

SEPARATION REPORT

非多孔性充填剤TSKgel DEAE-NPR、SP-NPRおよび Octadecyl-NPRを用いた、タンパク質・ペプチドの ナノグラム試料の分離回収について

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. カラム使用上の注意	1
3. 結果と考察	1
4. おわりに	5

1. はじめに

非多孔性充填剤は1967年Horváthら⁽¹⁾によって初めて紹介されました。当時は充填剤の粒子径はかなり大きかったものの(約50 μm)、分離条件について詳しい検討がなされました。^(2,3)非多孔性充填剤の大きな特徴は、多孔性充填剤におこるポア内部での試料の拡散がないことです。そのため、非多孔性充填剤は短い分離時間でも高い分離能が得られます。そして、この10年間で、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)のための充填剤に関する技術が進み、微粒子の非多孔性充填剤(粒子径1.5~7 μm)が開発され、タンパク質、ペプチド⁽⁴⁻¹⁸⁾、核酸^(19,20)が、10分以内で迅速に分離できるようになりました。

最近、非常に付加価値の高い遺伝子組み換え産物などの生体物質の品質管理や工程管理が必要となり、タンパク質、ペプチドをマイクログラム(μg)以下(すなわち、ピコモルまたはナノグラムレベル)の試料量で分離することが重要になっています。⁽²¹⁾このような背景から、多孔性充填剤に関しては、充填剤の総表面積を小さくするため、マイクロポアカラムを用いてナノグラムレベルのタンパク質が定量的に回収されることが、逆相クロマトグラフィ(RPC)⁽²²⁾およびゲルろ過クロマトグラフィ⁽²³⁾において報告されています。しかし、マイクロポアカラムによる分離は、通常のカラムと同様、分離時間が長く、特殊な送液ポンプやグラジエントミキサーが必要です。^(24,25)

一方、非多孔性充填剤の別の特徴は、表面積が小さい(5 m^2/g 以下)ことであり、少ない試料でも高い回収率が得られることが示唆されます。Burkeら⁽⁶⁾は、粒子径7 μm の非多孔性陽イオン交換体を用いて、タンパク質がナノグラムの試料でも、定量的に回収されることを報告しています。

本報では、既に加藤ら^(11,18)によりマイクログラムの試料負荷量の定量的回収が報告されているIEC用のTSKgel DEAE-NPRおよびSP-NPR、そしてRPC用のTSKgel Octadecyl-NPRを用いてタンパク質、ペプチドのナノグラムレベルでの回収定量性について報告いたします。尚、非多孔性充填剤の基本的性質に関しては既報のセパレーションレポートNo.56~58、63、64を参照下さい。

2. カラム使用上の注意

(省略、セパレーションレポートNo.63参照)

3. 結果と考察

カラム	タンパク質、ペプチド	回収率(%)
DEAE-NPR	オボアルブミン	103
	STI	98
	IgG ₁	89
SP-NPR	リゾチーム	94
Octadecyl-NPR	リボスクレアーゼA	95
	インシュリン	94
	チトクロムC	102
	ミオグロビン	99
	ソマトスタチン	99
	ブラジキニン	101
	アンジオテンシン I	106

表-1 TSKgel DEAE-NPRおよびSP-NPRを用いたイオン交換クロマトグラフィならびにTSKgel Octadecyl-NPRによる逆相クロマトグラフィにおける400ngのタンパク質、ペプチドの回収率

条件は図-1、2と同様

表-1に400ngのタンパク質およびペプチドのIECおよびRPCでの回収率を示します。全てのタンパク質及びペプチドに関してマイクログラム以下でも高い回収率が得られています。IECにおける回収率は、IgG₁はやや低いものの、加藤ら⁽¹¹⁾により報告された5 μg での回収率とよく一致しています。

