 及び Fig. 12 (SP-NPR) に示す。いずれも試料量 50 μg と 200 μg とでパターンに大きな差はなく良好に分離されている。しかし 200 μg 以上になると分離能が低下した。よって粗製タンパク質の最大試料負荷量は不純物の割合による変動は予想されるが、およそ 200 μg であると考えられる。

以上、精製タンパク質及び粗製タンパク質の最大試料負荷量について述べたが、これらはいずれも従来の多孔性充填剤と比較してかなり小さい値 (DEAE-5PW 及び SP-5PW の約100分の1) となっている。

(6) タンパク質回収率

Table 1 及び Table 2 は DEAE-NPR 及び SP-NPR のタンパク質回収率を調べた結果である。すべて負荷量 5 μg で標準的溶離条件での回収率を測定した。

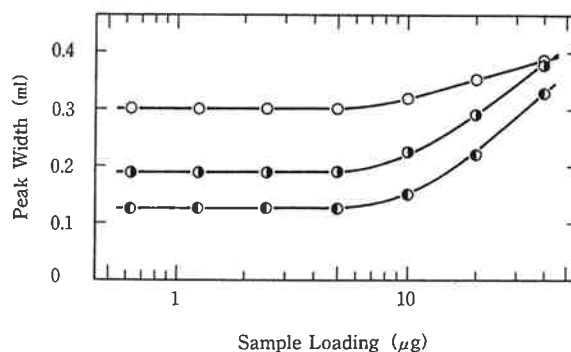


Fig. 10 Dependence of peak width on sample loading in the separation of proteins on TSKgel DEAE-NPR

Elution conditions as in Fig. 3.

Samples: (○) conalbumin; (●) ovalbumin; (◐) trypsin inhibitor.

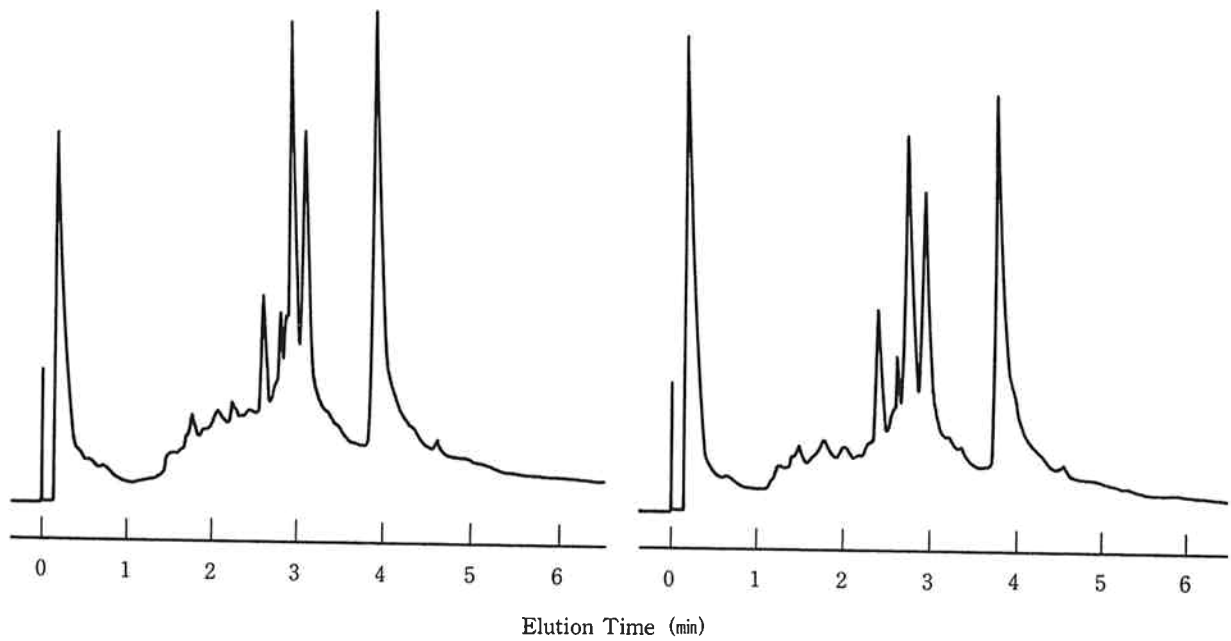


Fig. 11 Chromatograms of a crude sample of lipoxidase obtained on TSKgel DEAE-NPR
Sample loadings were 50 μg (left) and 200 μg (right). Elution conditions as in Fig. 3.

