

SEPARATION REPORT

高速ゲル透過カラム(TSK-GEL SWタイプ およびTSK-GEL PWタイプ)の応用 — 生体高分子を中心として —

— 目 次 —

	ページ
1. はじめに	1
2. TSK-GEL SWタイプの応用	2
1) 蛋白質およびペプチドの分子量測定	2
2) 蛋白質およびペプチドの分析	6
3) 蛋白質およびペプチドの精製	8
4) 核酸の分離	9
3. TSK-GEL PWタイプの応用	10
1) 多糖類の分析	10
2) オリゴ糖の分析	11
3) 蛋白質の分析	11
4) 巨大生体高分子(核酸やウイルスなど)への応用	11
4. おわりに	12

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィ(HPLC)の目覚ましい発展の中で、生体高分子への応用の進歩は最近の大きな話題のひとつと言えます。この分野だけは架橋デキストランゲルやその誘導体などの軟質ゲルをもちいる低速クロマトグラフィの独壇場でHPLCの侵すべからざる聖域の感がありましたが充填剤の急速な進歩の前に、その神話は崩壊しつつあると言えましょう。蛋白質を例にとって分離モードの面からみればゲル汙過(GFC)が先行して、すでに定着した感がある一方、イオン交換クロマトグラフィ(IEC)および逆相クロマトグラフィ(RPC)が現在急速に浸透しつつあります。

さて当社は表-1に示すように、この分野で多彩な優れたカラムあるいは充填剤を提供し、その発展に貢献してまいりました。特に高速GFC用カラム、TSK-GEL SWタイプおよびPWタイプはパイオニア的存在として定評をいただき、内外の諸先生方により多彩な利用法が開発され報告されております。(TSK-GEL Bibliographyをご参照下さい)。

本レポートでは生体高分子を中心に高速GFC用カラムの応用について整理し、ご報告いたします。

なお、TSK-GEL SWタイプに関する基礎的な事項(理論的背景、競合品との比較、溶媒の選択法、使用上の注

表-1 生体高分子分離用TSK-GELの種類

④ 非常によく使われている(または使われるであろう)

A よく使われている。

B ある程度使われている。

分離モード	対象試料		蛋白質	ペプチド	ポリヌクレオチド	オリゴヌクレオチド	多糖	オリゴ糖	
	TSK-GEL 種類								
ゲル汙過	SW	TSKgel G2000SW	A	A	B	A	B	B	
		TSKgel G3000SW	④	B	A	B	A	D	
		TSKgel G4000SW	A	D	A	D	A	D	
	PW	TSKgel G2000PW	D	C	D		C	④	
		TSKgel G3000PW	C	C	D	A	④	B	
		TSKgel G4000PW	C	D	C	D	A	D	
		TSKgel G5000PW	B	D	A	D	④	D	
		TSKgel G6000PW	C	D		D	A	D	
	イオン交換	カチオン交換	TSKgel SP-2SW	B	A				
			TSKgel CM-2SW	B	A				
TSKgel CM-3SW			A	B					
TSKgel SP-5PW			④	B					
アニオン交換		TSKgel QAE-2SW	B	A	B	A			
		TSKgel DEAE -2SW	B	A	B	A			
		TSKgel DEAE -3SW	A	B	A	B			
		TSKgel DEAE-5PW	④	B	A	B			
逆相	C ₁₈	TSKgel ODS-120A	C	A		A			
		TSKgel ODS-120T	B	④		④			
	C ₁	TSKgel TMS-250	A	B					

意など)につきましては、当社のSeparation Report No. 018および堀尾^④らの総説に詳細に記述されておりますのでご参照下さい。

2. TSK-GEL SWタイプの応用

1) 蛋白質およびペプチドの分子量測定

SWタイプをもちいる分子量測定法はその優れた迅速性、操作性、再現性などの多くの利点のゆえに、従来の軟質ゲルによるゲル濾過法やポリアクリルアミド-SDS電気泳動法に代り多用化される傾向にあります。通常の緩衝液系で行う場合と変性溶媒系で行う場合があります。主な溶媒系の特徴を表-2に示しました。

表-2 蛋白質およびペプチドの分子量測定における代表的溶媒系とその特徴

Item	Ordinary buffer	SDS	Guanidine-HCl	Urea
1. Native or denaturated	◎ native	denaturated	denaturated	denaturated
2. Fractionation range	○ wide	narrow	middle	middle
3. Linearity 1) MW > 10,000	good	○ very good	◎ excellent	good
2) MW < 10,000	no good	× bad	○ very good	good
4. Sensitivity to ionic strength	sensitive	× very sensitive	○ not sensitive	sensitive
5. Caution to corrosion	not severe	not severe	× severe	not severe
6. Running cost	○ cheap	○ cheap	× high	cheap
Typical condition	0.25M sodium phosphate (SP)	0.2% SDS 0.2M SP	6M Guanidine-HCl	8M urea

塩酸グアニジン系は宇井⁽²⁾により詳細に検討され図-1に示すようにプロットの直線性はたいへん優れていることが示されました。高濃度クロルイオン系であるためシステムのメンテナンスには注意が必要です。SDS系は高木⁽³⁾ら、や小西⁽⁴⁾らにより詳細に検討されポピュラーな方法となっています。ただ図-2に示すように直線性の範囲がせまい点や溶離液中の塩濃度依存性が非常に大きい点に難点があります。図-3に小西らによるSDS系で

の代表的なクロマトグラムを示しました。一方通常の緩衝液系は、蛋白質を変性させることなく取扱うことができるという大きな長所に加えて、分画範囲も広いという特徴を有しますが、溶離条件(pH、塩濃度など)依存性がかなり大きい点に注意する必要があります。宇井⁽⁵⁾は塩酸グアニジン系の、糖蛋白質への適用性について検討し、図-4のような良好な直線性を示しました。

