小山純一 中田興亜 森川良広*

High-performance liquid chromatographic
analysis and characterization of proteins

Junichi Koyama, Okitsugu Nakata, Yoshihiro Morikawa*

In order to estimate the molecular weights of proteins the analytical conditions of GPC and HPLC were investigated. Under presence of 0.2% SDS and 0.5M sodium phosphate buffer (pH 7.0), the plots of molecular weight *versus* retention time were linear in the range of 3000 to 150000 molecular weights. Furthermore, rough coformation of proteins were surmisable by analysis of changes in GPC chromatogram after denatured with 2-mercaptoethanol.

Retention times of small peptides on reversed-phase HPLC depend on their hydrophobicity. Molecular weights of peptides could be estimated by their retention times. This method is useful to estimate the molecular weights of small peptides and for pattern analysis of hydrolyzed peptides.

Proteins could be classified by analysis of their amino acids composition because they are characteristic for each proteins.

It is very effective for analysis of proteins in cosmetics and characterizing unknown proteins by combination of these methods.

1. 緒 言

近年、化粧品にもタンパク質が配合されることが多くみられるようになり、化粧品中のタンパク質を分析する機会も増えてきた。タンパク質の分析には分子量の測定、アミノ酸組成の分析がある。分子量の測定法としては電気泳動法が主流であるが、短時間で簡便に分析できる水系ゲル浸透クロマトグラフィー（水系 GPC）も多く用いられた。水系 GPC の欠点には、分子量 1 万以下のタンパク質は分析が難しいこと、水に不溶なタンパク質は分析できない点があげられる。このうち、水に不溶なタンパク質を水系 GPC で分析する方法として溶解液に可溶化剤を添加し、タンパク質を可溶化状態で分析する方法が報告されている¹⁻⁶⁾。

そこで水系 GPC を用い可溶化条件で、できるだけ低分子タンパク質まで分析できる条件の確立と、GPC 分析によってタンパク質の構造を推定する方法を検討した。

一方、GPC で分析できない低分子タンパク質（ペプチド）については、逆相系的高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いる方法が報告されており、構成アミノ酸からペプチドの溶出位置を予測する方法も報告されている^{7,8)}。Meek ら⁹⁾はペプチドの疎水度とクロマトグラムの保持時間が等しくなる条件を報告している。この条件ではペプチドの疎水度は Meek らの計算したアミノ酸個々の疎水度の和で表わされる。この方法を利用すればペプチドの溶出位置が予想できるだけではなく、アミノ酸組成分析と組み合わせれば分子量に関する情報も得られると考えられる。そこでペプチドを分析する HPLC 条件としては Meek らの計算したアミノ酸の疎水度が使える条件を検討した。さらにこれらの結果を応用し、GPC 分析、ペプチド分析、アミノ酸組成分析の手法を組み合わせ化粧品原料および製品中のタンパク質を分析す

Shiseido Toxicological and Analytical Research
Center Shiseido product Research Laboratory ;
1050 Nippa-cho Kouhoku-ku Yokohama-shi

(株)資生堂 安全性・分析センター

* (株)資生堂 製品研究所：横浜市港北区新羽町1050

ることを検討した。

2. 実験

2.1. GPC 分析

分離カラムは TSK-GEL G 3000SW (7.5×600mm; 東洋曹達製) を用いた。溶離液はラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を含むリン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いた。試料は 2% SDS 溶液を用い 0.1% の濃度に調製し、60°C で 1 時間加温したものを注入し、流速 0.5ml/min で送液し 280nm の UV 吸収をモニターした。タンパク質標準品は市販のものをを用いた。

2.2. HPLC 条件

分離カラムとして PARTISL-5 ODS-3 (4.6×250 mm; センシュア科学製) を用いた。溶離液は、a) 0.1% リン酸-0.1M NaClO₄ 液、b) 0.1% リン酸アセトニトリルを用い、b 液濃度を直線的に増す濃度勾配法を用いた。溶離液は 1.0~1.5ml/min で送液し 210nm の UV 吸収をモニターした。ペプチド標準品は市販のもの

Fig.-1 Plots of molecular weight *versus* retention times of proteins in 0.3M sodium phosphate buffer (pH 7.0) at various concentrations of SDS. The concentrations of SDS were 0.1% (○), 0.05% (●).

