

SEPARATION REPORT

非多孔性充填剤を用いたタンパク質の 二次元的高性能液体クロマトグラフィー

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. カラム使用上の注意	1
3. 2D-HPLCシステム	2
4. 結果と考察	3
5. おわりに	8

1. はじめに

異なる分離モードのクロマトグラフィーを組み合わせた二次元的な高性能液体クロマトグラフィー(2D-HPLC)分析法は、二次元電気泳動に比べて分離能は劣るものの、分離後の試料の回収が容易なことや比較的操作简单なこと、また、システムの自動化が容易なことなどから、タンパク質、ペプチドの新しい分析法として注目されています。現在までに、各種の分離モードを組み合わせた分析例が報告されていますが、HPLC用充填剤には多孔性充填剤が主に用いられています¹⁻³⁾。一方、最近、当社は充填剤に細孔のない超高性能イオン交換クロマトグラフィー用充填剤^{4,5)}(セパレーションレポートNa56参照)、超高性能逆相クロマトグラフィー用充填剤⁶⁾(セパレー

ションレポートNa63参照)および超高性能疎水クロマトグラフィー用充填剤⁷⁾(セパレーションレポートNa64参照)を開発しました。非多孔性充填剤では充填剤内部での試料の拡散が起こらないため試料ピークの広がりを抑えることができます。したがって、非多孔性充填剤は多孔性充填剤よりも短い分析時間で優れた分離能をもちます。多孔性充填剤を用いた従来の2D-HPLC分析には14時間以上要しましたが²⁾、非多孔性充填剤を用いることにより、分析時間を大幅に短縮できると考えられます。そこで、非多孔性充填剤を用いたタンパク質の迅速な2D-HPLC分析法を検討しましたので紹介します。

2. カラム使用上の注意

(省略。セパレーションレポートNa66参照)

3. 2D-HPLCシステム

図-1に2D-HPLCシステムの構成図を示します。一次元めにはイオン交換クロマトグラフィー(IEC)、二次元めには逆相クロマトグラフィー(RPC)を行いました。一次元めのIECにはTSKgel DEAE-NPRを、二次元めのRPCにはTSKgel Octadecyl-NPRを用いました。システムは、コンピュータコントロールマルチポンプCCPM 2台と、紫外可視検出器UV-8010、フラクションコレクタFC-8010、オートサンプラAS-8010各1台ずつ、およびダイナミックミキサMX-8010、インジェクションバルブユニット(A)、バルブユニットMV-8010から成ります。また、カラム内への微粒子の進入を防ぐため、ポンプと

カラムの間に0.45 μ mのラインフィルタを取り付けました。試料はインジェクションバルブを用いて一次元めのカラムに添加し、高圧グラジエント方式によるリニアグラジエント溶出を行い、フラクションコレクタを用いて溶出液を分取しました(図-1(a))。次に、各フラクションの一部をオートサンプラを用いて二次元めのカラムに添加し、高圧グラジエント方式によるリニアグラジエント溶出を行いました(図-1(b))。全ての装置の制御、およびデータ処理はスーパーシステムコントローラSC-8010を用いて行いました。

