



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ミセル水性二相分配法によるタンパク質の高性能分離に関する研究
Author(s)	谷, 博文
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	乙第5300号
Issue Date	1998-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3137263
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32686
Type	doctoral thesis
File Information	5300.pdf



学位論文

ミセル水性二相分配法によるタンパク質の
高性能分離に関する研究

1998 年 3 月

谷 博 文

目 次

第1章 序論	1
1-1 はじめに	1
1-2 タンパク質の分離精製	2
1-2-1 水溶性タンパク質の分離	2
1-2-2 膜タンパク質の分離	3
1-3 界面活性剤ミセル水溶液の二相分離に基づくタンパク質の抽出分離	5
1-3-1 界面活性剤ミセルを媒体とする物質分離	5
1-3-2 タンパク質のミセル水性二相分配法	6
1-4 本研究の目的と意義	9
引用文献	11
第2章 界面活性剤ミセル水溶液の二相分離とタンパク質の分配挙動	13
2-1 緒言	13
2-2 実験	13
2-2-1 試薬および装置	13
2-2-2 操作	14
2-3 結果および考察	18
2-3-1 Triton X-114ミセル水溶液の二相分離	18
2-3-2 アルキルグルコシドミセル水溶液の二相分離	24
2-3-3 タンパク質の抽出	31
2-3-4 タンパク質の分配挙動	35
2-4 結言	42
引用文献	43
第3章 アルキルグルコシド系界面活性剤による膜タンパク質の選択的可溶化	45
3-1 緒言	45
3-2 実験	46

3-2-1 試薬および装置	46
3-2-2 操作	46
3-3 結果および考察	49
3-3-1 各種界面活性剤による肝ミクロゾーム中の電子伝達系 膜タンパク質の可溶化	49
3-3-2 アルキルグルコシド系界面活性剤による可溶化特性	49
3-3-3 可溶化によるチトクロム b_5 とチトクロムP450の分離	56
3-4 結言	59
引用文献	61

第4章 アルキルグルコシド系界面活性剤ミセル-水溶性ポリマー混合水溶液の

二相分離による膜タンパク質の抽出分離	63
4-1 緒言	63
4-2 実験	64
4-2-1 試薬および装置	64
4-2-2 操作	64
4-3 結果および考察	65
4-3-1 相分離条件の検討	65
4-3-2 非荷電ポリマー共存下における精製したチトクロム b_5 およびチトクロムP450の抽出	67
4-3-3 荷電ポリマー共存下における精製したチトクロム b_5 およびチトクロムP450の抽出	75
4-3-4 肝ミクロゾーム中のチトクロム b_5 およびチトクロムP450 の抽出分離	80
4-4 結言	84
引用文献	87

第5章 ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系界面活性剤ミセル水溶液の	
二相分離による膜タンパク質の抽出分離	89
5-1 緒言	89
5-2 実験	89
5-2-1 試薬および装置	89
5-2-2 操作	90
5-3 結果および考察	92
5-3-1 相分離条件の検討	92
5-3-2 各種デキストラン共存下における精製したチトクロム b_5	
およびNADH-チトクロム b_5 還元酵素の抽出	92
5-3-3 各種デキストラン共存下における肝ミクロゾーム中のチトクロム b_5	
およびNADH-チトクロム b_5 還元酵素の抽出	97
5-3-4 ミセル水性二相分配法による肝ミクロゾーム中の	
チトクロム b_5 の分離	100
5-4 結言	108
引用文献	109
第6章 トリブロックコポリマー水溶液の相分離によるタンパク質の抽出分離	111
6-1 緒言	111
6-2 実験	112
6-2-1 試薬および装置	112
6-2-2 操作	112
6-3 結果および考察	113
6-3-1 トリブロックコポリマー水溶液の曇点ならびに二相分離特性	113
6-3-2 チトクロム c およびチトクロム b_5 の抽出	117
6-4 結言	130
引用文献	131

第7章 総括	133
--------	-----

謝 辞	137
-----	-----

第1章 序論

1-1 はじめに

近年の生命科学の著しい進歩により、生体の持つさまざまな機能が解明されつつある。生体機能の解明にともない、バイオテクノロジーは著しく発展し、その技術によって生産された物質は、食品、医薬品、染料、洗剤、化粧品、農薬などさまざまな分野に浸透してきた。一方、生産技術のみならず、生体機能を利用した分離分析法も開発されている。固定化酵素、タンパク質によるバイオセンサーやアフィニティークロマトグラフィーなどがその例である。これらの分離分析技術はバイオテクノロジーによる物質生産を支援する技術としてフィードバックされる。生命科学の進歩により発展した分離分析技術が、逆に生命科学の進歩を支えていることは言うまでもない。

バイオテクノロジーを基礎とする生産プロセスは、遺伝子操作による目的タンパク質の発現、細胞融合による大量培養およびバイオリアクターによる目的物質の合成などのアップストリームとそれらを分離精製するダウンストリームとよばれる段階からなる。アップストリームにおける技術は、まさにバイオテクノロジーを象徴する技術であり、目覚ましい進歩を遂げている。一方、ダウンストリームでは生産物は主にカラムクロマトグラフィーによって分離精製されている。カラムクロマトグラフィーは非常に高い選択性を有する反面、操作に熟練と長時間を要する。また、カラム担体は一般的に非常に高価であるため、生産コストの大半を精製プロセスが占めることになる。一方、従来の化学工業プロセスにおいて確立されている蒸留、溶媒抽出など精製技術は、タンパク質などの変性しやすい物質には対応できない。したがって、プロセス工学的に対応しうる迅速、簡便でかつ安価なタンパク質の分離法を開発することは、これまでのタンパク質の精製プロセスの効率化を図るだけでなく、新たな生産プロセスを構築するうえで重要な課題である。このような背景から本研究では、生体物質の中でも変性しやすいタンパク質の分離法としてミセル水性二相分配法に着目し、その高性能化を試みた。

1-2 タンパク質の分離精製

タンパク質 "protein" はギリシャ語の "proteios" (最も重要なもの)をその語源としている。その名前が示すように、タンパク質は生体の構造と機能の基本的かつ不可欠な担い手であり、それなくして生命はありえない。したがって、生命を分子レベルで理解するためには、タンパク質を理解することが不可欠である。しかし、タンパク質の機能、構造、生理的役割を解明するためには、実体としての個々のタンパク質を純粋に単離しなければならない。また、タンパク質の機能を*in vitro*で利用した固定化酵素、抗体触媒、酵素免疫測定などもタンパク質の精製なくしては成しえないものである。

1-2-1 水溶性タンパク質の分離

タンパク質の性質は極めて多彩で、種類も多く、人間の体だけでも10万種のタンパク質が存在するといわれている。これらは、変性しやすいものから安定なもの、水溶性のものから難溶性のものまでさまざまである。タンパク質の中でも水溶性タンパク質に関しては、その扱いやすさから、これまでに数多くの分離精製法が確立されている。水溶性タンパク質の分離操作は以下のように行われている。

まず生体組織を摘出したのち破碎し、遠心分離あるいはろ過などにより不溶性の画分を除去する（細胞分画）。次に、塩やアルコール、水溶性ポリマーなどを用いて分別沈殿を行い（粗分離、濃縮）、水に再溶解したのち、カラムクロマトグラフィーで最終精製を行う。分別沈殿のみによって精製が行われる場合もあるが、通常この方法では十分な分離能は得られず、その簡便さと迅速さにより前段分離法あるいは濃縮法としての役割に位置づけられている。現在、目的タンパク質の純度を上げる操作はクロマトグラフィーによって行われている。クロマトグラフィーによるタンパク質の分離は、1950年にPaléusら¹⁾によって弱酸性陽イオン交換樹脂AmberliteIRC-50を用いたチトクロムcの分離が行われて以来、著しい発展を遂げてきた。現在ではタンパク質の精製に必要不可欠とされており、用いられているカラムの種類も、イオン交換、ゲルろ過、疎水性、吸着、逆相、アフィニティなど多岐にわたっている。通常これらの分離モードの異なる各種カラムを組合せることによりタンパク質の精製が行われている。カラムクロマトグラフィーでは、幾本ものカラムをシリーズにつなぎ、吸脱着操作を繰り返すため、その優れた分離能とは対照的に、操作に熟練と非常に長い時間を必要とする。また、カラム担体は非常に高価であるため、コ

ストのかかる分離法でもある。したがって、迅速かつ簡便な粗分離操作によってタンパク質の純度を高め、いかにカラム法への負荷を抑えるかが重要な課題となる。

このようなタンパク質の前分離法として、ポリマー水性二相分配法がある。この方法は、二種の異なる水溶性ポリマーあるいは水溶性ポリマーと塩の混合水溶液が二相に分離する現象を利用した抽出法であり、1958年にAlbertsson²⁾によって開発された。ポリマー水性二相分配法は液液抽出法であるため操作が簡便でスケールアップが容易であり、有機溶媒を使わないのでタンパク質に対しても変性作用が少ないなどのメリットがある。また、非常に小さい界面張力のため細胞や細胞内顆粒をも扱うことが可能である。当初は選択性の低さに問題があったが、現在では、アフィニティリガンドや荷電置換基のポリマーへの導入、多段抽出などによる分離能の改善が試みられており³⁾、精製過程におけるカラムクロマトグラフィーへの依存度の低減に貢献している。

しかし、ポリマー水性二相分配法で扱うことができるのは、水溶性タンパク質に限られており、以下に述べる膜タンパク質のような水に難溶なタンパク質を取り扱うことはできない。

1-2-2 膜タンパク質の分離

膜タンパク質のように疎水的で水に不溶あるいは難溶なタンパク質の分離精製技術はいまだ発展途上にある。

SingerとNicolson⁴⁾によって提唱された生体膜の流動モザイクモデルに示されるように、膜タンパク質（中でも膜内在性タンパク質）は生体膜の内部に深く潜り込み、疎水性相互作用によって膜と強固に結合している。そのため膜タンパク質の分離精製においては、まず細胞分画により膜成分を分離回収したのち、目的の膜タンパク質を水溶液中に可溶化することが必要となる。可溶化された膜タンパク質は、水溶性タンパク質と同様、分別沈澱やカラムクロマトグラフィーにより精製することが可能である。

膜タンパク質の可溶化はその目的に応じて大きく二つの方法に分けることができる。一つは、膜に埋まっていない親水性の部分を膜と結合している疎水性の部分から切り離す方法である。この二つの部分の切断には、プロテアーゼやリパーゼなどの酵素が用いられ、切り離された膜タンパク質の親水性の部分は水溶性タンパク質と同様に取り扱うことができる。膜酵素の触媒活性が親水性部分に存在し、その活性のみを得たい場合、この方

法はよく用いられる。しかし、プロテアーゼ処理による可溶化は全ての膜タンパク質に適用できるものではなく、中には小さなペプチド断片にまで切断されてしまう場合もある。また、膜タンパク質の全体像が知りたい場合にもこの方法は適用できない。

もう一つは、生体膜構造を破壊し、膜タンパク質をそのままの形で可溶化する方法である。これには有機溶媒を用いたり、尿素やグアニジンなどの解膠剤を加えたりする方法が用いられていたが、これらの方法では膜タンパク質の変性を引き起こしたり、十分な可溶化ができないといった問題がある。そのため現在では、膜タンパク質の可溶化には界面活性剤が主に用いられている⁵⁾。脂質と同じ両親媒性分子である界面活性剤は、結合している脂質分子と置換することにより膜タンパク質を水溶液中に可溶化する。界面活性剤については次節で詳しく説明する。

可溶化後の膜タンパク質の分離プロセスにおいて、界面活性剤が共存することによる問題点がいくつか挙げられる⁶⁾。

- ・塩析操作において、非イオン界面活性剤の共存により分別沈澱が困難となる。非イオン界面活性剤が結合することにより、膜タンパク質表面の静電的特徴が弱められてしまうためと考えられる。
- ・遠心分離やゲルろ過クロマトグラフィーなどサイズの違いに基づく分離法では、界面活性剤の存在によりその分解能が低下する。これは、界面活性剤の結合により膜タンパク質間のサイズの違いがマスクされてしまうためである。
- ・イオン交換やハイドロキシアパタイトなどタンパク質の静電的性質の違いを利用したクロマトグラフィーでは、陰（あるいは陽）イオン界面活性剤を用いることはできない。等電点クロマトグラフィーについても同様である。
- ・疎水性クロマトグラフィーでは、界面活性剤は膜タンパク質と疎水性担体間の相互作用を阻害してしまう。

すなわち界面活性剤は、膜タンパク質を可溶化させるのに最も適しているにも関わらず、膜タンパク質と分離媒体との相互作用の妨げとなっている。

通常、膜タンパク質は生体膜中に存在するときもとても安定とされており、界面活性剤によって可溶化（脱脂質化）された状態では、構造安定性や酵素活性に関して溶液条件など周囲の影響を著しく受けやすくなる。またプロテアーゼによる分解を受けやすくなることも知られている。したがって精製の際には、膜タンパク質の安定性と分離能の両方を

考慮した上で、界面活性剤の種類や濃度を含めた最適条件の検討が必要不可欠である。また、各分離ステップにおいて最適化した界面活性剤の条件は、上述したような問題から次のステップにおいても最適な条件であるとは限らない。この場合、界面活性剤の置換などの操作が必要となる。

以上のように、膜タンパク質の分離精製は水溶性タンパク質に比べ、非常に困難であり、したがって分離プロセスの中心となるクロマトグラフィーへの負荷は著しく増大することになる。そのため、水溶性タンパク質の分離におけるポリマー水性二相分配法のような、カラム法への依存度を大幅に低減させる新規な膜タンパク質の分離法が望まれている。

ここでは可溶化に必要な不可欠な界面活性剤が、膜タンパク質と分離媒体との相互作用を抑制し、分離能を低下させるものとして捉えてきた。しかし近年では、この界面活性剤を媒体として積極的に利用した物質分離法が開発されている。

1-3 界面活性剤ミセル水溶液の二相分離に基づくタンパク質の抽出分離

1-3-1 界面活性剤ミセルを媒体とする物質分離

界面活性剤とはその分子内に親水基と疎水基を有する、いわゆる両親媒性物質である。水溶液中において低濃度で存在する界面活性剤分子は、単分子として分散しているが、ある濃度以上ではそれらが会合し、ミセルと呼ばれる動的な分子集合体を形成する。このミセル形成が起こる濃度は臨界ミセル濃度(critical micellar concentration, cmc)と呼ばれる。ミセル形成に参加している界面活性剤分子は、親水基をバルク水相に、疎水基をミセル内部に向けた構造を持っており、ミセルの大きさ(会合数)や形状はそれを形成する界面活性剤分子の種類や温度、共存物質などに依存する。一般的に、ミセルの直径は数十～数百オングストロームと非常に小さいので、ミセル水溶液は見掛け上普通の水溶液と変わりなく、擬均一溶液として扱うことができる。

界面活性剤分子が会合してミセルを形成すると、その内部は非常に疎水的な雰囲気になっている。そのため、ミセル水溶液において水に不溶な物質はミセル内部に取り込まれ、見掛け上溶解度を増す。この現象を可溶化と呼ぶ。ミセルを擬似的な相とみなしたとき、可溶化現象は水－ミセル二相間の分配現象と捉えることができる^{7,8)}。先にも述べたようにミセルは非常に小さく、動的な分子集合体であるため、この分配平衡は迅速に達成さ

れる。このような観点から、ミセルを媒体とする分離法がいくつか提案されてきた⁹⁻¹¹⁾。

ミセルを用いた分離法の利点として、以下のことが挙げられる。(1) 同じ二相間分配現象を利用した分離法である溶媒抽出のように有機溶媒を用いる必要がなく、人体や自然環境に対する影響が少ない。(2) 取り扱いが簡便である。(3) ミセルが非常にミクロな相であるため、バルク相間の分配には見られない新規な分離挙動が期待できる。(4) ミセル相の性質を制御しやすい。

Armstrongら⁸⁾は、高性能液体クロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィーの移動相にミセルを導入したミセルクロマトグラフィーを提案した。通常の液体クロマトグラフィーは溶質の固定相－移動相間の分配を利用するものであるのに対し、ミセルクロマトグラフィーは固定相、バルク水相、ミセル相の三相間の分配を利用したものである。したがって、界面活性剤の濃度や種類を変えることによって、溶質の保持を制御することが可能となる¹²⁾。この方法は、親水性、疎水性を問わず生体物質や金属キレートの分離など幅広く応用されている¹³⁻¹⁶⁾。

Terabeら^{17,18)}は、充填剤を用いない新規なクロマトグラフィーとしてミセル動電キャピラリークロマトグラフィーを提案した。この方法はキャピラリーを荷電ミセル水溶液で満たし、その両端に電圧をかけることによって発生する電気浸透流を移動相、これと逆方向に流れようとする荷電ミセルを動的な固定相とするものであり、フェノール類やアミノ酸誘導体、金属キレートやなどの分離に応用されている^{19,20)}。

以上の方法がクロマトグラフィーへの応用であるのに対して、Watanabeら²¹⁾はミセルを用いた液液抽出分離法として曇点抽出法（ミセル水性二相分配法）を開発し、金属キレートの分離・濃縮に応用した²¹⁻²⁴⁾。この方法は、Fig.1-1に示すようにポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルに代表される非イオン界面活性剤のミセル水溶液が曇点と呼ばれる一定の温度以上で、水相とミセルが濃縮した界面活性剤相の二相に分離する現象を利用したものである。曇点抽出では、ミセルに可溶化されていた物質は界面活性剤相に抽出される。また、界面活性剤相の体積が小さいために目的物質の濃縮も期待できる。そのため現在では、様々な有機化合物の分離にも応用されている^{25,26)}。

1-3-2 タンパク質のミセル水性二相分配法

Bordier²⁷⁾はこのミセル水性二相分配法を、界面活性剤ミセルで可溶化した膜タンパク

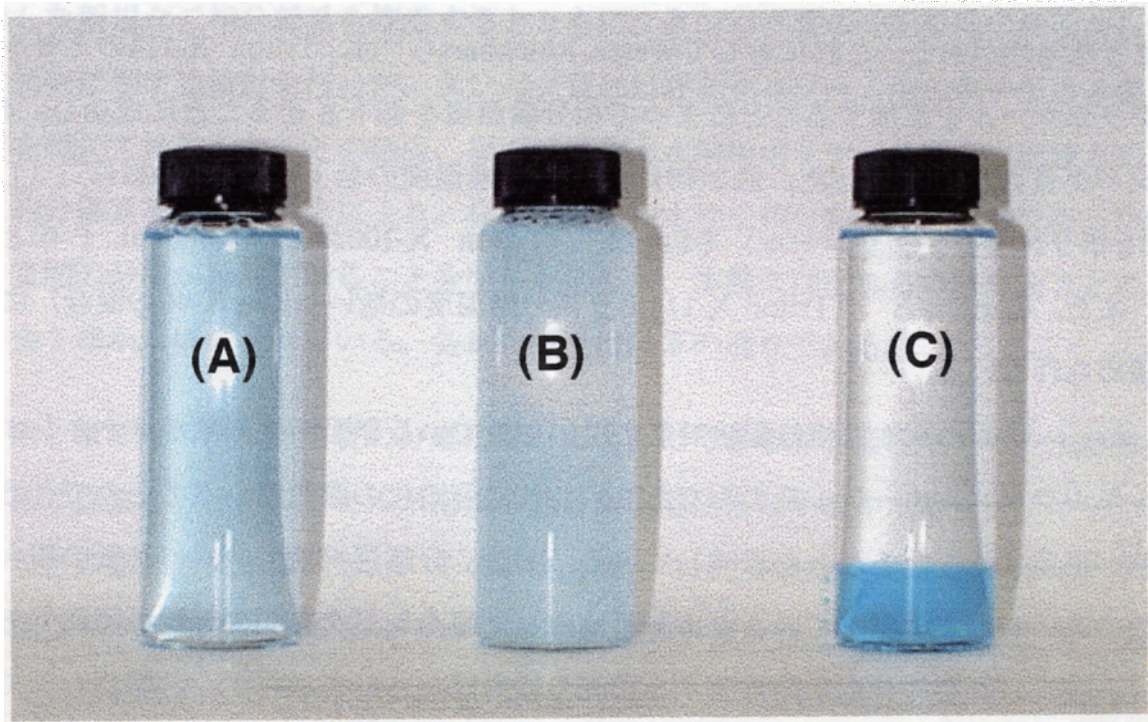


Fig. 1-1 Two-phase separation in aqueous Triton X-114 micellar solution. The solutions are colorized by the addition of hydrophobic dye, Coomassie Brilliant Blue G-250. (A) Homogeneous micellar solution below the cloud point, (B) Turbid above the cloud point, (C) Two-phase separation by standing or centrifuging the clouding solution. Upper of the solution is an aqueous phase and lower is a surfactant-rich phase in which the dye is extracted and concentrated.

