

# クロマトグラフ用イオン交換樹脂の進歩

橋本 勉\*

## 1. はじめに

タンパク質のイオン交換クロマトグラフィーは、1950年代にセルロースイオン交換体が開発されて以来、タンパク質、酵素、核酸等の生体物質の分離、精製手段として、広く使用されてきた。そして1970年代後半より、その高性能化が検討され始め<sup>(1-5)</sup>、シリカ又は、親水性樹脂をベースとした多孔性のイオン交換体が開発されてきた。この多孔性のイオン交換体は、単位質量あたりの吸着面積が大きいため試料負荷量も多く、現在、タンパク質の分離、分取手段として頻繁に使用されている。しかし、シリカをベースとしたイオン交換体は化学的に不安定なため、洗浄、再生にアルカリが使用不可能であり、現在では親水性樹脂をベー

スとしたイオン交換体を使用するケースがほとんどである。ところが、最近、Ungerらは、粒子径 $1.5\mu\text{m}$ 程度の非多孔性シリカゲルを用いたタンパク質のクロマトグラフィーを検討し<sup>(6)</sup>、非多孔性充填剤の有効性を見出した。

本稿では、当社で最近開発された親水性樹脂をベースとした非多孔性イオン交換体 (TSKgel DEAE-NPR, TSKgel SP-NPR) と、従来の多孔性イオン交換体 (TSKgel DEAE-5PW, TSKgel SP-5PW) の比較について述べる。

## 2. 基本的性質

### (1) イオン交換容量とタンパク質結合量

TSKgel DEAE-NPR, およびTSKgel DEAE-

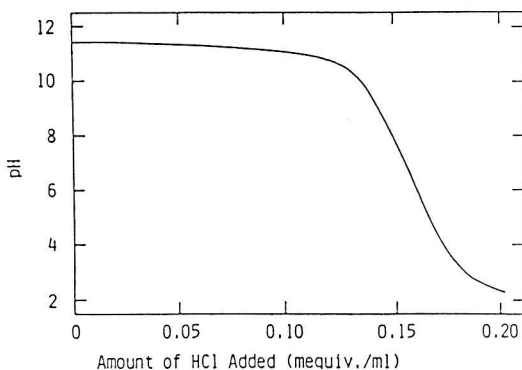


図1 Titration curve of TSKgel DEAE-NPR.

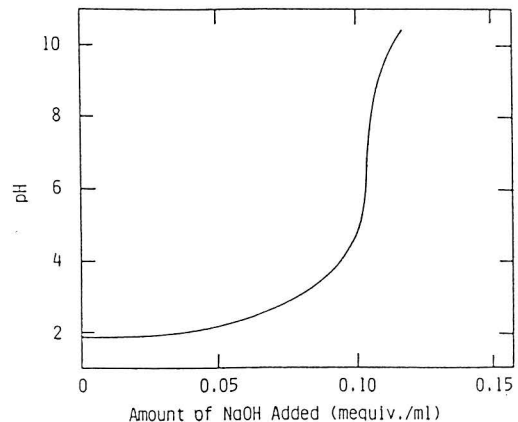


図2 Titration curve of TSKgel SP-NPR.

\* ㊦107 東京都港区赤坂1-7-7 東ソー(株) 研究本部長

5 PWは親水性樹脂にジエチルアミノエチル基を導入したアニオン交換体で、TSKgel SP-NPR、およびTSKgel SP-5PWはスルホプロピル基を導入したカチオン交換体である。

図-1, 2 にTSKgel DEAE-NPRおよびTSKgel SP-NPR の滴定曲線を示す。これらのイオン交換容量は、膨潤ゲル1mlあたりそれぞれ、約0.15および0.10meqに調節されている。TSKgel DEAE-5PW, SP-5PWも同様の滴定曲線、イオン交換容量を有する。

タンパク質結合容量は、TSKgel DEAE-NPR

はウシ血清アルブミン、TSKgel SP-NPRはウシヘモグロビンを用いてそれぞれ測定した結果、ともに約5mg/mlであった。一方TSKgel DEAE-5PW, SP-5PWは、約30~40mg/mlで、この差は単位質量あたりの表面積の差によるものと考えられている。