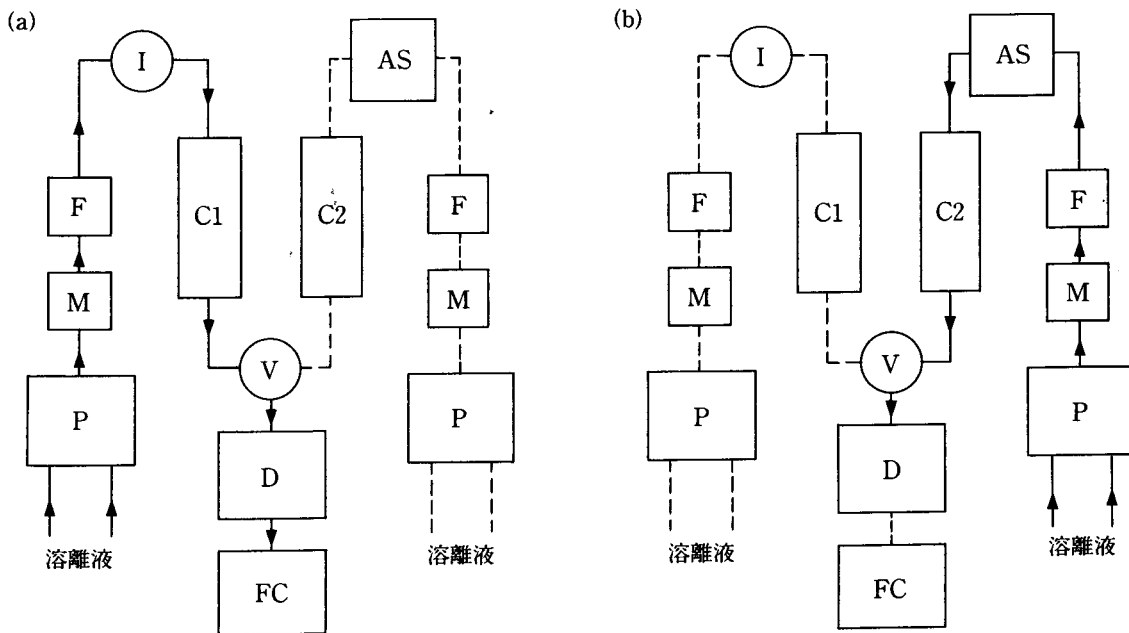


図-1 2D-HPLCシステム構成図

(a)一次元めのIECの流路(実線)

(b)二次元めのRPCの流路(実線)

P; 送液ポンプ: CCPM

M; ダイナミックミキサ: MX-8010

F; ラインフィルタ

I; インジェクションバルブユニット(A)

AS; オートサンプラ: AS-8010

C1, C2; カラム

V; バルブユニット: MV-8010

D; 検出器: UV-8010

FC; フラクションコレクタ: FC-8010

4. 結果と考察

図-2に、TSKgel DEAE-NPRを用いたIECにおけるタンパク質の溶出位置と等電点の関係を示します。溶離液には、等電点の高い塩基性タンパク質でも保持されるように、pHの高い緩衝液を用いました。IECでの保持に関与するのは、タンパク質の表面電荷ですので、溶出時

間と等電点との間に厳密な相関関係は見られませんが、ここで用いた試料では、炭酸デヒドラーゼ(4)を除き、等電点が低いほど、溶出時間が遅いという傾向が認められました。また、等電点が比較的小さいタンパク質(5~8)は近接して溶出しており、IECのみでは分離できないことがわかります。

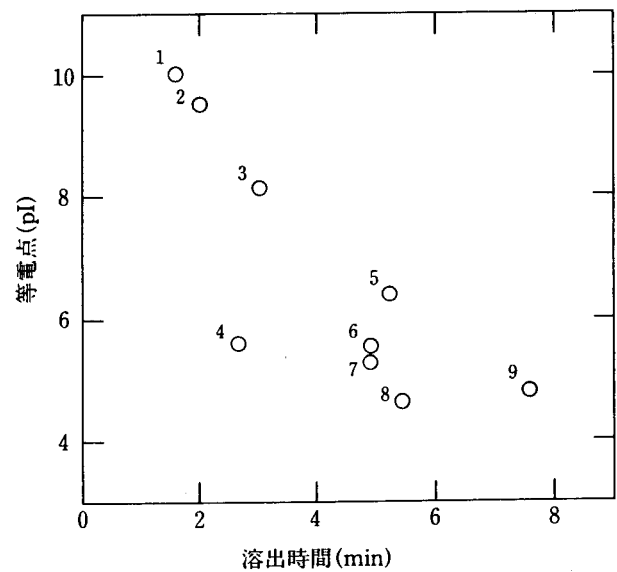


図-2 IECにおけるタンパク質の溶出位置と等電点の関係

カラム；TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm

溶離液；A：20mM 1,3-ジアミノプロパン-HCl
緩衝液(pH10.3)

B：A+0.5M NaCl(pH10.3)

A→B リニアグラジエント(10分)

流速；1.5mℓ/min

温度；25℃

検出；UV(280nm)

試料；1. チトクロムC 2. リボヌクレアーゼ
3. ミオグロビン 4. 炭酸デヒドラーゼ
5. コンアルブミン 6. インシュリン
7. トランスフェリン 8. オボアルブミン
9. ウシ血清アルブミン

図-3に、TSKgel Octadecyl-NPRを用いたRPCにおけるタンパク質の溶出時間と分子量の関係を示します。ここで用いたTFA-アセトニトリル系溶離液中では大部分のタンパク質は変性してランダムコイル構造をとっており、疎水性は分子量に厳密には比例しませんが、こ

で用いた試料については分子量約50,000までのタンパク質(1~8)はリボヌクレアーゼ(2)を除き、分子量が大きいほど、溶出時間が遅いという傾向が認められました。また、5~12のタンパク質は近接して溶出しており、RPCのみでは分離できないことがわかります。