質の抽出分離に応用した。この方法は現在、膜タンパク質の精製のための前処理法やタンパク質のキャラクタリゼーションなどに広く用いられている^{25,26,28,29)}。相分離のためには水溶液の温度を上げなければならない、主に用いられているTriton X-114のミセル水溶液の場合、通常約30℃である。このような温度では、熱に弱い膜タンパク質の変性を引き起こしてしまう危険性がある。これに対してWerck-Reichhartら³⁰⁾は、Triton X-114のミセル水溶液にグリセロールを添加することによって相分離温度を低下させることに成功し、4℃で膜タンパク質の抽出を行った。添加物による相分離温度の低下はYamazakiら³¹⁾ (Triton X-100とポリエチレングリコール) やFricke³²⁾ (Triton X-100およびNonident P-40と無機塩)、また、Ganongら³³⁾ (Triton X-114より相分離温度の低いTriton X-40の混合) によっても認められている。

しかし、ミセル水性二相分配法で主に用いられている界面活性剤はポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系のみであり、これは可溶化の際に用いることのできる界面活性剤が限定されていることを意味している。また、分離選択性がタンパク質の親水性、疎水性の違いのみに依存しているため、可溶化した膜タンパク質間の分離が困難である。さらに、タンパク質の分配挙動に関する詳細な検討はなされておらず、分離法としての基礎さえ確立していないのが現状である。したがって現時点では、この方法は膜タンパク質の精製においてカラム法への依存度を低減させるに至っていない。

最近、Garavitoら³⁴⁾は膜タンパク質の可溶化に用いられているアルキルグルコシド系界面活性剤の一つであるオクチルグルコシドの水溶液が、水溶性ポリマーであるポリエチレングリコールの添加によって水相と界面活性剤相の二相に分相することを見い出した。この二相は、ポリエチレングリコールを含んだ水相と、オクチルグルコシドが濃縮された界面活性剤相によって構成されている。さらに、この相分離はポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系界面活性剤の場合とは逆に、温度を低下させることによって起こる現象であることが見い出された³⁵⁻³⁷⁾。また、ポリエチレングリコールは、先にも述べたように、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系界面活性剤の相分離温度を低下させる働きを持っている。これらのポリマー誘導型の二相分離系は、界面活性剤の選択の幅を広げるだけでなく、二成分系であるため、その両方から系や分配の制御が可能となると考えられる。

1-4 本研究の目的

本論文では、ミセル水性二相分配法によるタンパク質の高性能分離法の確立を目的とし、Triton X-114およびアルキルグルコシド系界面活性剤と水溶性ポリマーの組合せを中心とした新規な二相分離系を探索するとともに、タンパク質の分配挙動の解明ならびに分配の制御に関する検討を行った。タンパク質には肝ミクロゾーム中の電子伝達系膜タンパク質を用いて検討した。その結果、界面活性剤と水溶性ポリマーの混合水溶液という新たな二相分離系を用いることにより、従来のミセル水性二相分配法では困難であった膜タンパク質間の分離が可能になることを明らかにした。本論文はそれらの経緯をまとめたもので、全7章から構成されている。各章の概要は以下の通りである。

第2章では、タンパク質の分離に用いることのできる界面活性剤ミセル水溶液の二相分離系の探索を行った。ミセル水溶液の相分離温度に及ぼす塩や水溶性ポリマー、ポリオールなどの添加効果を検討した。その結果、単独では二相分離しないアルキルグルコシド系界面活性剤がポリエチレングリコールやデキストランなどの水溶性ポリマーの添加によって二相分離することを見出した。また、Triton X-114も水溶性ポリマーや塩の添加によって相分離が促進されることを見出した。次いで、これらの二相分離系を用いてタンパク質の分配挙動を調べた。

第3章では、膜タンパク質のミセル水性二相分配に先立って行う可溶化について、ミクロゾーム中の電子伝達系膜タンパク質を対象に検討した。アルキルグルコシド系界面活性剤を用いたとき、チトクロム b_5 とNADPH-チトクロムP450還元酵素はほとんどが可溶化されたのに対し、チトクロムP450およびNADH-チトクロム b_5 還元酵素は可溶化しないことを見出した。さらに、アルキルグルコシド系界面活性剤の高い可溶化選択性を利用して、チトクロムP450とチトクロム b_5 の簡便な分離法を提案した。

第4章では、アルキルグルコシド系界面活性剤ミセル水溶液と水溶性ポリマー混合水溶液からなる二相分離系において、タンパク質の分配に及ぼすポリマー電荷の影響について検討した。ポリエチレングリコールやデキストランのような非荷電ポリマーを用いると、水溶性タンパク質はポリマーを含んだ水相に、疎水的な膜タンパク質は界面活性剤相に抽出されることを見出した。一方、ジエチルアミノエチルデキストランのような荷電ポリマーを用いると、タンパク質の分配はその電荷によっても大きく左右されることを見出

し、水溶性ポリマーに機能性置換基を導入することによる膜タンパク質の選択的分離の可能性を明らかにした。

第5章では、Triton X-114ミセル水溶液と水溶性ポリマーの混合水溶液からなる二相分離系について、第4章と同様にタンパク質の分配に及ぼす電荷の効果について検討した。この二相分離系においても、非荷電ポリマーを用いた場合、タンパク質の親疎水性によって、また、荷電ポリマーを用いるとタンパク質との静電的相互作用によって分配が制御されることを見出した。さらにTriton X-114-硫酸デキストラン二相分離系を肝ミクロゾーム中のチトクロム b_5 の精製に応用した。

第6章では、ポリエチレンオキシド(PEO)とポリプロピレンオキシド(PPO)からなるトリブロックコポリマー(Pluronic)の水溶液が二相分離することに着目し、この二相分離系におけるタンパク質の分配挙動について検討した。PPO-PEO-PPO型とPEO-PPO-PEO型のPluronicを用いてタンパク質の抽出を行った。その結果、水溶性タンパク質であるチトクロムcはいずれの場合もほとんど抽出されないのに対し、疎水性のチトクロム b_5 はPEO-PPO-PEO型のPluronicを用いた場合のみ界面活性剤相に抽出されることを見出した。この抽出挙動の違いについて、界面活性剤の構造のわずかな違いに起因することを述べ、この二相分離系を用いた膜タンパク質の新たな分離法の可能性を述べた。

第7章では、本研究を総括した。

引用文献

- 1) S. Paléus and J. B. Neilands, *Acta Chem. Scand.*, **4**, 1024-1030 (1950).
- 2) P.-Å. Albertsson, *Nature*, **182**, 709-711 (1958).
- 3) H. Walter, D. E. Brooks, and D. Fisher (Eds.), "*Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems Theory, Methods, Uses, and Applications to Biotechnology*", Academic Press, Inc., Orlando, 1985.
- 4) S. J. Singer and G. L. Nicolson, *Science*, **175**, 720-731 (1972).
- 5) A. Helenius and K. Simons, *Biochim. Biophys. Acta*, **415**, 29-79 (1975).
- 6) G. von Jagow and H. Schägger (Eds.), "A Practical Guide to Membrane Protein Purification", Academic Press, Inc., San Diego, 1994.
- 7) L. K. J. Tong and M. C. Glesmann, *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 4310-4313 (1957).
- 8) D. W. Armstrong and F. Nome, *Anal. Chem.*, **53**, 1662-1666 (1981).
- 9) W. L. Hinze and D. W. Armstrong (Eds.), "*Ordered Media in Chemical Separation*", American Chemical Society, Washington, DC, 1987.
- 10) D. W. Armstrong, *Sep. Purif. Methods*, **14**, 213-304 (1985).
- 11) E. Pramauro and E. Pelezetti, "*Surfactants in Analytical Chemistry - Application of Organized Amphiphilic Media*", Elsevier, Amsterdam, 1996.
- 12) P. Yarmchuk, R. Weinberger, R. F. Harsch, and L. J. C. Love, *Anal. Chem.*, **54**, 2233-2238 (1982).
- 13) D. W. Armstrong and R. Q. Terrill, *Anal. Chem.*, **51**, 2160-2163 (1979).
- 14) R. A. Barford and B. J. Sliwinski, *Anal. Chem.*, **56**, 1554-1556 (1984).
- 15) Z. E. Rass and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, **283**, 270 (1983).
- 16) C. M. Kirkman, C. Zu-Ben, P. C. Uden, W. J. Stratton, and D. E. Henderson, *J. Chromatogr.*, **317**, 569-578 (1984).
- 17) S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, and T. Ando, *Anal. Chem.*, **56**, 111-113 (1984).
- 18) S. Terabe, K. Otsuka, and T. Ando, *Anal. Chem.*, **57**, 834-841 (1985).
- 19) K. Otsuka and S. Terabe, *Hyomen*, **28**, 405-415 (1990).
- 20) T. J. Kasper, M. Melena, P. Gozel, and R. G. Brownlee, *J. Chromatogr.*, **458**, 303-312 (1988).

- 21) H. Watanabe and H. Tanaka, *Talanta*, **25**, 585-589 (1978).
- 22) H. Watanabe, in "*Solution Behavior of Surfactants*", K. L. Mittal and E. J. Fendler (Eds.), p 1305-1316, Plenum Press, New York, 1982.
- 23) S. Kawamorita, H. Watanabe, and K. Haraguchi, *Anal. Sci.*, **1**, 41-45 (1985).
- 24) T. Saitoh, Y. Kimura, T. Kamidate, H. Watanabe, and K. Haraguchi, *Anal. Sci.*, **5**, 577-581 (1989).
- 25) W. L. Hinze and E. Pramauro, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **24**, 133-177 (1993).
- 26) H. Tani, T. Kamidate, and H. Watanabe, *J. Chromatogr. A*, **780**, 229-241 (1997).
- 27) C. Bordier, *J. Biol. Chem.*, **256**, 1604-1607 (1981).
- 28) T. Saitoh, H. Tani, T. Kamidate, and H. Watanabe, *Trends Anal. Chem.*, **14**, 213-217 (1995).
- 29) A. Sánchez-Ferrer, R. Bru, and F. García-Carmona, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 275-313 (1994).
- 30) D. Werck-Reichhart, I. Benveniste, H. Teutsch, F. Durst, and B. Gabriac, *Anal. Biochem.*, **197**, 125-131 (1991).
- 31) M. Yamazaki, M. Ohshika, and T. Ito, *Biochim. Biophys. Acta*, **1063**, 175-177 (1991).
- 32) B. Fricke, *Anal. Biochem.*, **212**, 154-159 (1993).
- 33) B. R. Ganong and J. P. Delmore, *Anal. Biochem.*, **193**, 35-37 (1991).
- 34) R. M. Garavito and J. P. Rosenbusch, *J. Cell Biol.*, **86**, 327-329 (1980).
- 35) R. M. Garavito, Z. Markovic-Housley, and J. A. Jenkins, *J. Crystal Growth*, **76**, 701-709 (1986).
- 36) H. Michel, *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 56-59 (1983).
- 37) M. Zulauf, in "*Crystallization of Membrane Proteins*", H. Michel (Ed.), p. 53-72, CRC Press, Boca Raton, 1991.

第2章 界面活性剤ミセル水溶液の二相分離とタンパク質の分配挙動

2-1 緒言

Triton X-114 (TX114) などのポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルに代表される非イオン界面活性剤のミセル水溶液は、曇点と呼ばれる温度で、ミセルが濃縮した界面活性剤相と界面活性剤をほとんど含まない水相の二相に分離することが知られている。この二相間における物質の分配現象を利用して、水に難溶な金属キレート、有機化合物あるいは膜タンパク質などの抽出分離が行われている¹⁻⁴⁾。これまで低分子化合物の分配挙動は詳細に検討されているが、タンパク質に関しては、親疎水性のみが分配を支配していると考えられているものの、詳細な分配挙動についてはほとんど明らかにされていない。さらに、実試料への応用に関しても、系を操作することによる選択性の制御、すなわち分離システムとしての高性能化に関する研究例は少ない。

一方、界面活性剤ミセル水溶液の二相分離挙動は、様々な添加物によって影響を受けることが知られている。ポリオキシエチレンアルキルエーテル系非イオン界面活性剤ミセル水溶液の曇点温度は、塩、水溶性ポリマー、グリセロールなどの添加によって低下することが知られている¹⁾。また、近年、膜タンパク質の可溶化に用いられているアルキルグルコシド (AG) 系界面活性剤はポリエチレングリコールの添加によって、二相に分離することが知られている^{5,6)}。このような添加物は、相分離挙動だけでなくタンパク質の分配にも影響を及ぼすことが予想される。

そこで本章では、Triton X-114およびアルキルグルコシドの二相分離に及ぼす添加物の影響を検討し、タンパク質の抽出選択性の制御が可能となる新しい二相分離系を探索するとともに、タンパク質の分配挙動について検討した⁷⁾。

2-2 実験

2-2-1 試薬および装置

TritonX-114 (TX114) はナカライテスク社製を使用した。アルキルグルコシド (AG) である*n*-オクチル- β -D-グルコシド (OG), *n*-ヘプチル- β -D-チオグルコシド (HTG) および*n*-オクチル- β -D-チオグルコシド (OTG) はドータイト製を、*n*-ノニル- β -

D-グルコシド (NG) はSigma社製の市販品を特に精製せずに使用し、10% (w/v) 水溶液として要時調製した。TX114と用いたAG系界面活性剤の構造をFig.2-1に示す。

ポリエチレングリコール4000 (PEG4000, 分子量4,000), ポリエチレングリコール6000 (PEG6000, 分子量7,500), ポリエチレングリコール20,000 (PEG20,000, 分子量20,000), ポリエチレングリコール500,000 (PEG500,000, 分子量500,000), ポリエチレングリコール2,000,000 (PEG2,000,000, 分子量2,000,000), ポリビニルピロリドン (PVP) およびメチルセルロース400cp (MC) はいずれも和光純薬製のものを特に精製せずに使用した。デキストランT-500 (Dx), DEAE-デキストラン (DEAE-Dx) および硫酸デキストラン (Dx-S) (いずれもPharmacia社製, 分子量500,000) は100°Cで乾燥, 恒量したのち使用した。フィコール type400 (Ficoll, 分子量400,000) はSigma社製のものを使用した。以上の水溶性ポリマーは全て水溶液として保存した。用いたポリマーの構造をFig.2-2に示す。

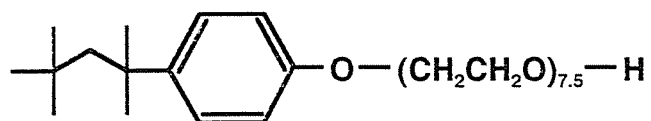
バクテリオロドプシン (BR, Halobacterium halobium由来), ペルオキシダーゼ (POD, 西洋ワサビ由来), チトクロムc (Cyt.c, ウマ心臓由来), ヘモグロビン (Hb, ウマ赤血球由来), アルブミン (BSA, 仔牛血清由来), トリプシン (Try, ウシ膵臓由来) およびコンカナバリンA (ConA, タチナタマメ由来) はいずれもSigma社製のものを用了。チトクロム b_5 (Cyt. b_5) はラット肝ミクロゾームから精製したものを, Cyt. b_5 の親水ドメイン (t-Cyt. b_5) は, 精製したCyt. b_5 をトリプシン消化して得たものを使用した。

その他の試薬は全て市販品の特級を特に精製せずに使用した。

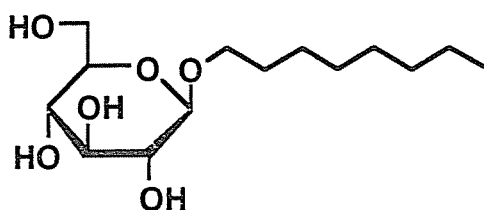
水溶液の温度調整にはヤマト-コマツ製CTE42A型恒温槽を使用した。吸光度の測定には日立製U-2000型ダブルビーム分光光度計を使用した。二相分離を促進するための遠心分離には国産製H-200NR型冷却小型高速遠心機を使用した。

2-2-2 操作

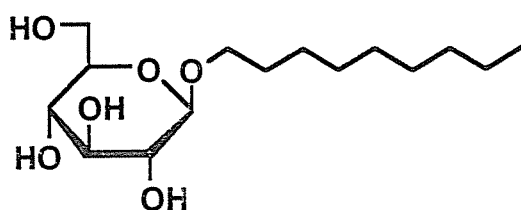
(1) 相分離温度の測定: 添加物およびpH緩衝液を含む界面活性剤ミセル水溶液 1 mlを1.5-mlのサンプルチューブに分取した。この溶液の温度を恒温槽中で, 0.5°C/15minの割合で昇温し, 溶液の濁りを観察した。溶液が最後に白濁した温度もしくは最初に曇った温度を相分離温度とした。



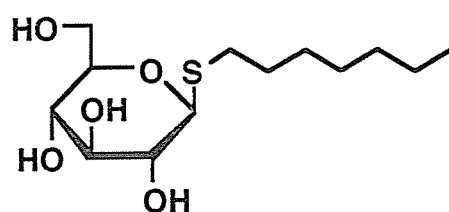
Triton X-114



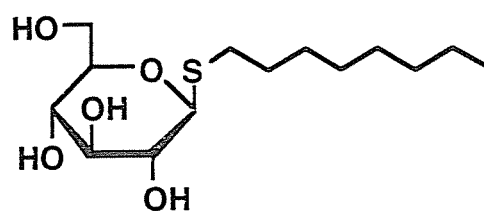
Octylglucoside



Nonylglucoside

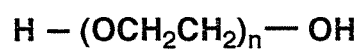


Heptylthioglucoside

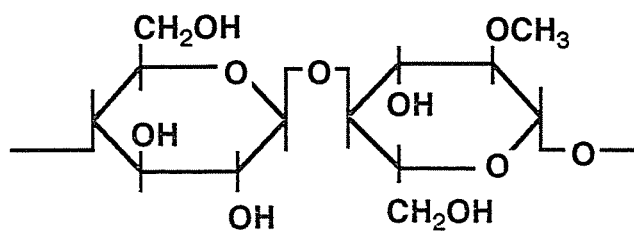


Octylthioglucoside

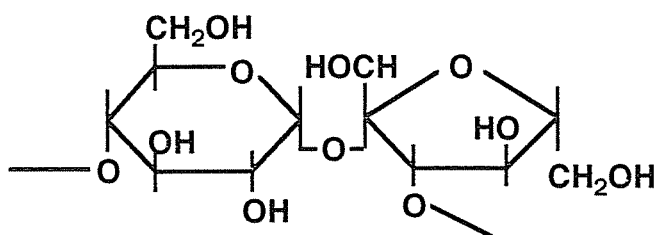
Fig. 2-1 Structures of Triton X-114 and alkylglucosides.