1) B.S. albumin 2) ovalbumin 3) α-chymotrypsin 4) lysozyme 5) ribonuclease 6) cytochrome-C 7) insulin

を用いた。

2.3. アミノ酸分析

タンパク質約 1mg に 6N 塩酸 2ml を加え、105°C で 24 時間加水分解したのち、ろ過、乾固し (蒸留水 4 ml を加え日立 835 型アミノ酸分析計で分析した。

3. 結果

3.1. GPC 条件

Fig.-1 に緩衝液濃度 0.3M のときに SDS 濃度を検討した結果を示した。分子量が 1 万以上であれば分子量と溶出時間の間には直線関係が成り立つが、分子量 6000 のインシュリンは直線からはずれてくる。SDS の濃度が保持時間に与える影響は小さかったため以後、SDS 濃度は 0.1% とした。

Fig.-2 に緩衝液濃度を変えたときの溶出挙動を示し

Fig.-2 Plots of molecular weight *versus* retention times of proteins in 0.1% SDS at various concentrations of sodium phosphate buffer (pH 7.0). The concentrations of sodium phosphate buffers were 0.2M (○), 0.3M (●), and 0.4M (□).

1) γ-globulin 2) B.S. albumin 3) ovalbumin 4) α-chymotrypsin 5) lysozyme 6) ribonuclease 7) cytochrome-C 8) aprotinin 9) insulin 10) insulin B chain

た。緩衝液濃度が高くなるほど低分子タンパク質の溶出が遅くなり、低分子タンパクも直線関係ののってくる。緩衝液濃度が高いほど低分子タンパクの分子量も求めることが可能となるが、分離は悪くなる。そこで緩衝液濃度としては0.5Mを用いることにした。

この条件では Fig.-3 に示したように分子量3000から150000までのタンパク質は分子量を求める検量線に乗せることができ、1万以下のタンパク質の分子量も求めることができた。

3.2. 可溶化したタンパク質の GPC 分析

Fig.-4 によく用いられる3種の可溶化剤で調製した B.S. アルブミンのクロマトグラムを示した。2% SDS, 8M尿素で溶かした場合は良好なクロマトグラムが得られたが、6M塩酸グアニジンで調製した場合には良好なピーク形状のクロマトグラムは得られなかった。この結果から今回設定した GPC 条件では水に不溶なタンパク質でも2% SDS あるいは8M尿素で可溶化できるもの

は分析できることがわった。

3.3 GPC 分析によるタンパク質の構造の推定

GPC 分析では分子の大きさにより溶出時間がまってくる。したがって分子量が同じであってもみかけ上の大きさが違うタンパク質は溶出時間が違ってくる。したがってタンパク質を変性処理することによりタンパク質の形が変われば変性前後でのクロマトグラムに差がみられるはずである。

Fig.-5 は γ -グロブリンの2% SDS 溶液に2-メルカプトエタノールを数滴落し、経時でクロマトグラムの変化をみた結果である。 γ -グロブリンは150000が主ピークであるが2-メルカプトエタノール添加直後にはピークが3本に、そして最終的には50000と25000の2本のピークに変化した。 γ -グロブリンの構造は Fig.-6 に示すように2本のH鎖(50000)と2本のL鎖(23000)がそれぞれ S-S 結合によりつながっている。メルカプトエ

Fig.-3 Calibration curves for proteins in 5M sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.1% SDS.

1) γ -globulin 2) B.S. albumin 3) ovalbumin 4) β -lactoglobulin 5) α -chymotrypsin 6) myoglobin 7) lysozyme 8) ribonuclease 9) cytochrome-C 10) myoglobin(6380) 11) aprotinin 12) insulin 13) insulin B chain 14) myoglobin (2500)

Fig.-4 Elution profile of B.S. albumin in various denaturants. Elution conditions were 0.5M sodium phosphate buffer (pH 7) containing 0.1% SDS.

Fig.-5 Elution profile of γ -globulin denatured with 2-mercaptoethanol.

Fig.-6 Conformation of γ -globulin¹⁰⁾.

タノール処理によりまず2本のL鎖がはずれ、さらにH鎖どうしの S-S 結合が切れクロマトグラムは最終的に H鎖, L鎖のみのピークになったと考えられる。このように変性処理をした時にタンパク質の構造が変化すればクロマトグラムによく反映されることがわかった。変性処理により起り得るパターンを3つに分類し Fig.-7に

タンパク質の構造と変性

GPCクロマトグラム

Fig.-7 Prospective changes of GPC chromatogram by reduction of proteins.