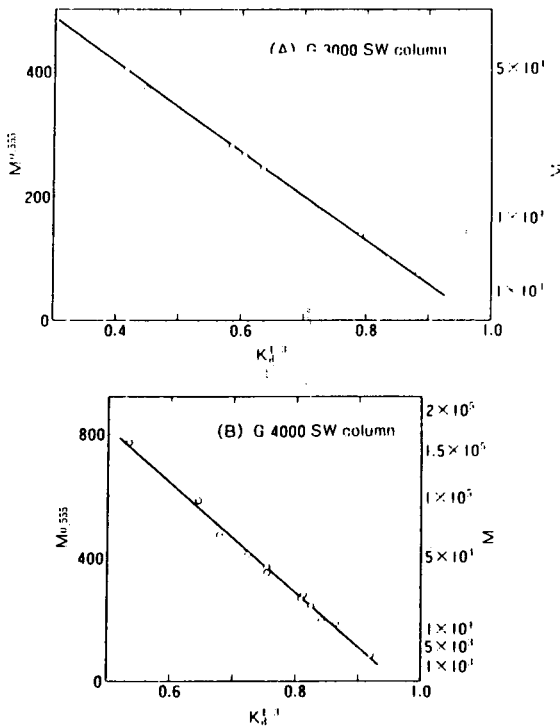


図-1 6 M塩酸グアニジン系におけるTSKgel G3000 SWおよびTSKgel G4000SWの蛋白質の検量線

カラム；TSKgel G3000SW、G4000SW

溶離液；6 M塩酸グアニジン+10mMリン酸塩+1 mM EDTA

流速；0.5ml/min

検出；UV(280nm)

試料；各種蛋白質を還元してアルキル化して得られるポリペプチド

(群馬大学宇井信生教授のご好意による)

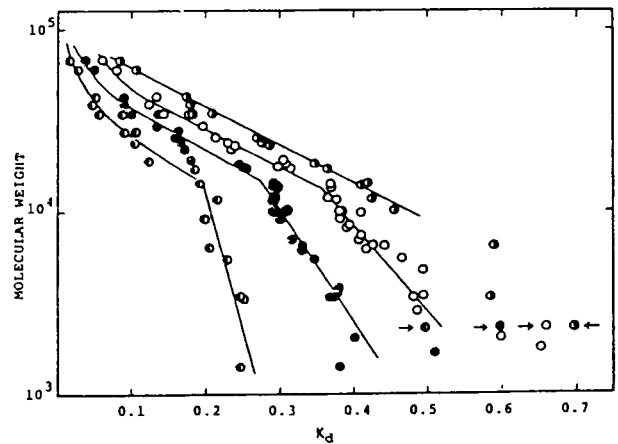


図-2 SDS系におけるTSKgel G3000SWのポリペプチドによる検量線(塩濃度依存性)

カラム；TSKgel G3000SW

溶離液；0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) + 0.1%SDS+NaCl

● 0.025M NaCl

● 0.05M NaCl

○ 0.10M NaCl

● 0.20M NaCl

流速；1.0ml/min

検出；UV(280nm)

試料；各種蛋白質およびそれらのCNBrによる分解生成ポリペプチド

(独協医科大学小西克利教授のご好意による)

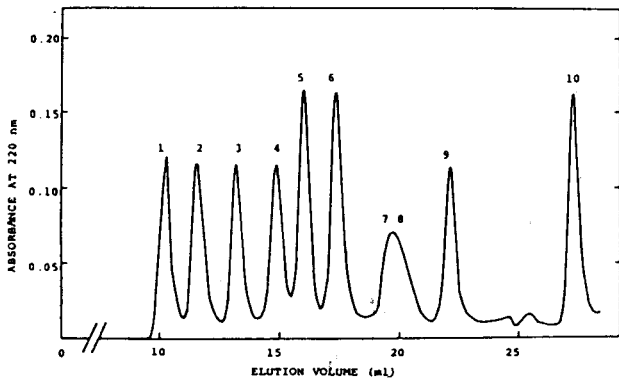


図-3 SDS系におけるポリペプチド混合物の分離

カラム; TSKgel G3000SW (7.5mm×60cm)

溶離液; 0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)

+0.2%SDS+0.2M NaCl

流速; 0.5ml/min

検出; UV (280nm)

試料; 1. blue dextran

2. serum albumin

3. pepsin

4. trypsinogen

5. myoglobin

6. cytochrome C

7. aprotinin

8. insulin B chain

9. insulin A chain

10. 2-mercaptoethanol

(独協医科大学小西克利教授のご好意による)

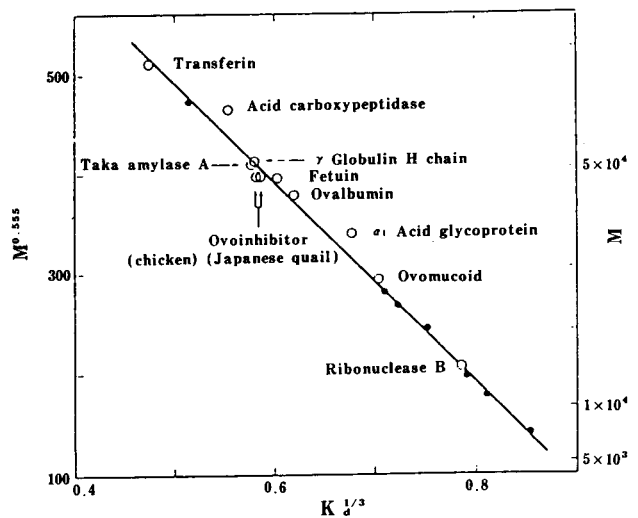


図-4 6M塩酸グアニジン系におけるポリペプチドおよびグリコポリペプチドの検量線

カラム; TSKgel G3000SW

溶離液; 6M塩酸グアニジン+10mMリン酸塩+1mMEDTA (pH 6.5)

