

疎水性クロマトグラフィーにおけるアミノ酸の溶出挙動 —アミノ酸類の効果的除去—

疎水性クロマトグラフィー (HIC) は、試料と充填剤の疎水的相互作用により分離される分離モードであり、特にタンパク質の分離に利用されています。また溶離液には高濃度の塩溶液を使用するので、タンパク質を安定化する働きがあり、酵素などを失活させずに分離することができます。また HIC では糖類や核酸類などの親水性物質がほとんど吸着されないため、タンパク質精製の初期段階で前処理としても効果を発揮します。特に細胞培養液や細胞破砕物の硫酸成分物などの分離に適しています。一方イオン交換体も同様な目的に使用されますが、試料中に含まれるイオン性低分子は、タンパク質と同様にカラムに吸着する恐れがあります。ここでは、イオン性があり、タンパク質の構成成分でもあるアミノ酸の溶出挙動をTSKgel Phenyl-5PW および TSKgel Ether-5PW を用いた HIC により調べました。

表に示したように、タンパク質が吸着できる条件 (1.5 M 硫酸を含む溶液中) でも、ほとんどのアミノ酸がカラム容積 (約 3.3 ml) 程度で溶出し、カラムへの吸着が非常に弱いことがわかりました。したがって、イオン交換体などではタンパク質と同様に吸着されるアミノ酸でも、HIC を用いれば簡単に除去できることがわかります。すなわち

細胞培養液などアミノ酸が含まれる試料の前処理として適していることがわかります。同様な現象は、トヨパール (トヨパールニュース No. 62) でも既に報告されており、改めて HIC の有用性が確認できました。

疎水性クロマトグラフィーにおける各種アミノ酸の溶出挙動

アミノ酸	Elution time (min)			
	Phenyl-5PW		Ether-5PW	
	BufferA	BufferB	BufferA	BufferB
グリシン	8.26	8.46	8.27	8.65
アラニン	8.27	8.50	8.28	8.67
バリン	8.31	8.61	8.32	8.79
ロイシン	8.41	8.86	8.41	9.06
イソロイシン	8.36	8.78	8.38	8.97
セリン	8.25	8.45	8.26	8.64
トレオニン	8.27	8.49	8.28	8.68
アスパラギン酸	8.19	8.46	8.20	8.64
グルタミン酸	8.19	8.34	8.28	8.49
アスパラギン	8.27	8.46	8.26	8.64
グルタミン	8.27	8.53	8.29	8.69
リジン	8.21	8.27	8.26	8.42
アルギニン	8.29	8.43	8.27	8.60
システイン	8.35	8.59	8.41	8.88
メチオニン	8.41	8.82	8.41	9.00
フェニルアラニン	8.76	9.50	8.82	9.61
チロシン	8.73	9.28	8.77	9.52
トリプトファン	10.44	12.70	10.54	12.83
ヒスチジン	8.31	8.54	8.32	8.74
プロリン	8.31	8.54	8.27	8.71
ブランク (水)	8.08*	8.56	8.26*	8.72

*: マイナスピーク

分析条件

カラム ; TSKgel Phenyl-5PW, TSKgel Ether-5PW (7.5mmI.D. × 7.5cm)

溶離液 ; BufferA: 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0)

BufferB: 1.5 M 硫酸アンモニウム + 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0)

流速 ; 0.3 ml/min 温度 ; 25°C 検出 ; UV (210nm) 試料 ; 10 μl (100 μg/ml)