Original

グアニジン変性したタンパク質のハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー——1. グアニジン含有リン酸緩衝液溶離系——

吉武朋彦[1)]、小林伸太郎[1)]、小川哲朗[1)]、奥山典生[2)]

Hydroxyapatite chromatography of guanidine denatured proteins——1. Guanidine containing phosphate buffer system——

Tomohiko Yoshitake*[1)] , Shintaro Kobayashi[1)] , Tetsuro Ogawa[1)] and Tsuneo Okuyama[2)]

1) New Ceramics Division, PENTAX Corporation 2−36−9, Maeno−cho, Itabashi−ku, Tokyo, 174−8639, Japan

2) Protein Technos institute 99−7 Shimokawa−iri, Atugi−shi, Kanagawa−ken, 243−0206, Japan

Received for review October 14, 2005. Revised manuscript received November 26, 2005. Accepted December 22, 2005.

Abstract

Elution behaviors of guanidine denatured proteins on ceramic hydroxyapatite column with 2 M guanidine containing phosphate buffer system were investigated. In phosphate buffer system, the retention time of proteins was increased with the positive charge of the proteins. On the other hand, in guanidine containing phosphate buffer system, the retention time of the proteins decreased with the positive charge of the proteins. Guanidine denatured acidic and neutral proteins were retained on the column, however the most of the basic proteins were not retained on the column, except cytochrome−c. In sulfonate type cation−exchange chromatography as comparison, showed no retention of cytochrome −c with 2 M guanidine buffer system.

Keywords : denatured protein, renaturation, hydroxyapatite, chromatography

1. Introduction

1956年にTiselius, Hjertenらがハイドロキシアパタイトを充填剤として適用し、クロマトグラフィーによるタンパク質の分離を行って以来、ハイドロキシアパタイトは等電点が酸性から塩基性にいたる幅広い範囲の生体高分子類を分離・精製する担体として広く用いられてきた。[1] さらに球状セラミック型の創出により、再現性のある分離・分析が行われるようになった。[2] また、ハイドロキシアパタイトは変性タンパク質の分離にも有効であることが知られている。[3] 一般的にハイドロキシアパタイトにはリン酸緩衝液の溶離系が適用

1）ペンタックス株式会社　ニューセラミックス事業部
〒174-8639　東京都板橋区前野町2-36-9
TEL : 03–3960−1290　**FAX :** 03–3960–2681
E−mail : tomo.yoshitake@aoc.pentax.co.jp

2）プロテインテクノスインスティテュート
〒243-0206　神奈川県厚木市下川入99-7

され、リン酸の濃度に依存してその溶離は酸性から塩基性の順序で行われることが知られている。[4, 5] 一方、硫酸塩が高濃度に存在していてもその溶離に与える影響は少なく、カルシウムイオン存在下では酸性タンパク質がよりよく保持されることも知られている。すでに尿素を溶離液全体に含有する溶離系 [6, 7, 8] やグアニジン濃度グラジエント溶離系についての報告 [9] はいくつかあるものの、グアニジンを溶離液全体に含有する溶離系についての報告はない。

本報ではタンパク質が変性を起こすような比較的高濃度のグアニジンを含有する溶離液でもタンパク質のクロマトグラフィーが可能であることを見出した。ここではこのような比較的高濃度のイオン性物質の存在状態を保持する条件、すなわち2Mグアニジンを含有する溶離液でのハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーを様々なタンパク質の分離について検討した結果について報告する。

2. Materials and methods

2-1 試薬

リン酸二水素ナトリウム二水和物（試薬特級)、リン酸水素二ナトリウム・12水（試薬特級)、グアニジン塩酸塩（生化学用）は全て和光純薬工業株式会社より購入した。
Table 1 に使用したタンパク質標品を示す。

充填剤は、セラミックハイドロキシアパタイト充填剤（以下HAp)（CHT Type-Ⅱ, 粒子径：40 μm, Bio-Rad Laboratories, Inc.）を使用した。この充填剤は分取を基本目的とするものであるため分析目的には適しているとは言えないが、市販されている充填剤が分取用のみであるため追試のしやすさを考えてこの充填剤を用いた。なお、比較実験にはSulfonate type

陽イオン交換樹脂（以下Sulfonate type)（Macro-Prep High S Support, 粒子径：50 μm, Bio-Rad Laboratories, Inc.）を使用した。

2-1-1 試料タンパク質溶液の調製法

1）試料タンパク質溶液

凍結乾燥タンパク質標品を10 mg/ml（オバルブミン、α－キモトリプシン、血清アルブミン、リゾチーム、γ－グロブリン、ヒストン)、または5 mg/ml（ミオグロビン、α－キモトリプシノーゲンA、チトクロムC）となるように1 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.8）を加え、4 ℃で溶解させた。その後、－30℃で保存し、使用時に室温で解凍した。