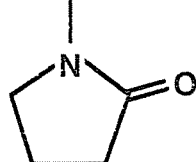
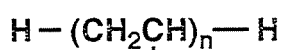
Polyethylene glycol



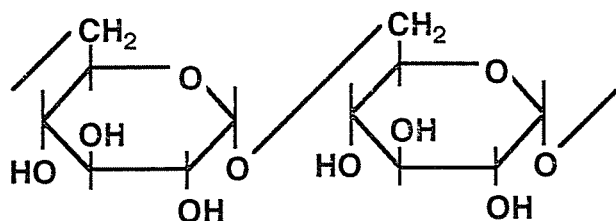
Methylcellulose



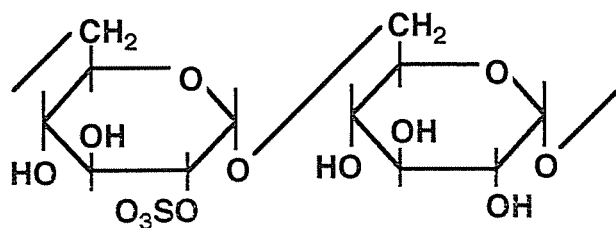
Ficoll



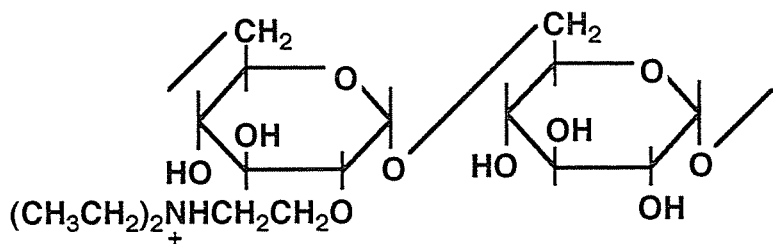
Polyvinylpyrrolidone



Dextran



Dextran Sulfate



Diethylaminoethyl-Dextran

Fig. 2-2 Structures of water-soluble polymers

(2) 相体積の測定：内径約 2 mm，長さ約20cmのガラス管に添加物およびpH緩衝液を含む界面活性剤ミセル水溶液を注入し，この溶液を所定の温度で分相させた。水相と界面活性剤相とが完全に分離し，両相の体積が一定になったとき，二液相界面と気-液相界面を正確に読み取り，印を付けた。その後ガラス管を良く洗浄・乾燥し，精秤した。次に四塩化炭素を上述の印までガラス管に注入し，その時の重量を測定した。測定した重量からガラス管の重量を差し引いた値を四塩化炭素の密度で割り，各相の体積を算出した。二液相界面まで注入した四塩化炭素量が界面活性剤相の体積で，気-液相界面まで注入した四塩化炭素量が初めに注入した混合水溶液の体積である。水相の体積は両者の差から求めた。

(3) チトクロム b_5 の精製：Kamatakiら⁸⁾の方法に準じて行った。ラット肝ミクロゾームからCyt. b_5 を0.2%(v/v) Emulgen 911および0.5%(w/v) コール酸ナトリウムを含む10mM リン酸緩衝溶液 (pH7.4) で可溶化したのち，DE-52カラムに流した。100mM NaClを含む同緩衝溶液で洗浄したのち，280mM KClおよび0.2%(v/v) Emulgen 911を含む50mM Tris緩衝溶液でCyt. b_5 を溶出させた。2 倍希釈したのち，DEAEセファロースカラムに流し，140mM KClを含む同緩衝溶液で洗浄した。ブロードなピークとなって溶出したCyt. b_5 を，次に，アミノオクチルセファデックスカラムに流した。0.5%(w/v)コール酸ナトリウムを含む100mM リン酸緩衝溶液でEmulgen 911を完全に洗い流したのち，0.3%(w/v)デオキシコール酸ナトリウムを含む同緩衝溶液でCyt. b_5 を溶出した。10mM リン酸緩衝溶液で透析し，Cyt. b_5 の精製標品とした。

(4) チトクロム b_5 のトリプシン消化：(3) で得られた溶液に，Cyt. b_5 に対して0.1当量のトリプシンを添加し，0.1M NaClを含む20mM Tris緩衝溶液 (pH8.1) 中で18時間インキュベートした。

(5) タンパク質の抽出：0.2mgのタンパク質，添加物およびpH緩衝液を含む界面活性剤ミセル水溶液 1 mlを1.5-mlサンプルチューブに入れ，攪拌した。その後，5,000gで15分間遠心分離した。各相のタンパク質濃度および体積比から，界面活性剤相への抽出率ならびに分配比を算出した。

(6) タンパク質の定量：バクテリオロドプシンについては540nm，ペルオキシダーゼ，チトクロム c ，ヘモグロビン，ミオグロビンおよびチトクロム b_5 については400～420nmの

吸光度から定量した。それ以外のタンパク質については、ビスンコニン酸法でアルブミンを標準タンパク質として定量した。

2-3 結果および考察

2-3-1 Triton X-114ミセル水溶液の二相分離

はじめに、添加物を加えていないTX114水溶液の相分離温度を測定した。TX114濃度と相分離温度との関係をFig.2-3に示す。この図において、曲線の高温側で二相分離現象が見られた。相分離温度はTX114濃度0.5%(w/v)までは急激に、その後緩やかに上昇した。このような二相分離現象は溶液の温度上昇に伴う界面活性剤ミセルの溶解度の低下として説明されている。0.5%(w/v)における相分離温度は約24℃であった。このため、通常TX114を用いた膜タンパク質のミセル水性二相分配法は、溶液を30℃に加温することによって行われている。しかしながら、このような高温では、膜タンパク質の変性をもたらす危険性がある。したがって、相分離温度はより低温であることが望ましい。そこで、添加物を加えることにより、TX114の相分離温度を低下させることを試みた。TX114と同じポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤水溶液において、塩、グリセロールおよび水溶性ポリマーなどの添加物が相分離温度を低下させることが知られている。そこで、TX114についてもこれらの添加物の相分離温度への影響を検討した。

はじめに、相分離温度に及ぼす塩の影響について検討した。結果をFig.2-4に示す。1%(w/v)TX114にNaCl, KCl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄をそれぞれ共存させたところ、いずれの塩も相分離温度を低下させることが分かった。すなわち、塩によってミセルの溶解度が低下したことを示している。また、その効果は、カチオンよりアニオンの種類に大きく依存していることが分かる。このようなミセル水溶液に対する塩の効果に関して数多くの報告がなされており¹⁾、いずれも、塩析効果によって説明されている。すなわち、塩による相分離温度低下の効果の序列はHofmeister系列に従っている。今回行ったTX114に関しても同様に塩析効果が働いていると考えられる。

次に、タンパク質の安定化剤として用いられているグリセロールの影響について検討した。また、グリセロールと同様、安定化剤として用いられるポリオール、グルコースおよびシュクロースについても検討した。結果をFig.2-5に示す。いずれのポリオールも塩と同様、相分離温度を低下させた。ポリオールは比較的高濃度で存在しているため、溶液中

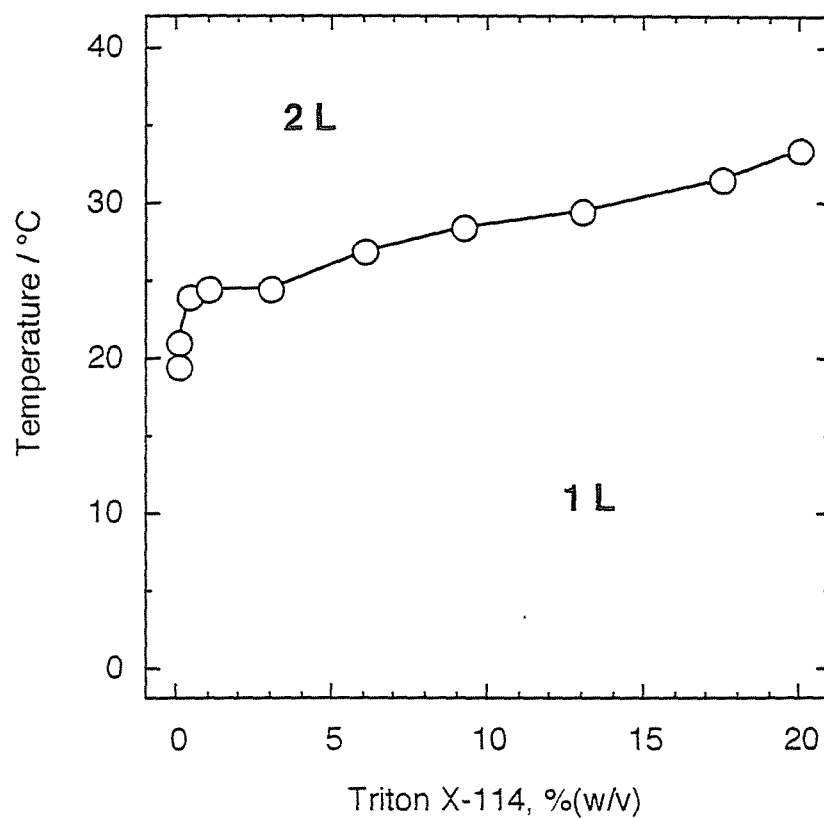


Fig. 2-3 Phase diagram in Triton X-114 micellar solution.
1L refers single isotropic phase and 2L means the presence
of two isotropic phase.

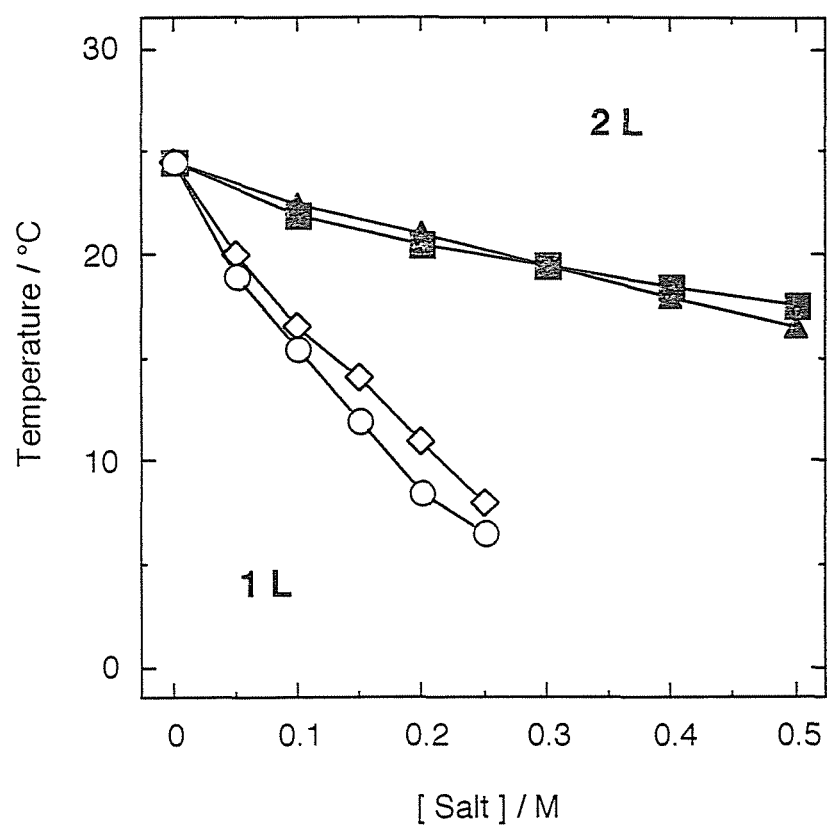


Fig. 2-4 Effect of salt concentration on cloud point in Triton X-114 micellar solution. 1L and 2L have the same meanings as in Fig. 2-3.
 Salt : (○) Na₂SO₄, (◇) (NH₄)₂SO₄, (▲) NaCl, (■) KCl.
 Condition : 1%(w/v) Triton X-114, 10mM Tris-HCl, pH 7.4.

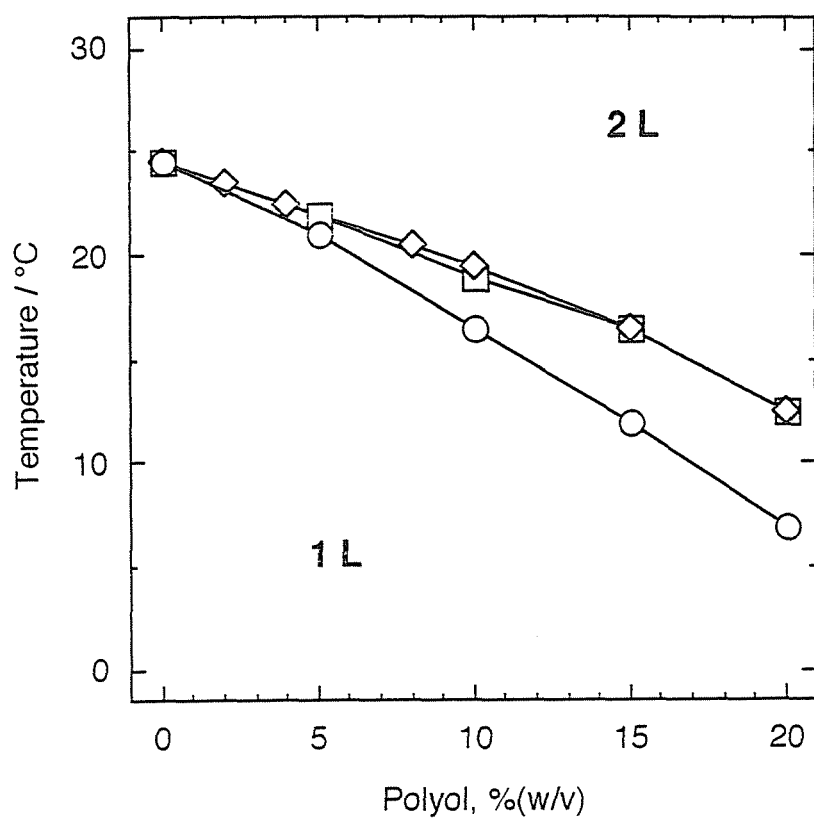


Fig. 2-5 Effect of polyol concentration on cloud point in Triton X-114 micellar solution. 1L and 2L have the same meanings as in Fig. 2-3.
Polyol : ($\circ$) glucose, ($\square$) sucrose, ($\diamond$) glycerol.
Condition : 1%(w/v) Triton X-114, 10mM Tris-HCl, pH 7.4.

