

蛋白質高負荷用アニオン交換体 Super Q-トヨパール650の評価

松 田 孝 夫
古 賀 俊 国
小 宮 克 夫
加 藤 芳 男

Basic Evaluation of TSKgel Super Q-Toyoparl 650, a New ion-Exchanger for Preparative Separation of Proteins

Takao MATSUDA
Toshikuni KOGA
Katsuo KOMIYA
Yoshio KATO

The title new anion-exchanger, prepared by introducing quaternary ammonium groups onto TSKgel Toyoparl HW65, was evaluated for its basic characteristics and applications. This new ion-exchanger was found to possess high chemical and mechanical stability as well as high adsorption capacity for standard proteins. The recovery of proteins was almost quantitative. Accordingly, it should be particularly useful for the preparative separation of proteins.

1. はじめに

蛋白質の分離精製においてイオン交換クロマトグラフィーは蛋白質の変性を起こし難い精製法の一つとして、古くから幅広く利用されている。一般にこの目的のイオン交換体はセルロース、アガロースなどの多糖基材の軟質ゲルと親水性ビニルポリマー（トヨパール）を基材とした半硬質ゲルに分類され、前者では蛋白質吸着容量は比較的大きいが、機械的強度に劣り流通特性、分離性能および再現性が低い。一方後者の半硬質ゲルは機械的強度は優れるが蛋白質吸着容量が少なく試料処理量が少ない。このように両者ともに一長一短があり高い吸着容量と耐圧性を両立させた充てん剤が要望されている。そのようなニーズに応える充てん剤として開発されたアニオ

ン交換体がゲル濾過用担体トヨパール HW-65 に第4級アンモニウム基を導入した強アニオン交換体の Super Q-トヨパール650である。本稿では Super Q-トヨパール650の基本的性質及び性能評価について述べる。

2. Super Q-トヨパール650の基本的性質

〔1〕 グレード

Super Q-トヨパール650には、Super Q-トヨパール650 S (20-50 μm), Super Q-トヨパール650 M (40-90 μm), 及び Super Q-トヨパール650 C (50-150 μm) の粒子径の異なる3グレードがある。

〔2〕 総イオン交換容量

Super Q-トヨパール650に導入された4級アンモニウム基のイオン交換容量は 0.24-0.28 meq/ml-gel であっ

た。Table 1 に Super Q-トヨパール650 S, M, C 及び QAE-トヨパール550 C と DEAE-トヨパール650M の総イオン交換容量を示す。Fig. 1 に代表的な Super Q-トヨパール650M の滴定曲線を示す。滴定曲線は非常にシャープで交換基が均一に導入されていることがわかる。

(3) 吸着容量

Super Q-トヨパール650 及び自社既存品、他社品のバッチ法での牛血清アルブミンの静的吸着容量を Table 2 に示す。Super Q-トヨパール650 の牛血清アルブミンの吸着容量は 126~143 mg/ml-gel で自社既存品及び他社品のゲルに比べ高い吸着容量を示している。次に分子量の異なる蛋白質の吸着容量をカラムに通液した状態

Table 1 Ion-exchange Capacity of Super Q TOYOPEARL 650, QAE-TOYOPEARL 550C and DEAE-TOYOPEARL 650M

	Particle size (μm)	Ion-exchange capacity (meq/ml-gel)
Super Q TOYOPEARL 650S	20-50	0.24
Super Q TOYOPEARL 650M	40-90	0.24
Super Q TOYOPEARL 650C	50-150	0.28
QAE TOYOPEARL 550C	50-150	0.34
DEAE TOYOPEARL 650M	40-90	0.12

