薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (8) 708-712 (1981)

蛋白の高速液体クロマトグラフィー (第 3 報) 逆相高速液体 クロマトグラフィーによる蛋白の分離

浅川直樹,* 津野昌紀, 服部禎一, 上山政悟, 篠田愛信, 三宅康夫
エーザイ株式会社川島技術研究所

High Performance Liquid Chromatography of Protein. III. Separation of Proteins by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

NAOKI ASAKAWA,* MASANORI TSUNO, TEIICHI HATTORI, MASAOKI UHEYAMA,
AISHIN SHINODA and YASUO MIYAKE

*Research Laboratories of Pharmaceutical Development, Eisai Co., Ltd.
Kawashima-cho, Hashima-gun, Gifu*

(Received February 5, 1981)

Conventionally, in gel permeation chromatography (GPC) it has been almost impossible to separate and identify proteins having near molecular weight.

As for high performance liquid chromatography (HPLC) method, which has been developed in our previous report, it was examined whether it can be applied to simultaneous, efficient separation and identification of six kinds of proteins having molecular weight of 21000—26000; trypsin inhibitor (soy beans), trypsin, trypsinogen, α -chymotrypsin, α -chymotrypsinogen and elastase. Under isocratic elution system by using Nucleosil CN as a stationary phase and sodium ethanesulfonate, sodium pentanesulfonate or octanesulfonate as an ion-pair reagent in mobile phase, all of them could be satisfactorily chromatographed.

Keywords—HPLC; separation; protein; Nucleosil CN; trypsin inhibitor; trypsin; trypsinogen; α -chymotrypsin; α -chymotrypsinogen; elastase

最近, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により種々の蛋白の分離が試みられ数多く報告されている。その中で size-exclusion 法を用いた蛋白の分離が盛んに行なわれ, 種々の固定相が開発されている。しかし, size-exclusion 法による分離の欠点は, 分離しようとする蛋白の分子量間に相当大きい差がなければならず,¹⁾ 分子量が比較的近いものについては, 新たな固定相の開発が望まれている。

著者らは, 先の報告²⁾ においてオクタンスルホン酸ナトリウムをカウンターイオンとして用い, インシュリン, リボヌクレアーゼ, ミオグロビン, 塩基リゾチームおよびチトクロム C の分子量約 5000—20000 の蛋白についてイソクラティック溶出法を用いた逆相クロマトグラフィーの分離・保持の検討を行なった。本報においては分子量約 21000—26000 の比較的分子量が近い蛋白の分離を検討した。検体としてはトリプシンインヒビター (MW 21000), トリプシン (MW 23000), トリプシノーゲン (MW 24000), α -キモトリプシン (MW 25200), α -キモトリプシノーゲン (MW 25500) およびエラスターゼ (MW 25900) を用い検討したところ, 満足できる結果が得られた。

逆相固定相への蛋白の保持

蛋白を構成するアミノ酸の中には, 解離基を有するアミノ酸が多数存在している。解離しやすいアミノ酸を数多くもつ蛋白を nonpolar な固定相に保持させるためには, 例えばアニオン型カウンターイオンであるアルキルスルホン酸を用い, 蛋白とイオンペアを形成させることにより, 疎水性を高めることが必要である。本報告ではオクタンスルホン酸ナトリウム, ペンタンスルホン酸ナトリウムおよびエタンスルホン酸ナトリウムを用い, 種々の蛋白の分離について検討した。

実 験 の 部

I) 試料, 試薬 検討した蛋白を Table I に示した。また HPLC 注入に際しては, トリプシン, トリプ

TABLE I. Proteins used in Experiment

Protein	MW	I _p	Source
Trypsin inhibitor	21000	4.5	Soy beans (A)
Trypsinogen	24000	9.3	Bovine pancreas (A)
Trypsin	23000	10.8	Bovine pancreas (B)
α -Chmotrypsin	25200	8.0	Bovine pancreas (A)
α -Chymotrypsinogen	25500	9.5	Bovine pancreas (A)
Elastase	25900	9.5	Porcine pancreas (A)

(A) A, Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.).

(B) E, P-L-Biochemical (Milwaukee, WI, U.S.A.).