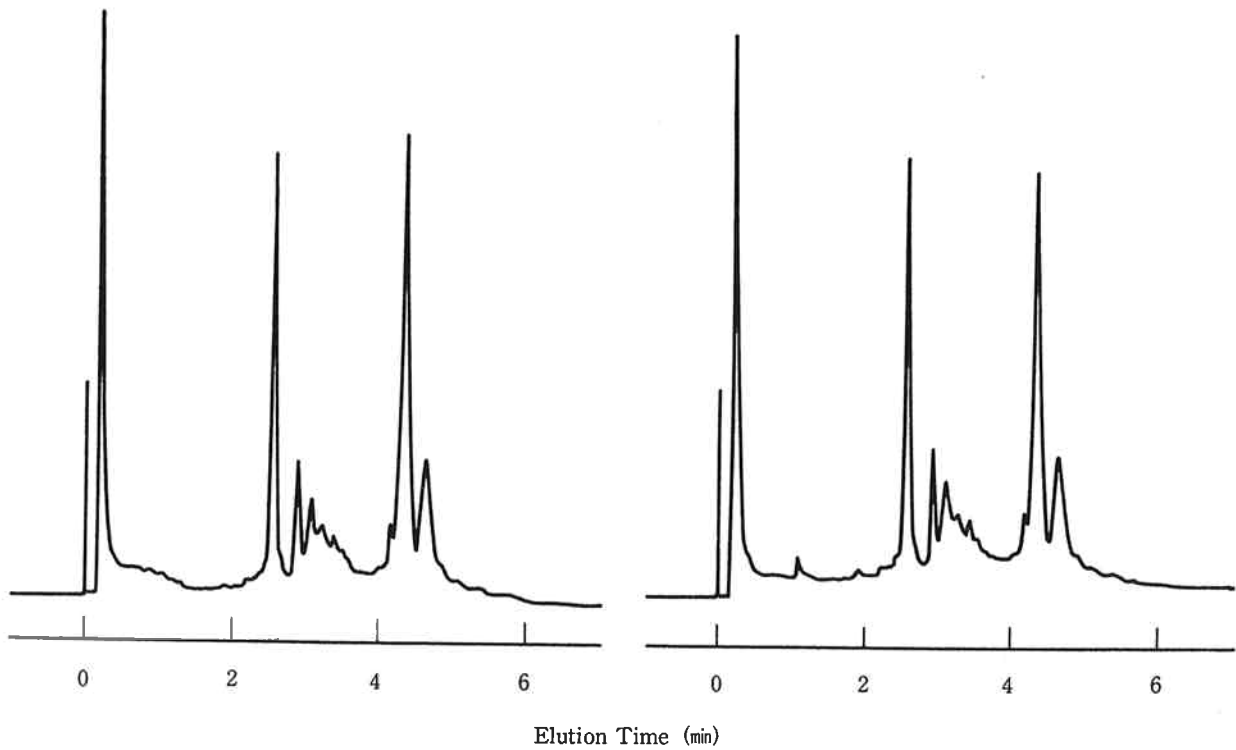


Fig. 12 Chromatograms of a crude sample of lipoxidase obtained on TSKgel SP-NPR
A crude sample of lipoxidase was separated on TSKgel SP-NPR with a 10-min linear gradient of sodium sulfate from 0 to 0.5 M in 20 mM acetate buffer (pH 4.5) at a flow rate of 1.5 ml/min. Sample loadings were 50 μg (left) and 200 μg (right).