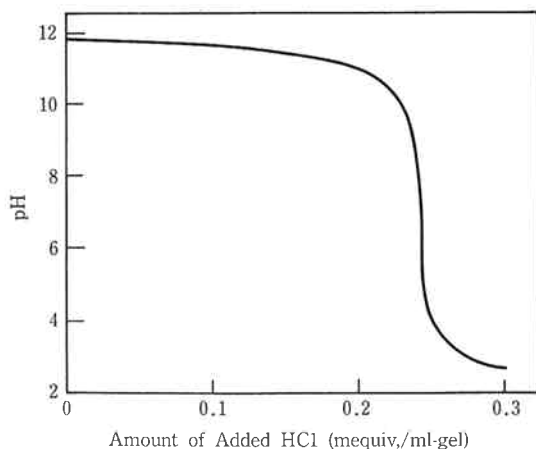


Fig. 1 Titration curve of Super Q-Toyoparl 650M

(動的吸着容量) で調べた。実験は 7.5×0.75 cm I.D. ステンレスカラムに充てんして 50 mM トリス塩酸バッファ (pH 8.7) で30分間平衡化する。蛋白質 (濃度 20 mg/ml) を、流速 1.0 ml/min で30分アプライし、カラムからもれてきた蛋白質が 280 nm の吸光度で検出され始める時間を測定し、吸着容量を求めた。Table 3 に結果を示すが、Super Q-トヨパール650は高分子量の蛋白質に対してもかなりの吸着容量を示す。その後、50 mM トリス塩酸バッファで未吸着の蛋白質を洗い流した。吸着された蛋白質の脱着は 0.5 M NaCl を含む 50 mM トリス塩酸バッファ (pH 8.7) で行ったが、静的、動的とも回収率は100%であった。この結果から Super Q-トヨパール650は蛋白質の分離精製に対して高吸着容量で回収率にも問題ないことがわかる。

(4) 化学的安定性

Super Q-トヨパール650は、蛋白質の吸着容量が大きいため蛋白質の粗精製試料などの分離にも適しているが、粗精製試料ではカラムが汚染されやすいため一般に酸、アルカリで洗浄して再生する。そのため酸、アルカリに対する安定性が要求される。そこでアルカリ及び酸に対する安定性を調べた。Fig. 2, Fig. 3 に 0.5 N NaOH 及び 0.5 N HCl 中に 25°C で浸漬したときのイオン交換容量及び牛血清アルブミン吸着容量の経時変化

Table 2 Static Adsorption Capacity for BSA on Some Anion-Exchangers

Anion-Exchanger	BSA Adsorption Capacity (meq/ml-gel)
Super Q TOYOPEARL 650S	126
Super Q TOYOPEARL 650M	143
Super Q TOYOPEARL 650C	129
QAE-TOYOPEARL 550C	70
DEAE-TOYOPEARL 650M	25
Q-Sepharose Fast Flow	40
Fractogel EMD TMAE 650M	57

Adsorption Buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8.7)

Table 3 Dynamic Adsorption Capacity for Proteins on Some Anion-Exchangers

Anion-Exchanger	Adsorption Capacity (mg/ml-gel)		
	Thyroglobulin (MW:660,000)	BSA (MW:66,000)	Trypsin inhibitor (MW:21,500)
Super Q TOYOPEARL 650M	12	157	167
QAE-TOYOPEARL 550C	9	69	72
DEAE-TOYOPEARL 650M	12	40	47
Q-Sepharose Fast Flow	7	45	92
Fractogel EMD TMAE 650M	10	56	60

Adsorption Buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8.7)

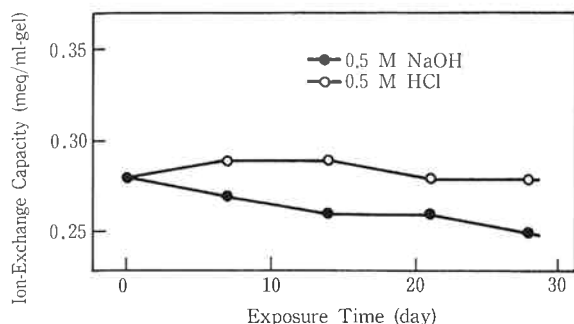


Fig. 2 Chemical stability of Super Q-Toyoparl 650M in alkaline and acidic aqueous solution

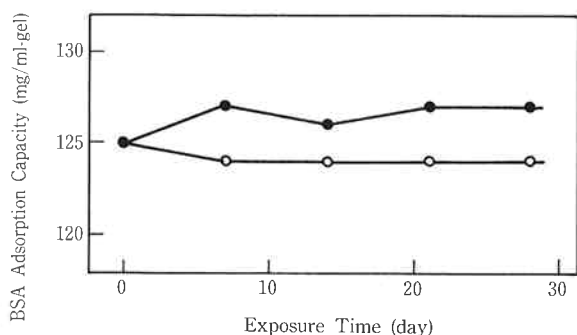


Fig. 3 Chemical stability of Super Q-Toyoparl 650M in alkaline and acidic aqueous solution