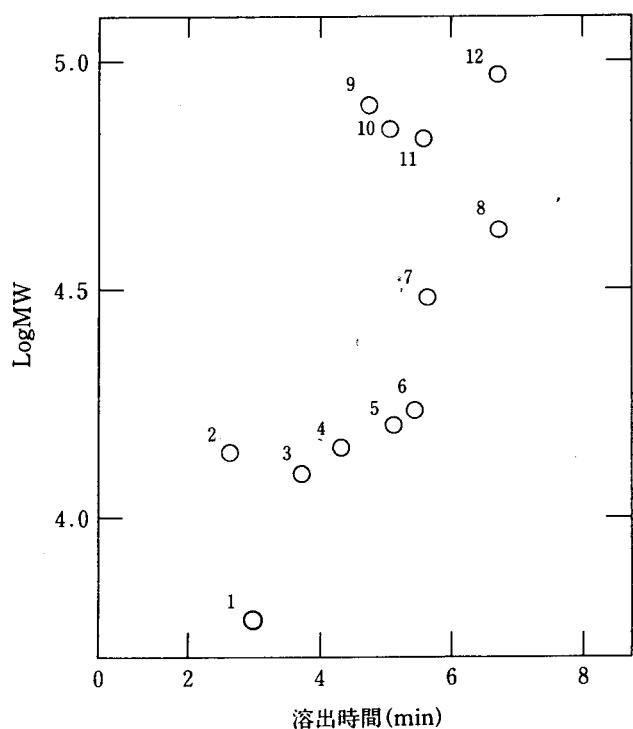


図-3 RPCにおけるタンパク質の溶出位置と分子量の関係

カラム；TSKgel Octadecyl-NPR 4.6mmID×3.5cm
溶離液；A：0.05%TFA+15%アセトニトリル溶液

B：0.05%TFA+80%アセトニトリル溶液

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(220nm)

試料；1. インシュリン 2. リボヌクレアーゼ
3. チトクロムC 4. リゾチウム
5. α-ラクトアルブミン 6. ミオグロビン
7. 炭酸デヒドラターゼ 8. オボアルブミン
9. トランスフェリン 10. コンアルブミン
11. ウシ血清アルブミン
12. ホスホリラーゼb

図-4にIECおよびRPCでの溶出時間を二次元座標上にプロットしたタンパク質の二次元マップを示します。座標上の各タンパク質の位置はばらついており、いずれか一方のクロマトグラフィーで溶出位置が近接しているタンパク質、例えば、インシュリン(5)とトランスフェリン(6)、あるいは、コンアルブミン(7)と α -ラクトアルブミン(9)などは二つのクロマトグラフィーを併用することにより分離できると予想されます。

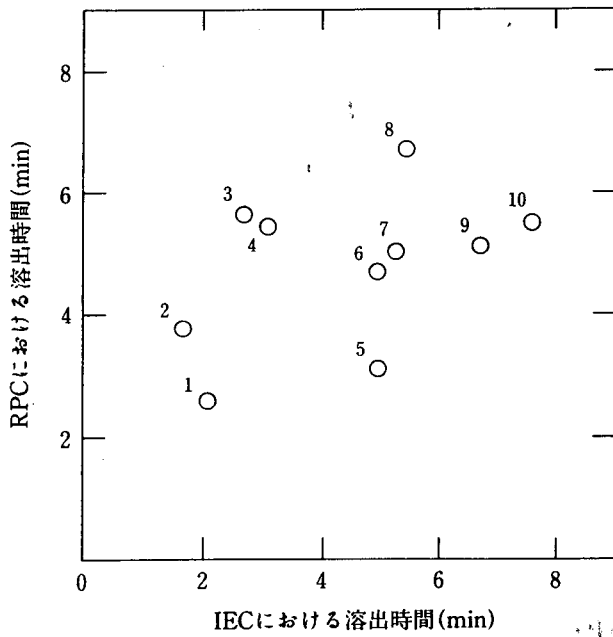


図-4 タンパク質の二次元マップ

- 試料; 1. リボスクレアーゼ 2. チトクロムC
 3. 炭酸デヒドラターゼ 4. ミオグロビン
 5. インシュリン 6. トランスフェリン
 7. コンアルブミン 8. オボアルブミン
 9. α -ラクトアルブミン
 10. ウシ血清アルブミン

次に、図-4で用いた10種類のタンパク質混合物を試料として、2D-HPLC分析法を検討しました。図-5は一次元めのIECによるタンパク質混合物の分離を示します。クロマトグラム上の垂線で示すように30秒(0.75ml)毎に溶出液を分取しました。クロマトグラム上の数字はフラクシオン番号を示します。フラクシオン4から7のピークは良好に分離されていますが、フラクシオン10、11のピークは悪くなっています。次に、オートサンプラAS-8010を用いて各フラクシオン0.5mlずつをカラムに注入し、RPCで分析しました。図-6に、システムコントローラSC-8010のマルチプロット出力を用いて、各フラクシオンのRPCのクロマトグラムを三次元的に示