## (2) 標準タンパク質の分離

図-3 および図-4 にTSKgel DEAE-NPRとTSKgel DEAE-5PW, TSKgel SP-NPRとTSKgel SP-5PWでのタンパク質の分離を、それぞれの標準分離条件で行なった場合の比較を示

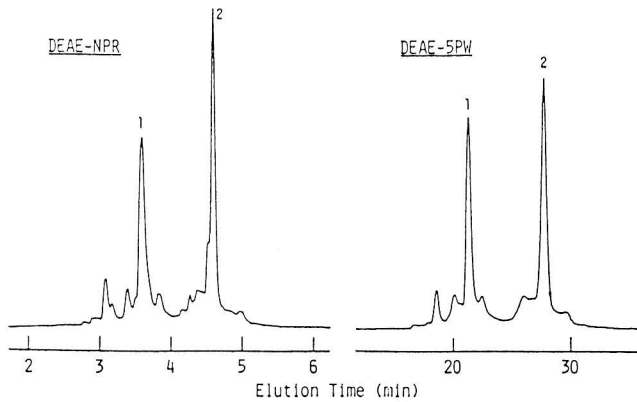


図3 Comparison of TSKgel DEAE-NPR and DEAE-5PW.

Column: TSKgel DEAE-NPR (35 x 4.6 mm I.D.) and DEAE-5PW (75 x 7.5 mm I.D.)  
 Sample: a mixture of ovalbumin(1) and trypsin inhibitor(2)  
 Elution: 10 or 60 min linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)  
 Flow rate: 1.5 or 1.0 ml/min Temperature: 25°C Detection: UV (280 nm)

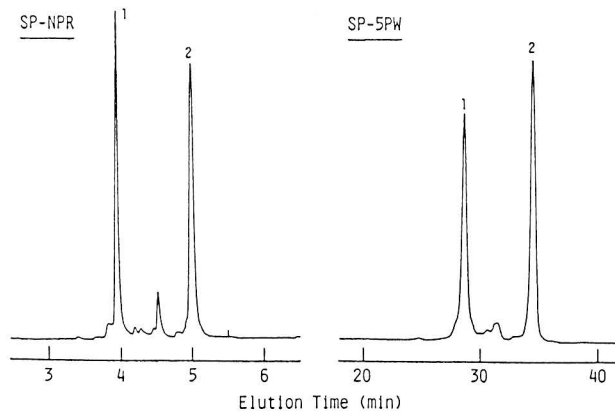


図4 Comparison of TSKgel SP-NPR and SP-5PW.

Column: TSKgel SP-NPR (35 x 4.6 mm I.D.) and SP-5PW (75 x 7.5 mm I.D.)  
 Sample: a mixture of  $\alpha$ -chymotrypsinogen A (1) and ribonuclease (2)  
 Elution: 10 or 60 min linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in 20 mM MES buffer (pH 6.0)  
 (2[N-morpholino]ethanesulfonic acid - NaOH)  
 Flow rate: 1.5 or 1.0 ml/min Temperature: 25°C Detection: UV (280 nm)

す。TSKgel DEAE-NPR, およびTSKgel SP-NPRの方が, 多孔性イオン交換体であるTSKgel DEAE-5PWやTSKgel SP-5PWよりも非常に短い分離時間(約6分の1)で高い分離能が得られている。

非多孔性充填剤にはポアがないため, 試料は充填剤外部表面だけでの相互作用により分離され, このため試料ピークの広がりを抑えることができ高分離が得られると考えられる。

### (3) タンパク質回収率

表-1および表-2にTSKgel DEAE-NPRおよびTSKgel SP-NPRのタンパク質回収率を, また表-3および表-4にTSKgel DEAE-5PW, TSKgel SP-5PWのタンパク質の回収率を示す。すべてのタンパク質がほぼ90%以上の高い回収率で得られている。

表1 Recovery of Proteins from TSKgel DEAE-NPR Column.

Protein	Recovery (%)
Thyroglobulin	100
Ferritin	99
γ-Globulin	104
Bovine serum albumin	102
Hemoglobin	91
Ovalbumin	103
β-Lactoglobulin	101
Trypsin inhibitor	98

Each protein of 5 μg was separated on TSKgel DEAE-NPR column (35 x 4.6 mm I.D.) with a 10 min linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) at a flow rate of 1.5 ml/min and detected at 280 nm.

表2 Recovery of Proteins from TSKgel SP-NPR Column.