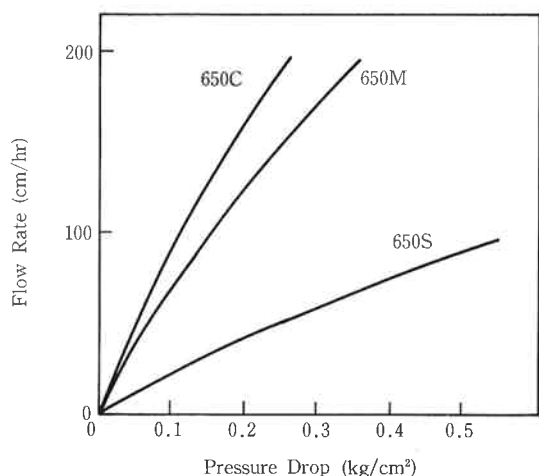


Fig. 4 Relationship between flow-rate and pressure drop on Super Q-Toyoparl 650S, 650M and 650C
Column size: 15×1.6 cm I.D. (glass column)
Eluent: Deionized water

った。この結果から Super Q-トヨパール650は酸、アルカリによる洗浄に対して非常に安定であり、十分な耐久性がある。

〔5〕 流速特性

ガラスカラム及びステンレスカラムに蒸留水で充てんして、流速とカラムの圧力損失との関係を調べた。Fig. 4 に 15×1.6 cm I.D. ガラスカラム, Fig. 5 に 20×10.8 cm I.D. ステンレスカラムでの関係を示す。Super Q-トヨパール650は、機械的強度が大きく高流速で使用でき、650Sはラボスケールからセミ分取、650M、650Cは工業用スケールの精製への対応が可能である。

〔6〕 体積変化

イオン交換クロマトグラフィーにおける蛋白質の溶出法は、溶離液中の NaCl などの塩による直線濃度勾配法 (リニアージェント) で溶離液のイオン強度を増して蛋白質を溶出させるが、そのために塩濃度及び pH に対する体積変化はない方がカラムとしての安定性が良く好ましい。そこで、Super Q-トヨパール650Mを 30×2.2 cm I.D. ガラスカラムにベッド体積が 55 ml (ベッド高 15 cm) になるように充てんして、50 mM トリス塩酸バッファの塩濃度 0~0.5 M 及び pH 4~9 におけるベッド体積の変化を調べた。Fig. 6 に結果を示すが、pH の変化に対してはゲルの体積変化はなかったが、塩濃度の変化に対しては 0.5 M NaCl で約 5% の収縮が見られた。しかしながら高塩濃度溶媒で充てんすれば膨潤収縮に対しても実用上カラム性能の変化はなく

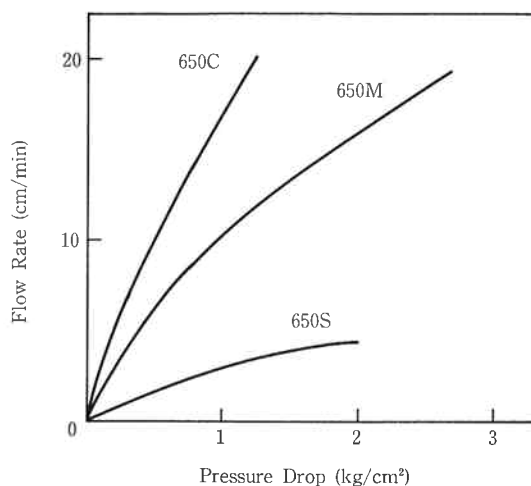


Fig. 5 Relationship between flow-rate and pressure drop on Super Q-Toyoparl 650S, 650M and 650C
Column size: 20×10.8 cm I.D. (stainless steel column)
Eluent: Deionized water