の水の活量を大きく減少させ、同時に、その高い水和能力により水分子間の水素結合を破壊していることが予想される。一方、グリセロールの添加によってミセルの水和半径が小さくなることが知られている。すなわち、グリセロールはミセル表面の水和水を除去するが、水和水の代わりとなってミセル表面に結合しないことを示している。グルコースやシュクロースについても同様に考えられ、これらの理由によってミセルの溶解度が減少したものである。

最後に、TX114の相分離に及ぼす水溶性ポリマーの影響について検討した。1%(w/v)TX114溶液に、各種ポリマーを添加した際のポリマー濃度と相分離温度の関係をFig.2-6に示す。PEG6000、Ficoll、MC、DxおよびPVPのいずれのポリマーを添加した場合においても、ポリマー濃度の増加にともない相分離温度は低下することが分かった。水溶性ポリマーと界面活性剤の混合水溶液の挙動に関していくつかの報告がある。生体膜の主要な構成物質であるリン脂質によって形成される二分子膜ベシクルは、ポリエチレングリコールやデキストランなどの水溶性ポリマーの添加によって融合することが知られている。Tilcockら⁹⁾はこの現象に対して、PEGによるベシクルの立体的な排除効果が働いていると説明した (volume exclusion theory)。近年、Yamazakiら¹⁰⁾はTriton X-100のミセル水溶液がPEGの添加によって、相分離温度を低下させることを見い出している。先のポリマーによるベシクル融合も含めたこれらの現象に関して、彼らは立体的な排除効果に伴う局所的な (ミセルあるいはベシクル周辺とポリマーを含んだバルク相との間の) 浸透圧のアンバランスにより、ミセルの凝集やベシクルの融合が起こっていると説明している¹¹⁾ (osmophobic association theory)。いずれにしても、ポリマーによるベシクルやミセルの立体的な排除効果に基づいた考えである。また、ミセルを一つのポリマーと見立てたとき、ミセルと水溶性ポリマーとの混合水溶液の相分離挙動は二つの異なるポリマー間の相互作用で説明することができる。これに関して、2種類の水溶性ポリマー混合水溶液におけるポリマー間の相互作用や水溶性ポリマーと水溶性タンパク質間の相互作用などが熱力学的に解析されている。これらの相互作用はいずれも反発相互作用であり、その多くは立体的な効果によるものとして説明されている。TX114についても同様に考えられ、ポリマーによるミセルの立体的な排除効果が相分離の低下をもたらしたものと考えられる。Fig. 2-6を見ると、FicollよりDxの方が相分離温度を低下させる働きの大きいことが分かる。この二つのポリマーはいずれも多糖類であり、その分子量もほぼ等しい (500,000程

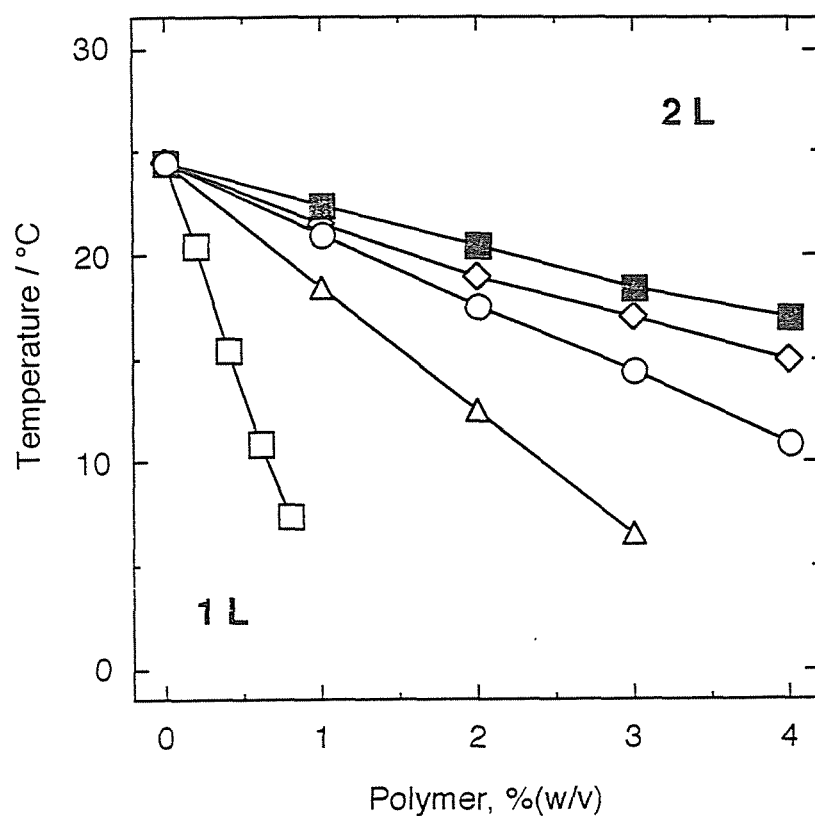


Fig. 2-6 Effect of polymer concentration on cloud point in Triton X-114 micellar solution. 1L and 2L have the same meanings as in Fig. 2-3.
 Polymer : (○) PEG6000, (■) Ficoll, (□) MC, (△) Dx, (◇) PVP.
 Condition : 1%(w/v) Triton X-114, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4.

度)。しかし、前者はコンパクトな球状構造を取っているのに対し、後者は鎖状構造で溶液中に分散している。このような立体構造上の違いが、立体的な排除効果の違いとなって表れたものと考えられる。

そこで、ポリマーによる排除効果と相分離挙動の関係をより明らかにするために、相分離温度に及ぼすポリマー分子量の影響について検討した。種々の分子量のPEGを用いて調べた。結果をFig.2-7に示す。PEGの分子量を4,000から500,000まで変化させたとき、相分離温度の低下はより一層急激なものとなった。したがって、TX114ミセルにおいても、ポリマーによる立体的な排除効果が相分離温度の低下を引き起こしていることが明らかになった。

これまでは、非荷電ポリマーについてのみ検討してきた。しかし、この相分離系で行おうとしている膜タンパク質の抽出分離において、ポリマーの電荷は重要なファクターと考えられる。そこで、電荷をもったポリマーについても相分離温度に及ぼすポリマー濃度の影響を調べた。電荷をもった水溶性ポリマーとしてカチオン性のDEAE-Dxおよびアニオン性のDx-Sを用いた。TX114ミセル水溶液の相分離温度とポリマー濃度との関係をそれぞれFig.2-8に示す。比較のために、対応する非荷電ポリマー、Dxを用いたときの結果も併せて示した。DEAE-DxおよびDx-Sいずれも非荷電ポリマーと同様にその添加によって相分離温度は低下した。しかし、その効果はDxよりも低くなっている。すなわち、ミセルに対する排除効果が弱くなったと言える。この原因としては二つ考えられる。一つは、イオン性の置換基を持つことによって、ミセルの親水基との間に静電的な引力が働いたため、もう一つは、荷電ポリマーは置換基を有する分、分子量は同じでも非荷電ポリマーに比べポリマーとしての糖鎖の拡がりが小さくなったためと考えられる。

2-3-2 アルキルグルコシドミセル水溶液の二相分離

アルキルグルコシド（AG）系界面活性剤であるオクチルグルコシドはPEGの添加によって二相分離することが、Michelら^{5,6)}によって見出されている。そこで、タンパク質の新規なミセル水性二相分配系を確立するために、AG系界面活性剤ミセル水溶液に種々の添加物を加え、その相分離挙動を調べた。添加物として塩やポリオールについて検討したが、相分離は観察されなかった。そこで以後は、水溶性ポリマーに絞って検討した。初めにPEG6000を添加したときの各種AGミセル水溶液の相分離温度を測定した。結果を

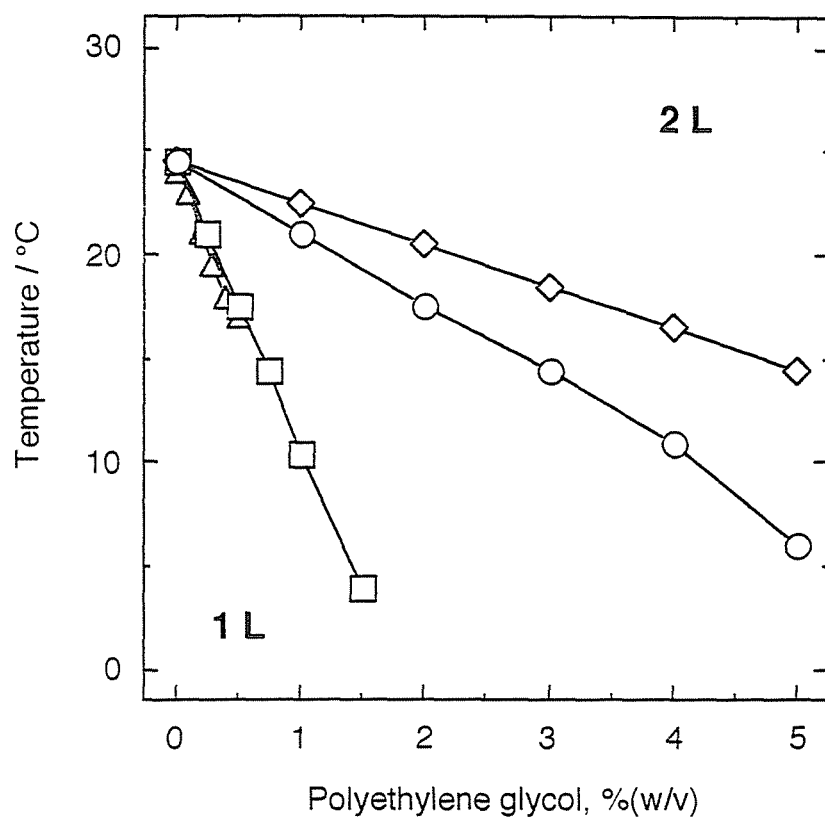


Fig. 2-7 Effect of polyethylene glycol with various molecular weights on cloud point in Triton X-114 micellar solution. 1L and 2L have the same meanings as in Fig. 2-3.

Molecular weight of polyethylene glycol : ($\diamond$) 4,000, ($\circ$) 7,500, ($\square$) 20,000, ($\triangle$) 500,000.

Condition : 1%(w/v) Triton X-114, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4.

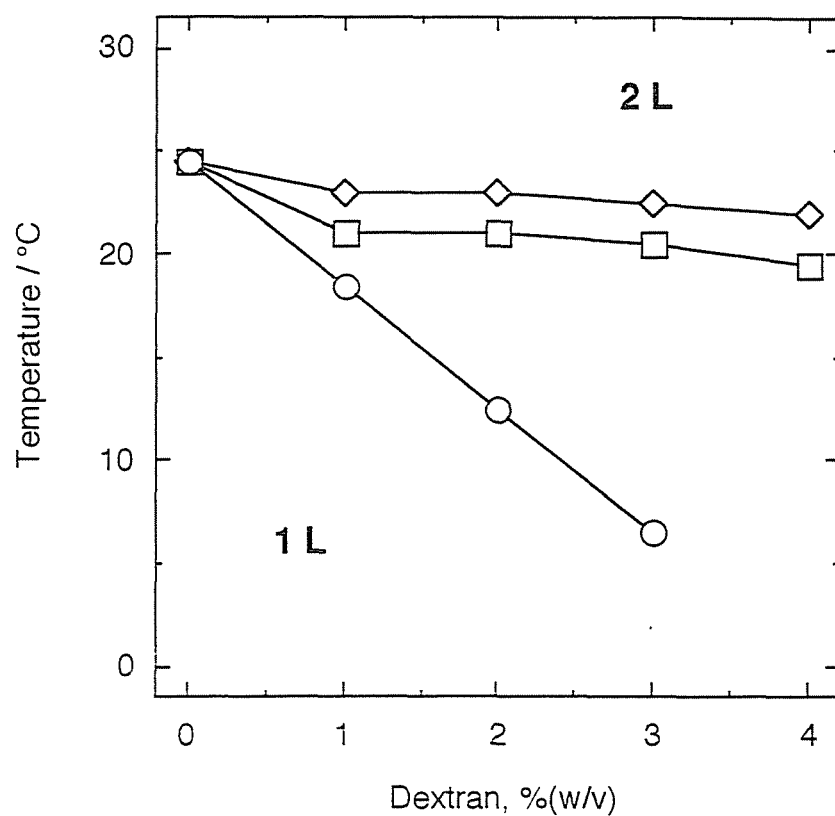


Fig. 2-8 Effect of dextran concentration on cloud point in Triton X-114 micellar solution. 1L and 2L have the same meanings as in Fig. 2-3.
Dextran : ($\circ$) Dx, ($\diamond$) DEAE-Dx, ($\square$) Dx-S.
Condition : 1%(w/v) Triton X-114, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4.

Fig.2-9に示す。二相分離が知られているOG以外にもNG, OTGおよびHTGについてもPEG6000の添加によって、二相分離現象が見られた。ここでTX114の系と大きく異なっているのは、各曲線より低温域で二相分離が見られたことである。これは、AG系界面活性剤ミセルの溶解度が温度を下げるにより低下することを意味している。相分離温度はPEG6000濃度の増加に伴い急激に上昇したのち、一定の温度に収束した。これは、PEG6000によって相分離が促進した、すなわち、ミセルの溶解度が低下したことを示している。各AGを比較すると、アルキル鎖のより長い方が、また親水基である糖と疎水基であるアルキル基が酸素原子より硫黄原子でつながっているほうがより低濃度のPEG6000によって相分離が起こった。これは、界面活性剤の疎水性が大きいほど相分離しやすいことを示している。中でも、OTGではPEG6000を添加しなくとも相分離現象が見られた。ここで見いだされた相分離現象もポリマーとミセルの立体的な反発相互作用によるものだとすると、Fig.2-9の結果はAGの疎水性の違いがミセルの大きさの違いとして反映していると考えられる。すなわち、疎水性の大きいAGはより大きなミセルを形成し、その結果PEG6000によってより排除されやすくなるものと考えられる。

本相分離系においてもPEG6000による立体的な排除効果が働き、それによってミセルの凝集すなわち相分離が促進されているとすると、PEG6000だけでなく他の水溶性ポリマーでも同様のことが予想される。そこで、種々の水溶性ポリマーのAGミセル水溶液の相分離温度に及ぼす影響について検討した。

Fig.2-9において最も相分離しやすかったOTGについて、各種水溶性ポリマーを添加したときの相分離温度の変化を調べた。結果をFig.2-10に示す。PEG6000だけでなく、調べた水溶性ポリマー全てがOTGミセル水溶液の相分離を促進した。しかし、相分離温度曲線の形は水溶性ポリマーの種類によって異なっている。これは水溶性ポリマーの性質の違いがOTGミセルとの相互作用の違いとして反映しているものと考えられる。そこで、TX114の場合と同様、ポリマーの性質の違いについて比較検討を行った。

まずFig.2-10において、ポリマー形状の異なるDxとFicollを比較すると、鎖状に延びたDxの方が球状構造のFicollより相分離を促進していることが分かる。次に、様々な分子量を持つPEGの濃度とOTGミセル水溶液の相分離温度との関係をFig.2-11に示す。その結果、PEGの分子量が大きいほど相分離はより促進されることがわかった。したがって、このAG二相分離系においてもポリマーによる立体的な排除効果が働いていると結論づけ

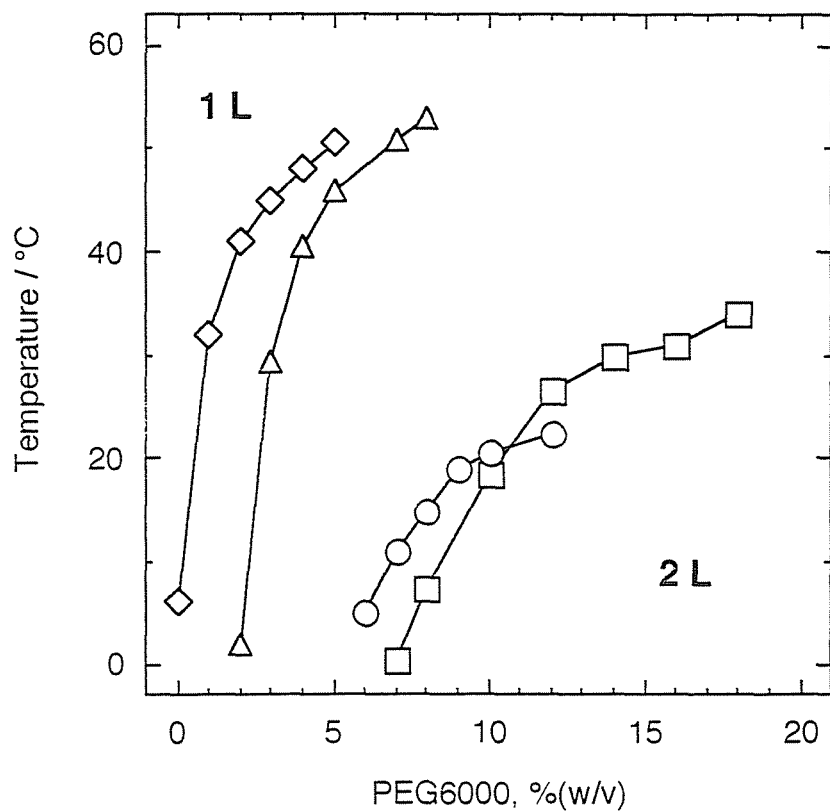


Fig. 2-9 Phase separation temperature in aqueous micellar solutions of 2%(w/v) alkylglucosides as a function of PEG6000 concentration.

1L and 2L have the same meanings as in Fig. 2-3.

Alkylglucoside : ($\circ$) HTG, ($\square$) OTG, ($\triangle$) OG, (∇), NG.

Condition : 10 mM potassium phosphate, pH 7.4.

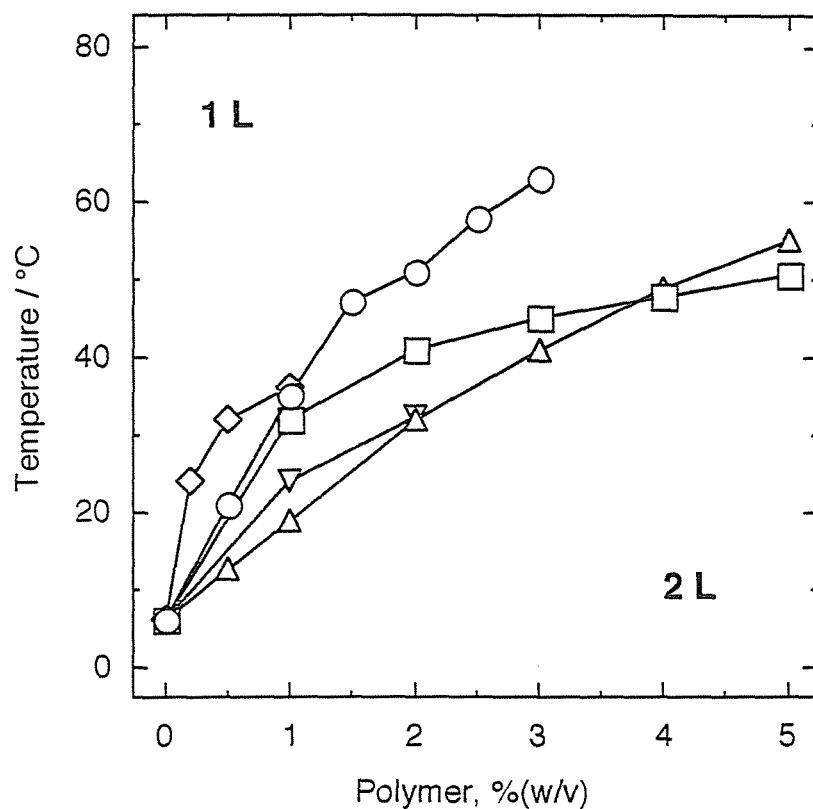


Fig. 2-10 Effect of water-soluble polymer concentration on phase separation temperature in aqueous micellar solution of 2%(w/v)

OTG. 1L and 2L have the same meanings as in Fig. 2-3.

Polymer : (□) PEG6000, (△) Ficoll, (◇) MC, (○) Dx, (▽) PVP.

Condition : 10 mM potassium phosphate, pH 7.4.