流速; 0.5ml/min

検出; UV (280nm)

試料; 蛋白質およびグリコ蛋白質を還元さらにアルキル化して得られるポリペプチドおよびグリコポリペプチド

(群馬大学宇井信生教授のご好意による)

高木⁽⁶⁾らや、高松⁽⁷⁾らは検出器として低角度レーザー光散乱光度計(LALLS)と示差屈折計を組合せてもちいるHPLC-LALLS法について詳細な検討を行っています。本法は標準物質による検量線を必要とせず、分子量測定法の決定版とも考えられる有力な方法で今後の進展が期待されています。図-5に高木らによる可溶化された生体膜蛋白質(ポーリン)の加熱による溶出パターンの変化を示しました。

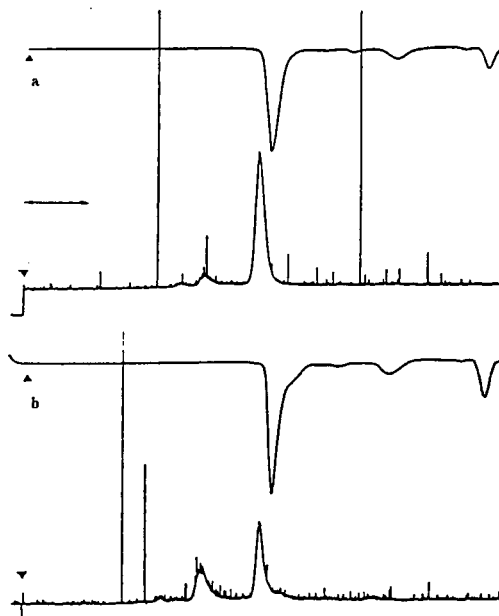


図-5 加熱によるポーリンの溶出パターンの変化 (HPLC-LALLS法の応用例)

カラム; TSKgel G3000SW (7.5mm×60cm)

溶離液; 0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.9) + 2mM SDS + 2 mM NaN₃

流 速; 0.16ml/min

検 出; 低角度レーザー光散乱光度計 (LS-8) + 示差屈折計 (RI-8)

試 料; a 加熱前のポーリン溶液

b 100°Cで5分間加熱後のポーリン溶液

(大阪大学蛋白質研究所高木俊夫教授のご好意による)

表-3 TSK-GEL SWタイプをもちいる蛋白質の反応の経時変化の追跡実験例

No.	Content	Author
1	Analysis of peptic fragmentation of human immunoglobulin G	T. Tomono et al ⁽⁸⁾
2	Proteolytic conversion of active to inactive ubiquitin	K.D. Wilkinson et al ⁽⁹⁾
3	Thermal denaturation of antithrombin III	K.C. Ingham et al ⁽¹⁰⁾
4	Thermal stability of human chorionic gonadotropin	K.C. Ingham et al ⁽¹¹⁾
5	Renin-RBP complex equilibrium	K. Murakami et al ⁽¹²⁾

2) 蛋白質およびペプチドの分析

SWタイプの高速度、高分離能、優れた再現性などの特徴により多くの画期的な分析法が開発されつつあります。高速度が最もよく活用される使用法として蛋白質の化学変化を伴う反応(変性、縮合、分解など)の過程の解析への利用をあげることができます。このような応用例の代表的なものを表-3に示しました。伴野⁽⁸⁾らは市販IgGのペプシンによる酵素分解の過程をTSKgel G3000SWカラムで追跡しました(図-6)。Ingham⁽⁹⁾らはアンチスロンビンIIIの熱変性の過程を追跡するとともに安定剤の変性防止効果の検討を行いました。これらの研究においては従来の低速クロマトグラフィで行うとすれば膨大な時間と労力を要すると推察されますが、SWタイプによる高速GFCで行えば再現性の確認を含めても数日以内で完了させることができます。

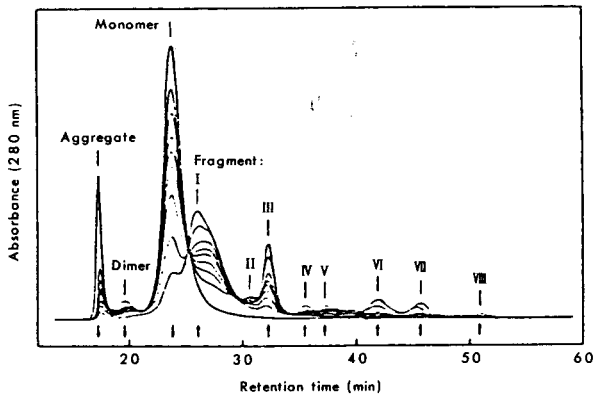


図-6 市販IgGのペプシンによる分解反応生成物の経時変化の追跡

カラム; TSKgel G3000SW (7.5mm×60cm×2)
 溶離液; 0.05M酢酸緩衝液(pH 5.0)+0.1M硫酸ナトリウム
 流速; 1.0ml/min
 試料; IgG (20mg/ml)をペプシンで分解し時間が0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30, 60分経過した溶液をそれぞれ100μl注入
 (日本赤十字中央血液センター伴野丞計部長のご好意による)

