

# 高負荷容量イオン交換カラム TSKgel SuperQ-5PWの開発

松 田 孝 夫  
森 山 弘 之

## Evaluation and Application of TSKgel Super Q-5PW, a New Anion Exchanger for Protein Separation

Takao MATSUDA  
Hiroyuki MORIYAMA

Basic properties of TSKgel Super Q-5PW, a new efficient anion exchanger, have been evaluated and its application to protein separation has been investigated. This anion exchanger (10  $\mu$ m in particle diameter), originally based on TSKgel G5000PW of wide pore size (ca. 1,000 Å) used for GFC packings, is featured by its excellent protein recovery and high chemical durability, and exhibits higher absorption capacity for protein than the existing anion exchanger TSKgel DEAE-5PW (ex. over 100 mg/ml-gel for bovine serum albumin). TSKgel Super Q series such as Super Q-5PW and Super Q-Toyopearl 650 have been successfully employed for the analytical and preparative chromatographic separation as well as purification of some protein samples.

### 1. はじめに

蛋白質の分離、精製の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る。今回、新しく開発されたTSKgel SuperQ-5PWはTSKgel G5000PWにトリメチルアミノ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る。ここでは、TSKgel SuperQ-5PWの基本的性質と蛋白質分離への応用について検討した結果を述べる。また、既に上市している分取精製用ゲルのTSKgel SuperQ-Toyopearl650との比較も併せて報告する。

### 2. 実験

測定は、ポンプにCCPM、検出器にUV-8010紫外

可視検出器（いずれも東ソー製）を用い、280nmで検出し、25℃の恒温室にて行った。カラムの充填は、内径7.5mm、長さ7.5cmのステンレスカラムにポンプを用いてスラリー充填方法で行った。

### 3. 結果と考察

#### 〔1〕 基本的性質

##### (1) 総イオン交換容量と蛋白質吸着容量

Table 1 にTSKgel SuperQ-5PWの総イオン交換容量と牛血清アルブミンでの吸着容量を示す。Super Q-5PWに導入された四級アンモニウム基のイオン交換容量は $0.13 \pm 0.02$  meq/ml-gelであった。牛血清アルブミンでの吸着容量は現行のDEAE-5PWの場合 $40 \pm 5$  mg/ml-gelであるのに対し約2倍強の $100 \pm 20$  mg/ml-gelであった。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（動的吸着容量）で調べ

**Table 1** Basic evaluation of TSKgel SuperQ-5PW and DEAE-5PW

	SuperQ-5PW	DEAE-5PW
Column size (mm.I.D. × cm)	7.5 × 7.5	7.5 × 7.5
Functional group	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>
Particle size (μm)	10 ± 2	10 ± 2
Ion-exchange capacity (meq/ml)	0.15	0.10
Adsorption Capacity (mg/ml)※	100	43

※) Adsorption Capacity for Bovine serum albumin

**Table 2** Dynamic adsorption capacity for proteins on TSKgel SuperQ-5PW

Protein	Adsorption capacity (mg/ml)
IgG	15
Bovine serum albumin	100
Trypsin inhibitor	136

in 0.05M Tris-HCl buffer (pH8.6)

**Table 3** Chemical stability of TSKgel SuperQ-5PW in Alkaline and acid solution for 10 Days at 25°C

Ion-exchanger	Solution	Ion-exchange capacity (meq/ml)	
		Before exposure	After exposure
SuperQ-5PW	0.5NHCl	0.15	0.15
SuperQ-5PW	0.5NNaOH	0.15	0.14

Ion-exchanger	Solution	BSA Adsorption capacity (mg/ml)	
		Before exposure	After exposure
SuperQ-5PW	0.5NHCl	111	111
SuperQ-5PW	0.5NNaOH	111	112

た結果をTable 2に示す。SuperQ-5PWは高分子量の蛋白質に対しても高い吸着容量を有している。吸着された蛋白質の脱着は0.5MNaClを含む50mMトリス塩酸バッファー (pH8.6)で行ったが、いずれの蛋白質も回収率は100%であった。

## (2) 化学的安定性

Table 3にSuperQ-5PWを0.5NNaOH及び0.5NHCl中に25°Cで10日間浸せしめ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す。10日経過後、0.5NNaOH及び0.5NHCl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なかった。この結果よりSuperQ-5PWは、酸、アルカリに