Table 1 Recovery of proteins from TSKgel DEAE-NPR column

Each protein of 5 μ g was separated on DEAE-NPR under the same conditions as in Fig. 3. The recovery was determined from the areas of eluted peaks.

Protein	Recovery (%)
Thyroglobulin	100
Ferritin	99
γ -Globulin	104
Bovine serum albumin	102
Hemoglobin	91
Ovalbumin	103
β -Lactoglobulin	101
Trypsin inhibitor	98

Table 2 Recovery of proteins from TSKgel SP-NPR column

Each protein of 5 μ g was separated on SP-NPR with a 10-min linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 1.5 ml/min. The recovery was determined from the areas of eluted peaks.

Protein	Recovery (%)
Hemoglobin	88
α -Chymotrypsinogen A	95
α -Chymotrypsin	100
Trypsinogen	87
Lysozyme	96
Ribonuclease A	95
Cytochrome c	93

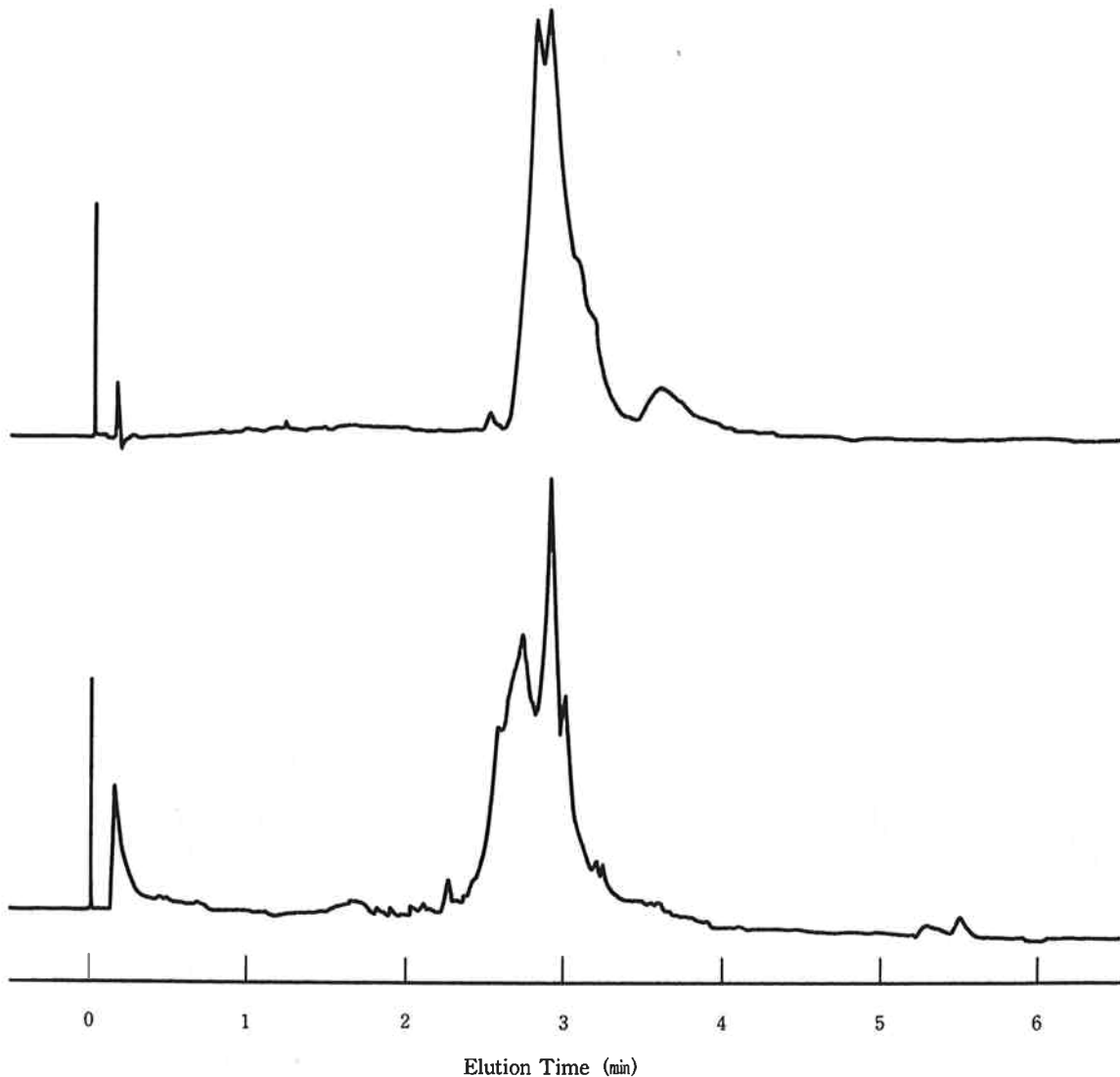


Fig. 13 Separation of protein A from recombinant *E. coli* product (upper) and from *staphylococcus aureus* (lower) by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR