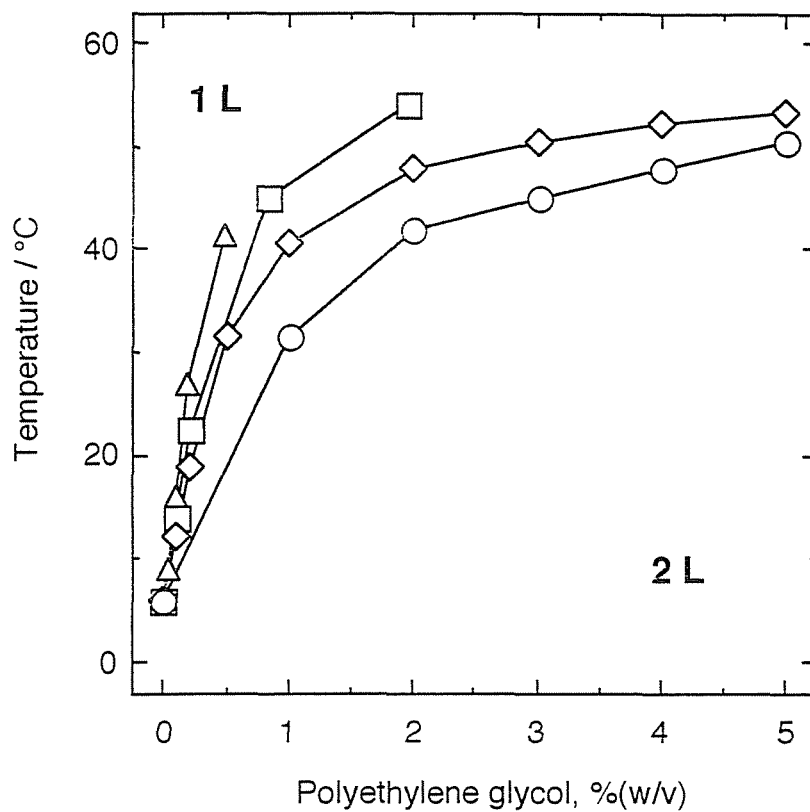


Fig. 2-11 Effect of polyethylene glycol with various molecular weights on phase separation temperature in 2%(w/v) OTG micellar solution. 1L and 2L have the same meanings as in Fig. 2-3.

Molecular weight of polyethylene glycol : (○) 7,500, (◇) 20,000, (□) 500,000, (△) 2,000,000.

Condition : 10 mM potassium phosphate, pH 7.4.

られる。

ポリマー電荷の影響についてもデキストランを用いて同様に検討した。結果をFig.2-12に示す。DEAE-Dxを用いた場合、Dxに比べて相分離を促進する効果は弱く、TX114のときと同様に説明することができる。一方、Dx-SではむしろDxより相分離を促進する傾向が見られた。これは、TX114では見られなかった傾向であり、TX114とOTGのミセル表面すなわち親水基の違い（ポリオキシエチレンとグルコース）に基づくポリマー上の硫酸基との相互作用の違いに起因しているものと思われる。

2-3-3 タンパク質の抽出

TX114とAGで共通に得られた水溶性ポリマー混合水溶液の二相分離系がタンパク質の抽出分離に応用可能であるか明らかにするため、性質のよく知られているタンパク質を用い、その抽出挙動を調べた。

初めにOTG-PEG6000系でタンパク質の抽出を行った。結果をFig.2-13に示す。水溶性タンパク質であるPODおよびCyt.cはほとんどが水相中に回収されたのに対し、膜タンパク質であるBRおよびCyt.b₅は半分以上が界面活性剤相に抽出された。BRは疎水性アミノ酸残基で構成された7本の α -ヘリックスからなる膜貫通ドメインを持ち¹²⁾、また、Cyt.b₅はC末端に約40の疎水性アミノ酸残基からなる膜結合ドメインを有している¹³⁾。トリプシン消化によって疎水ドメインを除去したCyt.b₅の親水ドメイン（t-Cyt.b₅）は水溶性タンパク質と同様、水相に回収されることから（Fig.2-13）、これらの疎水性ドメインと界面活性剤との相互作用により膜タンパク質が抽出されと考えられる。

次に、タンパク質の抽出率をTX114の系と比較した結果をTable2-1に示す。TX114-PEG6000系においても水溶性タンパク質であるPOD、Hb、Cyt.c、BSA、TryおよびConAはほとんど界面活性剤相には抽出されず、逆に膜タンパク質であるCyt.b₅は抽出されている。したがって、この系においても、タンパク質の親疎水性が抽出性を決定しているものと思われる。しかしながら、OTGの系と比較するとHb、ConAの抽出に関して大きな違いが見られた。この違いは界面活性剤との特異的な相互作用の違いに起因しているものと考えられる。ConAは糖結合性タンパク質であることから、OTGの親水部のグルコースと特異的に結合し、界面活性剤相に抽出されたと思われる。これは、一種のアフィニティ抽出であるといえる。事実、Saitohら¹⁴⁾は、両性イオン界面活性剤3-ノニルジメチルアンモ

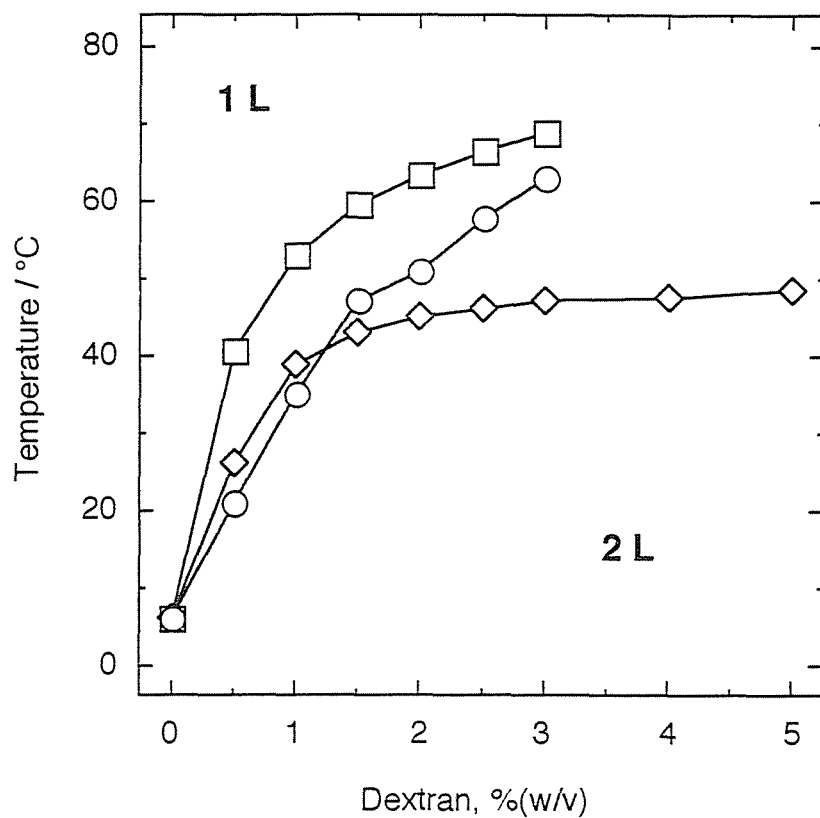


Fig. 2-12 Effect of dextran concentration on phase separation temperature in 2%(w/v) OTG micellar solution. 1L and 2L have the same meanings as in Fig. 2-3.

Dextran : (○) Dx, (◇) DEAE-Dx, (□) Dx-S.

Condition : 10 mM potassium phosphate, pH 7.4.

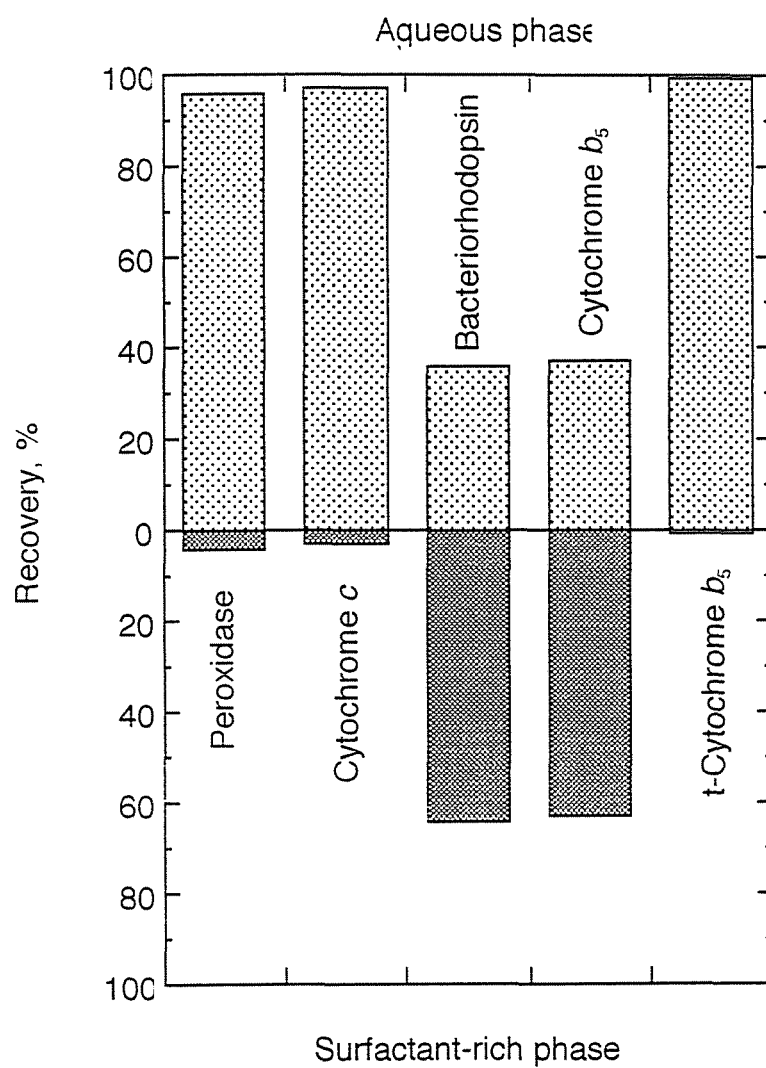


Fig. 2-13 Distribution of proteins between aqueous and surfactant-rich phases.

Condition : 2%(w/v) OTG, 2%(w/v) PEG6000.

Table 2-1 Extraction percent of proteins in polymer-induced phase separation systems.

Protein	Extraction, %	
	TX114 ^a	OTG ^b
Peroxidase	10	10
Hemoglobin	13	92
Albumin	5	3
Cytochrome c	10	8
Trypsin	11	10
Concanavalin A	25	61
Cytochrome <i>b</i> ₅	90	62

a. 1% TX114, b. 2% OTG, 2% PEG6000, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 25°C.

ニオプロピルサルフェイトの二相分離系において、オクチルグルコシドを共存させることにより、糖結合性の水溶性タンパク質であるヘキソキナーゼのアフィニティ抽出に成功している。一方、Hbに関してはアルキルグルコシドとの特異的相互作用に関する報告はない。そこで、HbとTX114およびOTGの相互作用の違いを、Hbの吸収スペクトルから検証した。Fig.2-14に1% TX114、2% OTGおよび0.5% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）共存下のHbの吸収スペクトルを示す。比較のため何も加えていないときのスペクトルも示した。界面活性剤が共存するとき、Hbの吸収は抑えられ、その序列はタンパク質と強く相互作用することが知られているSDS、次いでOTG、TX114となった。したがって、OTGはTX114に比べHbと強く相互作用することが明らかになった。TX114の方が疎水性の強い界面活性剤であることから、HbとOTGの相互作用は疎水的なものではない。生体内においてHbはグルコースと結合する¹⁵⁾ことが知られていることから、OTGの親水基と特異的に相互作用したものと考えられる。

以上の結果から、ここで述べたミセル水性二相分配系におけるタンパク質の抽出性は主にタンパク質の親疎水性によって支配されていることが分かった。すなわち、膜タンパク質と水溶性タンパク質の分離に応用しうることが示された。また、水溶性タンパク質の中にも界面活性剤との特異的な相互作用により、界面活性剤相に抽出されるものがあることが明らかになった。したがって、界面活性剤を選択することにより、水溶性タンパク質の選択的な分離も可能になるものと考えられる。

2-3-4 タンパク質の分配挙動

ここで用いているミセル水性二相分配系はミセルとポリマーの混合水溶液からなる。ミセルを一種のポリマーと見なせば、従来からあるポリマー水性二相分配系と対比させることができる。ポリマー水性二相分配系において、タンパク質の分配は各ポリマーとの相互作用によって決定する¹⁶⁾。ポリマー濃度を増加させれば、両相における各ポリマーの濃度差は拡大し、タンパク質は親和性の高いポリマーを多く含む相へより分配するようになる。すなわち、分配比の対数は0からかけ離れていくことになる。また、ポリマーの分子量もタンパク質の分配に大きな影響を与えることが知られている。二つのポリマーの重量濃度および片方のポリマー（A）の分子量を固定したままで、もう片方のポリマー（B）の分子量を増大させると、ポリマー（B）とタンパク質との立体的反発が大きくなり、ポ

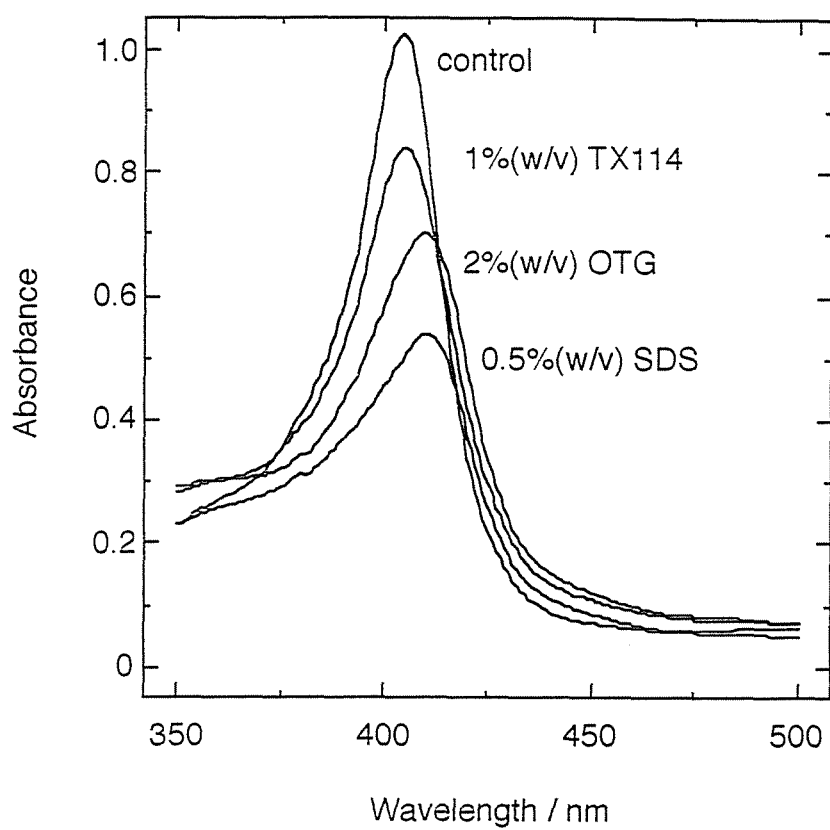


Fig. 2-14 Absorption spectra of hemoglobin in surfactant micellar solutions.

Condition : 0.125 mg/ml hemoglobin, 0.1M potassium phosphate, pH 7.0.

リマー（B）を多く含む相へのタンパク質の分配は抑制される。さらに、pH緩衝剤に対して過剰量の中性塩を加えて、緩衝剤の影響を遮蔽した条件下で、タンパク質の分配に及ぼすpHの影響を調べると、添加する中性塩ごとに異なったpH-分配比曲線が得られる。これらの曲線が交差するpHはタンパク質の等電点と一致することが知られている。これは、等電点においてタンパク質の電荷はキャンセルされるため、その分配は共存する中性塩の違いによらず等しくなるためである。このような現象はCross Partitionと呼ばれ¹⁶⁾、タンパク質の等電点を求めるのに用いられている。

ポリマー水性二相分配系におけるこのような分配挙動と比較するため、ミセル水性二相分配系におけるタンパク質の分配に及ぼすポリマー濃度、分子量およびpHの影響を調べた。タンパク質としてHb, Cyt.cおよびBSAを用いたときのPEG6000濃度と分配比の関係をFig.2-15に示す。ここで、分配比Dは以下のように定義する。

$$D = [\text{Protein}]_{\text{surfactant-rich phase}} / [\text{Protein}]_{\text{aqueous phase}}$$

すなわちタンパク質は $\log D$ が0より大きい場合は界面活性剤相へ、0より小さい場合は水相へ分配することを意味している。Fig.2-15において、界面活性剤相に分配するタンパク質（OTG系における全タンパク質、TX114系におけるHb）はPEG濃度の増加とともに分配比は増大した。逆に、水相に分配するタンパク質（TX114系におけるBSAとCyt.c）の分配比は減少した。また、PEG6000濃度の変化に伴う分配比の変化は、 $\log D$ が0に近いタンパク質ほど小さいことが分かった。したがって、ポリマー濃度を上げることで、分配比の異なる二つのタンパク質の効果的な分離が可能になる。

次に、ポリマーの分子量と分配比の関係をFig.2-16に示す。TX114濃度を1%，PEG濃度を0.5%に固定したままで、PEGの分子量を4,000から500,000まで変化させたところ、Hb, BSAいずれのタンパク質の分配比も増大した。なかでもBSAは、分子量4,000のとき、水相に分配していたものが、分子量500,000では界面活性剤相に分配された。

最後に、中性塩共存下におけるpHと分配比の関係をFigs.2-17および18に示す。Hbに関して、硫酸ナトリウムと塩化ナトリウムをそれぞれ共存させたところ、二本の分配比曲線が得られ、両者はHbの等電点¹⁷⁾（pI：7）付近で交差した（Fig.2-17）。またBSAについても同様に、等電点¹⁷⁾（pI：4.9）付近で交差した（Fig.2-18）。すなわち、ミセル水性

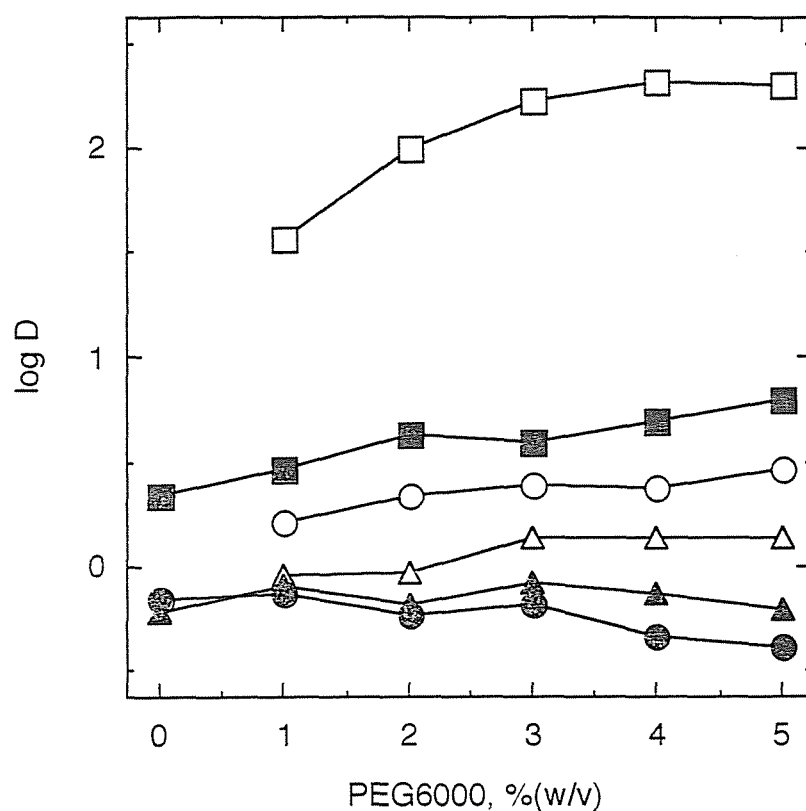


Fig. 2-15 Effect of PEG6000 concentration on the distribution of proteins in aqueous micellar two-phase systems of 2%(w/v) OTG (○, △, □) and 1%(w/v) TX114 (●, ▲, ■).