2）グアニジン処理試料タンパク質溶液

凍結乾燥タンパク質標品を10 mg/ml（オバルブミン、α－キモトリプシン、血清アルブミン、リゾチーム、γ－グロブリン、ヒストン)、または5 mg/ml（ミオグロビン、α－キモトリプシノーゲンA、チトクロムC）となるように2 Mグアニジン含有1 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）を加え室温で溶解させた。同様に4 Mグアニジン含有1 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）を加え室温で溶解させた。その後、室温で24時間以上保持した後使用した。

2-1-2 クロマトグラフィー溶離液の調製法

リン酸緩衝液は、初期溶離液(A)：1 mMリン酸（リン酸二水素ナトリウム二水和物0.156 g、リン酸水素二ナトリウム・12水0.358 g)、後期溶離液(B)：400 mMリン酸（リン酸二水素ナトリウム二水和物62.40 g、リン酸水素二ナトリウム・12水143.20 g）を秤量し、それぞれをイオン交換水で1 Lにメスアップした。

グアニジン含有リン酸緩衝液は、初期溶離液(C)：2 Mグアニジン－1 mMリン酸（グアニジン塩酸塩191.06 g＋リン酸二水素ナトリウム二水和物0.156 g、グアニジン塩酸塩191.06 g＋リン酸水素二ナトリウム・12水0.358 g)、後期溶離液(D)：2 Mグアニジン－400 mMリン酸（グアニジン塩酸塩191.06 g＋リン酸二水素ナトリウム二水和物62.40 g、グアニジン塩酸塩191.06 g＋リン酸水素二ナトリウム・12水143.20 g）を秤量し、それぞれをイオン交換水で1 Lにメスアップした。

2つの水溶液を混合し、pHメーター（カスタニーATC pHメーターD－24：株式会社堀場製作所）を用いてpH 6.8に調製した。調製した緩衝液は0.22 μmフィルター（Millipore express membrane : Millipore Corporation）で吸引濾過し、121℃、20分の条件でオートクレーブ（BS－245：トミー精

Table 1. A list of proteins subjected to the hydroxyapatite chromatography.

Protein	Source	Supplier
(a) Ovalbumin	avium	SIGMA Chemicals Co. (USA)
(b) Serum albumin	bovine	SIGMA Chemicals Co. (USA)
(c) γ-Globlin	bovine	ICN Biomedicals, Inc. (USA)
(d) Myoglobin	equine heart	SIGMA Chemicals Co. (USA)
(e) α-Chymotrypsinogen-A	bovin pancreas	SIGMA Chemicals Co. (USA)
(f) α-Chymotrypsin	bovin pancreas	SIGMA Chemicals Co. (USA)
(g) Trypsin	swine pancreas	Gibco BRL (USA)
(h) Lysozyme	avium	SIGMA Chemicals Co. (USA)
(I) Cytochrome-c	equine heart	SIGMA Chemicals Co. (USA)
(j) Histone	calf thymus nuclei	ICN Biomedicals, Inc. (USA)

工株式会社）にかけた。その後、室温で保存した。

2-2 カラムと装置

2-2-1 カラム充填方法

ステンレス管（4.0 I.D.×100 mm、フィルターサイズ：2 μm：株式会社杉山商事）にHApを乾式充填法で充填した。ステンレス管の片側のみにエンドフィッティングを取り付け、ステンレス管重量を測定した。ステンレス管にロートを接続し、ステンレス管を軽くタッピングしながらHApを充填した。その後、ロートを取り外し、カッターの刃をスライドさせて充填層表面を平らにした。この状態で重量を測定し、充填されたHAp重量を記録した。充填したHApの量は0.80 g ±0.01であり、再現性が得られた。最後にもう片方のエンドフィッティングを取り付けた。また、HApカラムの理論段数はオバルブミン（10 mg/ml、50 μl注入）を用いてisocratic elution system（400 mMリン酸緩衝液pH 6.8）で評価し、カラムの充填状態を確認した。

2-2-2 高速液体クロマトグラフィーシステム

高速液体クロマトグラフィーシステムは、Biologic Duoflow（Bio-Rad Laboratories, Inc.）を使用した。この装置は全て付属の制御プログラム（Biologic Duoflow system version 5.0）によって管理され、試料は測定ごとに100 μlマイクロシリンジ（株式会社伊藤製作所）を用い、50 μlをインジェクションバルブに注入した。検出にはBioLogic QuadTec UV-Vis Detector（Bio-Rad Laboratories, Inc.）を使用し、タンパク質は280 nm、ヒストンは215 nmで検出した。また、回収率は解析ソフトPeak Fit v 4.12 for Windows（SeaSolve Software, Inc.）を使用して求めた。

2-3 クロマトグラフィー操作法

初期溶離液(A)または(C)で1分間カラムを平衡化した後、インジェクションバルブをLoadに切り替え、試料をあらかじめ50 μl注入した1.0 mlサンプルループ内に１分間流し、インジェクションバルブをInjectに切り替えた。初期溶離液(A)もしくは(C)で３分間溶離した後、15分間のリニアグラジエント溶離を行い、最後に後期溶離液(B)もしくは(D)で５分間溶離した。その後、初期溶離液(A)または(C)に戻し、20分間カラムを平衡化した。流速は1.0 ml/minである。温度は室温で行った。

