

## ペプチドの効果的精製法

## —SP-トヨパール550CとODS-80Tsの組み合わせ—

ペプチドの分離方法としては、ODSを用いた逆相クロマトグラフィーが一般的ですが、遺伝子組み換え体など大腸菌や培養細胞上清などの粗試料からペプチドを精製する場合は、2段階またはそれ以上のステップが必要となります。その場合多用されているのがSP-タイプを用いた陽イオン交換体による前処理・分画粗精製と、それに続くODSカラムを用いた逆相クロマトグラフィーによる精密分離です。この2種類の分離モードを繰り返して使用したり、あるいはさらに他の分離モード（ゲル濾過クロマトグラフィーやアフィニティークロマトグラフィーなど）を組み合わせてペプチドを高純度に精製することができます。ここでは、陽イオン交換体として、試料処理量が大きく、かつ保持力の強い陽イオン交換体の、SP-トヨパール550C、逆相クロマトグラフィーとしてTSKgel ODS-80Tsを用いてペプチドを分画した例を報告します。

表-1および表-2に分子量の異なる各種ペプチドを、SP-トヨパール550C（トヨパールスターターキットHIC用カラム；5ml）を用いたステップグラジエントで分画した際のペプチドの回収率を示します。表-1の酢酸バッファー系では、全てのペプチドが十分カラムに吸着され、0.1Mの塩、または0.25Mの塩および有機溶媒を含む溶離液で分離分画されています。また吸着の強さは、ペプチドの分子量に依存した傾向がみられますが、ペプチドの疎水度も吸着へ寄与しているものと考えられます。ペプチドのカラムからの回収率はほぼ定量的でした。一方揮発性溶液として溶出に使用されるアンモニア系溶離液を使用した場合、ペプチドの溶出力が弱いため、吸着の強い試料（グルカゴン、アンジオテンシノーゲン、PZ-P-L-G-P-D-Rなど）には溶出液に、さらに有機溶媒などの添加が必要と思われます。尚、インシュリンのSP-トヨパール550Cへの動的吸着量は80mg/mlでした。

次に表-1の条件で分画したペプチドをTSKgel ODS-80Tsを用いて逆相クロマトグラフィーにより分離しました（図-1）。図よりSP-トヨパール550Cの各画分のペプチドは、それぞれ別の位置に溶出し、同一画分内のペプチドも完全分離されていることがわかります。

以上のようにペプチドの分離精製に際して、初期粗精製に試料処理量の大きいSP-トヨパール550Cを用いてペプチドを粗分画し、次にTSKgel ODS-80Tsを用いた逆相クロマトグラフィーによるHPLCを用いることで効果的にペプチドを精製することができます。特に培養上清などからの処理では、上清中のpH指示薬（フェノールレッドなど）も簡単にSP-トヨパール550Cを用いれば簡単に除去できますし、アルカリ洗浄等によるCIPも比較的容易であり、応用範囲は広いと考えられます。（pH指示薬の除去に関しては、詳細はトヨパールニュースNo. 62をご参照ください）

表-1 SP-トヨパール550Cを用いたペプチドの分画および回収率（1）

溶離液	溶出ペプチド	回収率 (%)
20mM酢酸 (pH4.7)	-	-
20mM酢酸+	H-Y-G-G-F-OH (MW:442)	96
0.1M硫酸ナトリウム (pH4.7)	Leu-Enkephalin (MW:556)	88
20mM酢酸+	Leu-Enkephalin (MW:556)	6
0.25M硫酸ナトリウム+	Angiotensinogen (MW:1759)	84
40%アセトニトリル (pH5.3)	Insulin (MW:5808)	83
	Glucagon (MW:3485)	74
	PZ-P-L-G-P-D-R (MW:777)	87

試料は各50  $\mu$ g (Leu-Enkephalinのみ  
100  $\mu$ g)を600  $\mu$ l 負荷した。  
溶出画分(10ml)を集めた。

表-2 SP-トヨパール550Cを用いたペプチドの分画および回収率（2）

溶離液	溶出ペプチド	回収率 (%)
水	H-Y-G-G-F-OH (MW:442)	9
1M酢酸アンモニウム	H-Y-G-G-F-OH (MW:442)	90
	Leu-Enkephalin (MW:556)	117
	Insulin (MW:5808)	52
	Glucagon (MW:3485)	39
2Mアンモニア	Angiotensinogen (MW:1759)	60
	PZ-P-L-G-P-D-R (MW:777)	-