図-1及び図-2に、IEC及びRPCでのタンパク質、ペプチドの試料負荷量とピーク面積の関係を示します。IECでは試料負荷量は25~400ng、RPCでは12.5~400ngです。いずれの試料でも試料負荷量とピーク面積の関係は、直線関係にあります。ところで、表-1に示しましたように、400ngでの試料の回収率はほぼ定量的であったので、IECでは25ng以上、RPCでは12.5ng以上で、試

料はほぼ定量的に回収されていると考えられます。この結果から、非多孔性充填剤の表面積が小さいことが微量試料での高い回収率に寄与していることが示唆されます。

以上のように、非多孔性充填剤を用いればナノグラムのレベルでもタンパク質、ペプチドの分離において高い回収率が得られることがわかりました。次に、マイクロ

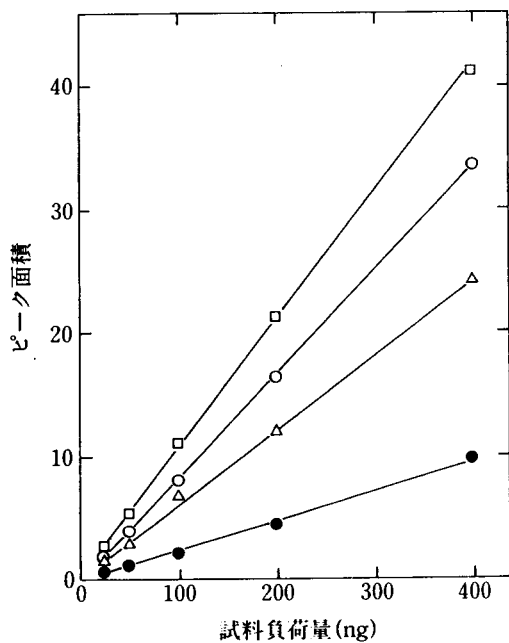


図-1 TSKgel DEAE-NPRおよびSP-NPRを用いたイオン交換クロマトグラフィにおけるタンパク質の試料負荷量と溶出ピーク面積の関係

カラム：TSKgel DEAE-NPRおよびSP-NPR (4.6mmID×3.5cm)

試料：オボアルブミン(□)、STI(○)、IgG₁(△)(DEAE-NPR)、リゾチーム(●)(SP-NPR)

溶離条件：DEAE-NPR

A：20mMトリス-塩酸バッファー (pH8.0)

B：A+0.5MNaCl

A→Bリニアグラジエント(10分)

流速：1.5ml/min

温度：25°C

検出：蛍光(Ex.：280nm、Em：340nm)

溶離条件：SP-NPR

A：20mM酢酸バッファー(pH5.0)

B：A+0.5M硫酸ナトリウム

A→Bリニアグラジエント(10分)

その他の条件はDEAE-NPRと同じ

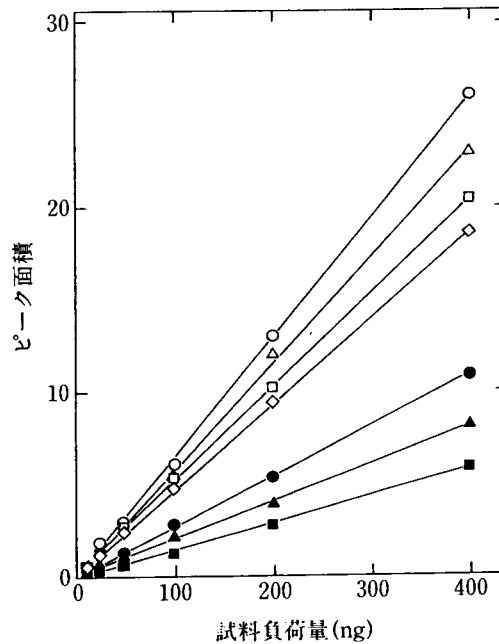


図-2 TSKgel Octadecyl-NPRを用いた逆相クロマトグラフィにおけるタンパク質、ペプチドの試料負荷量と溶出ピーク面積の関係

カラム：TSKgel Octadecyl-NPR (4.6mmID×3.5cm)