原⁽¹⁰⁾らは血清中のリポ蛋白質の分析法について詳細な研究を行い、リポ蛋白質および脂質の定量分析法を確立しました。この場合迅速性の他にピークのシャープ性およびポストラベル法による高感度化が実用化への大きなポイントとなっています。試料として約10μl程度の血清で十分であり、前処理なしで注入されます。代表的なクロマトグラムを図-7に示しました。

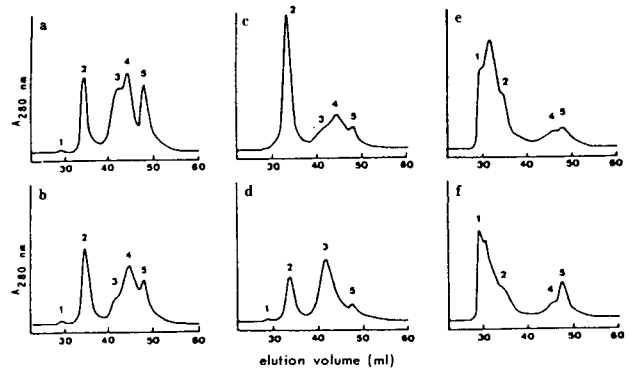


図-7 各種血清リポ蛋白質の分解パターン

カラム; TSKgel G5000PW (7.5mm×60cm)+TSKgel G3000SW (7.5mm×60cm×2)
 溶離液; 0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.4)
 流速; 1.0ml/min
 検出; UV (280nm)
 試料; 人血清

- (a) 若い女性
- (b) 男子老人
- (c) 心筋梗塞患者
- (d) 肝硬変患者
- (e), (f) 高脂血症

- ピーク1 VLDL
- ピーク2 LDL
- ピーク3 HDL₂
- ピーク4 HDL₃
- ピーク5 アルブミン

(東京医科歯科大学原一郎教授のご好意による)

鈴木¹⁰⁾らはメタロチオナインの定量分析について詳細な検討を行っています。試料としてCdを投与したラット肝やラット腎をもちい、検出器として原子吸光を直結してもちいました。低速クロマトグラフィによる従来法と比べて迅速化や高感度化はもちろんのことメタロチオナインの2つのアイソザイムが分離され定量されるというメリットがあります。このアイソザイムの分離にはSWゲルのシラノール基に基因するカチオン交換性が寄与し

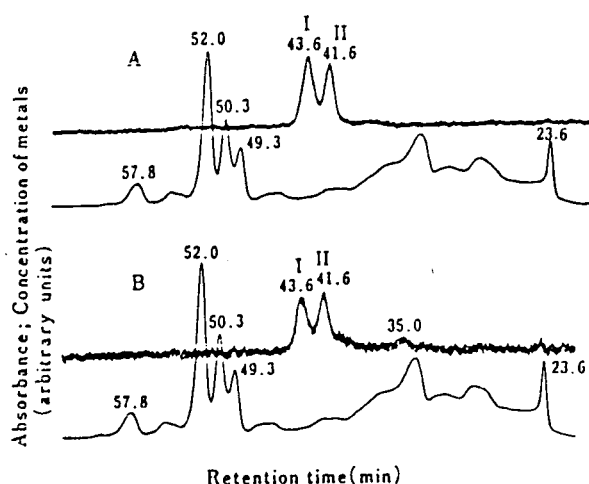


図-8 Cdを投与したラット肝上清のクロマトグラム

カラム；TSKgel G3000SWG (21.5mm×60cm)

溶離液；50mMトリス塩酸緩衝液

流速；原子吸光(Cd, Zn)+UV(280nm)

A：Cd

B：Zn

試料；ラット肝上清

ピークI メタロチオナインI

ピークII メタロチオナインII

(国立公害研究所鈴木和夫先生のご好意による)

ているものと推察されます。代表的なクロマトグラムを図-8に示しました。

伴野¹⁵⁾らは血漿蛋白質の分析について詳細な検討を行ってきました。その結果は血液製剤の製造における品質管理に内外で広く利用されています。伴野らによる血清のクロマトグラムを図-9に示します。図に示すような5分画を免疫沈澱法により分析した結果を表-4に示しました。

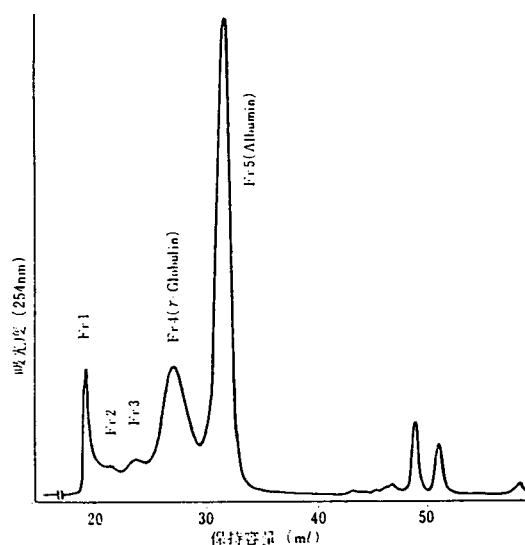


図-9 TSKgel G3000SWによる人血清蛋白質のクロマトグラム

カラム；TSKgel G3000SW (7.5mm×60cm×2)

溶離液；0.05M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)+0.1M硫酸ナトリウム

流速；1.0ml/min

試料；人血清30μl

(日本赤十字中央血液センター伴野丞計部長のご好意による)