Protein	Recovery (%)
Hemoglobin	88
α-Chymotrypsinogen A	95
α-Chymotrypsin	100
Trypsinogen	87
Lysozyme	96
Ribonuclease	95
Cytochrome C	93

Each protein of 5 μg was separated on TSKgel SP-NPR column (35 x 4.6 mm I.D.) with a 10 min linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 1.5 ml/min and detected at 280 nm.

表3 Recovery of Proteins from TSKgel DEAE-5PW.

Protein	Recovery (%)
Thyroglobulin	98
Ferritin	99
γ-Globulin	100
Bovine serum albumin	102
Hemoglobin	96
Ovalbumin	104
β-Lactoglobulin	103
Trypsin inhibitor	104
Myoglobin	103

Each protein of 0.4 mg was applied to DEAE-5PW column (75 x 7.5 mm I.D.) in 0.02 M tris-HCl buffer (pH 8.5) and the adsorbed protein was desorbed in 0.02 M tris-HCl buffer (pH 8.5) containing 0.5 M NaCl.

表4 Recovery of Proteins from TSKgel SP-5PW.

Protein	Recovery (%)
γ-Globulin	98
Hemoglobin	96
Trypsinogen	101
α-Chymotrypsinogen A	98
α-Chymotrypsin	104
Myoglobin	88
Lysozyme	95
Ribonuclease A	100
Cytochrome C	103

Each protein of 0.4 mg was applied to SP-5PW column (75 x 7.5 mm I.D.) in 0.02 M phosphate buffer (pH 6.0) and the adsorbed protein was desorbed in 0.02 M phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.5 M NaCl.

### (4) 試料負荷量

数種の精製タンパク質を用いて, 最大試料負荷量の検討を行なった。図-5にTSKgel DEAE-NPRにおける卵アルブミンとトリプシンインヒビター (soybean)の分離能への試料負荷量の影響を示す。また, 図-6にTSKgel DEAE-5PWでの結果を示す。図-5および図-6よりDEAE-NPRでは10 μg (各5 μg), DEAE-5PWでは1 (各0.5mg) まででは一定の分離能が得られるが, それ以上では分離能は徐々に低下した。図-5および図-6は, 精製された試料についての結果を示したが, 次に不純物の多い粗製試料について検討した。試料には市販リボキシダーゼを用いた。