本報では基本的にリン酸の濃度変化により溶離する系を用いたが、グアニジンを含まない溶離液で溶離する系を標準系と定義し、グアニジンを含む溶離液、つまり標準系の溶離液にグアニジンを添加した溶離液で溶離する系をグアニジン含有系と定義した。なお、グアニジン含有系においては高濃度のイオンが存在するため、電気伝導度でリン酸グラジエントを確認できない。そのため、Fig. 1、２、３、４におけるグアニジン含有系の電気伝導度（R軸）は標準系の電気伝導度を適用した。

3．Results and discussion

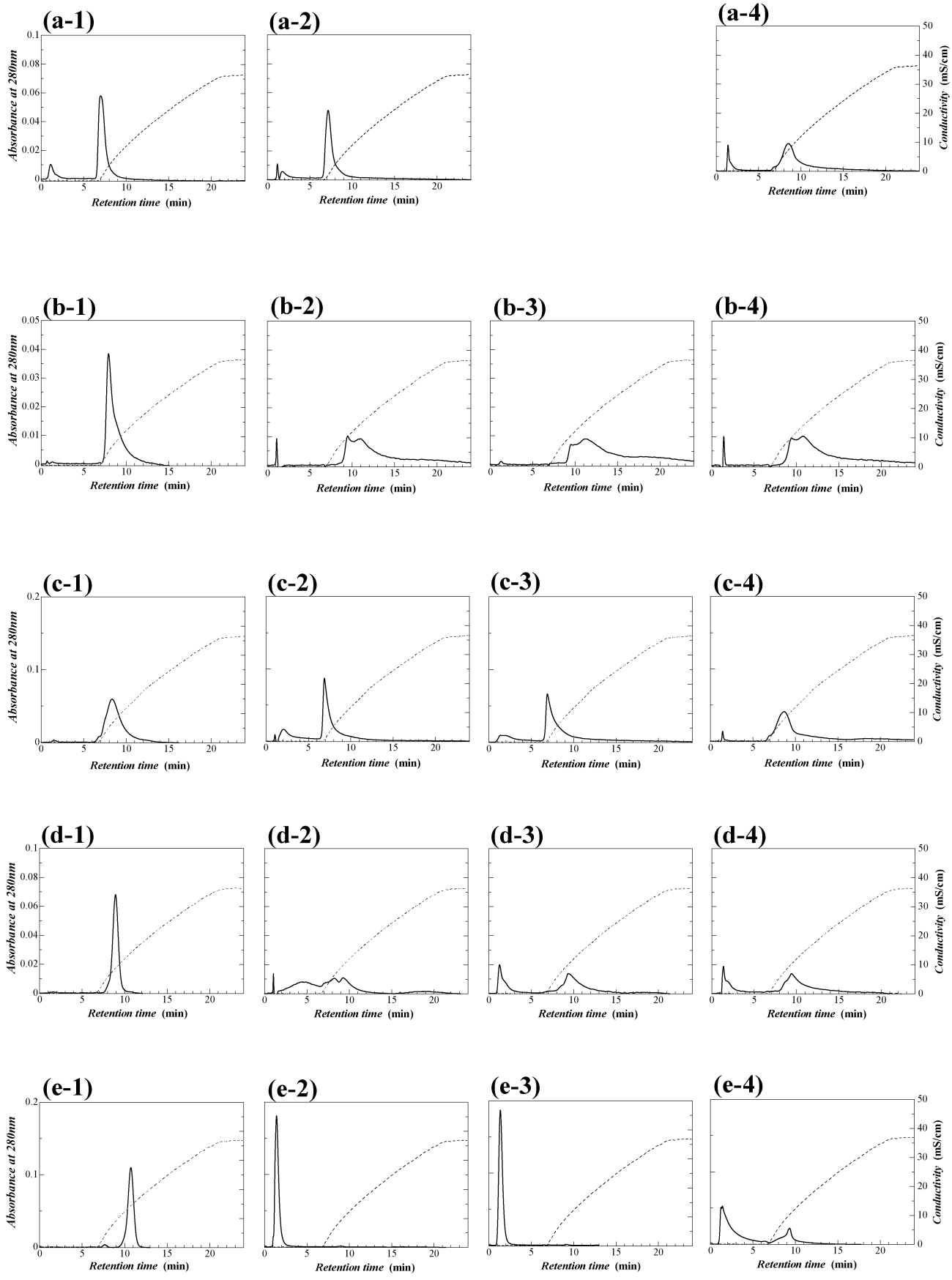
3-1 ２Mグアニジン含有系におけるタンパク質のクロマトグラム

タンパク質の構造はグアニジン濃度によって変化する可能性があるため、本報では溶離液に定常的に２ Mグアニジンを含む系を用いてタンパク質のクロマトグラフィーを検討した。またここでは試料注入後、さらに初期溶離液(A)または(C)を３分間流すことにより、タンパク質がカラムに保持されていることを確かめた。Figure １（a－1～i－1）は未変性タンパク質溶液をHApカラムに注入し、標準系（初期溶離液：A、後期溶離液：B）で溶離したクロマトグラムである。標準系では今回使用した全てのタンパク質がHApカラムに保持され、酸性タンパク質、中性タンパク質、塩基性タンパク質の順に溶出する傾向を示した。