表-4 TSKgel G3000SWによる人血清の分画の免疫沈澱法による分析結果

抗血清	血清	Fr-1	Fr-2	Fr-3	Fr-4	Fr-5	分子量	血清中の量 mg/dl
Prealbumin	+	-	-	-	-	+	61,000	20
Albumin	+	-	-	-	-	+	67,000	4,000
α ₁ -Lipoprotein	+	-	±	+	+	-	195,000~435,000	360
α ₂ -Acidglycoprotein	+	-	-	-	-	+	44,000	60
α ₁ -Antitrypsin	+	-	-	-	-	+	54,000	300
Ceruloplasmin	+	-	-	-	+	-	160,000	35
Haptoglobin	+	-	+	+	+	-	100,000~400,000	100
α ₂ HS-glycoprotein	+	-	-	-	+	+	49,000	50
α ₂ -Macroglobulin	+	±	±	±	-	-	820,000	250
Transferrin	+	-	-	-	±	+	90,000	250
β-Lipoprotein	+	+	±	-	-	-	3,200,000	360
C3-Component	+	-	-	-	+	-	240,000	100
Immunoglobulin G	+	-	-	±	+	±	150,000	1,300
Immunoglobulin A	+	-	±	+	±	-	160,000	210
Immunoglobulin M	+	+	-	-	-	-	900,000	140

3) 蛋白質およびペプチドの精製

迅速かつ高純度の精製を行うことができるため、SWタイプは分取クロマトグラフィに盛んに利用されるようになってきました。主な利用例を表-5に示しました。

通常分析用カラム(内径7.5mm)でも1回に数mg、また繰返し利用すれば1日に数十mg程度の処理を行うことができます。

分取用カラム(内径21.5mm)をもちいれば1回に数十mgから約100mg程度の精製が可能で、繰返し使用することにより1日に数百mgから数g程度の処理を行うことができ

ます。加藤²³⁾らは牛血清アルブミンをもちいて分取用カラムの試料負荷量について検討を行いました。またβ-ガラクトシダーゼやウレアーゼの精製を行い精製効率が良いことや活性回収率が優れていることを示しました(図-10、図-11)。Wher²⁴⁾らはアポリポ蛋白質の塩酸グアニジン系での精製における試料負荷量などについて詳細に検討を行っています。加藤²³⁾らの場合と比べて試料負荷量が小さいように思われますが、それは溶離液の粘性が高いことによるものと推察されます。

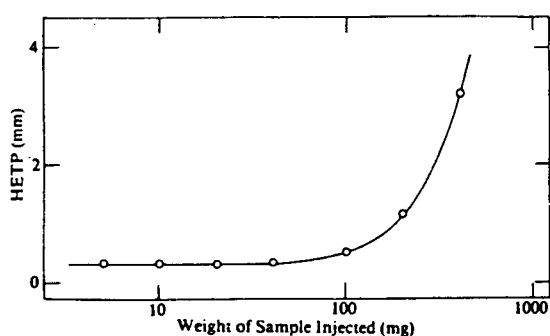


図-10 牛血清アルブミンをもちいるTSKgel G3000 SWG (分取用カラム)の試料負荷量の検討(理論段相当高さHETPと試料負荷量mgの関係)

カラム; TSKgel G3000SWG (21.5mm×60cm)

溶離液; 0.1Mリン酸緩衝液(pH 7)+0.3M塩化ナトリウム

流速; 8 ml/min

検出器; 示差屈折計

試料; 牛血清アルブミン溶液 4 ml

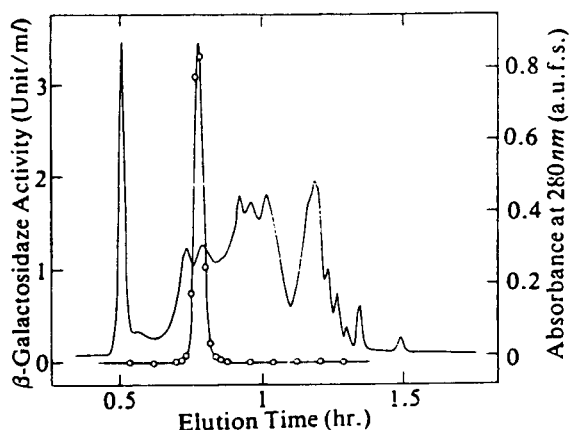


図-11 TSKgel G3000SWGによる粗β-ガラクトシダーゼの精製

カラム; TSKgel G3000SWG (21.5mm×60cm)

溶離液; 0.2Mリン酸緩衝液(pH 6.7)

流速; 5 ml/min

検出法; UV (280nm)+酵素活性

試料; 粗β-ガラクトシダーゼ2.5%溶液 3 ml

表-5 TSK-GEL SWタイプをもちいる蛋白質の精製例

Author	Sample	Column Size ID (mm)	Eluent
D. Polacek ⁽¹⁶⁾	Apolipoprotein	7.5	6M Urea
K. K. Kohli ⁽¹⁷⁾	Cytochrome P-450	7.5	PB+detergent
J. H. Collins ⁽¹⁸⁾	Triptic digest of acanthamoeba myosin II	7.5	6M Guanidine-HCl
M. R. Maurizi ⁽¹⁹⁾	Glutamine synthetase from E. Coli	7.5	PB or Trisacetate
L. E. Walker ⁽²⁰⁾	HLA-DR1 antigen	7.5	PB+0.1% SDS
J. E. Hurley ⁽²¹⁾	Cyclic CMP phosphodiesterase	7.5	Morpholinopropan sulfonic acid+Na ₂ SO ₄
E. Furuya ⁽²²⁾	Fructose-6-phosphate-2-kinase	7.5	PB
Y. Kato ⁽²³⁾	β-Galactosidase	21.5	PB
Y. Kato ⁽²⁴⁾	Human serum	21.5	PB
T. Tomono ⁽²⁵⁾	Plasma protein	7.5, 21.5	PB
T. Wehr ⁽²⁶⁾	HDL apolipoprotein	21.5	6M Guanidine-HCl
R. Asada	γ-Globulin	55	PB

