

D205

アパタイトクロマトグラフィーにおけるタンパク質とDNAの保持機構

(山口大) (学)日隈慎太郎・(学)阿部 光代・(正)吉本 則子・(正)山本 修一

緒言 ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー(HAC)はカルシウムイオンに起因するCサイトと、リン酸基に起因するPサイトを有し、その二つの異なった相互作用により、タンパク質・DNA等に対して独特の分離特性を示すと考えられているが、その保持機構は未だ不明な点が多い。

本研究では、HACの二つのサイト(Cサイト、Pサイト)を移動相添加剤により遮蔽することでタンパク質・DNAへの保持機構について解析した。

実験 AKTAexplorerを使用し、塩濃度直線勾配溶出実験を行った。HACはセラミック球状アパタイト粒子充填カラムを用いた(CHT-Type I, BioRad)。移動相には以下の緩衝液を使用した。

Table 1 buffer (mobile phase) solutions

Base buffer (buffer A) pH6.8	gradient
a 10mM sodium phosphate +0.1mM CaCl ₂	Sodium phosphate
b 10mM HEPES +3.0mM CaCl ₂	Sodium sulfate
c 10mM sodium phosphate+0.1mM CaCl ₂ +1.0M boric acid	Sodium phosphate

a: standard buffer b: for P-site block c: for C-site block
サンプルは合成DNA(poly A, poly T)、bovine serum albumin(BSA)、β-lactoglobulin、lysozyme等のタンパク質を使用した。吸着サイト数Bは勾配溶出実験のピーク溶出塩濃度 I_R と塩濃度勾配 GH から求めた[1]。

結果と考察

i)Pサイト遮蔽によるDNAの溶出挙動 標準移動相におけるSingle-stranded DNA(ssDNA)とDouble-stranded DNA(dsDNA)の分離挙動をFig.1に示した。ssDNAはカラムに保持されないが、dsDNAは若干ではあるが保持されている。塩基数にかかわらず同様の挙動が観察された。イオン交換クロマトグラフィー(IEC)においては、このようなssDNAとdsDNAの極端な保持挙動は見られず、HAの特徴である。この保持挙動には、Pサイトの反発が寄与していると考えられる。緩衝液(b)でPサイトを遮蔽したところssDNA、dsDNAともに保持力が強くなり反発の影響が確認できた(Fig2)。

ii)Pサイト遮蔽によるタンパク質の吸着サイト数 酸性タンパク質β-lactoglobulin(pI=5.2)の勾配溶出実験から吸着サイト数Bを算出した(Table 2)。緩衝液(b)では溶出塩濃度が増加するとともにBは緩衝液(a)の約2倍の値となり、IEC(Resource Q)の値(B=7.9)と近い値となった。

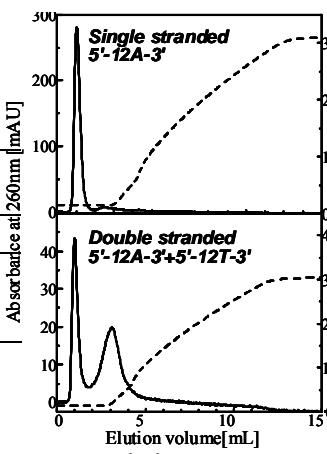
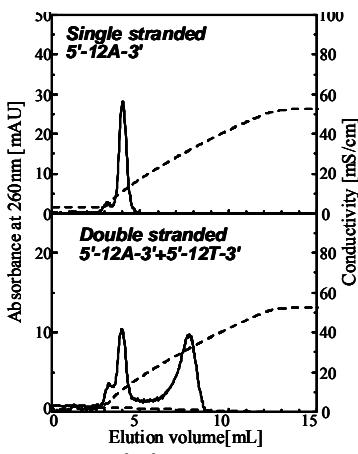
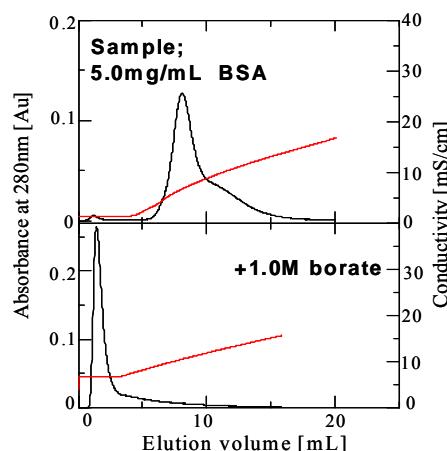
ii)Cサイト遮蔽におけるタンパク質の保持挙動 緩衝液(c)によりCサイトを遮蔽したところ酸性タンパク質は、カラムに保持されなかった。

結言 HACにおいてDNAと酸性タンパク質はCサイトに保持されるが、Pサイトの反発も寄与している。一方、NaClでは溶出されずリン酸が必要であることから、Cサイトとの結合はmetal affinityだと考えられる。塩基性タンパク質はリン酸塩とNaClのどちらでも溶出され陽イオン交換クロマトグラフィーと同様な挙動を示した。

記号表 F :流速[mL/min]、 GH :規格化した勾配 [M]、 I_R :溶出塩濃度 [M]、 B :吸着サイト数[-]

Reference [1] S.Yamamoto, Chemical Engineering & Technology, Vol.28, 1387-1393 (2005)

Absorbance at 260nm [mAU]

Fig1: HACにおける典型的なDNAの溶出挙動
(GH=0.0389, F=1.0mL/min, CHT Type)Fig2: Pサイト遮蔽によるDNAの溶出挙動
(GH=0.0389, F=1.0mL/min, CHT Type)Fig3: Cサイト遮蔽による酸性タンパク質の溶出挙動
(GH=0.0078, F=1.0mL/min, CHT Type)Table 2 Binding site B and peak salt concentraton I_R
Sample: β-lactoglobulin

B	I_R [M] at $GH=0.027$	
	a	b
5.1	8.4	0.23 0.44

a: standard buffer, b: buffer for p-site block

*Fax 0836-85-9201 e-mail shuichi@yamaguchi-u.ac.jp