示した。

1) のタイプは特に定まった構造を持たないタンパク質で変性処理により構造もクロマトグラムも変化しない。2) のタイプは分子内の S-S 結合により小さく折りたたまれたタンパク質であり、変性処理により分子はほどけて大きくなる。この場合はクロマトグラムの保持時間は分子が大きくなるため、変性前にくらべて早くなる。3) のタイプのタンパク質は複数のタンパク質が分子間の S-S 結合により結合したものである。このタイプのタンパク質は変性処理をほどこすと分子間の S-S 結合が切断されるため、変性前では1本だったピークが変性後では複数のピークに分かれる。この3) のタイプの例が先の γ -グロブリンであった。同じタイプの例として α -キモトリプシンがある。 α -キモトリプシンの構造は Fig.-8 に示したように3本のペプチド鎖が S-S 結合によりつながっている。変性前のクロマトグラムでは25,000が主ピークであったが、変性後では13,000, 10,000のピークが大きくなっている。13,000がB鎖, 10,000がC鎖に相当し、A鎖には 280nm 吸収を持つ官能基が

Fig.-8 Conformation of α -chymotrypsin¹¹⁾ and change in the elution pattern of α -chymotrypsin denatured with 2-mercaptoethanol.

ないため検出されてないと考えられた。2) のタイプの例としてリボヌクレアーゼAを示した。リボヌクレアーゼAは Fig.-9 に示したように、分子内 S-S 結合により小さく折りたたまれている。変性後ではこの S-S 結合が切断されるため分子が広がり大きくなる。クロマトグラムの変化は Fig.-9 のように変性後の方が保持時間

が早くなっており、リボヌクレアーゼAの分子量14000に対し、変性前後ではそれぞれ9200、13000と分析された。今までの数例で示したように、変性前後でのタンパク質の構造変化が、クロマトグラムに反映されるため、未知のタンパク質についても、変性前後でクロマトグラムを比較することで、そのタンパク質の構造が Fig.-7

Fig.-9 Conformation of ribonuclease¹¹⁾ and change in the elution pattern of ribonuclease denatured with 2-mercaptoethanol.

の1)~3)のどのタイプなのかを判別することが可能であった。

3.4. HPLC によるペプチドの分析

3.4.1. ペプチドの疎水度と保持時間が等しくなる条件の検討

溶離液として 0.1M NaClO₄/0.1% H₃PO₄ とアセトニトリル/0.1% H₃PO₄ の2液を用い、アセトニトリル濃度を 10%→48% (0.475%/min) まで徐々に変化させることにより、Meek らの求めたアミノ酸の疎水度⁹⁾を用いて計算したペプチドの疎水度と保持時間を等しくすることができた (Fig.-10)。この手法は単にペプチドの保持時間を予測するだけでなく、ペプチドの分子量に関する情報も得られる。

3.4.2. 化粧品原料ペプチドの分析

化粧品用のペプチド原料として、コラーゲンを加水分解した原料が多く用いられている。これらの原料は低分子まで分解されていることが多く、分析条件としてはアセトニトリル/0.1% H₃PO₄ を 0→60% (1.5%/min) に変更した方が原料間の差をとらえることができた。

Fig.-11 に原料ペプチドを分析したクロマトグラムを示した。多くのペプチドの混合物でありブロードなピークとなっている。a), b) は平均分子量が 300~500 とされ

Fig.-10 Correlation of retention times *versus* hydrophobicity of peptides. Hydrophobicity of peptides were calculated by use of retention coefficients for amino acids and end groups⁹⁾.

Fig.-11 Elution profile of hydrolyzed collagen peptides on reversed-phase HPLC.