試料：リボヌクレアーゼA(○)、チトクロム C(□)、ミオグロビン(◇)、インシュリン(△)、ブラジキニン(▲)、アンジオテンシン I(■)

溶離条件：(タンパク質)

A：5 mM過塩素酸

B：A+80%アセトニトリル

A/B(80/20)

→Bリニアグラジエント(10分)

(ペプチド)

A：100mM過塩素酸

B：A+80%アセトニトリル

A→Bリニアグラジエント(10分)

流速：1.5ml/min

温度：25°C

検出：UV(215nm)

グラム以下の試料での酵素活性の回収率について検討しました。図-3にTSKgel DEAE-NPRを用いたIECによる粗ヘキソキナーゼ(500ng)の微量分取のクロマトグラムを示します。分離は5分以内に終了し、ヘキソキナーゼは4.1分付近に溶出されます。図に示しましたヘキソキナーゼ画分を集め、活性回収率を調べたところ、80%でした。同一試料25 μ gを分離した際の回収率の方が500ngの回収率よりもやや高い⁽¹¹⁾ものの、マイクログラム以下の試料でも高い活性回収率が得られました。

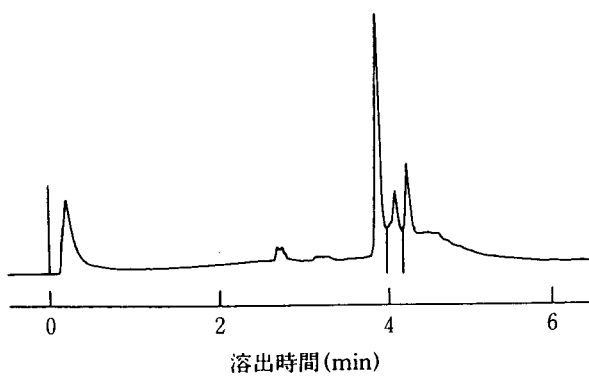


図-3 TSKgel DEAE-NPRを用いたイオン交換クロマトグラフィにおけるヘキソキナーゼのナノグラム試料の分離

カラム：TSKgel DEAE-NPR

(4.6mmID×3.5cm)

試料：粗ヘキソキナーゼ(500ng)

分離条件：図-1に同じ

活性回収率：80%

(図中の2本の垂線間を分画した)

図-4にTSKgel Octadecyl-NPRを用いたRPCによるタンパク質(それぞれ50ng)の分離のクロマトグラムを示します。タンパク質は6分以内に高い分離能でほぼ完全に分離されています。それぞれのピークもシャープであり、これは、小さな粒子径(2.5 μ m)によるものと考えられます。RPC用の溶離液としては、マイクログラム以下の試料を分離する場合、TFAよりも過塩素酸の方が、バックグラウンドが安定しています⁽¹⁸⁾(セパレーションレポートNo.63参照)。

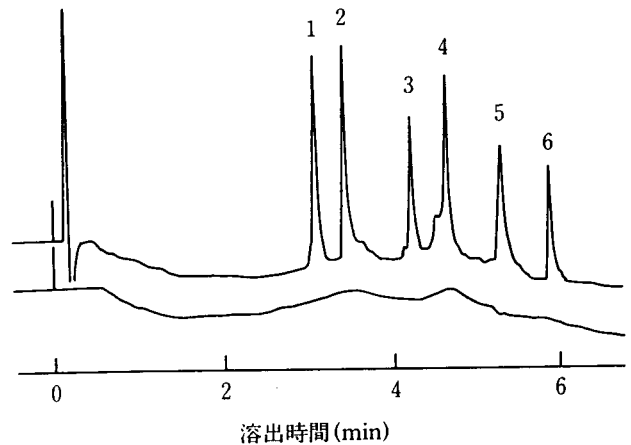


図-4 TSKgel Octadecyl-NPRを用いた逆相クロマトグラフィにおけるタンパク質混合物の分離

カラム：TSKgel Octadecyl-NPR

(4.6mmID×3.5cm)