最近更に大規模なカラム(内径55mm~108mm)の開発を行い1回に数百mgから数g、1日に数gから数十gの精製が可能になりました。ここまでスケールアップを行えば高付加価値の蛋白質、酵素、ペプチドなどの商業規模の精製工程にも十分に利用できると期待されます。HPLC法による精製については、a)迅速性(高生産性)、b)製品が高純度、c)完全自動化が容易、d)回収溶液が高濃度、e)スピーディな開発が可能、など多くの利点が考えられますが中でもスケールアップに要する時間と労力を大幅に節約できる点が極めて重要です。そのためには分析レベルから大規模なカラムまで分離能が低下しないことが大きなポイントとなります。図-12および図-13に示すようにSWタイプの大規模カラムでは分析レベルと同程度の分離が得られるよう設計されており

4) 核酸の分離

蛋白質に比べて核酸への応用は今まで著しく遅れていたと言えますが今後急速に応用開発が進展するものと予想されます。高速GFCは電気泳動に比べて分離能では劣るものの、操作性、迅速性などに優れ、また回収率も良く、大量分画も容易であるなど利点が多く、高い評価が得られつつあります。

図-14に小西²⁰⁾らのRNAの分離例を示しました。Wilkinsonらはラビットの9SグロビンmRNAの精製を行いSWタイプによる高速GFCが非常に有効な手段であることを報告しております。この場合通常の緩衝液系に比べて6M尿素系で優れた結果が得られております。今後DNAフラグメントの分析および粗分画にSWタイプが多用されるものと期待されます。

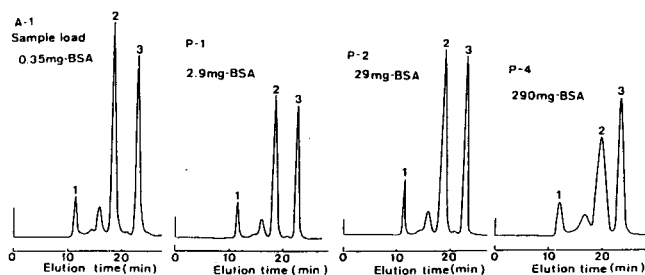


図-12 TSKgel G3000SWの分析用カラムと分取用カラムの比較

カラム; TSKgel G3000SW (A; 7.5mm×60cm)

TSKgel G3000SWG (P; 21.5mm×60cm)

溶離液; 0.1Mリン酸緩衝液(pH 6.8)+0.1M塩化ナトリウム

流速; 120ml/hr·cm² (A=0.89ml/min, P=7.3ml/min)

検出; UV(280nm)

試料; 1. blue dextran 2. bovine serum albumin
3. myoglobin

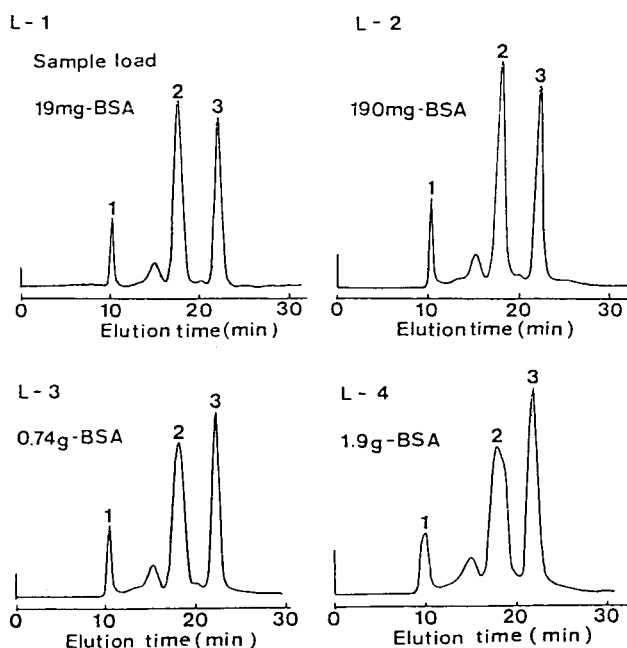


図-13 TSKgel G3000SWの大規模分取用カラムにおける試料負荷量の影響

カラム; TSKgel G3000SW (5.5mm×60cm)

溶離液; 0.1Mリン酸緩衝液(pH 6.8)+0.1M塩化ナトリウム

流速; 48ml/min

検出器; UV(280nm)

試料; 1. blue dextran 2. bovine serum albumin
3. myoglobin

3. TSK-GEL PWタイプの応用

表-5にPWタイプの代表的な応用例を示しました。PWタイプの主用途は水溶性合成高分子ですが、生体高分子に対してもSWタイプを補完する目的で利用されます。主な特徴としては、a)分画分子量の大きなグレードがある(TSKgel G5000PWおよびTSKgel G6000PW)、b)オリゴマー領域での分離能が良い(TSKgel G2000PW)、c)検量線の直線性が良い、d)耐アルカリ性に優れている、などを挙げるすることができます。

1) 多糖類の分析

多糖類の分析にはよくTSKgel G5000PW(またはTSKgel G6000PW)とTSKgel G3000PWを連結したカラム系がもちいられます。この場合分子量数100万(または数1000万)から数100程度まで検量線の直線性が良く、上述の特徴のa)およびc)が活用されています。Alsop²⁹⁾らはClinical dextranの製造において、TSKgel G5000PWとTSKgel G3000PWの連結カラム系をもちいて分子量分布を測定し品質管理を行い長期間に渡り非常に再現性の良い結果が得られることを報告しました。加藤²⁹⁾らは市販のデキストランやプルランのキャラクタライゼーションにPWタイプカラムをもちいています。