を示す。1ヶ月経過後、イオン交換容量は 0.5 N NaOH 中で若干減少する傾向にあるが、吸着容量は 0.5 N NaOH 及び 0.5 N HCl 中ともに変化は見られなか

問題なく使用できる。

3. Super Q-トヨパール650のクロマト的性質

〔1〕 粒子径による分離能への影響

15×1.6 cm I.D. ガラスカラムに Super Q-トヨパール650 S, 650M及び650Cを充てんし, 50 mM トリス塩酸バッファー (pH 8.7) から 0.5 M NaCl を含む 50 mM トリス塩酸バッファーへのリニアージェント溶出で標準蛋白質4種類(カーボニックアンヒドラーゼ, トランスフェリン, オブアルブミン, トリプシンインヒビター, いずれもシグマ社製) の分離を比較した。Fig. 7 にそのクロマトグラムを示すが, 分離能は粒子径に依存し, 粒子径が小さいグレードほど高分離能が得られ

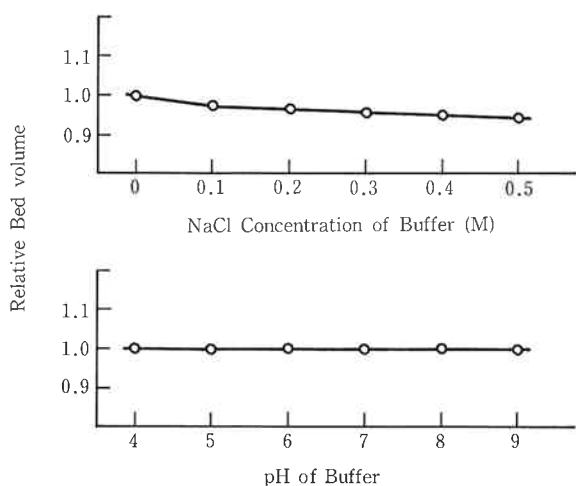


Fig. 6 Dependence of bed volume on pH and ionic strength of the buffer

る。

〔2〕 回収率

15×1.6 cm I.D. ガラスカラムに Super Q-トヨパール650Mを充てんして, 50 mM トリス塩酸バッファー (pH 8.7) で30分平衡化した後, 各種蛋白質 (10 mg) を注入し吸着させ, 1分後, 0.5 M NaCl を含む 50 mM トリス塩酸バッファーで脱着した溶出液を分光光度計 (吸光度 280 nm) で測定し, 回収率を求めた。Table 4

Table 4 Recovery of Proteins from Super Q-Toyopearl 650M

Protein	Recovery (%)
thyroglobulin	98
Ferritin	97
γ -globulin	101
Hemoglobin	89
Bovine serum albumin	99
Ovalbumin	100
β -lactoglobulin	100
Trypsin inhibitor	100
Myoglobin	100

Column size: 15×1.6 cm I.D. (glass column)

Proteins of 10 mg each were applied to the column equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer of pH 8.7 at a flow rate of 2.0 ml/min. After elution for 1 min with 0.05 M Tris-HCl buffer of pH 8.7, the adsorbed proteins were washed out in the 0.05 M Tris-HCl buffer of pH 8.7 containing 0.5 M NaCl. The column effluent were collected for 12.5 min after sample injection and then the proteins in the effluents were determined spectrophotomerically at 280 nm.

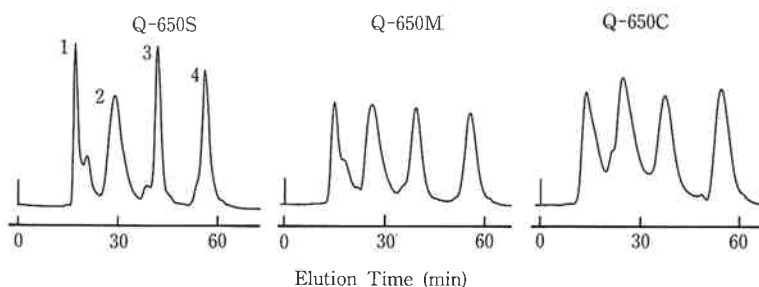


Fig. 7 Chromatograms of a protein mixture obtained by ion-exchange chromatography on TSKgel Super Q-Toyopearl 650S, 650M and 650C