Conditions as in Fig. 3.

DEAE-NPR はここにあげたすべての試料について90%以上の高い回収率が得られており、SP-NPR でも数種のタンパク質でわずかに回収率が低い、すべて85%以上の回収率が得られている。これらのことより、タンパク質の種類により回収率に多少の変動はあるものの、多くのタンパク質の分離について問題なく使用できると言える。

(2) 応用例

(1) DEAE-NPR によるタンパク質の分離

Fig. 13 に起源の異なる二種のプロテインAのDEAE-NPR による分離パターンを示す。Repligen社の遺伝子組み換え大腸菌産生のプロテインAはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、また生化学工業の黄色ブドウ球菌由来のプロテインAはディスク電気泳動でそれぞれシングルバンドしか確認されていない高純度タンパク質として市販されている。しかしながら、Fig. 13 に示すように、いずれの試料においても複数のピーク及びショルダーがみられる。このことは、DEAE-NPR によるイオン交換クロマトグラフィで電気泳動よりも高い分解能が得られることを示唆している。よって DEAE-NPR または SP-NPR によるイオン交換クロマトグラフィは電気泳動に代る純度チェックの手段として有用であると考えられる。

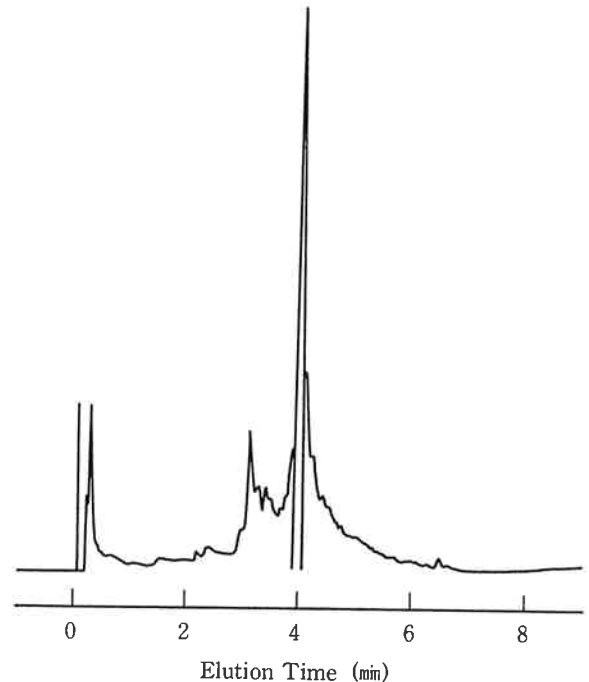


Fig. 14 Separation of α -chymotrypsin by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR

α -Chymotrypsin of 5 μ g was separated with a 20-min linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in 20 mM 1, 3-diaminopropane-HCl buffer (pH 10.3) at a flow rate of 1.5 ml/min.