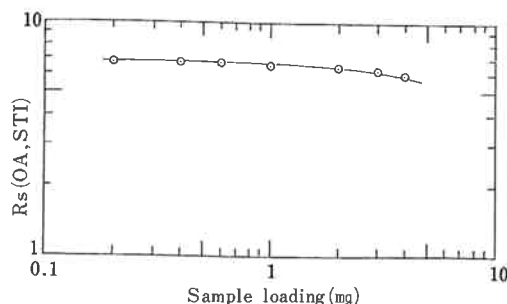


Fig. 1 Sample loading dependence of resolution between ovalbumin and trypsin inhibitor on TSKgel Super Q-5PW

Table 4 Recovery of proteins from TSKgel SuperQ-5PW and DEAE-5PW

Protein	Recovery(%)	
	SuperQ-5PW	DEAE-5PW
Thyroglobulin	101	98
IgG	106	100
Bovine serum albumin	101	102
Hemoglobin	99	96
Ovalbumin	106	104
$\beta$ -Lactoglobulin	105	103
Trypsin inhibitor	100	104
Myoglobin	101	103

Each protein of 0.4mg was applied to SuperQ-5PW column (75 $\times$ 7.5mmI.D) in 0.05M tris-HCl buffer (pH8.6) and the absorbed protein was desorbed in 0.05M tris-HCl buffer (pH8.6) containing 0.5 M NaCl

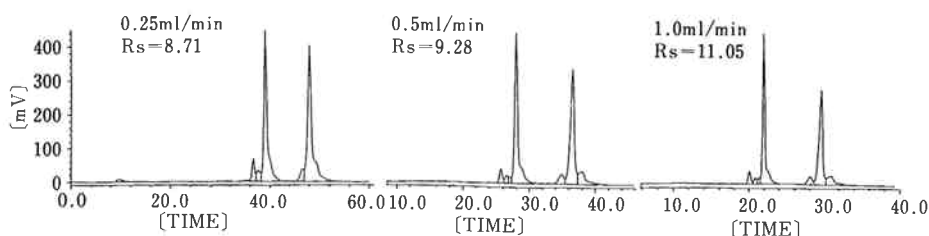


Fig. 2 Separation of a protein mixture by ion-exchange chromatography on TSKgel Super Q-5PW

Column : TSKgel Super Q-5PW 7.5 $\times$ 0.75cmI.D.  
 Sample : ovalbumin, 1mg  
           trypsin inhibitor, 1mg  
 Sample size : 100  $\mu$ l  
 Elution : 60min linear gradient from 0.05M tris-HCl buffer of pH 8.6 to  
           0.05M tris-HCl buffer of pH 8.6 containing 0.5M NaCl  
 Flow rate : 0.25, 0.5, 1.0ml/min  
 Temperature : 25 $^{\circ}$ C  
 Detection : UV absorbance at 280 nm

対して安定であり、蛋白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、再生を行うことができる。

### (3) 回収率

カラムを50mMトリス塩酸バッファー (pH8.6) で30分平衡化した後、各種蛋白質を注入し吸着させ、1分後、0.5MNaClを含む50mMトリス塩酸バッファー (pH8.6) で脱着した溶出液を分光光度計 (吸光度280nm) で測定し、回収率を求めた。結果をTable 4に示す。現行のDEAE-5PWと同様にいずれの蛋白質も回収率は定量的であった。

### (4) 試料負荷量

試料にオブアルブミン (ニワトリ卵、生化学工業製)

とトリプシンインヒビター (大豆、Sigma社製) を用い、濃度を1 mg/mlとし注入量を変えて試料負荷量を調べた。結果をFig. 1に示す。DEAE-5PWは約1 mg位から分離能が低下するのに対し、SuperQ-5PWは約3 mg位からの分離能は徐々に低下してくる。

### (5) 蛋白質の分離におよぼす流速の影響

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Fig. 2に示す。流速が速いほど分離時間が短く、高分離能が得られる。

(6) 蛋白質の分離におよぼす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、

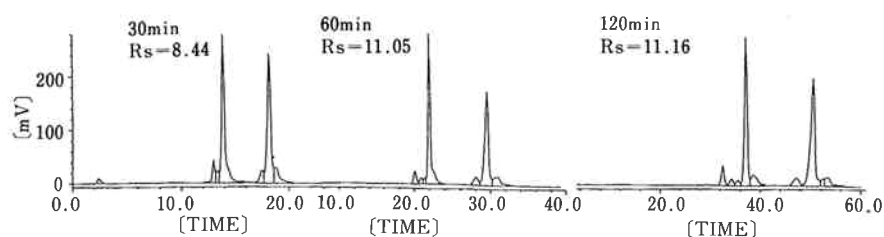


Fig. 3 Separation of a protein mixture by ion-exchange chromatography on TSKgel Super Q-5PW