Figure １（a－2～i－2）は未変性タンパク質溶液をHApカラムに注入し、グアニジン含有系で溶離したクロマトグラムである。この結果から分かるように、オバルブミン（a－2）、血清アルブミン（b－2）、γ－グロブリン（c－2）、ミオグロビン（d－2）は保持されたが、α－キモトリプシノーゲンA（e－2）、α－キモトリプシン（f－2）、トリプシン（g－2）、リゾチーム（h－2）は保持されなかった。つまりグアニジン含有系におけるタンパク質の溶出傾向は標準系とは異なり、酸性と中性タンパク質はHApカラムに保持されたが、標準系で一番強く保持される塩基性タンパク質が保持されなかった。これはHApのリン酸塩基と相互作用する塩基性タンパク質が溶離液中のグアニジウムイオンと競合するためと考えられる。しかし、例外としてチトクロムC（i－2）は塩基性タンパク質ではあるがHApカラムに保持され、３本のピークとなった。これはチトクロムCがヘムタンパク質であるため、通常の塩基性タンパク質とは異なった機構でHApと相互作用しているものと考えられる。また、血清アルブミンはグアニジンの存在によってHApとの相互作用が高くなっている。これはグアニジウムイオンがリン酸塩基と相互作用することによりカルシウムサイトに相当するグアニジンサイトを形成したため保持しやすくなったと考えられる。

Figure １（b－3～i－3）はタンパク質をあらかじめ２ Mグアニジンで溶解し、これをグアニジン含有系（初期溶離液：C、後期溶離液：D）で溶離したクロマトグラムである。オバルブミンは沈殿が生ずるため、クロマトグラフィーを行っていない。ほとんどのタンパク質は未変性のタンパク質をグアニジン含有系で溶離した場合とほぼ同様の結果となったが、ミオグロビン（d－3）は保持されない部分と保持される部分が存在し、保持された部分は標準系での溶離位置付近に広がったピークが得られた。

Figure １（a－4～i－4）はタンパク質をあらかじめ４ Mグアニジンで溶解し、これをグアニジン含有系（初期溶離液：


(a-1)
(a-2)
(a-4)
(b-1)
(b-2)
(b-3)
(b-4)
(c-1)
(c-2)
(c-3)
(c-4)
(d-1)
(d-2)
(d-3)
(d-4)
(e-1)
(e-2)
(e-3)
(e-4)
Absorbance at 280nm
Conductivity (mS/cm)
Retention time (min)