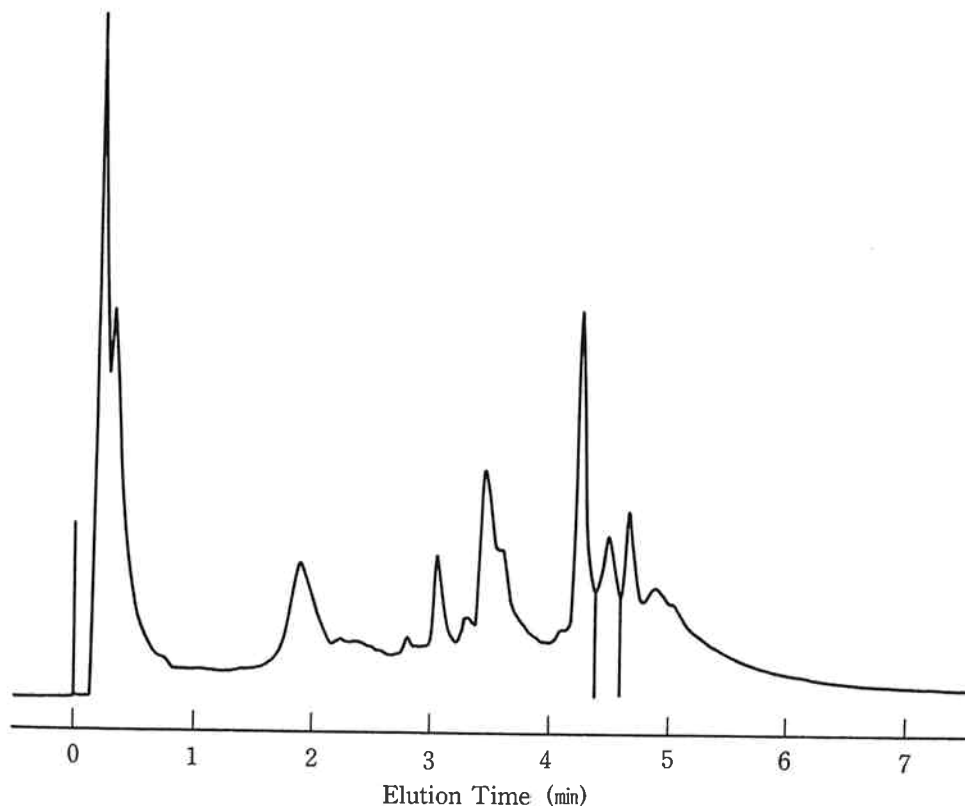


Fig. 15 Separation of hexokinase by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR
A crude sample of hexokinase (25 μ g) was separated under the same conditions as in Fig. 3.

次に、DEAE-NPR による α -キモトリプシンの純度チェックを行った。試料としては市販精製品 $5 \mu\text{g}$ を用いた。そのクロマトグラムを Fig. 14 に示している。 α -キモトリプシンは等電点8.5の塩基性タンパク質であるが、溶離液に pH 10.3 の1, 3-ジアミノプロパン-塩酸緩衝液を使用し、 α -キモトリプシンにマイナスの電荷を帯びさせると DEAE-NPR に吸着し、分離分析が可能であった。クロマトグラムには、いくつかの不純物と思われるピーク及びショルダーがみられ、DEAE-NPR での純度チェックが有用であることを示している。また、 α -キモトリプシンと思われるメインピークのカラム溶出液を図に示す範囲でフラクションし、酵素活性回収率を測定したところ80%であった。また、同フラクションを TSKgel Phenyl-5PW RP による逆相クロマトグラフィで純度検定をし、高純度であることを確認した。

次に粗製タンパク質の分離精製への応用を試みた。

Fig. 15 は分子量10万の市販粗製ヘキソキナーゼ $25 \mu\text{g}$ を DEAE-NPR で分離し、得られたクロマトグラムである。保持時間約4.5分のピークを中心に酵素活性がみられ、図に示す位置のカラム溶出液をフラクションして酵素活性回収率を測定したところ85%であった。また、同フラクションを用いて逆相クロマトグラフィにより純度検定を行い、精製が進んだことを確認した。

粗製タンパク質の分離精製をもう一例 Fig. 16 に示している。これは市販の粗製カタラーゼ $50 \mu\text{g}$ を DEAE-NPR で分離したものである。カタラーゼのピークを精製品でチェックしたところ、図に示すような比較

