LC-CD のタンパク質への応用*

1. はじめに

タンパク質がタンパク質であるための高次構造、つまり構成アミノ酸がどのような空間配置をとっているかはX線解析により幾種かのタンパク質では明らかにされている。そしてこの方向はさらに進み、新しいタンパク質の立体構造が数多く明らかにされていくものと思われる。CDはX線解析のように立体構造の全体を細部に渡って明らかにすることはできないが、分子の中に含まれる種々の残基やグループの状態を調べてその構造や立体環境を知る有力な手掛かりを提供してくれる。X線解析されたタンパク質が増えてくれば、CDとの関係もより明確になっていくと考えられる。そしてCDはX線解析と比べれば、ずっと簡便に行えるので、タンパク質の種々の機能を高次構造を通して理解するのに欠くことのできない方法である。さらにX線との決定的な違いは、溶液状態で測定するCDに対し、X線は固体状態で測定することである。タンパク質が生体内で、まるで海草やアメーバのように動的なものであることからして、固体状態の静的なものとしてのX線解析が果たして実際のタンパク質の挙動をどの程度まで推し量れるのか、議論の余地が残されている。

一方、タンパク質の分離分析のための優れた HPLC 用の充填剤が開発され、かなり実用化されてきた。そのタンパク質を分離する時、最も注意することとして、活性が落ちていないか、変化していないか、また、活性部位はどこに画分に含まれているかなどが、問題になってくる。これらの状態を反映するのは、タンパク質の高次構造にあるが、一般的に HPLC 用の検出器として使用されているUVでは、その高次構造の情報を得ることは難しい。そこで、タンパク質の光学活性検出器として、従来の LC-CD¹⁾ に改良を加えて、微量(5-100 µg)なタンパク質、ペプチドにも適用が可能になったので紹介する。

2. 従来の LC-CD の問題点と改良点

従来の HPLC 用の、たとえば、UVセルをセルユニ

ットに取付、CDに装着する安易な方法で行うと、光の利用率が低く、また、使用する溶出液によっては、その吸収の影響が重大である。

そこで、以下のような改良を行い、目的物質が、微量であったり、CD測定に障害を与えるような溶出液を使用した場合でも測定が可能になった。

フローセルを使用した時のCD測定には、次のことを考慮する必要がある。

- 1: 短波長ほど、光源のエネルギーが急速に落ちること
 - 2: 使用する緩衝液自身による光吸収の影響があること
- そこで、LC-CD セルについて、以下の工夫を施した。

1: 光エネルギー対策; CD装置の試料室における光束の口径は、8-10 mmφであるために、フローセルの口径を2 mmφ(ところで、あまり口径を大きくすると、石英板の締め付けによる歪みがCD測定に影響を及ぼしやすくなるし、また、セル容積をも大きくするので、クロマトグラフィーの立場から分離に影響をあたえる)とし、更に集光器(石英レンズ)などを装着することにより光束の全体を有効に利用できるようにした。

2: 緩衝液の光吸収対策; たとえば、一般的緩衝液の一つであるトリス-塩酸系の場合 220 nm 以下の吸収が、CD 測定を妨害する。そこで、フローセルの光路長を1 mmもしくは2 mmとし、220 nm 以下まで測定できるようにした。ただし、中紫外-可視領域は、CDの感度的に光路長が10mmのセルが必要であるので、この場合においては、フローセルを通常のUVセル(10mm)のものに交換して、測定できる。

セルの構造上で最も重要なポイントは、光路方向と水平方向に、石英を締め付け、押さえることである。垂直に押さえるようなセル構造にすると、歪みが生じ、CD測定に決定的な打撃を与えてしまう。

3. 全体のシステムと測定方法

CDに、2で述べたような改良を行った適当なフローセル装置を装着し、これに、HPLCの溶出液を直接流して、モニター(CDクロマトグラム)しながら、目的とする成分がセルの中に入った状態 HPLCでの送液を止め、CDスペクトルの測定を行った。全体のシステム構成を図1に示した。

4. 結果と考察

まず基礎的な検討として、蒸留水及び0.06% (w/v) ammonium d-10-camphorsulfonate (ACS) を満たした状態でCDスペクトルの測定を行った。その結果、前者では、CDベースラインの蛇行は波長700-185 nm間

* Application of LC-CD for Proteins.

図1 LC-CDシステム

図2 タンパク質混合物のゲルろ過クロマトグラフィー (GPC)

で、10 mdeg (SBW=1 nm) 以内であった。後者では、CD-ratio, $[\theta]_{192}/[\theta]_{290.5} = -2.05 \pm 0.03$ (標準値は -2.03) であり、CD値の波長依存性に問題はなかった²⁾。また、グラジエント溶出法によるベースライン (CDクロマトグラム: 波長 220 nm) の安定性においても問題はなか

った。

上記の条件で、タンパク質及びペプチドの代表的な分離モードであるゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、イオン交換クロマトグラフィー (IEC) 及び逆相クロマトグラフィー (RPC) を行ったが、都合よく測定できた。代表

例として、GFCの溶離図(CDクロマトグラム及びUVクロマトグラム)の一部を図2-①に示した³⁻⁶⁾。CDクロマトグラムでは、感度の高い波長 220 nm (さらにより短波長でも可能)においてモニターすることができた(最小検知感度: 0.12 μ g ミオグロビン [time const=4, S/N=2])。又、ピーク頂点での各ピークのCDスペクトルを図2-②を示したが、195 nm 以下においては、溶媒の影響で測定は困難であった。図2-③にミオグロビンを用いて、ストップドフロー法と対照(同一セルに0.005% ミオグロビン溶液を満したものの)のCDスペクトルを比較したが、同じようなパターンが得られている。

以上の結果より、タンパク質の二次構造解析も可能な検出器として、タンパク質及びペプチドの活性または、その活性部位に着目したタンパク質、ペプチドのHPLCに大きく貢献するものと期待される。

文 献

- 1) 和田明生, 高桑 堯, 金内美美子, 坂柳信之: 分析化学討論会, p. 7 (1986).
- 2) T. Takakuwa, T. Kondo, H. Meguro: *Analytical Sciences*, **1**, 215-218 (1985).
- 3) T. Takakuwa, Y. Kurosu, et al: *J. Liq. Chromatog.* (in press).
- 4) 黒須泰行, 高桑 堯ら: 第7回液体クロマトグラフィー討論会, p. 101 (1986).
- 5) 黒須泰行, 高桑 堯, 坂柳信之, 千田正昭: 第60回生化学, p. 739 (1987).
- 6) OE. カスティリオーニ, 高桑 堯, 黒須泰行ら: 第2回CD国際会議 (1987).
(日本分光 黒須泰行*, 高桑 堯)

* Yasuyuki KUROSU and Takashi TAKAKUWA, Japan Spectroscopic Co., Ltd (JASCO).