ているもの、c) は平均分子量が 1000 とされているものである。平均分子量が大きくなると、全体の保持時間が遅くなりピークの中心がおくれてくる。クロマトグラムの分布のパターンに見ることにより、大まかな平均分子量の差をみわけることができた。

3.5. タンパク質構成アミノ酸の分析

公定書に記載されており、化粧品に配合が可能なタンパク質を種類ごとに分類し、各分類ごとにアミノ酸組成を調べた結果を Table-1 に示した。これらのアミノ酸組成は種類ごとに特徴的であり、アミノ酸組成を分析することにより、タンパク質の種類を特定できることがわかった。しかし、2種類以上のタンパク質が混合されている場合には、アミノ酸組成が重ね合わさったものとなるため、アミノ酸組成のパターンからタンパク質を特定することは困難であった。

3.6. 化粧品原料および化粧品に配合されたタンパク質の分析

化粧品原料および化粧品に配合されたタンパク質を分

Table-1 Amino acids compositions of proteins. (mol %)

	コラーゲン	エラスチン	ケラチン	カゼイン	大 豆	卵	アルブミン	シルク
Pro	13.52	11.60	13.67	8.37	5.58	3.72	3.47	—
Asp	4.34	0.60	3.87	12.10	12.01	10.24	19.27	1.70
Thr	1.81	0.90	1.40	3.46	4.35	4.56	4.03	1.04
Ser	3.07	0.90	2.92	6.55	6.85	8.91	3.94	8.05
Glu	6.59	1.60	6.98	28.58	19.61	13.06	20.48	1.25
Gly	36.47	33.00	36.60	3.98	7.64	5.96	3.87	42.40
Ala	10.05	22.80	13.00	5.23	6.18	10.66	12.29	33.80
Val	2.50	13.20	1.84	4.03	4.81	7.74	3.49	2.03
Met	0.50	—	0.17	2.21	0.59	1.87	1.00	0.35
Ile	1.24	2.40	1.10	2.47	4.54	6.58	1.81	0.65
Leu	2.72	6.00	2.05	9.31	7.25	9.76	10.30	0.91
Tyr	0.64	0.60	0.16	1.59	1.55	2.55	1.67	4.39
Phe	0.57	3.00	0.42	3.08	4.51	4.63	3.44	0.86
Lys	2.69	0.30	1.70	5.16	5.91	6.28	9.17	0.91
His	0.55	0.10	0.25	1.52	2.35	1.83	1.76	0.92
Arg	4.40	0.60	4.80	2.35	5.68	4.20	2.78	0.44
Hyp	7.46	0.72	—	—	—	—	—	—
Hyl	0.89	—	—	—	—	—	—	—

析するフロチャートを図-12に示した。まず、アミノ酸分析によりタンパク質の種類を決め、次にそのタンパク質がそのまま配合されているかあるいは加水分解されたものが入っているかを GPC 分析で調べる。加水分解されたタンパク質であることが判明した場合には、どの程度の分子量分布をもっているかを HPLC 分析で把握する。この3種の手法を組み合わせることにより、タンパク質を特徴づけることができた。タンパク構成アミノ酸組成の分析の項でもふれたが、2種以上のタンパク質が混っている場合はアミノ酸組成も重ってしまうため、アミノ酸組成からタンパク質を特定することは難しくなる。例外として、コラーゲンと他のタンパク質が混っている場合には特定が可能であった。以下に GPC 分析で

構造を推定した例、タンパク質が混合された場合の分析の例を示した。

3.6.1. 大豆タンパク質の分析

大豆タンパク質は水に不溶であったため、8 M尿素で可溶化して GPC 分析を行った。クロマトグラムは図-13(変性前)に示したように22分の高分子のピークが主であった。メルカプトエタノールにより変性処理を行うと22分のピークがなくなり、新たに33分、36分(分子量はそれぞれ35000、20000に相当)のピークが生じた。この2本が主成分であり、27分(分子量72000に相当)にも小さなピークが認められた。これらの結果から大豆タンパク質は分子量35000、20000のタンパク質が主成分で、さらに少量の分子量72000のタンパク質がS-S結合によりつながり大きなタンパク質の構造となっ

3.6.2. タンパク質混合物の分析

タンパク質が混合されている場合には、アミノ酸組成からタンパク質の種類をみわけることは難しいが、コラーゲンがまざっている場合には、コラーゲンに特徴的なヒドロキシプロリン(Hyp)に着目することによりタンパク質を特定できた。次にこの例を示した。図-14は化粧品中のタンパク質のアミノ酸組成を分析した結果をTable-1の各分類ごとのアミノ酸組成と比較し、最も近

Fig.-12 A profile of protein analysis in cosmetics.

Fig.-13 Elution profile of soy bean protein in 8M urea.