シノーゲン, α -キモトリプシン, α -キモトリプシノーゲンおよびエラスターゼは水に, トリプシンインヒビターは 0.001 N HCl にそれぞれ溶解して使用した。

アセトニトリル, 酢酸, オクタンスルホン酸ナトリウム, ペンタンスルホン酸ナトリウム, エタンスルホン酸ナトリウムは, 試薬特級品を使用した。

II) 装置および HPLC 条件 1) 装置; ポンプ: L-3000 (柳本), 検出器: UV_{254nm} 検出器付 UVD-1 (島津). 2) HPLC 条件; カラム: Nucleosil CN (ナーゲル社製, 10 μ , 4.0 mm $\times$ 25 cm), 流速: 1.5 ml/min, 試料注入量: 10 μ l (各々の蛋白として 40 μ g 相当量), 感度: 0.04 aufs および 0.02 aufs, カラム温度: 室温。

結果および考察

I) オクタンスルホン酸イオン濃度と k'

先の報告で, カウンターイオンにアルキルスルホン酸塩を用いた場合, アルキル鎖とその濃度およびアセトニトリルの濃度が分離・保持に大きな影響をおよぼすことを述べた。本検討において 6 種の蛋白を同時分離するた

Fig. 1. Dependence of the Capacity Factor of the Protonated Proteins on the Concentration of $C_8H_{17}SO_3Na$ in the Mobile Phase

Column; Nucleosil CN, flow-rate; 1.5 ml/min, temperature; ambient, mobile phase; $CH_3CN-H_2O-CH_3COOH$ (42: 58: 2, pH 2.5), containing various concentration of $C_8H_{17}SO_3Na$.

—●—; trypsin inhibitor, —○—; trypsinogen,
—●—; trypsin, —○—; α -chymotrypsin,
—△—; α -chymotrypsinogen, —□—; elastase.

Fig. 2. Chromatogram of Proteins

Column; Nucleosil CN, mobile phase; $CH_3CN-H_2O-CH_3COOH$ (42: 58: 2, pH 2.5) containing 15 mM $C_8H_{17}SO_3Na$, flow-rate; 1.5 ml/min, temperature; ambient, detector; UV₂₅₄, detector sensitivity; 0.04 aufs, sample size; 10 μ l injected respectively.

1. trypsin inhibitor, 2. trypsinogen, 3. trypsin, 4. α -chymotrypsin, 5. α -chymotrypsinogen, 6. elastase.

めにエタンスルホン酸ナトリウム、ペンタンスルホン酸ナトリウムおよびオクタンスルホン酸ナトリウムを用いた。2% 酢酸を加えた移動相にエタンスルホン酸ナトリウムおよびペンタンスルホン酸ナトリウムを添加し、添加濃度およびアセトニトリルの濃度を変えて検討したが、これら6種の蛋白は分離できなかった。そこで比較的アルキル鎖の大きいオクタンスルホン酸ナトリウムを用いることにより、分離・保持が可能となった。

アセトニトリル-水-酢酸 (42:58:2, pH 2.5) の移動相にオクタンスルホン酸ナトリウムを添加し、添加した濃度 (全体積中の濃度) と k' ³⁾ の関係を Fig. 1 に示した。

また、オクタンスルホン酸ナトリウム 10 mM を添加した移動相を用い、各々の蛋白 4 mg/ml 濃度の混合液 10 μ l (各々の蛋白として 40 μ g 相当量) をとり、HPLC に注入したときのクロマトグラムを Fig. 2 に示した。

オクタンスルホン酸ナトリウムの濃度が増加するにつれ、 k' も増加した。これは蛋白中に存在する遊離のアミノ基とオクタンスルホン酸イオンとがイオンペアーを形成し、固定相への親和が増加したと考えられる。また溶出順序は size-exclusion 法で見られるように分子量の大きい順ではなかった。トリプシノーゲン (Ip=9.3) とトリプシン (Ip=10.8) を比較するとトリプシノーゲンの方が先に溶出した。一方、 α -キモトリプシン (Ip=8.8) と α -キモトリプシノーゲン (Ip=9.5) の場合は逆に α -キモトリプシンの方が先に溶出した。このように2% 酢酸を加えた移動相を用いた場合、同程度の分子量を有する蛋白は、等電点の高い方が保持される傾向が見られた。

次にオクタンスルホン酸ナトリウムの濃度を 10 mM と一定にし、アセトニトリルの量を変化させた時の k' を Fig. 3 に示した。

アセトニトリルの量が増加するに従い、 k' は減少した。蛋白を溶出させるアセトニトリルの範囲は極めて狭く、Fig. 3 に示した溶出パターンは逆相クロマトグラフィーに見られるものであった。

このように、カウンターイオンを用い、蛋白とのイオンペアーを形成させることにより逆相固定相で分離する方法は、比較的分子量に近い蛋白の分離にもすぐれていた。

II) トリプシノーゲンとトリプシンの分離

ウシトリプシンはトリプシノーゲンから Val-Asp-Asp-Asp-Lys の6個のアミノ酸がはずれた活性型の酵素である。⁴⁾ この両者の分離について検討した。アセトニ

Fig. 3. Effect of Organic Modifier (Acetonitrile)

Concentration on protein capacity factors using Nucleosil CN with 10 mM $C_8H_{17}SO_3Na$ in $CH_3CN-H_2O-CH_3COOH$ ($x:y:2$, $x+y=100$). Other condition as in Fig. 2.