しました。IECのみでは分離不十分であったフラクシオン10、11のピークが良好に分離されました。一方、IECでは良好に分離されていたフラクシオン6のピークはRPCでは非常に近接しており、一次元めで得られた分離能がかえってそこなわれてしまいました。これは一次元めの溶出液を一定時間毎に分取したこの方法の欠点と考えられます。また、非多孔性充填剤を用いたクロマトグラフィーでは平衡化時間、分離時間ともに10分程度ですので、フラクシオン数を20とした場合、全分析に要する時間は約7時間で、多孔性充填剤を用いた場合の約1/2に短縮されました。

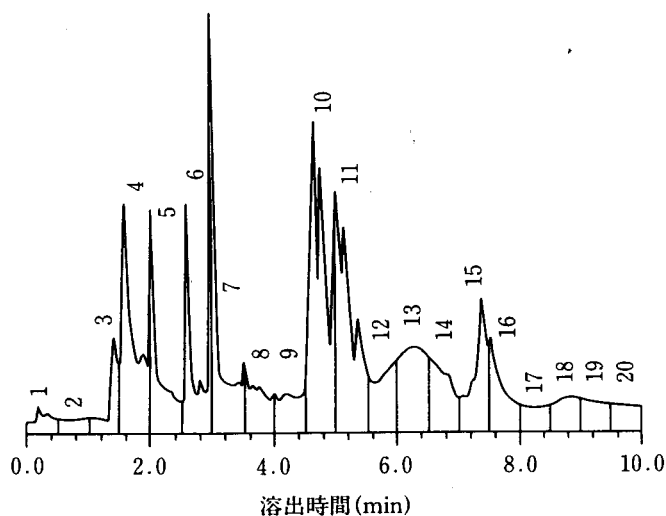


図-5 IECによるタンパク質混合物の分離

分離条件；図-2に同じ

試料；リボスクレアーゼ(2.5 μ g)、チトクロムC(5 μ g)、インシュリン(2.5 μ g)、ミオグロビン(2.5 μ g)、炭酸デヒドラターゼ(2.5 μ g)、トランスフェリン(2.5 μ g)、コンアルブミン(2.5 μ g)、 α -ラクトアルブミン(5 μ g)、ウシ血清アルブミン(5 μ g)、オボアルブミン(10 μ g)

(クロマトグラム上の数字はフラクシオン番号を示す。)

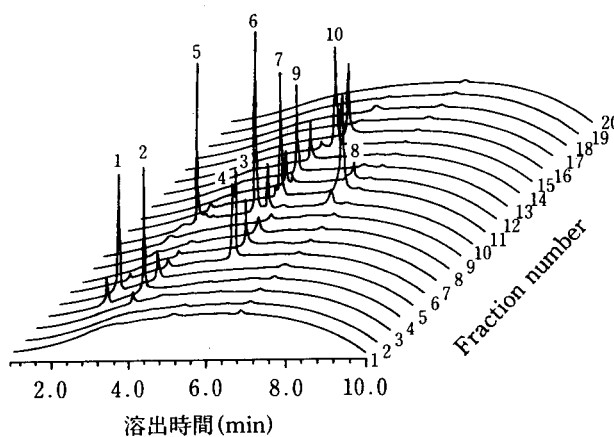


図-6 RPCによるタンパク質混合物の二次元めの分離

分離条件；図-3に同じ

試料；図-5の各フラクシオン0.5ml

(クロマトグラム上の番号は図-4に同じ。)

次に、この方法を用いて粗試料の分析を試みました。試料は酵母酵素濃縮物を用いました。図-7は一次元めのIECによる分離を示します。溶出は塩化ナトリウム濃度0から0.4Mまでの10分間リニアグラジエントの後、強く吸着した成分を1M塩化ナトリウムで溶出しました。溶出液を0.75mlずつ分取し、0.2mlをRPCで分析しました。図-8に各フラクションのクロマトグラムを示します。ピーク数は約50と比較的少ないものの、各ピークが良好に分離されていることがわかります。一次元めのIECで

のフラクション間隔を細かくすることにより、分離能は向上し、ピーク数はさらにふえるものと思われます。精製酵素標品を用いてピークの同定を試みたところ、図に示すようにアルコール脱水素酵素(ADH)およびグルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)の溶出位置を確認しました。また、一次元めのIECで1M塩化ナトリウムで溶出した画分、フラクション22は、RPCではほとんどピークが見られませんでした。この画分にはタンパク質以外の成分、おそらく核酸が含まれているものと思われます。