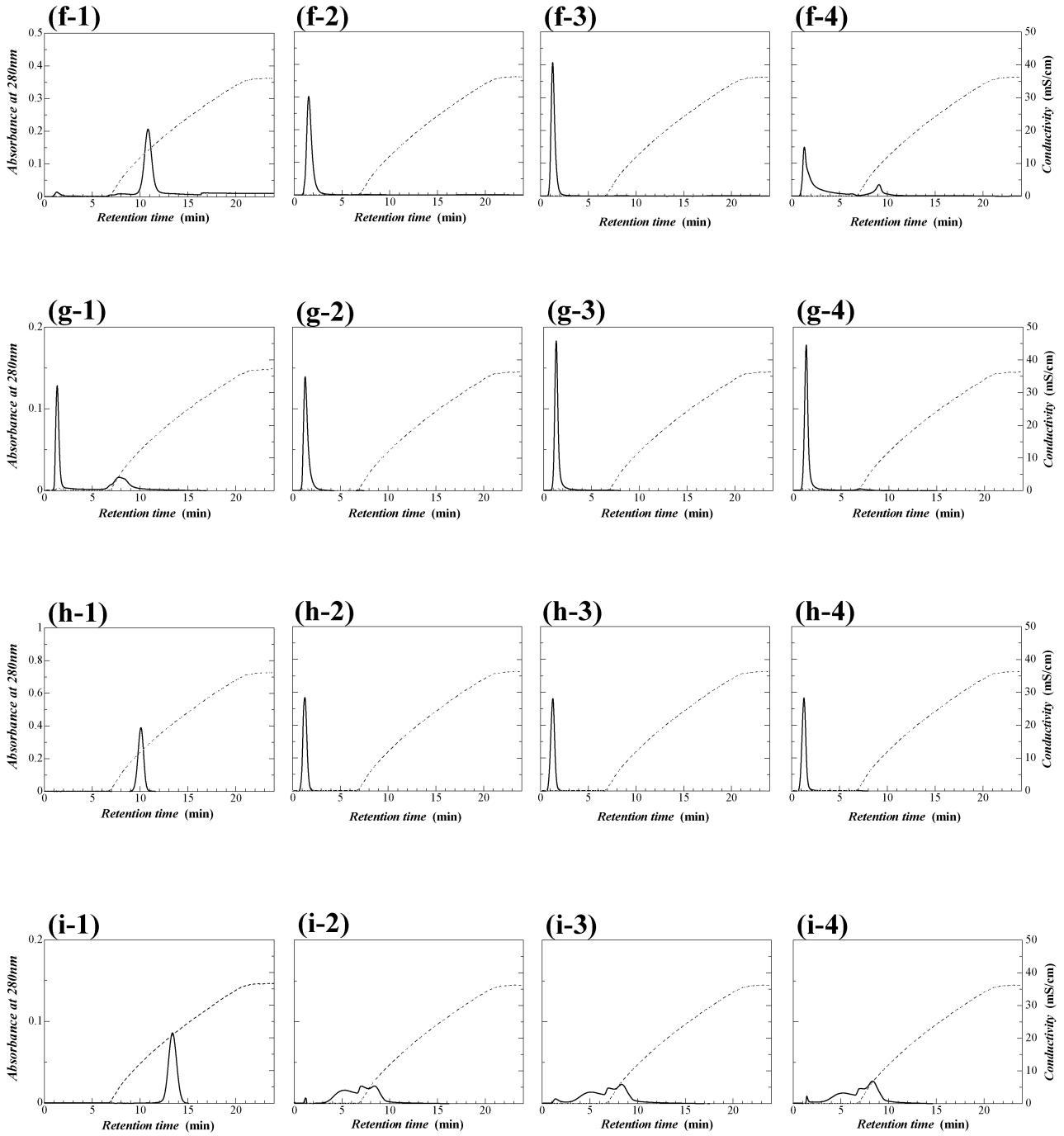


Figure 1. Chromatogram of proteins on HAp column with 2 M guanidine containing buffer system.
Proteins were loaded on the HAp column and eluted by standard system (eluent A : 1 mM Sodium phosphate buffer, eluent B : 400 mM Sodium phosphate buffer pH 6.8, 0% to 100% B in 15 minutes flow rate : 1.0 ml/min)・・(a−1~i−1) and guanidine containing system (eluent C : 1 mM Sodium phosphate−2 M guanidine buffer, eluent D : 400 mM Sodium phosphate−2 M guanidine buffer pH 6.8, 0% to 100% D in 15 minutes ; flow rate : 1.0 ml/min)・・(a−2~i−4). The effluent was monitored at 280 nm. (a−1~i−1) Chromatogram of proteins with standard system. (a−2~i−2) Chromatogram of proteins with guanidine containing system. (b−3~i−3) Chromatogram of 2 M guanidine treated protein with guanidine containing system. (a−4~i−4) Chromatogram of 4 M guanidine treated protein with guanidine containing system. (a) ovalbumin, (b) serum albumin, (c) γ−globlin, (d) myoglobin, (e) α−chymotrypsinogen−A, (f) α−chymotrypsin, (g) trypsin, (h) lysozyme and (i) cytochrome−c.

Table 2. Recovery of proteins subjected to the hydroxyapatite chromatography.

Protein	Recovery [%] 0 M	2 M	4 M
	(Guanidine concentration)		
(a) Ovalbumin	90	—	86
(b) Serum albumin	59	63	67
(c) γ−Globlin	100	100	83
(d) Myoglobin	89	100	100
(e) α−Chymotrypsinogen−A	100	100	100
(f) α−Chymotrypsin	96	91	94
(g) Trypsin	100	100	100
(h) Lysozyme	100	99	100
(I) Cytochrome−c	95	100	100

C、後期溶離液：D）で溶離したクロマトグラムである。ほとんどのタンパク質は先ほどの２ Mグアニジンで溶解したタンパク質と同様の結果となったが、α－キモトリプシノーゲン A（e−4）とα－キモトリプシン（f−4）は保持される部分も現れ、標準系での溶出位置付近にピークが観察された。このようにグアニジン含有系でもタンパク質によってはHApカラムに保持されるものがあると確認できた。以上の結果から、HApカラムではグアニジン含有系でもタンパク質の電荷の違いによる分離が行われているものと推察されるが、その挙動はタンパク質とHApとの相互作用に対する影響や、タンパク質の高次構造に対する影響などと考えられる。また、グアニジンで溶解したタンパク質でもグアニジン含有系における回収率はほぼ100%であった（Table ２）。

3-2 ヒストンの２ Mグアニジン含有系におけるクロマトグラム

ヒストンをハイドロキシアパタイトカラムにかけグアニジン濃度リニアグラジエント溶離を適用すると、いくつかの画分に分離することが報告されている。[9] そこで、２ Mグアニジンを含む系を用いてヒストンのクロマトグラフィーを検討した。ヒストンをHApカラムに注入し、リニアグラジエント溶出法で溶離した。この溶離系では、試料注入後の３分間のイソクラティック溶離は行っていない。Figure ２（j−1）は標準系（初期溶離液：10 mMリン酸緩衝液pH 6.8、後期溶離液：600 mMリン酸緩衝液pH 6.8、リニアグラジエント：15 min）で溶離したクロマトグラムである。なお、リン酸緩衝液に溶解したヒストンは完全に溶解しなかったため、試料には上精を使用した。標準系においてヒストンは素通り部分と保持部分では５本のピークが確認された。