Protein : (○, ●) cytochrome c, (△, ▲) albumin, (□, ■) hemoglobin.

Condition : 0.5 mg/ml protein, 0.1 M potassium phosphate, pH 7.0, 25°C.

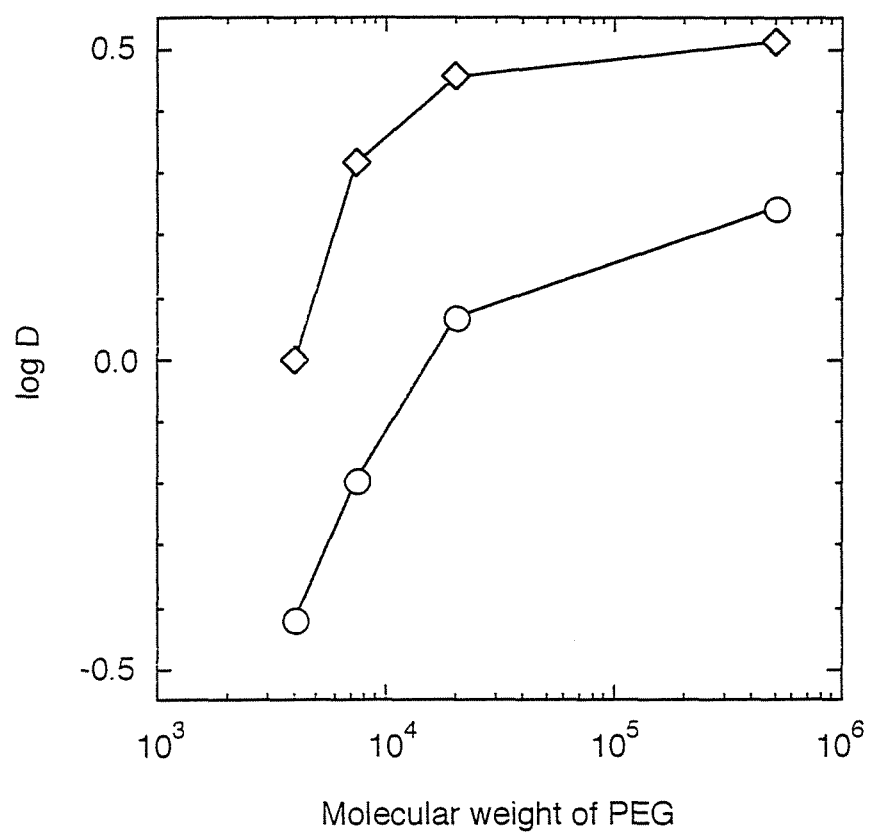


Fig. 2-16 Effect of molecular weight of PEG on distribution of proteins.

Protein : (○) albumin, (◇) hemoglobin.

Condition : 1%(w/v) TX114, 0.5%(w/v) PEG, 0.5 mg/ml protein, 0.1 M potassium phosphate, pH 7.0, 25°C.

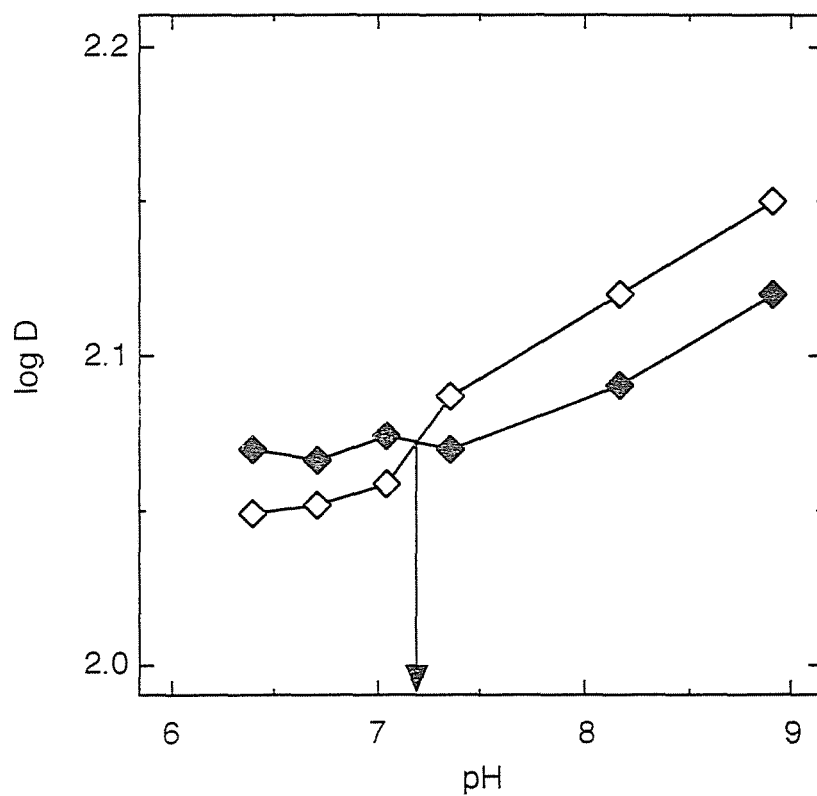


Fig. 2-17 Distribution ratio of hemoglobin in OTG-PEG6000 two-phase system containing 0.05 M Na₂SO₄ or 0.1 M NaCl as a function of pH.

Salt : (◇) NaCl, (◆) Na₂SO₄.

Condition : 2%(w/v) OTG, 2%(w/v) PEG6000, 0.5 mg/ml hemoglobin, 10 mM potassium phosphate or Tris-HCl, 25°C.

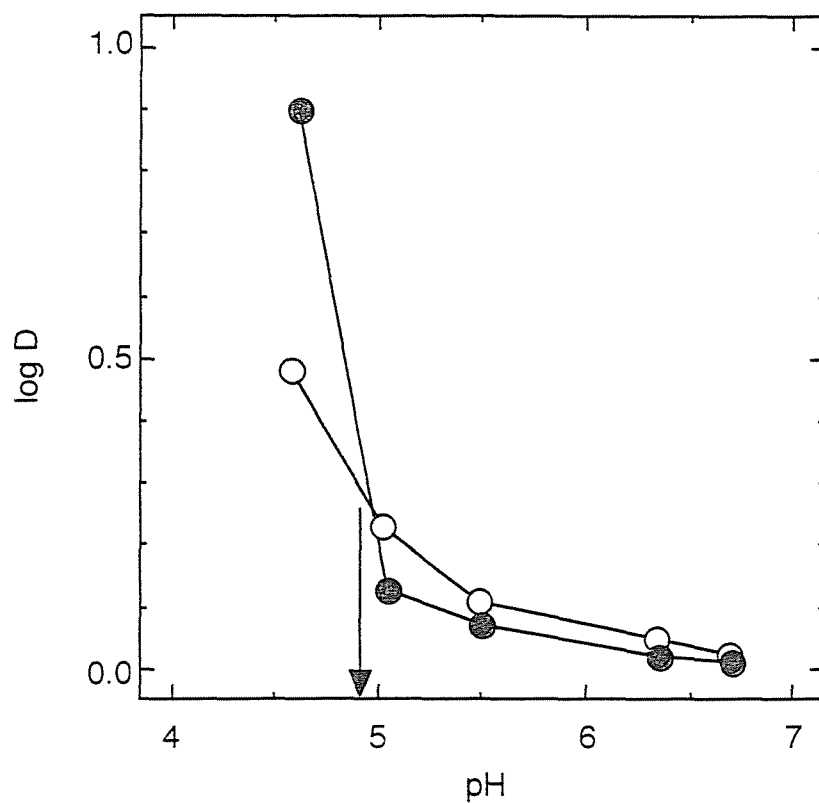


Fig. 2-18 Distribution ratio of albumin in OTG-PEG6000 two-phase system containing 0.05 M Na₂SO₄ or 0.1 M NaCl as a function of pH.

Salt : (○) NaCl, (●) Na₂SO₄.

Condition : 2%(w/v) OTG, 2%(w/v) PEG6000, 0.5 mg/ml albumin, 10 mM potassium phosphate or Tris-HCl, 25°C.

二相分配系においてもCross Partitionが起こることが示された。

以上の結果から、ミセル水性二相分配系におけるタンパク質の分配挙動はポリマー水性二相分配系のそれと非常によく一致していることが明かとなった。したがって、前節で紹介したような界面活性剤との特異的な相互作用がなくとも、ポリマー水性二相分配系と同様、ミセル水性二相分配系においても水溶性タンパク質の分離精製への応用や等電点の測定が可能になると思われる。ポリマー水性二相分配法では、すでに電荷やアフィニティリガンドが導入され、分配の制御が行われている¹⁶⁾ことから、本ミセル水性二相分配系においても同様の分配の制御が期待できる。

2-4 結言

本章では、タンパク質の分離に用いることのできる界面活性剤ミセル水溶液の二相分離系の探索を行った。その結果、TX114ミセル水溶液が水溶性ポリマーや塩の添加によって二相分離が促進されることを見出した。さらに、単独では二相分離しないAG系界面活性剤ミセル水溶液が水溶性ポリマーの添加によって二相分離する現象を見出した。この二相分離系はTX114相分離系と異なり、相分離温度の低温側で二相分離することが明らかになった。次に、これら二相分離系を用いてタンパク質の抽出を行った。いずれの系も水溶性タンパク質は水相に回収されたのに対し、膜タンパク質は界面活性剤相に抽出された。したがって、本相分離系が水溶性タンパク質と膜タンパク質の分離に応用可能であることが明らかになった。水溶性タンパク質の中には界面活性剤との特異的相互作用により界面活性剤相に分配するものがあつた。また、ポリマー水性二相分配系におけるタンパク質の分配挙動と比較したところ、ミセル水性二相分配系における水溶性タンパク質の分配挙動は、ポリマー水性二相分配系とよく一致していることを見出した。したがって、界面活性剤との特異的相互作用を利用したり、ポリマー濃度や分子量を変化させるなど、系の設計に応じて水溶性タンパク質の選択的な分離が可能になることが示された。ここで明らかになった分配挙動は、膜タンパク質の分離においても重要な指針を与えるものと思われる。

引用文献

- 1) W. L. Hinze and E. Pramauro, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **24**, 133-177 (1993).
- 2) A. Sánchez-Ferrer, R. Bru, and F. García-Carmona, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 275-313 (1994).
- 3) T. Saitoh, H. Tani, T. Kamidate, and H. Watanabe, *Trends Anal. Chem.*, **14**, 213-217 (1995).
- 4) H. Tani, T. Kamidate, and H. Watanabe, *J. Chromatogr. A*, **780**, 229-241 (1997).
- 5) H. Michel, *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 56-59 (1983).
- 6) M. Zulauf, in "*Crystallization of Membrane Proteins*", H. Michel (Ed.), p. 53-72, CRC Press, Boca Raton, 1991.
- 7) T. Saitoh, H. Tani, T. Kamidate, and H. Watanabe, *Anal. Sci.*, **10**, 299-303 (1994).
- 8) T. Kamataki, K. Maeda, Y. Yamazoe, T. Nagai, and R. Kato, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 1-7 (1981).
- 9) C. P. S. Tilcock and D. Fisher, *Biochim. Biophys. Acta*, **688**, 645-652 (1982).
- 10) M. Yamazaki, M. Ohshika, and T. Ito, *Biochim. Biophys. Acta*, **1063**, 175-177 (1991).
- 11) M. Yamazaki, S.-I. Ohnishi, and T. Ito, *Biochemistry*, **28**, 3710-3715 (1989).
- 12) N. Unwin and R. Henderson, *Sci. Am.*, **250** (February), 56-66 (1984).
- 13) J. Ozols, *Biochim. Biophys. Acta*, **997**, 121-130 (1989).
- 14) T. Saitoh and W. L. Hinze, *Talanta*, **42**, 119-127 (1995).
- 15) H. F. Bunn, R. Shapiro, M. McManus, L. Garrick, M. J. McDonald, P. M. Gallop, and K. H. Gabbay, *J. Biol. Chem.*, **254**, 3892-3898 (1979).
- 16) H. Walter, D. E. Brooks, and D. Fisher (Eds.), "*Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems Theory, Methods, Uses, and Applications to Biotechnology*", Academic Press, Inc., Orlando, 1985.
- 17) D. Malamud and J. W. Drysdale, *Anal. Biochem.*, **86**, 620-647 (1978).

第3章 アルキルグルコシド系界面活性剤による膜タンパク質の選択的可溶化

3-1 緒言

膜タンパク質の精製では生体試料の調製後、生体膜中の膜タンパク質を界面活性剤によって可溶化する¹⁾。これは、界面活性剤分子が生体膜構造を破壊し、膜タンパク質を取り巻く脂質分子に置き変わることのできる能力に基づいている。可溶化において最も重要なことは、目的のタンパク質を高い回収率で選択的に可溶化できる界面活性剤を選択し、最適な条件を選定することにある。そのため、現在数多くの界面活性剤が市販されている。ミセル水性二相分配法では、膜タンパク質を含む可溶化溶液を相分離させることによって行われている。したがって、可溶化操作はミセル水性二相分配法にとっても大前提となっている。従来のミセル水性二相分配法では、界面活性剤は主にTritonX-114 (TX114) が用いられているため、可溶化の際も必然的にTX114が使用されていた。そのため、ミセル水性二相分配法は汎用性の低い方法として扱われてきた。

前章では、これまで用いられてきたTX114に加え、アルキルグルコシド (AG) 系界面活性剤がミセル水性二相分配法に適用できることを示した。これは、ミセル水性二相分配法に先立って行われる可溶化の際の、界面活性剤の選択の幅が拡張されたことを意味しており、目的の膜タンパク質に応じた界面活性剤の使用が可能になる。

本章では、この可溶化について、第4章および第5章にわたって扱う肝ミクロゾーム中の電子伝達系膜タンパク質を対象に検討を行った。肝ミクロゾーム中の電子伝達系膜タンパク質であるチトクロム b_5 (Cyt. b_5)、チトクロムP450 (Cyt.P450)、NADH-チトクロム b_5 還元酵素 (fp1) およびNADPH-チトクロムP450還元酵素 (fp2) は、生体内で薬物代謝や脂肪酸の不飽和化に関与する重要なタンパク質である。そのため、多くの分離精製法が報告されている。Imaiら²⁾は、アミノオクチルセファロースカラムを用いた分離法を提案した。この方法は現在、可溶化に引き続いて行われる最初のクロマトグラフィーとして広く利用されている。一方、可溶化はコール酸などの胆汁酸塩やEmulgen 911などのポリオキシエチレンアルキルエーテル系の界面活性剤で行われているが、界面活性剤の種類や条件について検討した報告はない。そこで、これらの膜タンパク質を様々な界面活性剤を用いて最適な可溶化条件を検討した。その結果、AG系界面活性剤がCyt. b_5 に対して非常に高い選択性を示したことから、可溶化によるCyt. b_5 とP450の迅速分離法を検討した³⁾。

3-2 実験

3-2-1 試薬および装置

Triton X-114 (TX114) はナカライテスク社製を使用した。n-オクチル- β -D-グルコシド (OG) , n-ヘプチル- β -D-チオグルコシド (HTG) およびn-オクチル- β -D-チオグルコシド (OTG) はドータイト製を, n-ノニル- β -D-グルコシド (NG) およびタウロデオキシコール酸ナトリウム (STDC) はSigma社製の市販品を特に精製せずに使用した。シュクロースモノラウレート (SML) , シュクロースモノカプレート (SMC) およびシュクロースモノコラート (SMCh) はキシダ化学社製を, コール酸ナトリウム (SC) , デオキシコール酸ナトリウム (SDC) およびタウロコール酸ナトリウム (STC) は和光純薬製を使用した。Triton X-100 (TX100) およびEmulgen 911 (EM911) はそれぞれナカライテスク社および花王アトラス社製を使用した。

その他の試薬は, 市販の特級品を特に精製せずに使用した。

可溶化の際の遠心操作には, 日立55P-72型超遠心機を使用した。吸光度の測定には, 日立U-2000型ダブルビーム分光光度計を使用した。

3-2-2 操作

(1) ラット肝ミクロゾームの調製: フェノバルビタールを投与したラット肝ミクロゾーム (Ms) 懸濁液は既存の方法⁴⁾によって調製し, 使用時まで -80°C で保存した。

(2) ミクロゾームの可溶化: 5-mlのバイアル瓶に10.5mg/mlのタンパク質を含むMs懸濁液 1 ml, 50%(v/v) グリセロール 1.2ml, 50mM EDTA 60 μ lおよび所定の濃度の界面活性剤とリン酸緩衝溶液 (pH7.4) を加え, 総量 3 mlとした。この溶液を氷中で1時間インキュベートしたのち, 4°C , 105,000gで1時間遠心分離した。得られた上清を可溶化画分として回収し, 各タンパク質濃度および活性を測定した。可溶化率は, 可溶化画分に残っているタンパク質量と初めのMsに含まれていた量との比から算出した。

(3) チトクロム b_5 とチトクロムP450の分離: 30-mlのバイアル瓶に10.5mg/mlのタンパク質を含むMs懸濁液 5 ml, 10%(w/v) OTG 2.25ml, 0.2M リン酸緩衝溶液 (pH7.4) 0.75ml, 50%(v/v) グリセロール 6 ml, 50mM EDTA 0.3mlおよび H_2O を加え, 総量15mlとした。この溶液を上述したように, インキュベート, 遠心分離した。得られた上清を第1可溶化画