—●—; trypsin inhibitor, —○—; trypsinogen, —□—; trypsin, —△—; α -chymotrypsin, —◇—; α -chymotrypsinogen, —×—; elastase.

Fig. 4. Chromatogram of Trypsin and Trypsinogen

Column; Nucleosil CN, mobile phase; $CH_3CN-H_2O-CH_3COOH$ (30:70:2, pH 2.7) containing 15 mM $C_8H_{17}SO_3Na$, detector sensitivity; 0.02 a.u. Other condition as in Fig. 2.

2. trypsinogen, 3. trypsin.

酸ナトリウムを添加したところ両者の分離は良好となった。そのときのクロマトグラムをFig. 4に示した。

III) α -キモトリプシノーゲンと α -キモトリプシンの分離

α -キモトリプシノーゲンは単一ペプチド鎖からなり、トリプシン等の作用により、Ser-Arg, Thr-Asn の4個のアミノ酸がはずれた活性型の α -キモトリプシンになることが知られている。⁵⁾ α -キモトリプシノーゲンと α -キモトリプシンの分離について検討した、前述のトリプシン、トリプシノーゲンと同様にアセトニトリル-水-酢酸 (30:70:2, pH 2.7) の移動相に、15 mM のペンタンスルホン酸ナトリウムおよびオクタンスルホン酸ナトリウムを添加したとき、両者とも保持が大きくなり溶出しなかった。そこで 15 mM のエタンスルホン酸ナトリウムを添加したところ両者の分離は可能となった。そのときのクロマトグラムを Fig. 5 に示した。

トリプシノーゲンとトリプシンの場合と同様に分離は良好であった。

以上のように、カウンターイオンとしてアルキルスルホン酸塩を適当に選択することにより、比較的似かよったアミノ酸組成と構造を有する蛋白の分離にも本報は有用であった。

さらに α -キモトリプシノーゲンはトリプシンにより分解されることが知られている。トリプシンおよび α -キモトリプシノーゲンを各々同量秤り、水に溶解し、よく混合し 37°C

Fig. 5. Chromatogram of α -Chymotrypsin and α -Chymotrypsinogen

Column; Nucleosil CN, mobile phase; $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{COOH}$ (30:70:2, pH 2.7) containing 15 mM $\text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_3\text{Na}$, detector sensitivity; 0.02 aufs. Other condition as in Fig. 2.

4. α -chymotrypsin, 5. α -chymotrypsinogen.

Fig. 6. Chromatogram of decomposing α -Chymotrypsinogen by Trypsin

Column; Nucleosil CN, flow-rate; 1.5 ml/min, temperature; ambient, mobile phase; $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{COOH}$ (30:70:2, pH 2.7) containing 15 mM $\text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_3\text{Na}$, detector sensitivity; 0.02 aufs. Other condition as in Fig. 2.

3. trypsin, 5. α -chymotrypsinogen.

(A) after 30 min, (B) after 60 min, (C) after 120 min, (D) after 180 min.

に放置した。一定時間ごとに HPLC に注入したときのクロマトグラムを Fig. 6 に示した。

α -キモトリプシノーゲンがトリプシンにより分解されていく様子が Fig. 6 のクロマトグラムから観察される。またこの分解については、分解条件により 3 種の α -キモトリプシン、 π -キモトリプシンおよび δ -キモトリプシンが生成すると言われている。⁵⁾ しかし現状では、先の HPLC 条件でこれら 3 種の分離・同定は出来なかった。

引用文献および注

- 1) 石井信一, “新実験化学講座, 20 巻, 生物化学 [I],” 日本化学会 編, 丸善, 東京, 1978, p. 33.
- 2) 浅川直樹, 津野昌紀, 服部禎一, 上山政悟, 篠田愛信, 三宅康夫, 薬誌 **101**, 279 (1981)
- 3) $k' = (V_t - V_o)/V_o$. V_t : 試料の保持容積, V_o : 水の保持容積.
- 4) a) M. Kunitz, J.H. Northorp, *J. Gen. Physiol.*, **19**, 991 (1935—1936); b) M. Kunitz, *J. Gen. Physiol.*, **21**, 601 (1938); c) M. Kunitz, *J. Gen. Physiol.*, **22**, 293, 429 (1939).
- 5) a) M. Kunitz, J.H. Northorp, *J. Gen. Physiol.*, **18**, 433 (1935); b) C.F. Jacobsen, *Compt. rend. trav. lab., Carlsberg, Sér. Chem.*, **25**, 325 (1949).