Figure ２（j−2）はヒストンをHApカラムに注入し、グアニジン含有系（初期溶離液：２ Mグアニジン−10 mMリン酸緩衝液pH 6.8、後期溶離液：２ Mグアニジン−600 mMリン酸緩衝液pH 6.8、リニアグラジエント：15 min）で溶離したクロマトグラムである。同様にFigure ２（j−3）はヒストンをあらかじめ２ Mグアニジンで溶解した場合のクロマトグラム、Figure ２（j−4）はヒストンをあらかじめ２ Mグアニジンで溶解した場合のクロマトグラムである。グアニジン含有系においては未変性ヒストン、２ Mグアニジンで溶解したヒストンと４ Mグアニジンで溶解したヒストンのいずれも保持部分は存在し、グアニジン含有系でもヒストンがHApカラムに保持されることがわかった。

3-3 Sulfonate typeカラムの２ Mグアニジン含有系におけるクロマトグラム

一般的なイオン交換カラムの例としてSulfonate typeカラムを取り上げ、グアニジン含有系（初期溶離液：C、後期溶離液：D）においてHApカラムと同様の溶離条件でチトクロムCの分離挙動を比較した。Figure ３はチトクロムCをHApカラムとSulfonate typeカラムに注入し、グアニジン含有系で溶離したクロマトグラムである。また、ここでは試料注入後３分間(C)液を流すことで、タンパク質がカラムに保持されていることを確かめた。その結果、グアニジン含有系において

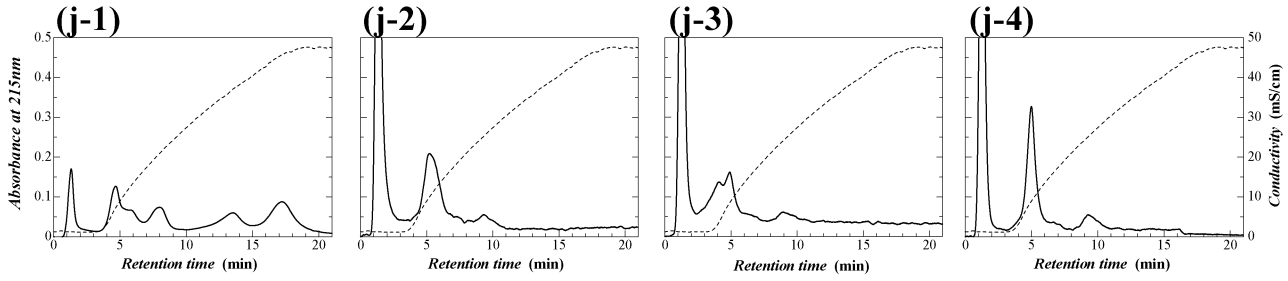


Figure 2. Chromatogram of histone on HAp column with 2 M guanidine containing buffer system.
Histone was loaded on the HAp column and eluted by standard system (eluent E : 10 mM Sodium phosphate buffer, eluent F : 600 mM Sodium phosphate buffer pH 6.8 , 0% to 100% F in 15 minutes ; flow rate : 1.0 ml/min)・・(j−1) and (eluent G : 10 mM Sodium phosphate−2 M guanidine buffer, eluent H : 600 mM Sodium phosphate−2 M guanidine buffer pH 6.8, 0% to 100% H in 15 minutes ; flow rate : 1.0 ml/min)・・(j−2~j−4). The effluent was monitored at 215 nm. (j−1) Chromatogram of histone with standard system. (j−2) Chromatogram of histone with guanidine containing system. (j−3) Chromatogram of 2 M guanidine treated histone with guanidine containing system. (j−4) Chromatogram of 4 M guanidine treated histone with guanidine containing system.