試料：1. リボヌクレアーゼA、2. インシュリン、3. チトクロムC、4. リゾチーム、5. トランスフェリン、6. ミオグロビン(各50ng in 5 μ l)

分離条件：図-2に同じ

図-5に、TPCK-トリプシンにより消化されたチトクロムCの消化反応のモニタリングをTSKgel Octadecyl-NPRを用いたRPCで行った結果を示します。500ngの試料を消化反応を停止させずに直接カラムに注入しました。消化物の分離は7分で終了し、チトクロムC由来の多くのペプチドは、時間経過に伴い、ピーク高さが増加しています。この結果は、酵素反応の迅速なモニタリングやマイクログラム以下のタンパク質のペプチドマッピングへの応用を示唆するものです。Kalghatgiら⁽¹²⁾は、以前に同様な実験を10 μ gの試料で行っていますが、20分の1の試料量(500ng)で十分分離、検出が可能であることがわかります。

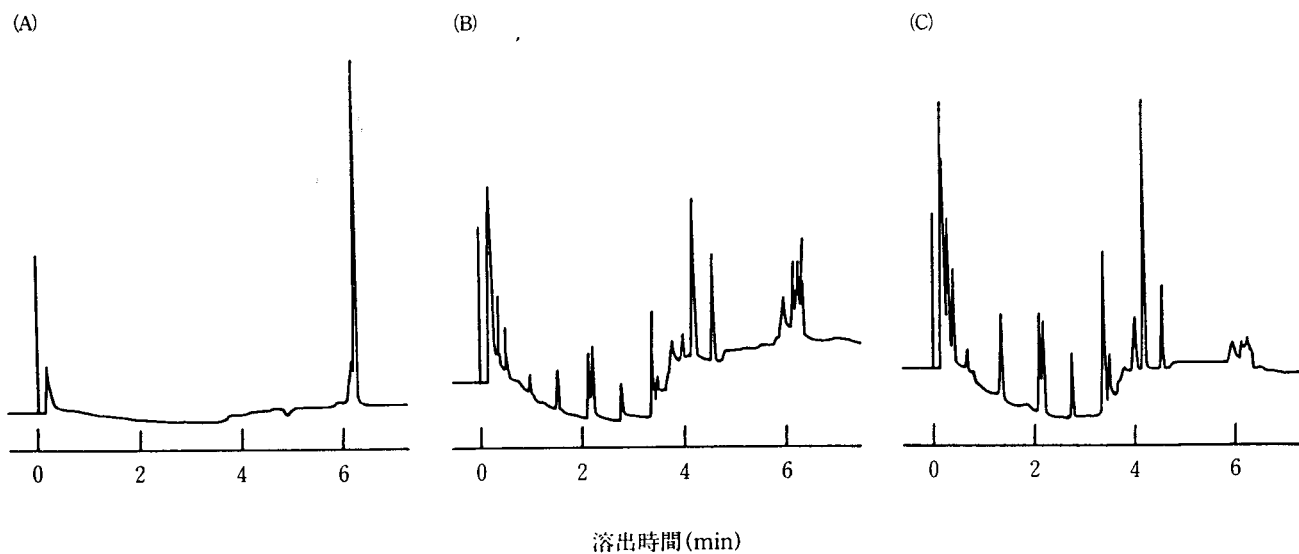


図-5 TSKgel Octadecyl-NPRを用いた逆相クロマトグラフィによるチトクロムC-トリプシン消化物のナノグラム試料の分離

カラム：TSKgel Octadecyl-NPR
(4.6mmID×3.5cm)

試料：チトクロムC消化物(500ng)
(A)混合直後、(B)混合1時間後、
(C)混合2時間後

分離条件：図-2に同じ

ただし検出はUV(215nm)