表-1、表-2の回収率は、HPLCにより求めた。

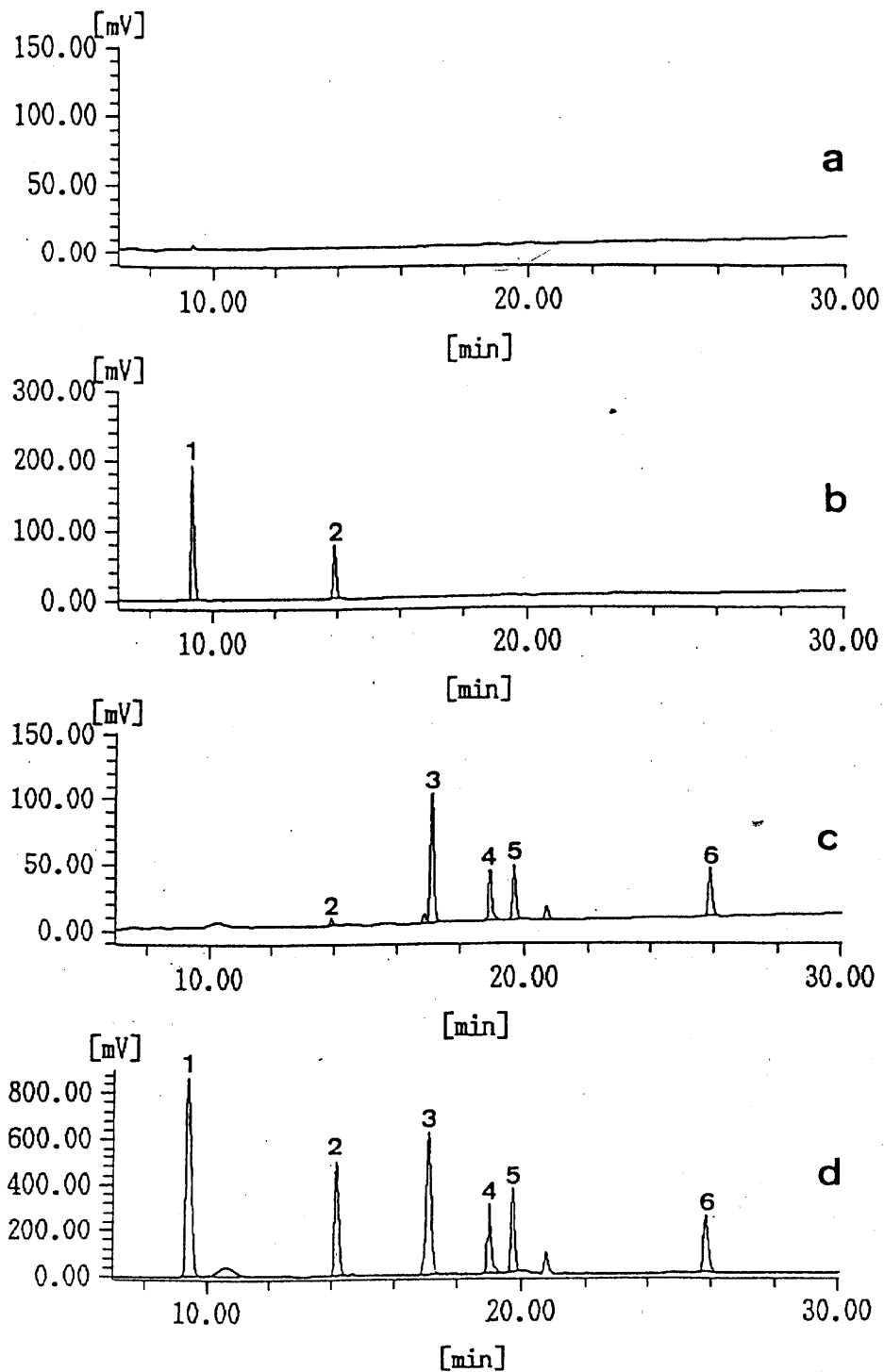


図-1 ペプチド（イオン交換体溶出画分）のTSKgel ODS-80Ts を用いた逆相クロマトグラフィーによる分離

カラム；TSKgel ODS-80Ts

溶離液；A: 10% アセトニトリル in 0.1% TFA B: アセトニトリル in 0.1% TFA

A→B リニアグラジエント（30分）

流速；1.0 ml/min 温度；40℃ 検出；UV(220 nm)

試料；SP-トヨパール550C溶出画分 a. 20 mM 酢酸 (pH 4.7) 画分

b. 20 mM 酢酸 (pH 4.7)+0.1 M 硫酸ナトリウム画分

c. 20 mM 酢酸 (pH 5.3)+0.25 M 硫酸ナトリウム+40% アセトニトリル画分 d. 標準試料

1. H-Y-G-G-F-OH 2. Leu-Enkephalin 3. Angiotensinogen 4. Insulin 5. Glucagon

6. PZ-P-L-G-P-D-R (10 μl, 70-140 μg/ml each)