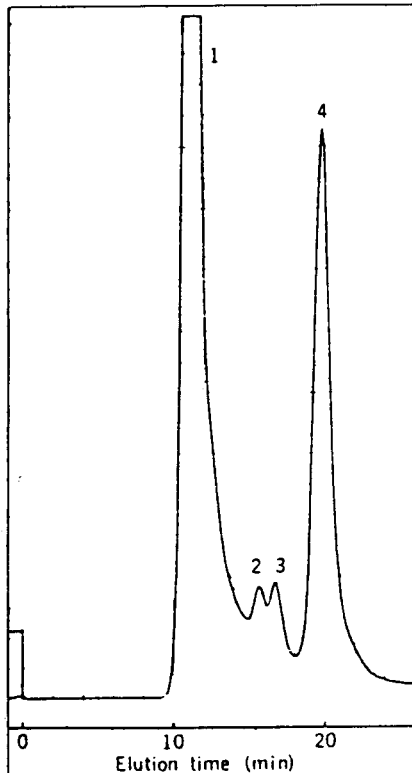


図-14 TSKgel G3000SWによるラット肝チトプラスミンRNAの溶出パターン

カラム; TSKgel G3000SW (7.5mm×60cm)

溶離液; 0.2Mリン酸緩衝液(pH 7.0)+0.1%SDS

流速; 0.90ml/min

検出; UV(260nm)

試料; 65°Cにて抽出したラット肝チトプラスミン

ピーク1 28S+18S

ピーク2 5.8S

ピーク3 5S

ピーク4 4S RNA

表-6 TSK-GEL PWタイプの代表的応用例

Classification	Examples
1. Synthetic polymers <ul style="list-style-type: none"> . nonionic . cationic . anionic 	<ul style="list-style-type: none"> . PEG, polyglycerin, Polyacrylamide . Polyethyleneimine, Polyvinylpyrrolidone . Poly (sodium acrylate), Poly (sodium styrene sulfonate)
2. Polysaccharides and derivatives	<ul style="list-style-type: none"> . Standard dextran, Clinical dextran, Pulluran . Inulin, Heparin, Chitosan . Carboxymethylcellulose
3. Very large biopolymers <ul style="list-style-type: none"> . polynucleotide . virus . protein 	<ul style="list-style-type: none"> . DNA fragments . TMV, SBMV, TBSV . Lipoprotein (VLDL, LDL), Apo-ferritin . Gelatin, Sea worm chlorocruorin
4. Small molecules <ul style="list-style-type: none"> . oligomers . others 	<ul style="list-style-type: none"> . Oligosaccharides (dextran hydrolysate, cyclodextrin hydrolysate), Cyclodextrins . Oligopeptides . Oligonucleotides

2) オリゴ糖の分析

TSKgel G2000PWは分子量1000以下の領域においてTSKgel G2000SWに比べ著しく優れた分離能を示しオリゴ糖の分析に多用されています。広海⁹⁾らはアミロースのアミラーゼによる分解生成物の分析にTSKgel G2000PWを利用して良い結果を得ています。林¹⁰⁾らはキトオリゴ糖の分析にTSKgel G2000PWをもちいています。

3) 蛋白質の分析

通常の大さの蛋白質に対しては分画範囲からすればTSKgel G3000PWまたはTSKgel G4000PWが使用できますがSWタイプに比べて分離能が劣る(理論段数が低くかつ検量線の傾きが大きいことによる)ためあまり使われていません。ただし耐アルカリ性に優れている点には十分留意しておく必要があります。たとえばpHの高い溶液での洗浄による再生も容易にでき、吸着性の強い成分を含む試料にもSWタイプよりも安心して使用できます。TSKgel G4000SWの分画範囲を越えるような大きな蛋白質に対してはTSKgel G5000PWやTSKgel G6000PWが有用となります。原¹¹⁾らはリポ蛋白質の分析にTSKgel G5000PWとTSKgel G3000SWの混合連結カラム系を多用しています。TSKgel G4000SWとTSKgel G3000SWの連結系ではVLDLやLDLがいずれもポイドボリュームに溶出するのに比べてTSKgel G5000PWとの連結カラム系ではこれらを分離することができ幅広くVLDLからHDLまでのパターンをみることができます。(図-7)Himmelらはウイルスや巨大蛋白質の溶出挙動をTSKgel G5000PWG(分取用カラム、内径21.5mm)をもちいて検討しました。巨大蛋白質であるsea worm chlorocruorin(分子量290万)やアポフェリチンダイマ(分子量96万)などが分画範囲内にあることを報告しています。図-15にHimmelらにより得られたクロマトグラムを示しました。ゼラチンの分析にはSWタイプも使われますが一般に分子量分布が広くTSKgel G4000SWでも高分子領域が一部排除されることも多くTSKgel G5000PWまたはTSKgel G6000PWを主体とするカラム系がよくもちいられます。

4) 巨大生体高分子(核酸やウイルスなど)への応用

DNAフラグメントについてはTSKgel G4000SWで約700塩基対までの分画能力がありますがそれ以上の大きなフラグメントについてはTSKgel G5000PWが有用です。