(A);0.32ABU/FS、(B)、(C);0.08ABU/FS

4. おわりに

粒子径 $2.5\mu\text{m}$ の非多孔性充填剤TSKgel DEAE-NPR、SP-NPRおよびOctadecyl-NPRを用いることにより、タンパク質、ペプチドがナノグラムのレベルでもIECまたはRPCで、シャープなピークとして分離でき、回収率もほぼ定量的であることがわかりました。多孔性充填剤を用いたマイクロボアカラムでは、特殊なHPLCシステムが必要ですが、非多孔性充填剤を用いれば、通常のHPLCシステムが適用できます。さらにNPRシリーズは

基材が樹脂であるため、化学的に安定で、シリカ系の充填剤では使用できない高いpHの溶離液や、カラムの洗浄に水酸化ナトリウムを使用することができます。したがって非多孔性充填剤TSKgel NPRシリーズは、品質管理、製造工程管理、遺伝子組み換え産物等のペプチドマッピングによる純度検定のほか、生体物質を活性を保持したまま微量分取することに、非常に有用であると考えられます。

References

- (1) C. G. Horvath, B. A. Preiss and S. R. Lipsky, *Anal. Chem.*, 39(1967)1422
- (2) C. Horvath and S. R. Lipsky, *J. Chromatogr. Sci.*, 7(1969)109
- (3) C. Horvath and S. R. Lipsky, *Anal. Chem.*, 41(1969)1227
- (4) D. J. Burke, J. K. Duncan, L. C. Dunn, L. Cummings, C. J. Siebert and G. S. Ott, *J. Chromatogr.*, 353(1986)425
- (5) K. K. Unger, G. Jilge, J. N. Kinkel and M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr.*, 359(1986)61
- (6) D. J. Burke, J. K. Duncan, C. Siebert and G. S. Ott, *J. Chromatogr.*, 359(1986)533
- (7) J. K. Duncan, A. J. C. Chen and C. J. Siebert, *J. Chromatogr.*, 397(1987)3
- (8) G. Jilge, R. Janzen, H. Giesche, K. K. Unger, J. N. Kinkel and M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr.*, 397(1987)71
- (9) R. Janzen, K. K. Unger, H. Giesche, J. N. Kinkel and M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr.*, 397(1987)81
- (10) R. Janzen, K. K. Unger, H. Giesche, J. N. Kinkel and M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr.*, 397(1987)91
- (11) Y. Kato, T. Kitamura, A. Mitsui and T. Hashimoto, *J. Chromatogr.*, 398(1987)327
- (12) K. Kalghatgi and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, 398(1987)335
- (13) F. D. Antia and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, 435(1988)1
- (14) M. A. Round and F. E. Regnier, *J. Chromatogr.*, 443(1988)73
- (15) K. Kalghatgi and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, 443(1988)343
- (16) Y-F. Maa and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, 445(1988)71
- (17) M. W. Dong, J. R. Gant and B. R. Larsen, *Bio-Chromatography*, 4(1989)19
- (18) Y. Kato, T. Kitamura, S. Nakatani and T. Hashimoto, in preparation
- (19) Y. Kato, T. Kitamura, A. Mitsui, Y. Yamasaki and T. Hashimoto, *J. Chromatogr.*, 447(1988)212
- (20) Y. Kato, Y. Yamasaki, S. Fukushige and K. Matsubara, in preparation
- (21) S. Borman, *Anal. Chem.*, 59(1987)973A
- (22) E. C. Nice, C. J. Lloyd and A. W. Burgess, *J. Chromatogr.*, 296(1984)153
- (23) C. Flurer, C. Borra, S. Beale and M. Novotny, *Anal. Chem.*, 60(1988)1826
- (24) M. A. Stadalius, M. A. Quarry and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 327(1985)93
- (25) C. L. Flurer, C. Borra, F. Anderolini and M. Novotny, *J. Chromatogr.*, 448(1988)73