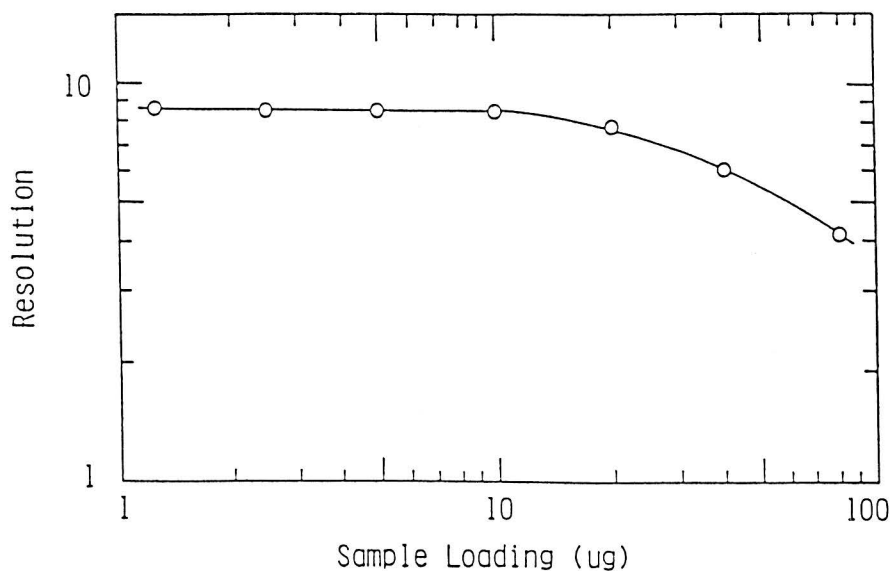


图5 蛋白质在 TSKgel DEAE-NPR 上分离时分辨率对样品加载量的依赖性。

在相同的条件下，用等量的卵白蛋白和胰凝乳蛋白酶抑制剂混合物进行分离。样品加载量在 1.25 到 80  $\mu\text{g}$  之间变化。

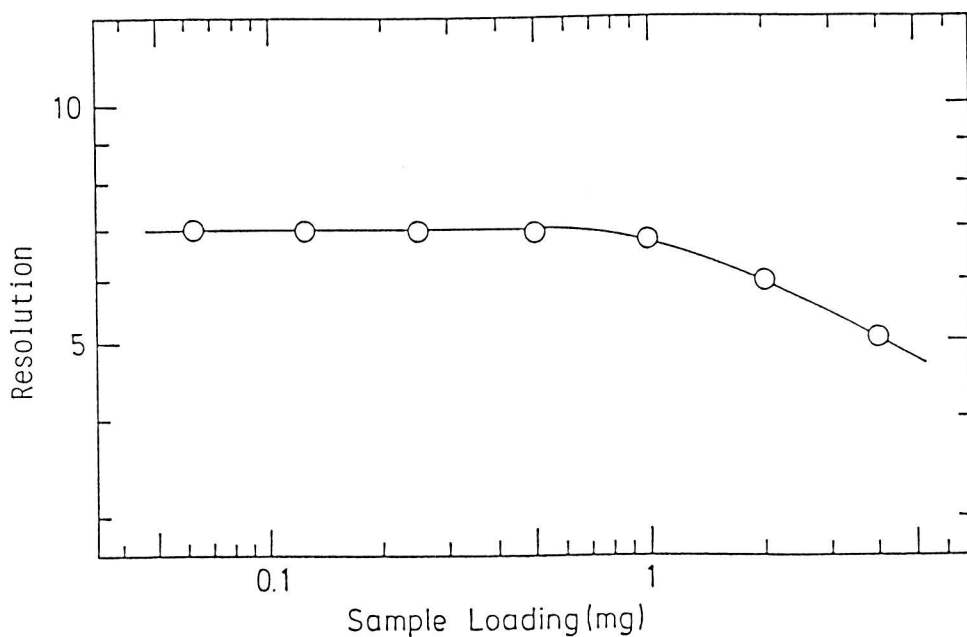


图6 蛋白质在 TSKgel DEAE-5PW 上分离时分辨率对样品加载量的依赖性。

在相同的条件下，用等量的卵白蛋白和胰凝乳蛋白酶抑制剂混合物进行分离。样品加载量在 0.06 到 4 mg 之间变化。

図-7に試料量50 $\mu$ gと200 $\mu$ gのクロマトグラムを示す。図-7より試料量200 $\mu$ gまでは、クロマトグラムに大きな違いはなく良好に分離されたが、200 $\mu$ g以上では分離能は低下した。

以上、精製タンパク質および粗製タンパク質の最大試料負荷量について検討したが、非多孔性充填剤は表面積が少ないため、従来の多孔性充填剤と比較すると約100分の1であった。

### 3. 応用例

基本的性質の項で述べたように、非多孔性充填剤 (TSKgel DEAE-NPR, SP-NPR) は微量タンパク質の分離精製,あるいは純度チェックなどが非常に短時間で行なえ、一方、多孔性充填剤 (TSKgel DEAE-5PW, SP-5PW) は、分取を目的とした精製が行なえる。