Column : TSKgel Super Q-5PW 7.5×0.75cm I.D.  
 Sample : ovalbumin, 1mg  
           trypsin inhibitor, 1mg  
 Sample size : 100 μl  
 Elution : 30, 60, 120min linear gradient from 0.05M tris-HCl buffer of pH 8.6 to 0.05M tris-HCl buffer of pH 8.6 containing 0.5M NaCl  
 Flow rate : 1.0ml/min  
 Temperature : 25°C  
 Detection : UV absorbance at 280 nm

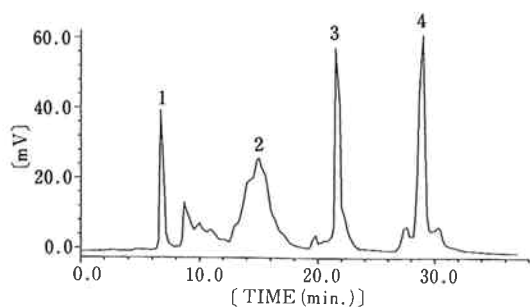


Fig. 4 Separation of a protein mixture by ion-exchange chromatography on TSKgel Super Q-5PW

Column size : 7.5×0.75cm I.D.  
 Sample : 1. Carbonic anhydrase (2mg)  
           2. Transferrin (4mg)  
           3. Ovalbumin (5mg)  
           4. Trypsin inhibitor (5mg)  
 Sample loading : 100 μl  
 Elution : 60min linear gradient from 0.05M tris-HCl buffer of pH 8.6 to 0.05M tris-HCl buffer of pH 8.6 containing 0.5M NaCl  
 Flow rate : 1.0ml/min  
 Temperature : 25°C  
 Detection : UV absorbance at 280 nm

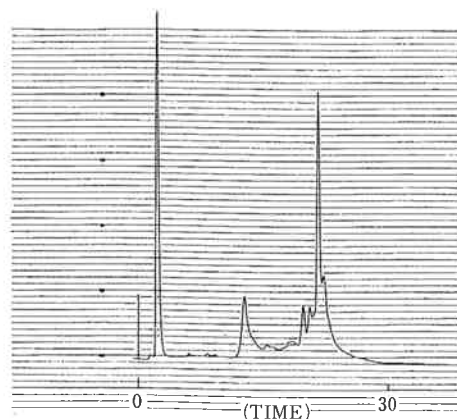


Fig. 5 Separation of Egg Whites by ion-exchange chromatography on TSKgel Super Q-5PW

Column size : 7.5×0.75cm I.D.  
 Sample size : 1mg/ml, 100 μl  
 Elution : 60min linear gradient from 0.05M tris-HCl buffer of pH 8.6 to 0.05M tris-HCl buffer of pH 8.6 containing 0.5M NaCl  
 Flow rate : 1.0ml/min  
 Temperature : 25°C  
 Detection : UV absorbance at 280 nm

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 Fig. 3 に示す。グラジエント時間が長いほど高分離能が得られるが、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る。したがってグラジエント時間は45～60分が適当と思われる。

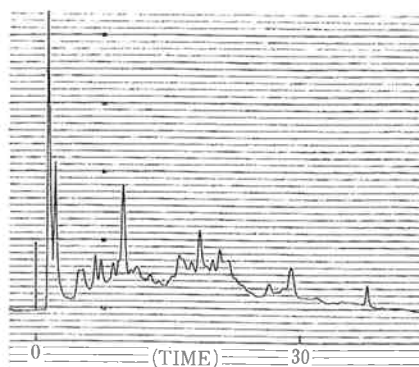


Fig. 6 Separation of urease (Jack Beans) by ion-exchange chromatography on TSKgel Super Q-5PW

Column size : 7.5×0.75cm I.D.  
 Sample size : 10mg/ml, 100 μl  
 Elution : 60min linear gradient from 0.05M tris-HCl buffer of pH 8.6 to 0.05M tris-HCl buffer of pH 8.6 containing 0.5M NaCl  
 Flow rate : 1.0ml/min  
 Temperature : 25°C  
 Detection : UV absorbance at 280 nm

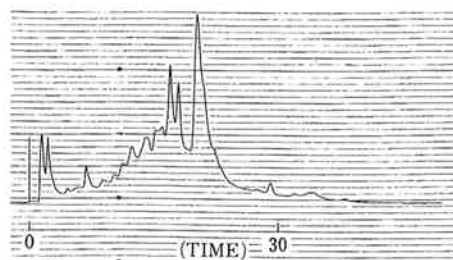


Fig. 7 Separation of commercial lipoxidase by ion-exchange chromatography on TSKgel Super Q-5PW