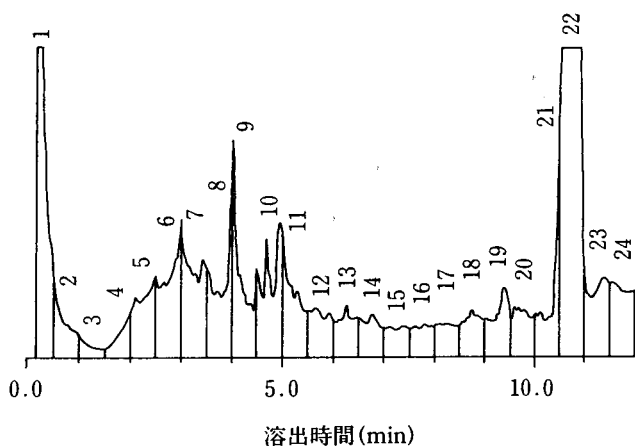


図-7 IECによる酵母酵素濃縮物の分離

溶離液; A: 20mM 1,3-ジアミノプロパン-HCl
緩衝液(pH10.3)

B: A+0.4M NaCl(pH10.3)

C: A+1.0M NaCl(pH10.3)

A → B → C
リニアグラジエント(10分) ステップグラジエント

流速; 1.5ml/min

温度; 25°C

検出; UV(280nm)

試料; 酵母酵素濃縮物(100μg)

(クロマトグラム上の数字はフラクション番号を示す。)

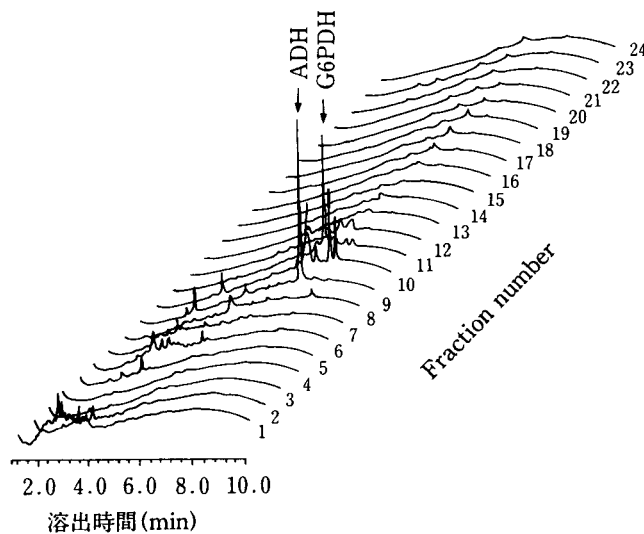


図-8 RPCによる酵母酵素濃縮物の二次元めの分離

溶離液; A: 0.05%TFA

B: 0.05%TFA+80%アセトニトリル溶液

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(220nm)

試料; 図-7の各フラクション0.2ml

ADH: アルコール脱水素酵素

G6PDH: グルコース-6-リン酸脱水素酵素

5. おわりに

以上のように、非多孔性充填剤を用いた2D-HPLC分析法により、比較的短時間でタンパク質を高分離能で分離できます。またスーパーシステムコントローラSC-8010を用いて分析を自動化することが可能です。この方法は、細胞抽出液や血清タンパク質などの複雑なタンパク質混合物の分離、分析に有用であると考えられます。さらに遺伝子組換え産物の高精度の純度検定や品質管理への応用が期待されます。

参考文献

- 1) N.Takahashi, Y.Takahashi and F.W.Putnam, J. Chromatogr., 266(1983) 511
- 2) N.Takahashi, N.Ishioka, Y.Takahashi and F.W. Putnam, J.Chromatogr., 326(1985) 407
- 3) B.Schoel and S.H.E.Kaufmann, J.Chromatogr., 448 (1988) 165
- 4) Y.Kato, T.Kitamura, A.Mitsui and T.Hashimoto, J. Chromatogr., 398(1987) 327
- 5) Y.Kato, T.Kitamura, A.Mitsui, Y.Yamasaki and T. Hashimoto, J.Chromatogr., 447(1988) 212
- 6) Y.Kato, S.Nakatani, T.Kitamura, Y.Yamasaki and T.Hashimoto, J.Chromatogr., 502(1990)416
- 7) Y.Kato, T.Kitamura, S.Nakatani and T.Hashimoto, J.Chromatogr., 483(1989) 401