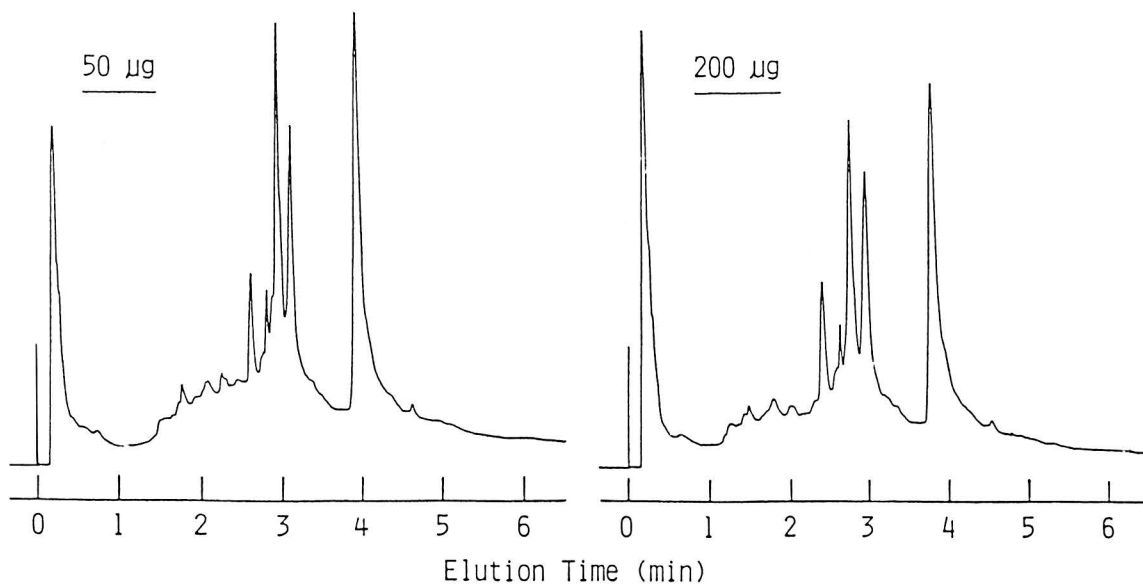


図7 Separation of a crude sample of lipoxidase of 50 $\mu$ g and 200 $\mu$ g by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR.

Column: TSKgel DEAE-NPR (35 x 4.6 mm I.D.)

Sample: a commercial crude sample of lipoxidase (50 or 200 $\mu$ g)

Elution: 10 min linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)

Flow rate: 1.5 ml/min Temperature: 25°C Detection: UV (280 nm)

3-1, TSKgel DEAE-NPR, SP-NPR  
による応用例

(1) TSKgel DEAE-NPによるタンパク質の  
純度チェック

図-8に起源の異なる二種のプロテインAの  
TSKgel DEAE-NPRによるクロマトグラムを示  
す。Repligen社製の遺伝子組み換え大腸菌産生  
のプロテインAは、SDS-ポリアクリルアミドゲ  
ル電気泳動で、また生化学工業社製の黄色ブドウ

球菌由来のプロテインAは、ディスク電気泳動で  
それぞれシングルバンドしか確認されませんが、  
図-8からわかるようにいずれの試料も複数のピー  
クが認められる。分析時間も約5分と非常に短い  
ことより、TSKgel DEAE-NPRおよびSP-NPR  
によるタンパク質の分離は、電気泳動法に代わる  
純度チェックや、製品の品質管理の手段として有  
用であると考えられる。

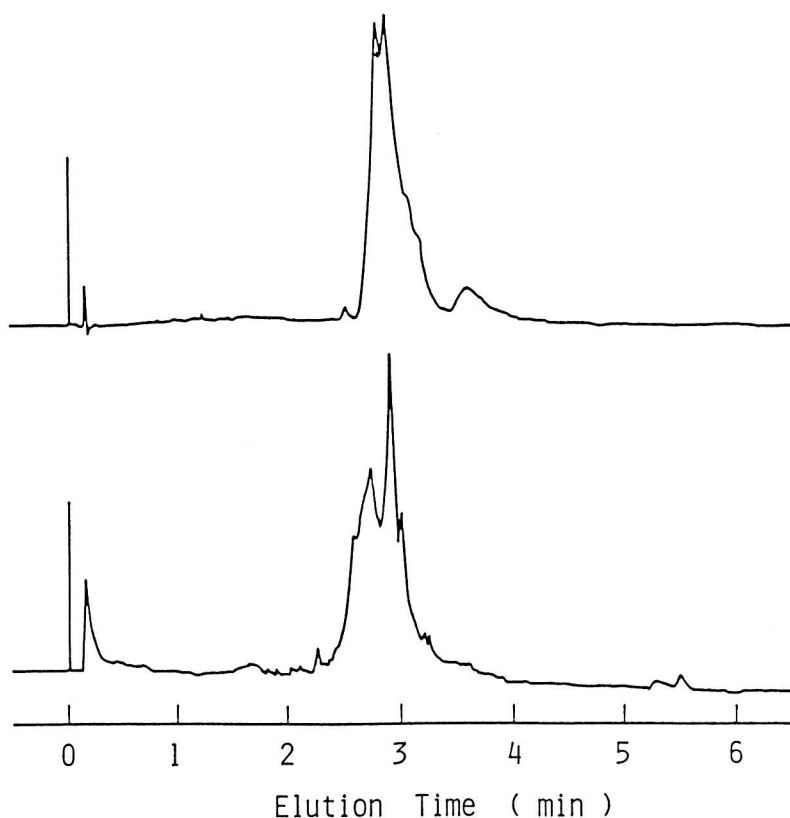


図8 Separation of protein A from recombinant E.coli product (upper) and from Staphylococcus aureus (lower) by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR.