的広い範囲のピークに相当していたため、この部分のカラム溶出液をフラクションし、酵素活性回収率を調べたところ、92%と高い値が得られた。さらに、同フラクションを逆相クロマトグラフィにかけ純度検定を行った。Fig. 17 に示すように一本のメインピークと溶媒ピークを含む数本の小さなピークが見られるが、かなりきれいなカタラーゼが得られている。カタラーゼは、分子量24万の高分子量タンパク質であるが、このように良い結果が得られている。

(2) SP-NPR によるタンパク質の分離

臨床検査への応用例として SP-NPR によるヒトヘモグロビンスタンダードの分離を検討した。グリコヘモグロビンの測定は糖尿病のスクリーニングテストとして、また、糖尿病患者の長期血糖コントロールの指標として注目され、すでに臨床検査の項目に上っている。Fig. 18 に示すように約1.2分でグリコヘモグロビン (Hb A_{1c}) と思われるピークが溶出し、約2.4分に溶出するヘモグロビン (Hb A₀) のピークと良好に分離されている。このように短時間で高分離能が得られる SP-NPR は、リアルタイムの検査報告が要求される臨床検査への応用が可能と思われる。

4. おわりに

以上のように、DEAE-NPR 及び SP-NPR によるイオン交換クロマトグラフィは、非常に短い分析時間で高い分離能が得られる。よって、分析時間のスピードを要求される臨床検査、あるいは、大量精製、生産過程の工

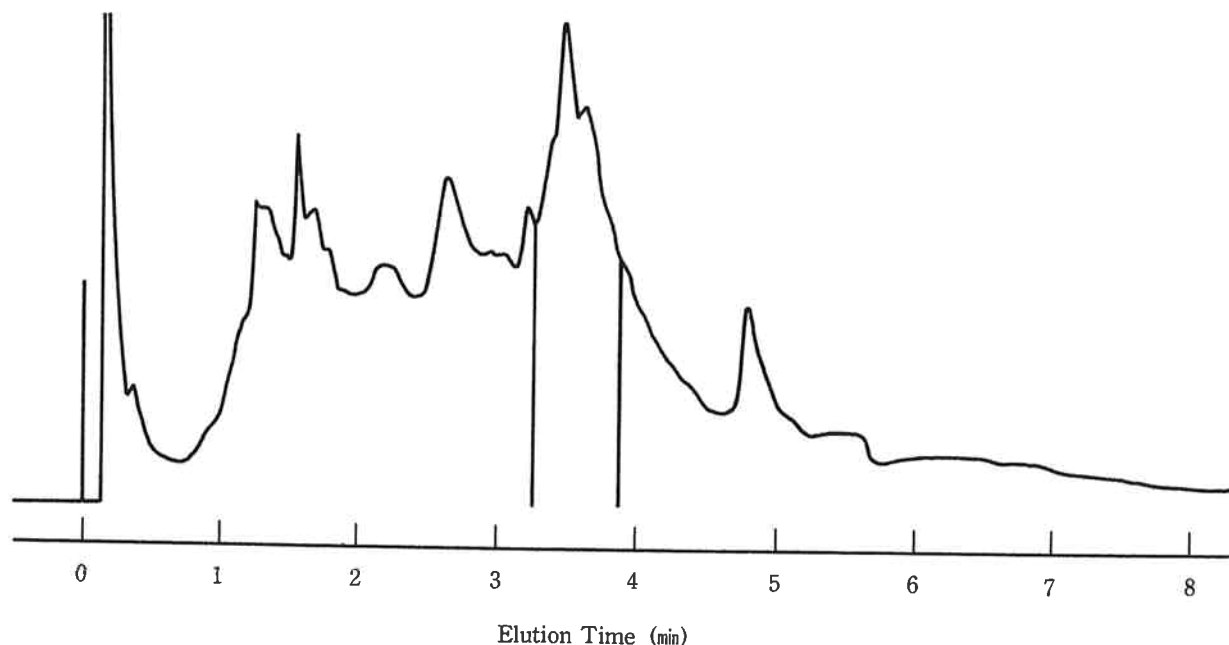


Fig. 16 Separation of catalase by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR
A crude sample of catalase ($50 \mu\text{g}$) was separated under the same conditions as in Fig. 3.

