

トヨパールスターターキットの応用例

-培養上清中の遺伝子組み換え産物の分離-

1. 最適なHIC用充填剤のスクリーニングと分離条件の決定

東ソー(株)

科学計測事業部

トヨパールスターターキットを使って、遺伝子組み換え細胞の培養によって生産されたタンパク質の精製方法を検討しました。

用いた培養細胞は、ヒトインターロイキン-6レセプタの可溶性フラグメント遺伝子で組み換えたCHO細胞です(参考文献)。この細胞を動物細胞培養装置Verax System Oneで培養し、培養液を連続的に回収しました。得られた培養液を遠心分離した上清を用いて、トヨパールスターターキットで分離方法を検討しました。

スクリーニングにはトヨパールスターターキットHIC(疎水クロマトグラフィー用)を使用しました。このキットにはButyl-トヨパール650C、Phenyl-トヨパール650C、Ether-トヨパール650Cの3種類のカラムが含まれています。まず上記の培養液の遠心上清に1.2Mの硫酸アンモニウム(硫安)を加え、この5mlをそれぞれ3種類のカラムに負荷し、その後1.2M、0.6M、0M硫安を含むリン酸緩衝液で段階的に溶出させ、最後に20%エタノールで洗浄を行いました。3種類のカラムからの溶出パターンを比較したのが図-1です。目的物質である組み換えインターロイキン-6レセプタ(sIL-6R)は、最も吸着保持力の強いButyl-トヨパール650Cには強く吸着し、20%エタノール洗浄でようやく溶出されています。最も吸着力の弱いEther-トヨパール650Cでは、1.2M硫安の条件で完全には吸着されず広い分画に溶出されています。精製方法として最も適していると思われるのはPhenyl-トヨパール650Cの場合で、sIL-6Rは1.2M硫安で完全に吸着し、0M硫安溶出で狭い範囲に溶出しています。

そこで次に、このキット中のPhenyl-トヨパール650Cを使ってさらに詳しくその溶出条件を検討しました。図-2のように今度は0.6M硫安で吸着させ、0.4M、0.2M、0M硫安を含むリン酸緩衝液で溶出させたところ、sIL-6Rは0.4M硫安で溶出しました。また各分画の280nmの紫外吸収の測定結果から、試料中のほとんどの280nmの吸収物質はカラムに吸着せずに溶出され、目的物質と分離されています。この非吸着画分には、培養液に多く含まれているアミノ酸などの低分子化合物などが含まれていると思われます。また培養液に通常含まれているフェノールレッドの溶出を560nmの可視吸収で検出したところ、図-2に示すように0M硫安の画分に溶出しており、sIL-6Rと完全に分離できていることが分かります。

表 -1 に Phenyl- トヨパール 650C を使った精製についてまとめています。目的タンパクである sIL-6R の回収率は 74 % で、精製度は約 7 倍に上昇しています。

このように、本格的な HPLC システムを使わなくてもトヨパールスターターキットを使って簡単に目的物質の分離に最適な充填剤の選択（スクリーニング）と分離条件の検討ができます。そしてこの後にトヨパールパックやその他の分取用 HPLC カラムを用いてより詳細な分離条件を検討することで、目的物質の精製方法の検討に費やす時間とコストを低減することができます。

参考文献 Purification and Characterization of Soluble Human IL-6 Receptor Expressed in CHO Cells, K. Yasukawa, T. Saito, T. Fukunaga, Y. Sekimori, Y. Koishihara, H. Fukui, Y. Ohsugi, T. Matsuda, H. Yawata, T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto, J. Biochem., 108, 673 (1990)

実験条件

図-1

培養液遠心上清

↓ 硫安溶液添加（最終濃度 1.2 M）

↓ 遠心して沈澱を除去

試料（5 ml）

↓ 3 種類のカラムに負荷

↓ 洗浄 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 + 1.2 M 硫安（pH 7.0）（5 ml X 4）

↓ 溶出 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 + 0.6 M 硫安（pH 7.0）（5 ml X 2）