Column size : 7.5×0.75cm I.D.  
 Sample size : 6mg/ml, 100 μl  
 Elution : 60min linear gradient from 0.05M tris-HCl buffer of pH 8.6 to 0.05M tris-HCl buffer of pH 8.6 containing 0.5M NaCl  
 Flow rate : 1.0ml/min  
 Temperature : 25°C  
 Detection : UV absorbance at 280 nm

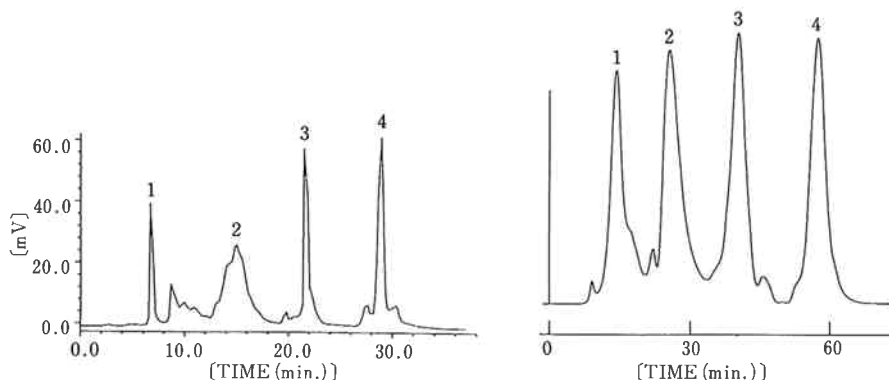


Fig. 8 Comparison of TSKgel Super Q-5PW and Super Q-Toyopearl 650 M

Column : (a) TSKgel Super Q-5PW 7.5×0.75cm I.D.  
 (b) TSKgel Super Q-Toyopearl 650M 15×1.6cm I.D.  
 Sample loading : (a) 1.6mg  
 (b) 54mg  
 Elution : A; 0.05M tris-HCl buffer (pH 8.6)  
 B; A+0.5M NaCl  
 A ⇄ B linear gradient (a) 60min (b) 100min  
 Flow rate : (a) 1.0ml/min (b) 2.0ml/min  
 Temperature : 25°C  
 Detection : UV absorbance at 280 nm

#### 4. 蛋白質の分離例

##### (1) 標準蛋白質の分離

50mMトリス塩酸バッファー (pH8.6) から0.5M NaClを含む50mMトリス塩酸バッファー (pH8.6) へのリニアグラジエ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 (牛赤血球, sigma)、トランスフェリン (ウシ, sigma)、オプアルブミン (ニワトリ卵白, 生化学工業)、トリプシンインヒビター (大豆, sigma) を分離したクロマトグラムをFig. 4に示す。

##### (2) 卵白の分離

標準的な分離条件でニワトリの卵白を分離した例をFig. 5に示す。

##### (3) ウレアーゼの分離

市販のウレアーゼ (JackBeans, sigma) を分離した例をFig. 6に示す。

##### (4) リポキシダーゼの分離

市販の粗リポキシダーゼ (大豆, SERVA社製) の分離例をFig. 7に示す。

#### 5. SuperQ-トヨパール650との比較

TSKgel SuperQ-Toyoparl650M (粒子径、44~

88  $\mu$ m、内径1.6cm、長さ15cmガラスカラム) と TSKgel SuperQ-5PW (粒子径 8~12  $\mu$ m、内径 7.5mm、長さ7.5cmステンレスカラム) で、オプアルブミンとトリプシンインヒビターを標準的な分離条件で分離したクロマトグラムをFig. 8に示す。試料負荷量はSuperQ-Toyoparl650Mが54mg、SuperQ-5PWが1.6mgで、いずれも同様な溶出パターンを示しており、分析用HPLCでの分析レベルから工業用スケールの精製への対応が可能である。

#### 6. まとめ

蛋白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の基本的性質とその評価及び蛋白質の分離例について紹介した。TSKgel SuperQ-5PWは、分離能に優れているほか、蛋白質の吸着容量も大きく化学的安定性にも優れているため、分析レベルでの高純度精製や蛋白質の粗抽出試料などの多成分試料の分離に最適である。また、既に分取精製用ゲルとしてTSKgel SuperQ-Toyoparl 650が上市されており、分析から分取まで一貫した商品構成となり生化学分野での応用、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  
セパレーションセンター  
副主任研究員



著者

氏名 森山 弘之  
Hiroyuki MORIYAMA  
入社 昭和55年4月1日  
所属 科学計測事業部ゲル製造部  
セパレーションセンター  
センター長