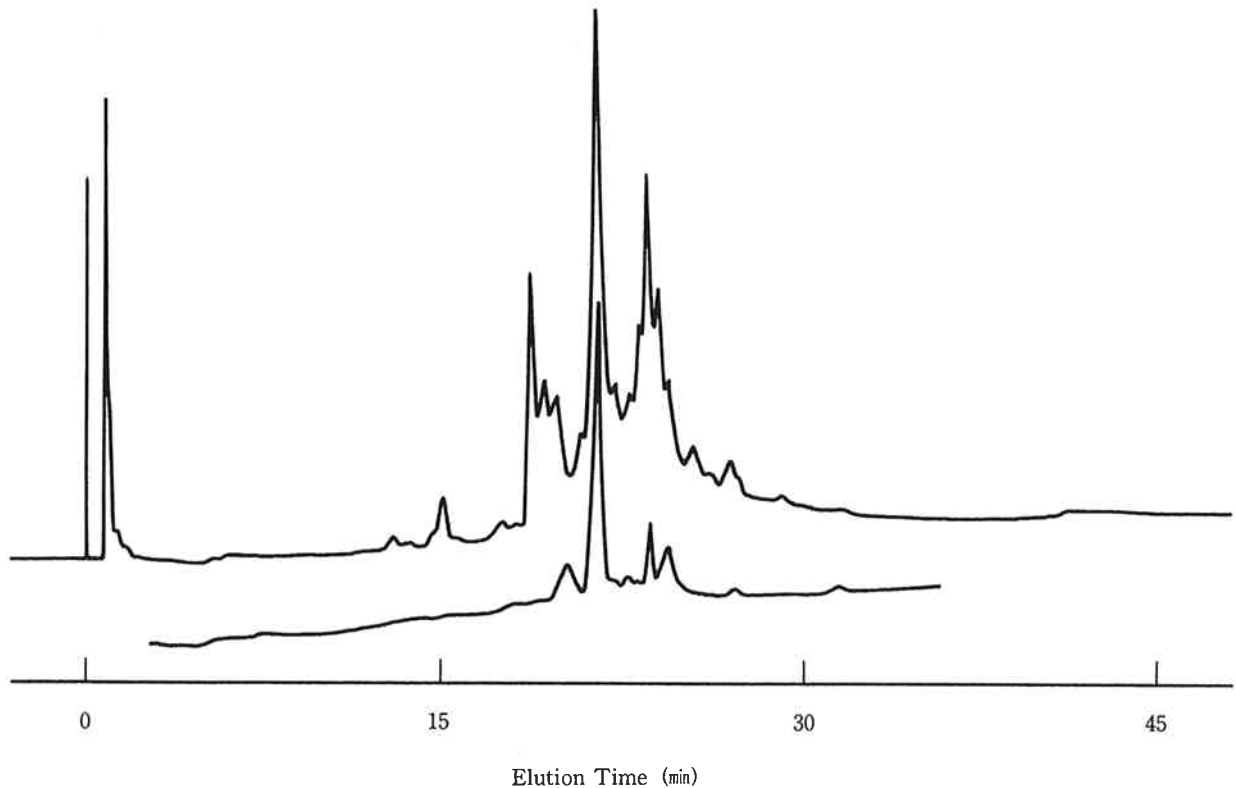


Fig. 17 Purity test of catalase fraction by reversed-phase chromatography on TSKgel Phenyl-5PW RP

Commercial catalase (upper curve) and catalase fraction on TSKgel DEAE-NPR (lower curve) was separated with 2-min linear gradient of acetonitrile from 5 to 20% followed by 48-min linear gradient of acetonitrile from 20 to 80% in 0.05% TFA at a flow rate of 1 ml/min. The size of Phenyl-5PW RP column was 75×4.6 mm I.D.