Column Size: 15×1.6 cm I.D. (glass column)

Sample: 1. carbonic anhydrase (1 mg), 2. transferrin (1.6 mg), 3. ovalbumin (2 mg), 4. trypsin inhibitor (2 mg)

Elution: 100 min linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.7)

Flow rate: 2.0 ml/min

Detection: UV (280 nm)

Temperature: 25°C

に各種標準蛋白質の回収率を示すが、いずれの蛋白質も回収率は定量的で良好であった。

〔3〕 試料負荷量の影響

7.5×0.75 cm I.D. ステンレスカラムに Super Q-トヨパール650Mをペリスタポンプで充てんし、50 mM トリス塩酸バッファーで30分平衡化したのち、試料を注入した。試料は卵アルブミン (生化学社製) とトリプシンインヒビター (シグマ社製) を用いた。Fig. 8 に試料負荷量を 110 mg から 440 mg まで変えたときのクロマトグラムを示す。クロマトグラムからわかるように 330 mg 以上になると V_0 付近 (素通り画分) に卵アルブミンが溶出し始め、分離能も低下してくる。

4. 蛋白質の分離例

〔1〕 標準蛋白質の分離

Fig. 9 に Super Q-トヨパール650Mでの市販の標準蛋白質4種類の分離例を示す。

〔2〕 リポキシダーゼの分離

同じく Super Q-トヨパール650Mで市販の粗リポキシダーゼ 30 mg を分離した例を Fig. 10 に示す。

〔3〕 β -ラクトグロブリン A, B の分離

Super Q-トヨパール650S の分離例で 20 mM 塩酸ピペラジンバッファー (pH 6.0) から 0.3 M NaCl を含む 20 mM 塩酸ピペラジンバッファーへのリニアグラジェント溶出で、 β -ラクトグロブリン 50 mg を分離したクロマトグラムを Fig. 11 に示す。 β -ラクトグロブリ

ン A, B が良く分離していることがわかる。

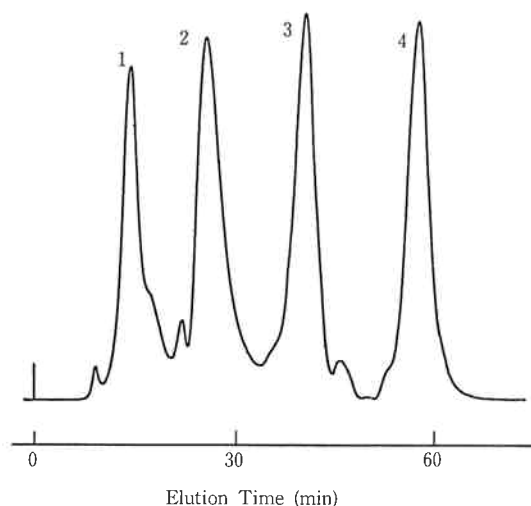


Fig. 9 Separation of a protein mixture by ion-exchange chromatography on Super Q-Toyopearl 650M
 Column size: 15×1.6 cm I.D. (glass column)
 Sample: 1 carbonic anhydrase (20 mg), 2. transferrin (40 mg), 3. ovalbumin (50 mg), 4. trypsin inhibitor (50 mg)
 Elution: 100 min linear gradient of NaCl 0 to 0.5 M in Tris-HCl buffer (pH 8.7)
 Flow rate: 2.0 ml/min
 Detection: UV (280 nm)
 Temperature: 25°C

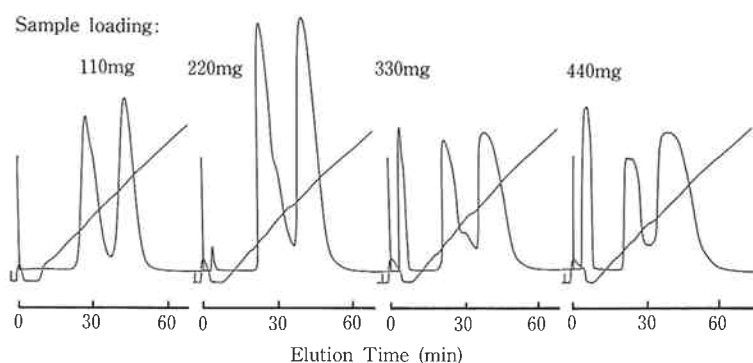


Fig. 8 Chromatogram of a mixture of ovalbumin and trypsin inhibitor obtained on Super Q-Toyopearl 650M
 Column Size: 7.5×0.75 cm I.D. (stainless steel column)
 Sample: a mixture of equal amount of ovalbumin and trypsin inhibitor
 Elution: 100 min linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.7)
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Detection: UV (280 nm)
 Temperature: 25°C