Conditions as in Fig. 3.

(2) TSKgel SP-NPRによる

グリコヘモグロビンの分離

図-9にTSKgel SP-NPRによるヒトヘモグロビンスタンダードの分離のクロマトグラムを示す。グリコヘモグロビンの測定は、糖尿病のスクリーニングテストとして、また糖尿病患者の長期

血糖コントロールの指標として注目され、すでに臨床検査の項目に上がっている。図に示すように、約1.2分にグリコヘモグロビン (Hb A1c)と思われるピークが溶出し、約2.4分に溶出するヘモグロビン (Hb Ao)のピークと良好に分離されている。このように臨床検査への応用も可能である。

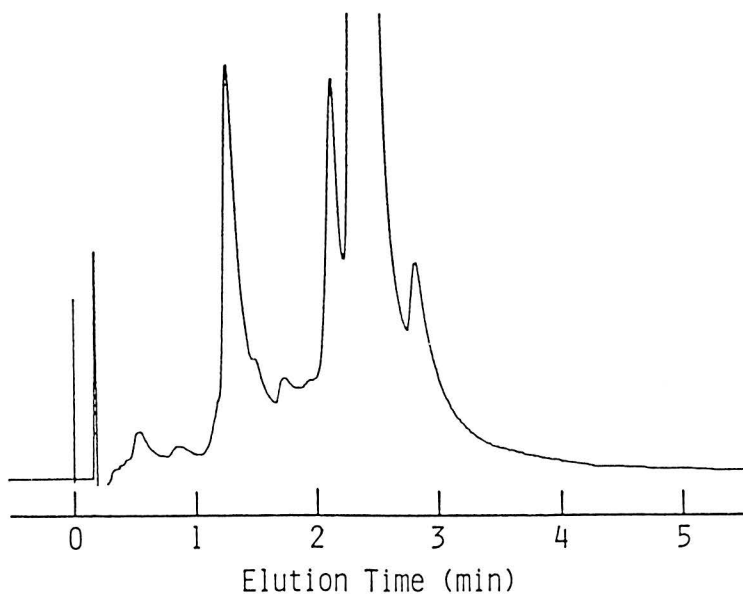


図9 Separation of human hemoglobin standard by ion-exchange chromatography on TSKgel SP-NPR.

Column: TSKgel SP-NPR (35 x 4.6 mm I.D.)

Sample: human hemoglobin standard

Elution: 3 min linear gradient of NaCl from 0.05 to 0.2 M in 20 mM bis-Tris-HCl buffer (pH 6.0)

Flow rate: 1.5 ml/min      Temperature: 25°C      Detection: UV (415 nm)

(3) DNAフラグメントの分離

図-10に  $\phi$ X-174 RF DNAのHaeIII消化物のクロマトグラムを示す。72~310 塩基対 (base pair : bp) の分離は従来の多孔性充填剤とほとんど同じだが、603 ~ 1,353 bp の大きいフラグメントについては、非多孔性充填剤であるTSKgel DEAE-NPRの方が良い分離を示し、分析時間も12分と非常に短いことがわかる。