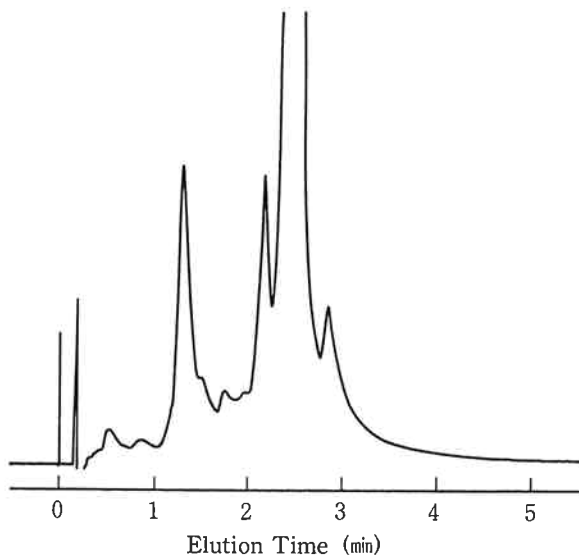


Fig. 18 Separation of human hemoglobin standard by ion-exchange chromatography on TSKgel SP-NPR

Human hemoglobin standard was separated with a 3-min linear gradient of NaCl from 0.05 to 0.2 M in 20 mM bis-Tris-HCl buffer (pH 6.0) at a flow rate of 1.5 ml/min and detected at 415 nm.

程管理等の分野に有用と考えられる。また、実験室レベルのタンパク質の純度検定、または、同定等を目的とした微量分取にも有用である。さらに多孔性充てん剤の細孔に入らないような分子量の大きなタンパク質の分離への適用も考えられる。しかしながら、充てん剤の表面積が小さいことから、多孔性充てん剤に比べて最大試料負荷量がかかなり小さい。よって大量精製、大量分取への適用には不向きである。しかし反面、微量試料でも回収率が高いことから、微量試料の分取には適している。粒子径の小さい充てん剤 (2.5 μm) を使用しているため圧力損失の問題が考えられるが、非多孔性であるため多孔性充てん剤よりも機械的強度が大きく、35×4.6 mm I. D. のカラムに充てんし、流速 1.5 ml/min で流したときの圧力損失は DEAE-NPR, SP-NPR とともに 100-150 kg/cm² で、使用上問題はない。

このような特徴を持つ TSKgel DEAE-NPR 及び SP-NPR は高速液体クロマトグラフィの超高速化、超高分離能化に寄与するものと考えられる。

文 献

- 1) B. Anspach, K. K. Unger, H. Giesche and M. T.

- W. Hearn; paper presented at the 4th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides, Baltimore, USA, December 1984, paper 103.
- 2) K. K. Unger, G. Jilge, J. N. Kinkel and M. T. W. Hearn; *J. Chromatogr.*, 359 (1986) 61.
- 3) G. Jilge, R. Janzen, H. Giesche, K. K. Unger, J. N. Kinkel and M. T. W. Hearn; paper presented at the 6th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides, Baden-Baden, FRG, October 1986, paper 202.
- 4) R. Janzen, K. K. Unger, H. Giesche, J. N. Kinkel and M. T. W. Hearn; paper presented at the 6th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides, Baden-Baden, FRG, October 1986, paper 208.
- 5) R. Janzen, K. K. Unger, H. Giesche, J. N. Kinkel and M. T. W. Hearn; paper presented at the 6th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides, Baden-Baden, FRG, October 1986, paper 112.
- 6) D. J. Burke, J. K. Duncan, L. C. Dunn, L. Cummings, C. J. Siebert and G. S. Ott; *J. Chromatogr.*, 353, 425 (1986).
- 7) D. J. Burke, J. K. Duncan, C. Siebert and G. S. Ott; *J. Chromatogr.*, 359, 533 (1986).
- 8) L. F. Colwell Jr. and R. A. Hartwick; *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 9, 304 (1986).