分として回収した。次に、残った沈殿を洗浄するために、1 mM EDTAおよび20%(v/v) グリセロールを含む10mM リン酸緩衝溶液 (pH7.4) で懸濁し、再度105,000gで1時間遠心分離した。得られた沈殿に、タンパク質濃度が2.5mg/mlとなるように0.6%(w/v) SC, 1 mM EDTAおよび20%(v/v) グリセロールを含む0.1M リン酸緩衝溶液 (pH7.4) を加え、再び懸濁した。この懸濁液を氷中で1時間インキュベートしたのち、4 °C, 105,000gで1時間遠心分離した。得られた上清を第2可溶化画分として回収した。

(4) タンパク質の定量

総タンパク質濃度の定量：BSAを標準タンパク質として、ビシンコニン酸法⁵⁾によって定量した。

チトクロム b_5 およびチトクロムP450濃度の定量：Cyt. b_5 濃度は酸化還元差スペクトルから求めた⁶⁾。タンパク質濃度が1 mg/ml以下となるように希釈した試料をサンプル側およびリファレンス側の両方のセルに加え、ベースライン補正をした。サンプル側の試料には10mM NADH (2 %(w/v) Na_2CO_3 に溶解したもの) を、リファレンス側には蒸留水をそれぞれ1/100容加えて、400-500nmのスペクトルを測定した。得られた酸化還元差スペクトルの424nmと409nmの吸光度の差から、モル吸光係数 $185\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ を用いて濃度を算出した。

Cyt.P450およびその変性型であるチトクロムP420 (Cyt.P420) 濃度は一酸化炭素 (CO) 結合還元差スペクトルから求めた⁷⁾。タンパク質濃度が1 mg/ml以下となるように希釈した試料をサンプル側およびリファレンス側の両方のセルに加え、ベースライン補正をした。サンプル側の試料に1分間COを通気したのちジチオナイトの粉末を加えて還元した。リファレンス側の試料にはジチオナイトの添加のみ行い、400-500nmのスペクトルを測定した。この際、スペクトルの測定は数回行い、450nmの吸収が最大のものを採用した。得られたCO結合還元差スペクトルから、450nmと490nmの吸光度の差($\Delta A_{450\text{nm}-490\text{nm}}$)に対するCyt.P450およびCyt.P420のモル吸光係数91および $-11\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ を用いて、また420nmと490nmの吸光度の差($\Delta A_{420\text{nm}-490\text{nm}}$)に対するP-450およびP-420のモル吸光係数 -41 および $110\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ を用いて、以下の連立方程式から両者の同時定量を行った。

$$\Delta A_{450\text{nm}-490\text{nm}} = 91 [\text{Cyt.P450}] - 11 [\text{Cyt.P420}]$$

$$\Delta A_{420\text{nm}-490\text{nm}} = -41 [\text{Cyt.P450}] + 110 [\text{Cyt.P420}]$$

(濃度の単位はいずれもmM)

NADH-チトクロム b_5 還元酵素およびNADPH-チトクロムP450還元酵素の活性測定：fp1活性測定には電子受容体としてフェリシアン化カリウムを用い、フェリシアン還元活性として25℃で測定した⁶⁾。試料10 μ lに1M リン酸緩衝液 (pH7.4) 200 μ l, 10mM フェリシアン化カリウム44 μ lおよびH₂Oを添加し、総量を1.98mlとした。これに10mM NADH (2%(w/v) Na₂CO₃に溶解したもの) 20 μ lを添加して反応を開始し、フェリシアン化カリウムの還元に伴う420nmの吸光度の減少を追跡した。反応は、初期では0次反応とみなし、初期の吸光度変化から次式に従い活性(試料単位体積あたり) および比活性を求めた。

活性 (mmolフェリシアン化物還元/min/ml)

$$= (1 \text{ 分間あたりの420nmの吸光度変化}) \times (\text{反応液の体積 } 2 \text{ ml}) \\ / 1.02 \times (\text{試料体積 } 0.01 \text{ ml})$$

比活性 (mmolフェリシアン化物還元/min/mg タンパク質)

$$= (\text{活性, mmolフェリシアン化物還元/min/ml}) \\ / (\text{試料中のタンパク質濃度, mg/ml})$$

ここで、1.02は420nmにおけるフェリシアン化カリウムとフェロシアン化カリウムのミリモル吸光係数の差である。

fp2活性測定には電子受容体としてチトクロムc (Cyt.c) を使用し、Cyt.c還元活性として25℃で測定した⁸⁾。試料10 μ lに1M リン酸緩衝液 (pH7.4) 700 μ l, 2mM Cyt.c 50 μ l, 0.1M シアン化カリウムおよびH₂Oを添加し、総量を1.98mlとした。これに4.2mM NADH (2%(w/v)Na₂CO₃に溶解したもの) 20 μ lを添加して反応を開始し、Cyt.cの還元に伴う550nmの吸光度の増加を追跡した。反応は、初期では0次反応とみなし、初期の吸光度変化から次式に従い活性(試料単位体積あたり) および比活性を求めた。

活性 (mmol Cyt.c還元/min/ml)

$$= (1 \text{ 分間あたりの550nmの吸光度変化}) \times (\text{反応液の体積 } 2 \text{ ml}) \\ / 21.1 \times (\text{試料体積 } 0.01 \text{ ml})$$

比活性 (mmol Cyt.c還元/min/mg タンパク質)

$$= (\text{活性, mmol Cyt.c還元/min/ml}) / (\text{試料中のタンパク質濃度, mg/ml})$$

ここで、21.1は550nmにおけるCyt.cの酸化型と還元型のミリモル吸光係数の差である。

3-3 結果および考察

3-3-1 各種界面活性剤による肝ミクロゾーム中の電子伝達系膜タンパク質の可溶化

初めに、アルキルグルコシド (AG) 系, ショ糖エステル (SE) 系, 胆汁酸 (BA) 系およびポリオキシエチレンアルキルエーテル (POEAE) 系の各種界面活性剤を用いて Ms電子伝達系膜タンパク質の可溶化を行った。結果をTable 3-1に示す。AG系界面活性剤であるHTG, OTG, OGおよびNGはいずれも, Cyt.*b*₅およびfp2を90%以上の高い回収率で可溶化した。一方, Cyt.P450およびfp1の可溶化率は低く, なかでもCyt.P450の可溶化率は, NGを除くと10%台であった。すなわち, AG系界面活性剤がCyt.*b*₅とfp2に対して, 高い可溶化選択性を示す界面活性剤であることが明らかになった。SE系, POEAE系界面活性剤も比較的高い回収率でCyt.*b*₅とfp2を可溶化した。しかし同時に, Cyt.P450の可溶化率は30~60%とAG系界面活性剤より高い値を示し, AG系に比べ可溶化選択性が劣っていることが分かった。BA系界面活性剤は検討した界面活性剤の中で最もよくCyt.P450を可溶化した。しかし, Cyt.*b*₅, fp1およびfp2も同様によく可溶化されている。SCを例にとると, Cyt.*b*₅, Cyt.P450, fp1, fp2および総タンパク質のいずれの可溶化率も60~76%の範囲内に収まっていることが分かる。このような非選択性は他の界面活性剤には見られない現象である。これは, BA系界面活性剤ミセルの特異的な性質によるものと考えられる。BAは生体膜を可溶化する際, 非常に高い比率で脂質分子と混合ミセルを形成することが知られている⁹⁾。この混合ミセルにおいて, BA分子は脂質分子と側面同士で疎水性相互作用し, 脂質二分膜の形を維持したまま, その周りを取り囲んでいる。したがって, 膜タンパク質は脂質二分膜に埋まったままBA系界面活性剤によって可溶化されているものと思われる。そのため, 非選択的な可溶化が起こるものと考えられる。

3-3-2 アルキルグルコシド系界面活性剤によるMsタンパク質の可溶化特性

前節でAGがMs中のCyt.*b*₅とfp2に対して, 可溶化選択性の非常に高い界面活性剤であることが明らかになった。高い選択性は電子伝達系膜タンパク質間の分離に有用である。

Table 3-1 Solubilization yields of the microsomal proteins with various surfactants

Surfactant	Solubilization yield, %				
	Cyt. <i>b</i> ₅	Cyt.P450	fp1	fp2	Total protein
(alkylglucoside)					
1.5% HTG	93.6	11.5	37.9	95.5	42.3
1.5% OTG	94.6	11.2	55.5	98.8	47.8
1.5% OG	93.5	17.7	39.0	97.6	43.8
1.0% NG	91.4	24.1	58.9	94.5	42.9
(sugar ester)					
1.0% SMC	90.0	40.3	54.2	102	46.7
0.5% SML	86.5	49.3	76.3	97.7	48.5
1.5% SMCh	88.6	28.4	28.1	93.8	40.2
(bile salt)					
1.5% SC	64.0	76.1	60.6	65.8	60.4
1.0% SDC	109	79.6	97.1	101	82.4
1.5% STC	87.1	77.8	85.2	88.5	68.8
1.0% STDC	104	89.5	96.1	104	85.5
(polyoxyethylene alkyl ether)					
0.5% TX100	95.9	56.5	70.4	102	55.0
0.2% EM911	74.6	46.5	30.9	79.0	48.1

Solutions contain 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 3.5 mg/ml protein, 1 mM EDTA, and 20%(v/v) glycerol.

そこで、このAG系界面活性剤のMsタンパク質に対する可溶化特性を詳細に調べ、膜タンパク質間の分離のための最適な可溶化条件について検討した。

まずAG系界面活性剤のMsタンパク質の可溶化特性について検討した。初めに、Msタンパク質の可溶化時間について検討した。OTGを用いたときのインキュベート時間と総タンパク質の可溶化率との関係をFig.3-1に示す。可溶化率は測定を開始した15分後から120分までほぼ一定の値となった。すなわち、OTGによるMsタンパク質の可溶化が非常に迅速に行われていることが分かった。次に、可溶化に及ぼす界面活性剤濃度の影響について検討した。結果をFig.3-2に示す。Msタンパク質の可溶化率は、各AGの臨界ミセル濃度 (cmc ; OG : 0.73%¹⁰⁾, NG : 0.20%¹¹⁾, HTG : 0.88%¹²⁾, OTG : 0.28%¹²⁾ ; いずれも w/v) 付近で急激に上昇したのち、ほぼ一定の値となった。各AGの1.5%(w/v)における可溶化率は40～50%であり、アルキル鎖長や糖とアルキル鎖のエーテル結合の種類に依存しないことが分かった。

可溶化において、目的のタンパク質を変性させないことは重要な問題である。そこで、MsにAG系界面活性剤を添加したときの、各電子伝達系膜タンパク質の安定性について検討した。OTGの添加に伴うCyt.*b*₅とCyt.P450の吸光度から測定した見掛けの含量およびfp1とfp2の活性の経時変化をTable 3-2に示す。OTGの存在によって、Cyt.*b*₅の含量がわずかに増加した。これは、OTGの添加によってMs懸濁液の濁りが減少したためと考えられる。fp1およびfp2の活性は、ほとんど変化しなかった。したがって、これら3つの膜タンパク質はOTGの存在によって、変性を受けないことが明らかになった。一方、Cyt.P450の含量はOTGの添加によって大きく減少した。また、そのスペクトルから変性型のCyt.P420の生成していることが分かった。

最後に、Cyt.*b*₅およびfp2のための最適な可溶化条件について検討した。Fig.3-3にOTG濃度と各タンパク質の可溶率の関係を示す。Fig.3-2と同様、各タンパク質の可溶化率はOTGのcmc付近で急激に増加した。OTG濃度1.5%(w/v)においてCyt.*b*₅およびfp2はほぼ100%可溶化されたのに対し、fp1は55%程度しか可溶化されなかった (Table3-1) 。Cyt.P450の可溶化率はOTG濃度1%(w/v)のとき最大となり、その後OTG濃度の増加とともに減少した。前節でも述べた通り、OTGがCyt.*b*₅とfp2に対し高い選択性を有していることが分かる。この結果から、Cyt.*b*₅とfp2の可溶化率が高く、Cyt.P450とfp1の可溶化率が安定している1.5%(w/v)を最適OTG濃度とした。

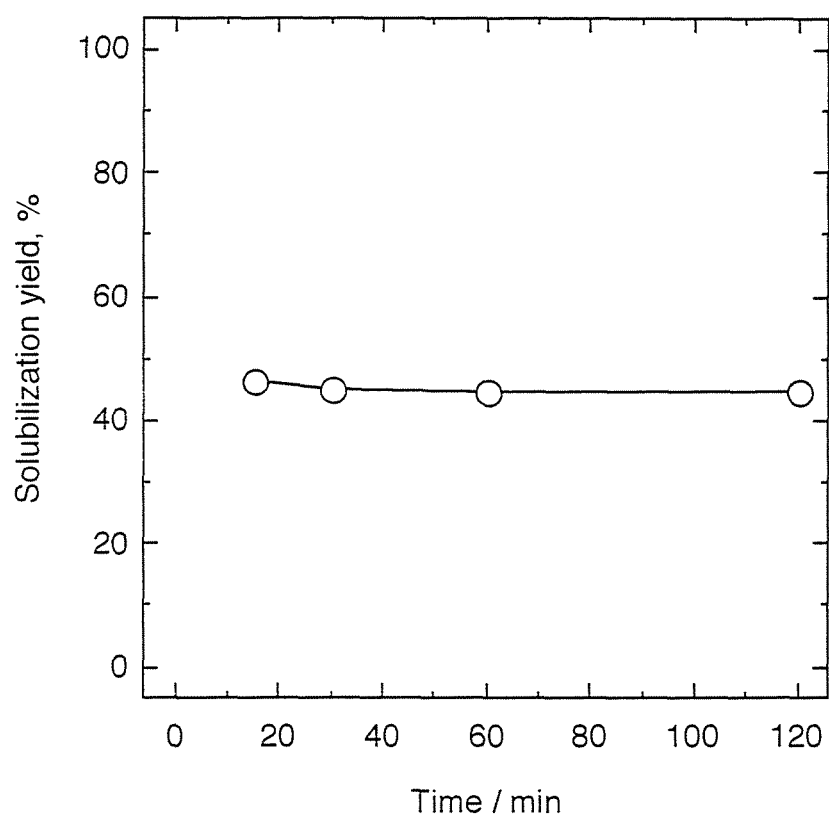


Fig. 3-1 Effect of incubation time on the solubilization of the microsomal protein.

Condition : 3.5 mg/ml protein, 1.5%(w/v) OTG, 10 mM potassium phosphate, 1 mM EDTA, 20%(v/v) glycerol, pH 7.4, 4°C.

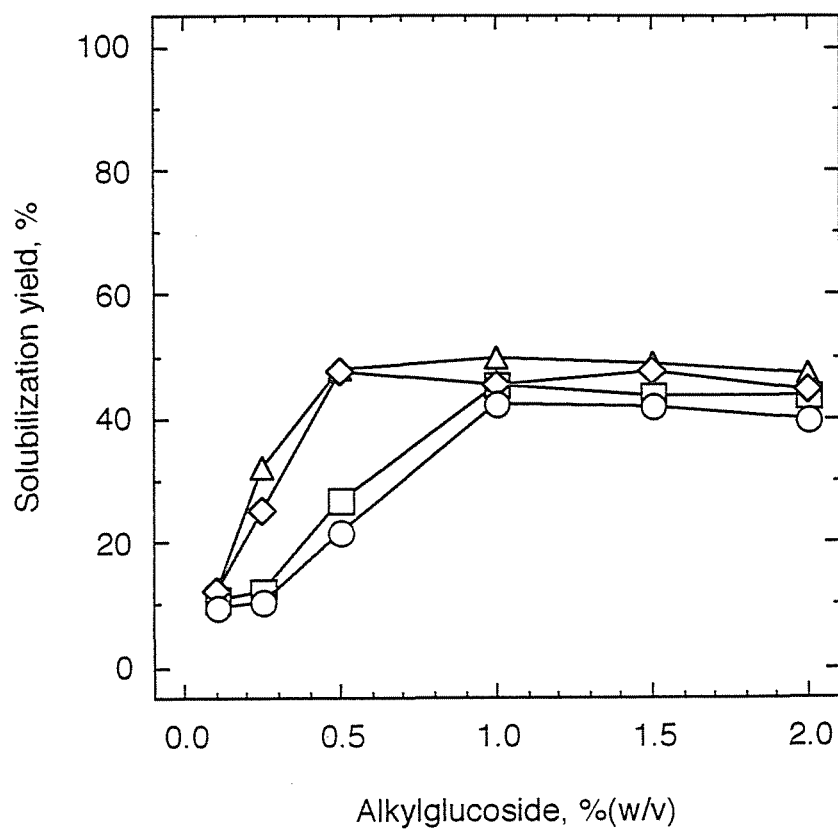


Fig. 3-2 Effect of alkylglucoside concentration on the solubilization of the microsomal protein.

Alkylglucoside : (○) HTG, (◇) OTG, (□) OG, (△) NG.

Condition : 3.5 mg/ml protein, 10 mM potassium phosphate, 1 mM EDTA, 20%(v/v) glycerol, pH 7.4, 4°C.

Table 3-2 Stability of the microsomal electron transfer proteins
in OTG micellar solution

	Recovery, %			
	Cyt. <i>b</i> ₅	Cyt.P450	fp1	fp2
without OTG	100	100	100	100
with 1.5% OTG				
30 min	108	63	100	102
60 min	107	64	98	98
180 min	106	68	97	105

Solution contains 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4),
3.5 mg/ml protein, 1 mM EDTA, and 20%(v/v) glycerol.

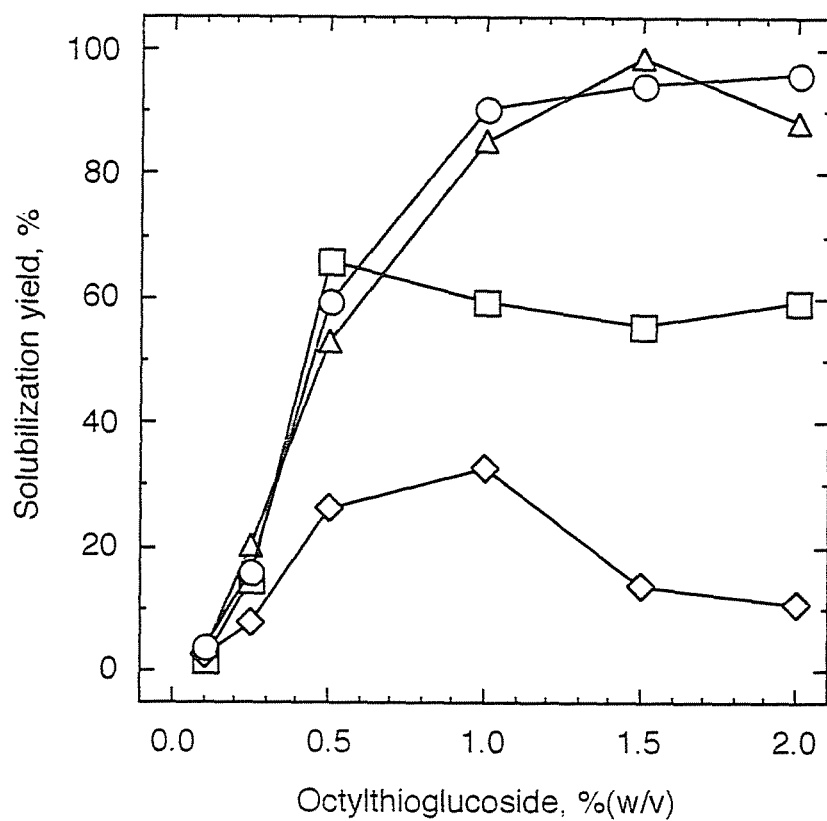


Fig. 3-3 Effect of octylthioglucoside concentration on the solubilization of the microsomal electron transfer proteins.