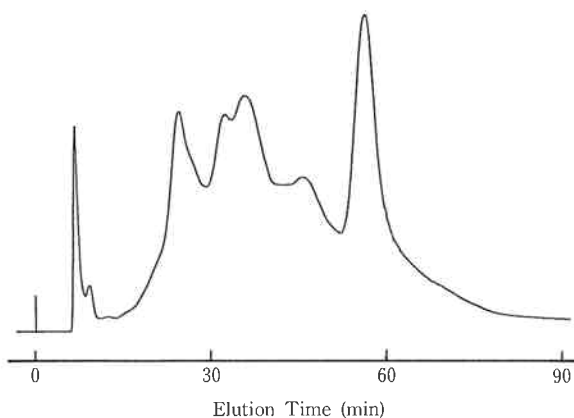


Fig. 10 Separation of lipoxydase by ion-exchange chromatography on TSKgel Super Q-Toyopearl 650M
 Column size: 15×1.6 cm (glass column)
 Sample: a commercial crude sample of lipoxydase (30 mg)
 Elution: 100 min linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.7)
 Flow rate: 2.0 ml/min
 Detection: UV (280 nm)
 Temperature: 25°C

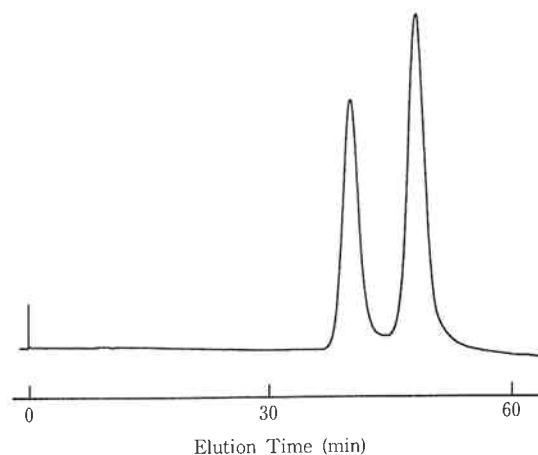


Fig. 11 Separation of β -lactoglobulin obtained by ion-exchange chromatography on TSKgel Super Q-Toyopearl 650S
 Column size: 15×1.6 cm I.D. (glass column)
 Sample loading: 50 mg
 Elution: 100 min linear gradient of NaCl from 0 to 0.3 M in 20 mM piperazine-HCl buffer (pH 6.0)
 Flow rate: 2.0 ml/min
 Detection: UV (280 nm)
 Temperature: 25°C

5. おわりに

蛋白質高負荷用アニオン交換体 Super Q-トヨパール650の基本的性質、性能評価及び蛋白質の分離例について紹介した。Super Q-トヨパール650は従来のイオン交

換体に比べ、高吸着容量と優れた化学的安定性を有し、なおかつ機械的強度が大きいため、工業用分取に最も適しており、今後、生化学分野の分析から工業用分取までの広い範囲での応用、展開が期待される。



著者
 氏名 松田 孝夫
 Takao MATSUDA
 入社 昭和44年3月4日
 所属 ゲル製造部
 ゲル開発課
 副主任研究員



著者
 氏名 古賀 俊国
 Toshikuni KOGA
 入社 昭和37年4月2日
 所属 ゲル開発課
 副主任研究員



著者
 氏名 小宮 克夫
 Katsuo KOMIYA
 入社 昭和47年4月1日
 所属 ゲル製造部
 ゲル開発課
 課長



著者
 氏名 加藤 芳男
 Yoshio KATO
 入社 昭和45年4月6日
 所属 ゲル製造部
 部長