↓ 溶出 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）（5 ml X 2）

↓ 溶出 20 % エタノール（5 ml X 2）

各 5 ml フラクション

図-2

培養液遠心上清

↓ 硫安溶液添加（最終濃度 0.6 M）

↓ 遠心して沈澱を除去

試料（5 ml）

↓ Phenyl- トヨパール 650C カラムに負荷

↓ 洗浄 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 + 0.6 M 硫安（pH 7.0）（5 ml X 4）

↓ 溶出 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 + 0.4 M 硫安（pH 7.0）（5 ml X 4）

↓ 溶出 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 + 0.2 M 硫安（pH 7.0）（5 ml X 4）

↓ 溶出 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）（5 ml X 4）

各 5 ml フラクション

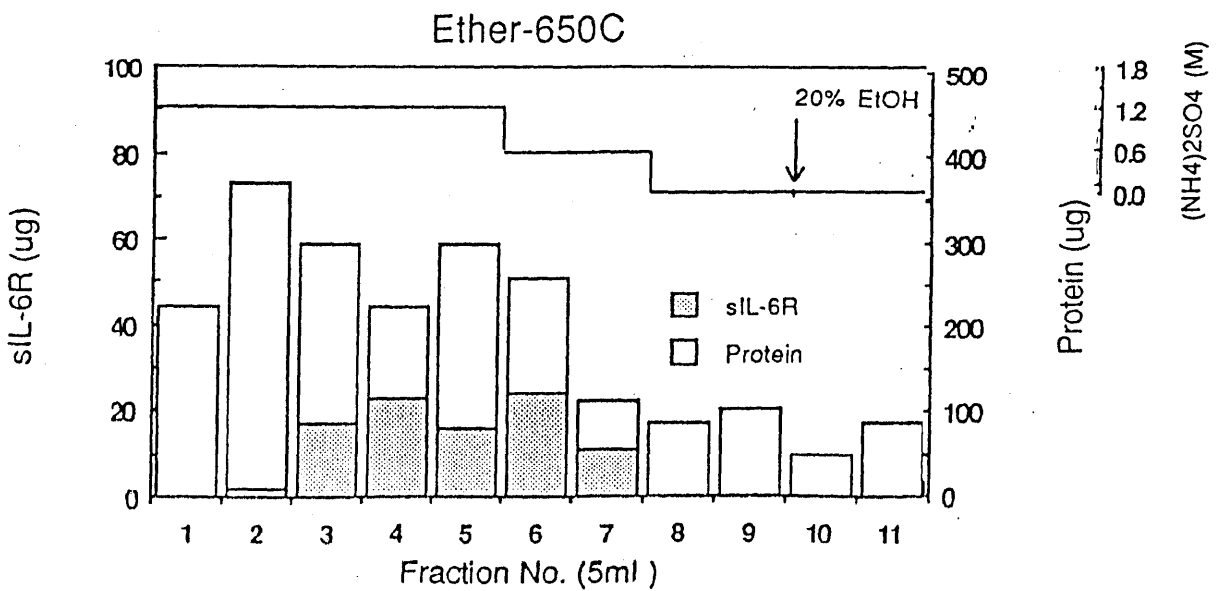
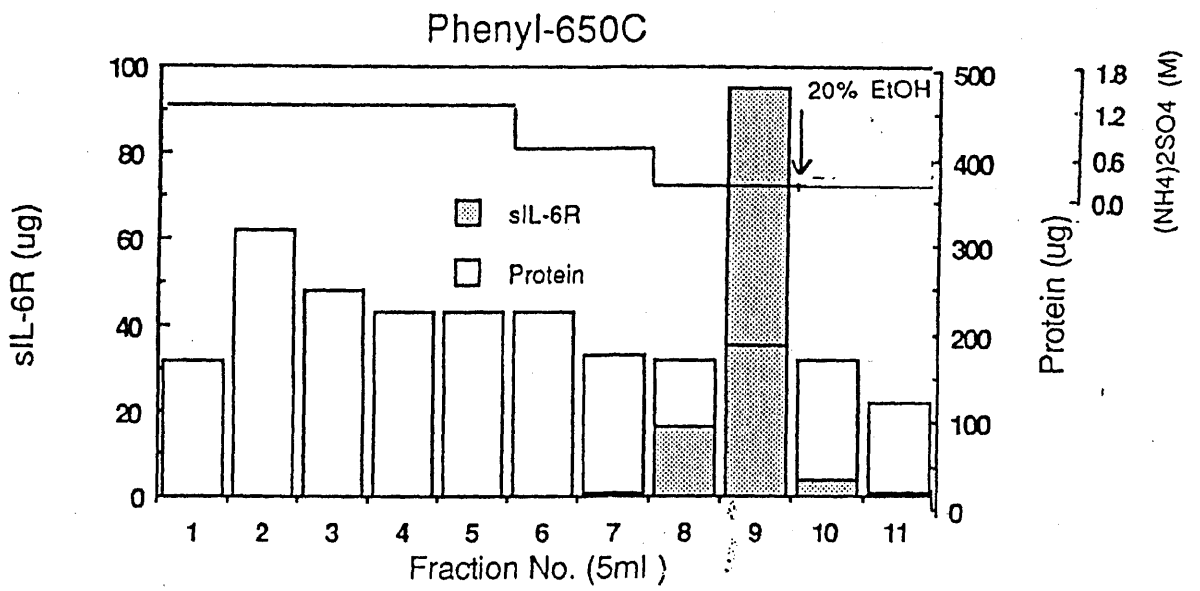
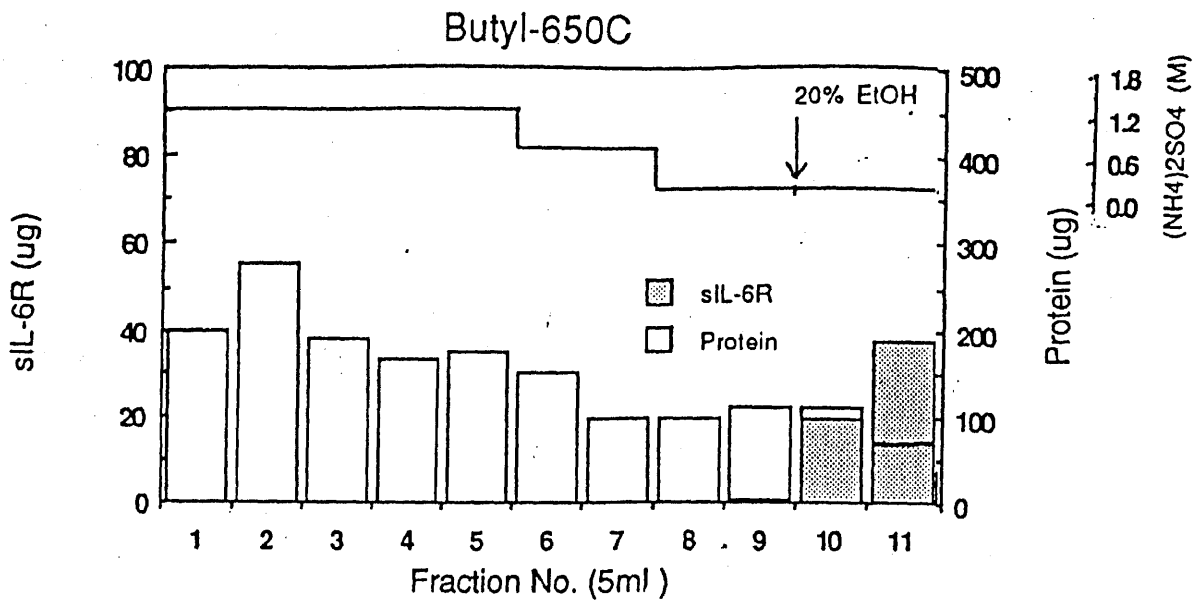