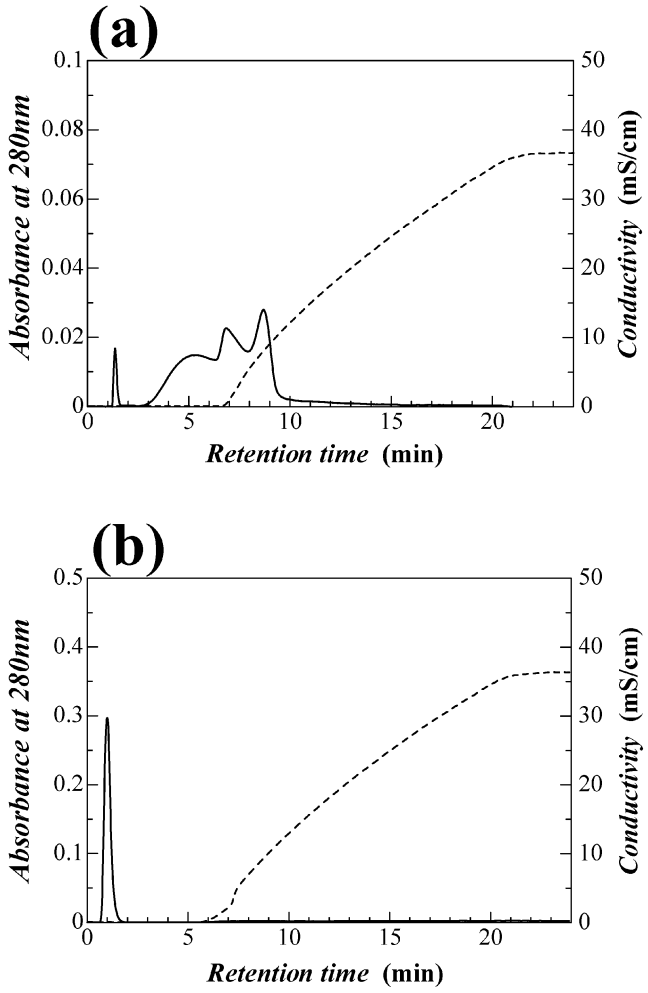


Figure 3. Comparison of chromatogram of cytochrome−c for HAp column and Sulfonate type cation−exchange column with 2 M guanidine containing buffer system.
Cytochrome−c was loaded on two different type of column and eluted by guanidine containing system. (a) HAp column(4.0 I.D.× 100 mm, particle size : 40 μm). (b) Sulfonate type column(4.0 I. D.×100 mm, particle size : 50 μm).

チトクロムCはSulfonate typeカラムに保持されなかった（Figure ３−b)。一方、HApカラムは２ Mグアニジンという比較的高濃度条件下でもチトクロムCを保持し、３つのピークが確認された（Figure ３−a)。以上の結果から、HApカラムは塩基性の強いグアニジン含有系においてSulfonate typeカラムでは保持できないタンパク質を保持することが確認され、HApカラムは比較的高濃度のイオン性物質が存在するグアニジン含有系においてもクロマトグラフィーを行うのに有効であると言える。

3-4 ２M グアニジン含有系におけるクロマトグラフィー画分の再クロマトグラフィー

グアニジン含有系においてチトクロムCが３つのピークに分離したためそれぞれのピークを画分し、再クロマトグラフィーを行った。Figure ４(a)はチトクロムCをHApカラムに注入し、グアニジン含有系（初期溶離液：C、後期溶離液：D）で溶離させ、溶出液を画分したクロマトグラムである。画分は試料注入後、4.５ml通液した時点で開始し、溶出液は1.５mlマイクロチューブに1.１mlずつ画分した。画分A、B、Cはそれぞれ4.５〜5.６ml、６.７〜７.８ml、７.８〜８.９mlの部分である。Figure ４(b)に示すこれらの画分は、それぞれチトクロムCの赤色を示した。

Figure ４(c)は回収したそれぞれの画分A、B、CをHApカラムに500 μl注入し、グアニジン含有系（初期溶離液：C、後期溶離液：D）で溶離したクロマトグラムである。なお、再クロマトグラフィーの試料として使用した画分A、B、Cはリン酸濃度の調節を行っていない。画分A、B、Cはそれぞれが元の溶出位置ごとに溶出すると思われたが、画分AとBは元の位置に溶出せず、画分A、B、C全てがCの位置に溶出した。

Figure ４(d)はそれぞれの画分A、B、CをHApカラムに300 μl注入し、標準系（初期溶離液：A、後期溶離液：B）で溶離したクロマトグラムである。画分A、B、Cはいずれも同位置に溶出したが、その溶出位置はグアニジン含有系の場合とは異なり、未変性チトクロムCを標準系で溶離した場合と同じ溶出位置であった。

４．Conclusion

ハイドロキシアパタイトカラムは一般の合成樹脂系イオン交換カラムと異なり、比較的高濃度のイオン性物質が存在するグアニジン含有系でもクロマトグラフィーが可能であることが確認できた。その溶出傾向は標準系とは異なり、酸性タンパク質と中性タンパク質は保持したが、塩基性タンパク質は保持しなかった。しかし、塩基性タンパク質でもチトクロムCだけは保持し、グアニジンで溶解したチトクロムCを標準系のハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーに適応すると、その溶出位置は未変性チトクロムCの溶出位置と同じであった。