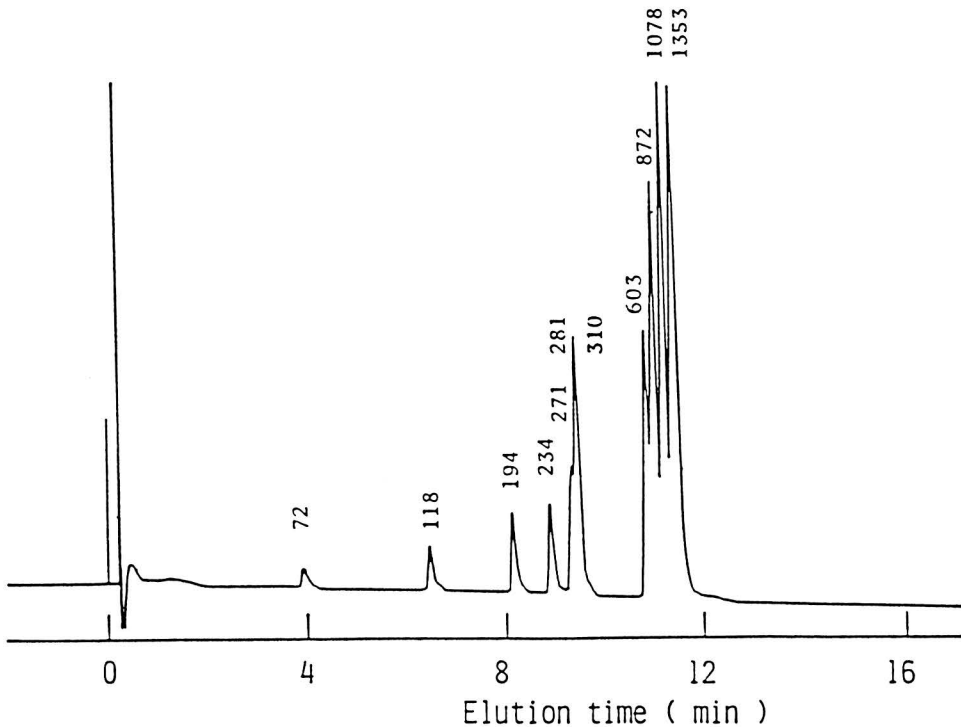


図10 Separation of  $\phi$ X-174 RF DNA-Hae III digest by ion-exchange chromatography on TSKgel DEAE-NPR.

Column : TSKgel DEAE-NPR ( 35 x 4.6 mmI.D. )  
Sample :  $\phi$ X-174 RF DNA-Hae III digest ( 1.25  $\mu$ g )  
Elution : 50 min linear gradient of NaCl from zero to 0.5 M  
in 20 mM Tris-HCl (pH 9)  
Flow rate : 1.0 ml/min      Temperature : 25°C  
Detection : UV absorbance at 260 nm



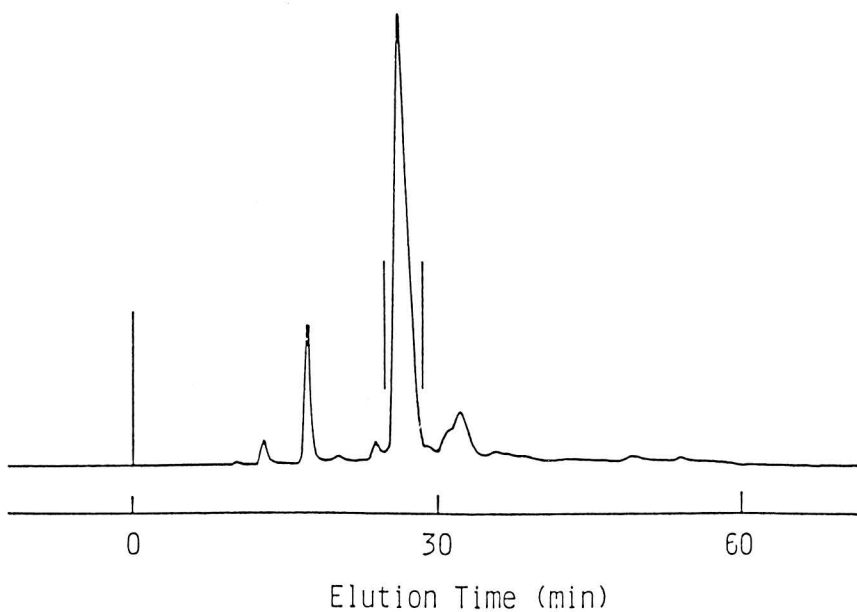


图11 Chromatogram of crude superoxide dismutase (300mg) obtained on TSKfes CEAE-5PW 200×55mm I.D. column with a 180min linear gradient of NaCl from 0 to 0.3M in 0.02M Tris-HCl buffer (pH7.5) at a flow-rate of 30ml/min.