いパターンとくらべた結果を示した。Fig.-14 から明らかなように、アミノ酸パターンはエラスチンに似ているが、細部には違いがみられる。特に Hyp の含量がエラスチン単体にしては多すぎることから、この原料は、エラスチンにコラーゲンが混っていると考えられた。そこで、Hyp の量を基に下式を解くことによりエラスチンとコラーゲン量を求めた。

$$\begin{cases} x+y=a \\ bx+cy=d \end{cases}$$

Fig.-14 Comparison of amino acids composition of protein extracted from cosmetic and elastin.

x =コラーゲン由来のアミノ酸量 (nmol)

y =エラスチン由来のアミノ酸量 (nmol)

a =アミノ酸分析より得られた総アミノ酸量 (nmol)

b =コラーゲンに含まれる Hyp の割合

c =エラスチンに含まれる Hyp の割合

d =アミノ酸分析より得られた総 Hyp 量 (nmol)

この例の場合はアミノ酸分析の結果 $a=53.998$ $d=1.535$ であった。また、 b, c の値は Table-1 よりそれぞれ 0.0746, 0.0072 を用いた。計算の結果、 $x=17.01$, $y=36.988$ が得られコラーゲンとエラスチンが約 1 : 2 の割合でまざっていることがわかった。

Fig.-15 は GPC 分析の結果である。この結果から、分子量は 10000 弱であることがわかり、加水分解されている原料であることがわかった。Fig.-16 は HPLC 分析の結果である。分布を持ったパターンであり、このことから加水分解されていることが裏づけられた。また、平均分子量 8000 のコラーゲン加水分解物よりも保持時間は遅く、平均分子量は 8000 以上あると思われ GPC 分析の結果とよく一致した。これらの結果から、分析した製品中のタンパク質は加水分解され平均分子量が 10000 程度のコラーゲンとエラスチンが 1 : 2 の割合でまざっていることがわかった。

このように GPC 分析, HPLC 分析, アミノ酸分析を組み合わせる分析することによりタンパク質の特徴をよく把握できた。

4. まとめ

(1) GPC の溶離液として 0.1% SDS, 0.5M リン酸緩衝液を用いることにより、可溶化状態で分子量 3000~150000 までのタンパク質が分析できるようになった。こ

Fig.-15 GPC chromatogram of protein obtained from cosmetic.

Fig.-16 Elution profile of peptides obtained from cosmetic on RP-HPLC.

の条件では水に不溶なタンパク質でも 2% SDS, 8 M 尿素で可溶化できるタンパク質は GPC で分析が可能であった。

(2) タンパク質の S-S 結合を切断する処方をほどこし、その前後の GPC クロマトグラムを比較することによりそのタンパク質の構造が一本鎖なのか、いくつかのサブユニットが集まった集合体なのか判別できた。

(3) ペプチドの分析法として逆相系の HPLC を検討

し、ペプチドの疎水度と保持時間が一致する分析条件が確立できた。HPLC 分析は加水分解されたタンパク質のパターン分析に有効であった。

これらの手法とアミノ酸組成分析を組み合わせることで、タンパク質の同定ならびに未知タンパク質の特徴を知ることができた。

5. 文 献

- 1) I. Imamura, K. Konishi, M. Yokoyama, J. Lip. Chromatogr., 4, 613 (1981)
- 2) N. Ui, J. Chromatogr., 215, 289 (1981)
- 3) T. Takagi, K. Takeda, T. Okuno, J. Chromatogr., 208, 201 (1981)
- 4) Y. Kato, K. Komiya, H. Sasaki, T. Hashimoto, J. Chromatogr., 193, 456 (1980)
- 5) Y. Kato, K. Komiya, H. Sasaki, T. Hashimoto, J. Chromatogr., 193, 29 (1980)
- 6) N. Ui, Anal. Biochem., 97, 65 (1979)
- 7) C.E. Dunlap III., S. Gentleman, L. I. Lowney, J. chromatogr., 160, 191 (1978)
- 8) I. Molnár, C. Horváth, J. Chromatogr., 142, 623 (1977)
- 9) J. L. Meek, Z. L. Rossetti, J. Chromatogr., 211, 15 (1981)
- 10) 今堀和友, タンパク質, 核酸, 酵素, 27, 692 (1982)
- 11) 小倉安之編, 酵素学の基礎, 139, 140, 朝倉書店 (昭和60年12月12日受理)