Reference

[1] Tiselius, A.; Hjerten, S.; Levin, Ö. *Arc. Biochem. Biophys.* **1956**, *65*, 132−155.
[2] Kadoya, T.; Isobe, T.; Ebihara, M.; Ogawa, T.; Okuyama, T. *J. Liq. Chromatogr.* **1986**, *9*, 3543−3557.
[3] Lundahl, P.; Watanabe, Y.; Takagi, T. *J. Chromatogr.* **1992**, *604*, 95−102.
[4] Gorbunoff, M. J. *Anal. Biochem.* **1984**, *136*, 425−432.
[5] Gorbunoff, M. J. *Anal. Biochem.* **1984**, *136*, 433−439.
[6] 門屋利彦; 黒須泰行 *LC Family* **1988**, *23*, 9−13.
[7] 門屋利彦; 奥山典生 分析化学 **1983**, *32*, 664−669.
[8] Li, M.; Su, Z. *Chromatographia* **2002**, *56*, 33−38.
[9] 三井東圧化学株式会社、技術資料７、ヒストンの精製

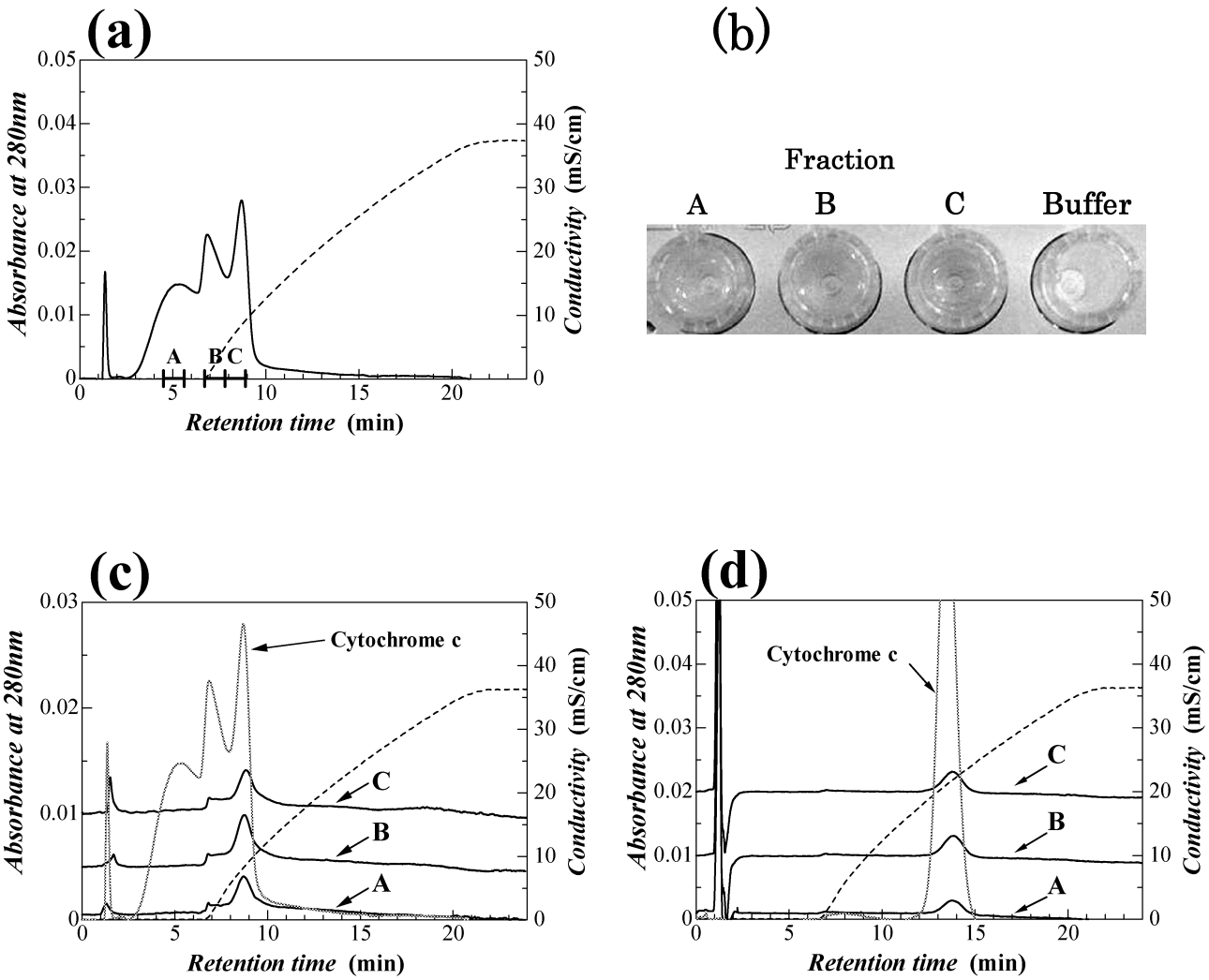


Figure 4. Rechromatography of denatured cytochrome−c on HAp column.
Cytochrome−c was fractionated by HAp column with guanidine containing system. The each fraction was rechromatographed on HAp column with guanidine containing system and standard system. (a) Chromatogram of cytochrome−c with guanidine containing system. (b) Fraction A, B, C and buffer. (c) Chromatogram of fraction A, B, C (500 μl) with guanidine containing system. (d) Chromatogram of fraction A, B, C (300 μl) with standard system.