Himmelらは先に述べたようにTSKgel G5000PWの分取用カラムで数種類のウイルスの分析について検討しています。

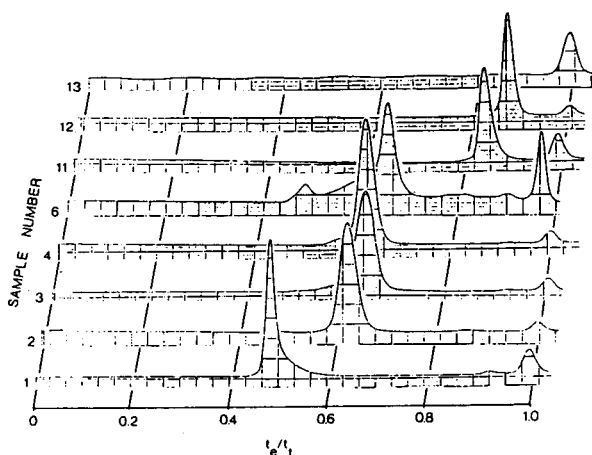


図-15 TSKgel G5000 PWGによるウイルスおよび蛋白質の溶出パターン

カラム; TSKgel G5000PWG (21.5mm×60cm)

溶離液; 0.01Mリン酸緩衝液(pH 7)+0.1M塩化カリウム

流速; 0.96ml/min

検出; UV(280nm)

試料; 1. TMV (tobacco mosaic virus)

2. TBSV (tomato bushy stunt virus)

3. SBMV (southern bean mosaic virus)

4. TYMV (turnip yellow mosaic virus)

5. apo-ferritin dimer

6. hemoglobin

7. myoglobin

8. cytochrome C

4. おわりに

以上TSK-GEL SWタイプおよびTSK-GEL PWタイプをもちいる高速GFCの生体高分子への応用について、内外の諸先生方の報告と当社の実験結果をまとめて述べてまいりました。他に多くのご紹介できなかった応用例がありますがTSK-GEL Bibliographyをご参照下さい。今後ますます高速GFCの利点が活用されて発展すること期待しております。なお図の引用をお許しいただきました皆様に厚く御礼申しあげます。

参考文献

1. 角野富三郎、日裏久英、海野益郎、石川治、加藤芳男、山下仁平、堀尾武一：巨大粒子のゲルパーミエーションクロマトグラフィー、137(1981)、喜多見書房
2. N. Ui : Anal. Biochem., 97,65 (1979)
3. 高木俊夫：巨大粒子のゲルパーミエーションクロマトグラフィー、107 (1981) 喜多見書房
4. 1) T. Imamura, K. Konishi, M. Yokoyama, and K. Konishi : J. Biochem., 86,639 (1979)
2) T. Imamura, K. Konishi, M. Yokoyama, and K. Konishi : J. Liq. Chromatogr., 4(4), 613(1981)
5. N. Ui : J. Chromatogr., 215, 289(1981)
6. 高木俊夫：蛋白質核酸酵素 臨時増刊号 タンパク質研究の新しい視点、27(12), 1526(1982)
7. 高松亨：化学工業、91, 1381(1982)
8. 1) T. Tomono, T. Suzuki, and E. Tokunaga : Anal. Biochem., 123, 394(1982)
2) T. Tomono, T. Suzuki, and E. Tokunaga : Bio. Phys. Acta., 660, 186(1981)
9. K. D. Wilkinson, and T. K. Audhya : J. Biol. Chem., 256(17), 9235(1981)
10. T. F. Busby, D. H. Atha, and K.C. Ingham : J. Biol. Chem., 256(23), 12140(1981)
11. H. Forastieri, and K. C. Ingham : J. Biol. Chem., 257(14), 7976(1982)
12. N. Ueno, H. Miyazaki, S. Hirose, and K. Murakami : J. Biol. Chem., 256(23), 12023(1981)
13. 原一郎：モダンメディア別冊、28(6), 299(1982)
14. 鈴木和夫：薬学雑誌、102(9), 801(1982)
15. 伴野丞計：化学の領域増刊、135, 141(1982)
16. D Polacek, C. Edelstein, and Angelq A. M. Scanu : Lipids., 16, 927(1981)
17. K. K. Kohli, O. Hernandez, and J. D. Mckinney : J. Liq. Chromatogr., 5(2), 367(1982)
18. J. H. Collins, G. P. Cate, and E. D. Korn : J. Biol. Chem., 257(8), 4529(1982)
19. M. R. Maurizi, and A. Ginsburg : J. Biol. Chem., 257(12), 7246(1982)
20. L. E. Walker, and R. A. Reisfeld : J. Biol. Chem., 257(14), 7940(1982)
21. J. E. Hurley, and L. Stryer : J. Biol. Chem., 257(18), 11094(1982)
22. E. Ftruya, M. Yokoyama, and K. Uyeda : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 325(1982)
23. Y. Kato, K. Komiya, Y. Sawada, H. Sasaki, and T. Hashimoto : J. Chromatogr., 190, 305(1980)
24. Y. Kato, K. Komiya, H. Sasaki, and T. Hashimoto : J. HRC & CC, 3, 145(1980)
25. C. T. Wehr, R. L. Cunico, G. S. Ott, and Virgie G. Shore : Anal. Biochem., 125, 386(1982)
26. S. Uchiyama, , T. Imamura, S. Nagai, and K. Konishi : J. Biochem., 90, 643(1981)
27. L. Graeve, W. Goemann, P. Foldi, and J. Kruppa : Biochemical and Biophysical Research Communications, 107(4), 1559(1982)
28. R. M. Alsop and G. J. Vlachogiannis : J. Chromatogr., 246, 227(1982)
29. T. Kato, T. Okamoto, T. Tokuya, and A. Takahashi : Biopolymers, 21, 1623(1982)
30. H. Kondo, H. Nakatani, R. Matsuno, and K. Hiromi : J. Biochem., 87, 1053(1980)
31. 1) T. Fukamizo, and K. Hayashi : J. Biochem., 91, 619(1982)
2) T. Fukamizo, T. Torikata, S. Kuhara, and K. Hayashi : J. Biochem., 92, 709(1982)
32. M. E. Himmel, and P. G. Squire : J. Chromatogr., 210, 443(1981)