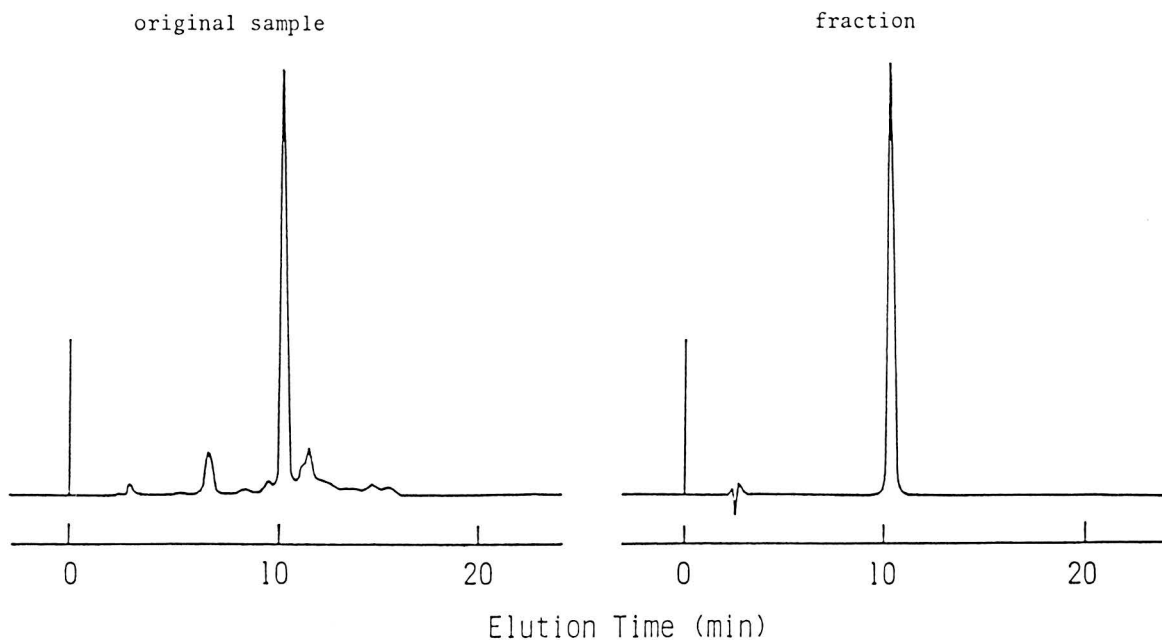


图12 Analytical ion-exchange chromatograms of original sample and superoxide dismutase fraction on TSKgel DEAE-5PW 75×7.5mm I.D. column with a 30 min linear gradient of NaCl from 0 to 0.3M in 0.02M Tris-HCl buffer (pH7.5) at a flow-rate of 1ml/min.

### 3-2, TSKgel DEAE-5PWによる応用例

#### (1) TSKgel DEAE-5PWによるスーパー オキシドジスムターゼ (SOD) の精製

図-11にTSKgel DEAE-5PW分取カラム (200×55mmI.D.) を用いて、SODを分離したクロマトグラムを示す。図-11中のメインピークにSOD活性が認められ、二本の縦線間を分取した。フラクションは分析カラムで純度チェックをし、その結果を図-12に示す。図-12より、不純物のないSODが得られていることがわかる。また、電気泳動パターンは示さないが、電気泳動でも純度チェックした結果、一本のバンドしか認められなかった。

## 4. 終わりに

以上、最近開発された非多孔性充填剤と従来の多孔性充填剤の比較について簡単に述べたが、非多孔性充填剤では微量の試料を短時間でしかも高分離能で分離することが可能なため、分析時間のスピードが要求される臨床検査や、大量精製における生産過程の工程管理や純度チェックなどへの応用が期待される。

一方、多孔性充填剤では表面積が大きいことを利用し、大量精製や大量分取が可能であり、遺伝子組み換え技術や細胞融合技術などを利用したライフサイエンスが成熟し、それを応用した有用物質の大量生産と精製への応用が期待される。

## 引用文献

- 1) G. Vanecek and F. E. Regnier, Anal. Biochem., 109(1980)345.
- 2) Y. Kato, K. Komiya and T. Hashimoto, J. Chromatogr., 246(1982)13.
- 3) S. Gupta, E. Pfannkoch and F. E. Regnier, Anal. Biochem., 128(1983)196.

4) W. Kopaciewicz and F. E. Regnier, Anal. Biochem., 133(1983)251.

5) Y. Kato, K. Nakamura and T. Hashimoto, J. Chromatogr., 266(1983)385.

6) K. K. Unger, G. Gilge, J. N. Kinkel and M. T. W. Hearn, J. Chromatogr., 359(1986) 61.