図 -1 トヨパールスターターキット IIC による充填剤のスクリーニング

Phenyl-650C

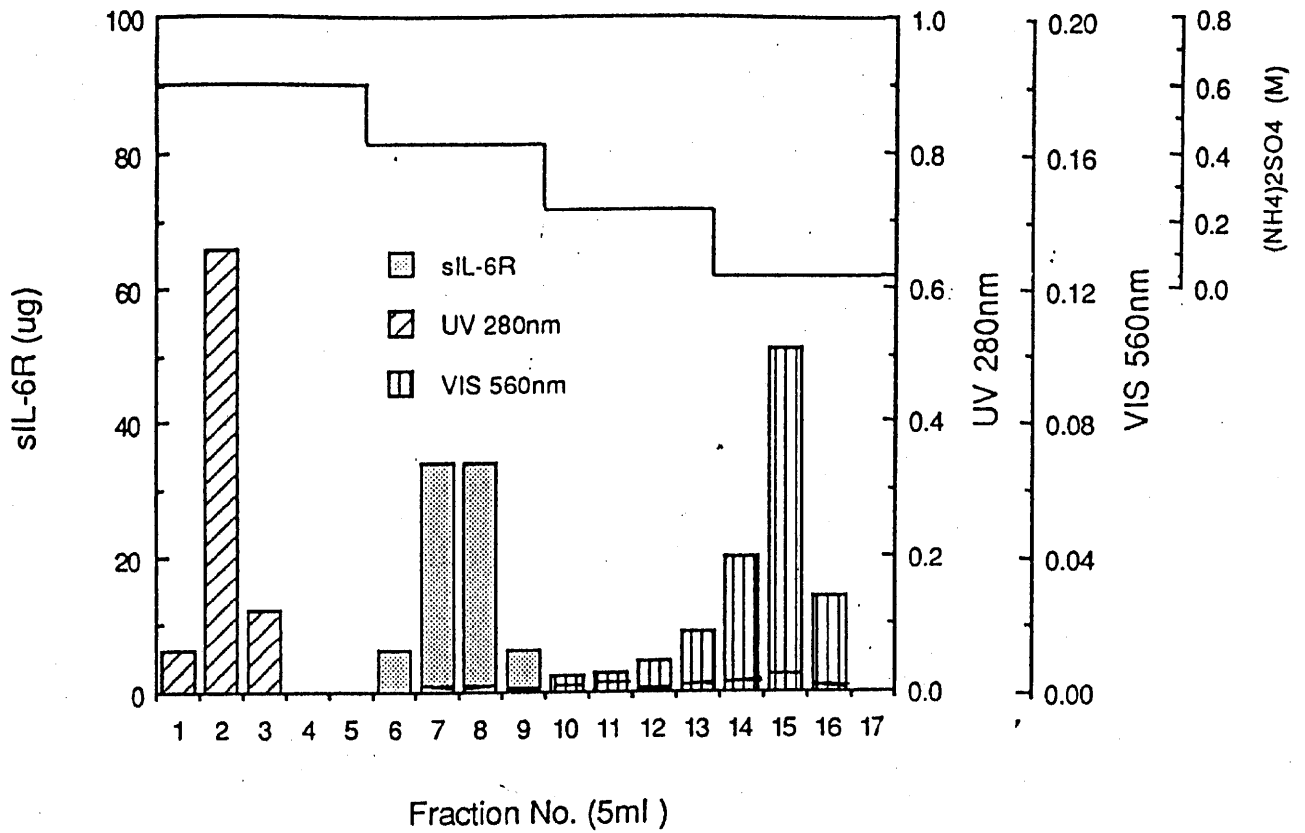


図 -2 Phenyl- トヨパール 650C (トヨパールスターターキット HIC) での sIL-6R の精製

表 -1 培養上清からの Phenyl- トヨパール 650C による sIL-6R の精製

	容量 (ml)	UV 280 nm (Absorbance X Vol)	Protein* (ug)	sIL-6R** (ug)	Purity (ug/ug)	Purification
培養上清	2.5	6.88	560	54	0.096	1
Phenyl-650C	10.0	0.05	61	40	0.66	6.9

* 定量は色素を用いた Bradford らの方法による

** 定量は EIA 法による

Phenyl- トヨパール 650C の活性画分は図 -2 の Fraction No. 7, 8 をまとめたもの