Protein : (○) cytochrome b_5 , (◇) cytochrome P450, (□) NADH-cytochrome b_5 reductase (fp1), (△) NADPH-cytochrome P450 reductase (fp2).

Condition : 3.5 mg/ml protein, 10 mM potassium phosphate, 1 mM EDTA, 20%(v/v) glycerol, pH 7.4, 4°C.

安定している1.5%(w/v)を最適OTG濃度とした。

可溶化選択性は脂質や膜タンパク質を含めたMs成分の量ならびに塩濃度の影響を受けることが知られている。Figs.3-4および3-5に1.5%(w/v)OTGを用いたときの各タンパク質の可溶化率に及ぼすMs量およびリン酸緩衝剤濃度の影響をそれぞれ示す。ここでMsの量は、Msに含まれるタンパク質濃度として表した。Fig.3-4において、Cyt.*b*₅とfp2の可溶化率はタンパク質濃度の増加とともに減少するのに対し、Cyt.P450とfp1の可溶化率は増大した。一方、リン酸濃度の増加に伴い、Cyt.*b*₅とfp2の可溶化率は100%でほぼ一定だったのに対し、Cyt.P450とfp1の可溶化率は急激に増大した（Fig.3-5）。したがって、OTGに対してMs量が低いほど、また塩濃度が低いほど、Cyt.*b*₅とfp2に対する高い選択性が得られることが明らかになった。タンパク質の精製の際、Ms量が多いほど一度に処理できるタンパク質量が多くなることから、ここではCyt.*b*₅とfp2の高い可溶化率を維持している3.5mg/mlを可溶化の最適Msタンパク質濃度とした。また、リン酸塩は10mMを最適濃度とした。

このような選択性の変化はOTGと脂質との混合ミセルの性質に依存しているものと考えられる。可溶化の過程において、膜タンパク質は可溶化している混合ミセルに分配し、膜タンパク質-混合ミセル複合体が形成される。また一般的に、界面活性剤に対するMs量が多いとき、脂質を多く含んだ大きな混合ミセルが形成されることが知られている。事実、可溶化したMs溶液の濁りは界面活性剤／Msの量比が小さいほど、増大することが観察された。Cyt.P450やfp1は、Cyt.*b*₅やfp2に比べ、おそらく疎水性が大きいため、脂質を多く含んでいる相、すなわち大きな混合ミセルもしくは可溶化されなかった膜残渣に分配しているものと思われる。一方、Cyt.*b*₅やfp2はOTGをより多く含んだ相、すなわち小さい混合ミセルに分配するものと思われる。Fig.3-4では、Ms量（タンパク質濃度）の増加にともない、大きい混合ミセルが形成され、その結果、選択性が失われていったものと考えられる。一方、塩が共存すると界面活性剤の疎水性が増すことが知られている。そのため、Fig.3-5において、Cyt.P450やfp1の可溶化率が増大したものと考えられる。

3-3-3 可溶化によるチトクロム*b*₅とチトクロムP450の分離

前節では、AG系界面活性剤によるMsタンパク質の可溶化特性を調べ、電子伝達系膜タンパク質間の分離に最適な可溶化条件を検討した。ここでは、電子伝達系膜タンパク質

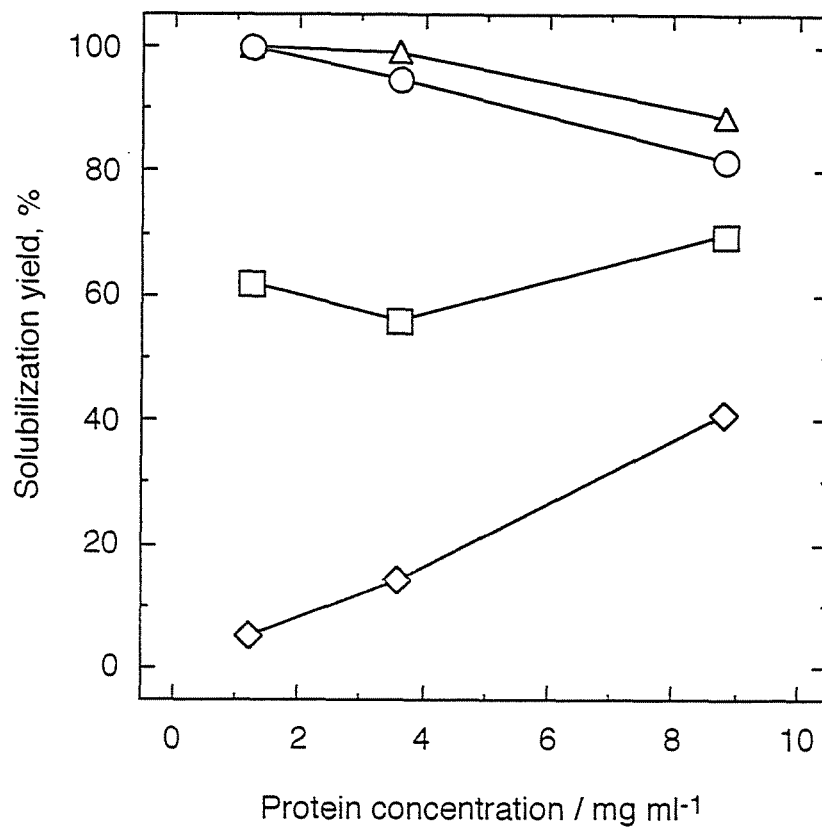


Fig. 3-4 Effect of microsomal protein concentration on the solubilization of the microsomal electron transfer proteins.

Protein : (○) cytochrome *b*₅, (◇) cytochrome P450, (□) NADH-cytochrome *b*₅ reductase (fp1), (△) NADPH-cytochrome P450 reductase (fp2).

Condition : 3.5 mg/ml protein, 10 mM potassium phosphate, 1 mM EDTA, 20%(v/v) glycerol, pH 7.4, 4°C.

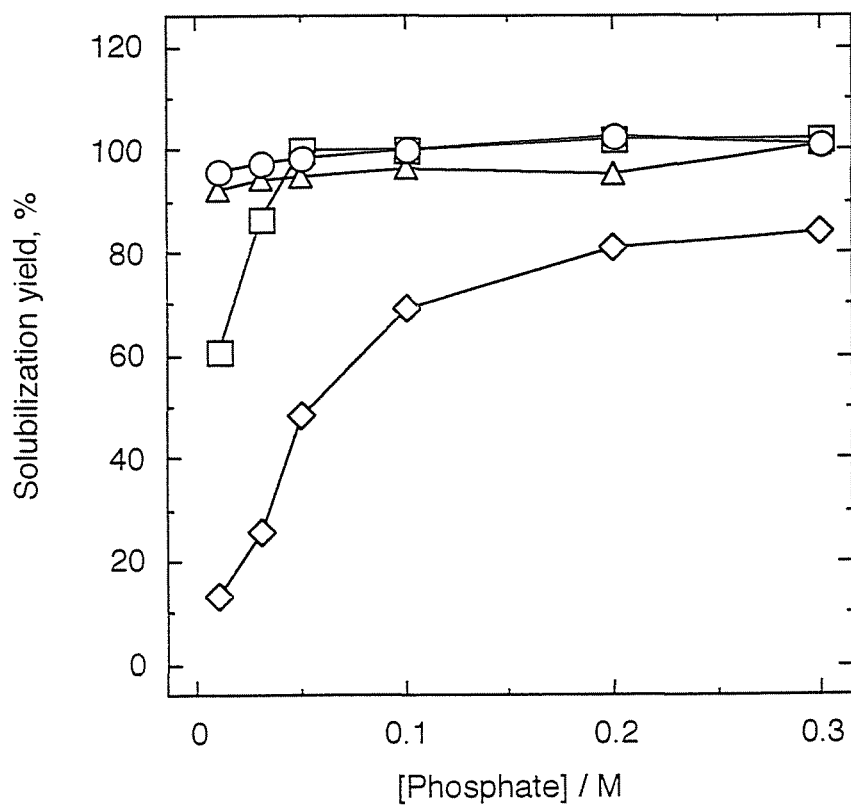


Fig. 3-5 Effect of phosphate concentration on the solubilization of the microsomal electron transfer proteins.

Protein : (○) cytochrome b_5 , (◇) cytochrome P450, (□) NADH-cytochrome b_5 reductase (fp1), (△) NADPH-cytochrome P450 reductase (fp2).

Condition : 3.5 mg/ml protein, 10 mM potassium phosphate, 1 mM EDTA, 20%(v/v) glycerol, pH 7.4, 4°C.

のなかでもCyt. b_5 とCyt.P450に着目し、OTGの高い可溶化選択性を利用したCyt.P450からCyt. b_5 の分離法の開発を試みた。この方法は、二段階の可溶化からなる。すなわち、まずOTGを用いてMsからCyt. b_5 を選択的に可溶化し、残った沈殿（残渣）を緩衝溶液で洗浄したのち、今度はSCで処理し、Cyt.P450を可溶化するというものである（実験操作を参照）。

Table 3-3に、二段階の可溶化における各画分中のタンパク質の回収率を示す。一回目の可溶化後の上清（S 1）には、100%近いCyt. b_5 が可溶化されていることが分かる。そのため、一回目の可溶化後の残渣（P 1）以降の画分には検出されなかった。一方、Cyt.P450は、S 1画分にはわずかに11%しか可溶化されず、P 1画分に57%が回収された。P 1画分中のCyt.P450はSCによって可溶化され、その上清（S 2画分）に40%以上が回収された。なお、S 1、P 1それぞれの画分におけるCyt.P450の回収率の和が100%にならないのは、変性してCyt.P420となったためである（Table3-2）。この変性したCyt.P420は25%がS 1画分中に回収されたが、S 2画分にはCyt.P420は検出されなかった。したがって、S 2画分中にCyt. b_5 およびCyt.P420から完全に分離したCyt.P450を得ることができた。

3-4 結言

本章では、ミセル水性二相分配に先立って行われる可溶化について、肝ミクロゾーム中の4つの電子伝達系膜タンパク質を対象に検討した。アルキルグルコシド（AG）系、ショ糖エステル系、胆汁酸系およびポリオキシエチレンアルキルエーテル系の各界面活性剤を用いて可溶化を行ったところ、AG系界面活性剤がCyt. b_5 およびfp2に対し高い可溶化選択性を有することが明らかになった。さらに、最適な可溶化条件を検討したのち、この選択性を利用してCyt.P450からのCyt. b_5 の分離を試みた。OTGで可溶化した後の残渣を、SCで再可溶化することにより、Cyt. b_5 ならびにCyt.P450の変性型であるCyt.P420から完全に分離したCyt.P450を得ることができた。本法は、わずか2回の可溶化のみでCyt.P450をCyt. b_5 から迅速かつ簡便に分離できることから、Cyt.P450の精製に有用な分離法であると考えられる。

Table 3-3 Two-step solubilization of Cyt.*b*₅ and Cyt.P450.

Fraction	Recovery, %		
	Cyt. <i>b</i> ₅	Cyt.P450	Total protein
Ms	100	100	100
S1	95	11	48
P1	nd	57	46
S2	nd	43	31
P2	nd	7	10

nd: not detected

引用文献

- 1) A. Helenius and K. Simons, *Biochim. Biophys. Acta*, **415**, 29-79 (1975).
- 2) Y. Imai, *J. Biochem.*, **80**, 267-276 (1976).
- 3) H. Tani, T. Saitoh, T. Kamidate, T. Kamataki, and H. Watanabe, *Anal. Sci.*, **13**, 747-751 (1997).
- 4) T. Kamataki and H. Kitagawa, *Japan. J. Pharmacol.*, **24**, 195-203 (1974).
- 5) P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk, *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85 (1985).
- 6) T. Omura and S. Takesue, *J. Biochem.*, **67**, 249-257 (1970).
- 7) Y. Imai and R. Sato, *Eur. J. Biochem.*, **1**, 419-426 (1967).
- 8) K. Mihara and R. Sato, *J. Biochem.*, **71**, 725-735 (1972).
- 9) N. A. Mazer, G. B. Benedek, and M. C. Carey, *Biochemistry*, **19**, 601-615 (1980).
- 10) K. Shinoda, T. Yamaguchi, and R. Hori, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **34**, 237-241 (1961).
- 11) R. M. Garavito, Z. Markovic-Housley, and J. A. Jenkins, *J. Crystal Growth*, **76**, 701-709 (1986).
- 12) S. Saito and T. Tsuchiya, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 503-508 (1985).

第4章 アルキルグルコシド系界面活性剤ミセル-水溶性ポリマー混合水溶液の 二相分離による膜タンパク質の抽出分離

4-1 緒言

序論でも述べたように、TX114ミセル水溶液は曇点と呼ばれる温度以上に加温すると、二相分離することが知られており、この現象はミセル水性二相分配法として水溶性タンパク質と膜タンパク質の簡便な分離法に応用されている¹⁻⁴⁾。

しかし、この方法にはいくつかの問題点がある。まず第一に、使用しうる界面活性剤がTX114に限定されていることである。これは、生体膜からの可溶化に際してもTX114しか用いることができないことを意味している。したがって、TX114で可溶化できない膜タンパク質や変性する膜タンパク質には適用できない。第二に、相分離温度が高い点である。TX114の場合、通常溶液は30℃にまで加温され、相分離が行われている。これでは、熱に弱いタンパク質の変性を引き起こす危険性がある。第三に、タンパク質の抽出性が主にそのタンパク質の疎水性にのみ依存していることである。したがって、従来のミセル水性二相分配法では疎水的な膜タンパク質同士の分離が困難である。このような問題点に対する解決は現在ほとんど試みられていない。

第2章において、このような制限に捕らわれることのない、新規な二相分離系を探索した。本章では、その中でもアルキルグルコシド系界面活性剤と水溶性ポリマー混合水溶液に着目した。アルキルグルコシドはタンパク質に対する変性作用が小さいとされ、近年膜タンパク質の可溶化に広く用いられている。また、この二相分離系は相分離温度の低温域で二相分離するため、タンパク質の熱変性を抑えることが可能となる。加えて第2章では、この二相分離系における水溶性タンパク質の分配挙動がポリマー水性二相分配系におけるそれとよく一致していることを見出している。したがって、ポリマー水性二相分配法において行われている、電荷やアフィニティリガンドの導入による分配の制御が、本二相分離系においても適用できる可能性がある。そこで本章では、膜タンパク質として肝ミクロゾーム中のCyt.b₅とCyt.P450を対象に、アルキルグルコシド-水溶性ポリマー混合水溶液による抽出を行い、ミセル水性二相分配法としての有用性を検証した。さらに、荷電ポリマーの導入による膜タンパク質間の選択的な分離を行った⁵⁾。

4-2 実験

4-2-1 試薬および装置

n-オクチル- β -D-グルコシド (OG) , *n*-ヘプチル- β -D-チオグルコシド (HTG) および *n*-オクチル- β -D-チオグルコシド (OTG) はドータイト製を, *n*-ノニル- β -D-グルコシド (NG) はSigma社製の市販品を特に精製せずに使用した。

デキストランT-500 (Dx) およびDEAE-デキストラン (DEAE-Dx) (いずれもPharmacia社製, 分子量500,000) は100°Cで乾燥, 恒量したのち使用した。ポリエチレングリコール6000 (PEG6000, 分子量7,500) は和光純薬製のものを特に精製せずに使用した。

その他の試薬は全て市販品の特級を特に精製せずに使用した。

水溶液の温度調整にはヤマト-コマツ製CTE42A型恒温槽を使用した。吸光度の測定には日立製U-2000型ダブルビーム分光光度計を使用した。OTG濃度の測定には島津製誘導結合プラズマ発光分光分析装置を使用した。ミセル-ポリマー混合水溶液の分相を促進するための遠心分離には国産製H-200NR型冷却小型高速遠心機を使用した。

4-2-2 操作

(1) 相分離温度の測定：第2章に準じて行った。

(2) 相体積の測定：第2章に準じて行った。

(3) 肝ミクロゾームの調製：第3章に準じて行った。

(4) チトクロム b_5 の精製：第2章に準じて行った。

(5) チトクロム b_5 のトリプシン消化：第2章に準じて行った。

(6) チトクロムP450の精製：Kamatakiら⁶⁾の方法に準じて行った。全ての操作は4°Cで行った。また, Cyt.P450の安定化のために, 使用した全ての緩衝溶液には終濃度が20%(v/v)となるようにグリセロールを加えた。

フェノバルビタールを投与したラット肝ミクロゾームから0.5%(w/v)コール酸を含む10mM リン酸緩衝溶液 (pH7.25) でCyt.P450を可溶化した。可溶化溶液をアミノオクチル

セファロースカラムに流したのち、同じ緩衝溶液で洗浄した。その後、0.2%(w/v) Emulgen911と0.5%(w/v)コール酸を含む同緩衝溶液でCyt.P450を溶出させた。次いで、Cyt.P450画分をハイドロキシアパタイトカラムに流した。カラムに30mM リン酸緩衝溶液 (pH7.4) を流して過剰の界面活性剤を洗浄したのち、300mM リン酸緩衝溶液 (pH7.4) でCyt.P450を溶出させた。Cyt.P450溶液は最終的に10mM リン酸緩衝溶液で透析した。精製標品は使用時まで -80°C で保存した。

(7) ラット肝ミクロゾームの可溶化：第3章で得られた条件下で、OTGを用いて行った。

(8) チトクロム b_5 およびチトクロムP450の抽出：操作(4)～(7)で得られたチトクロム b_5 およびチトクロムP450を含む溶液の所定量を1.5-mlサンプルチューブに分取した。これに、OTGおよび水溶性ポリマーを添加し、総量1 mlとした。このとき、OTGの終濃度が2%(w/v)となるようにした。この溶液を混合し、 0°C で10分インキュベートしたのち5,000gで15分間遠心分離した。抽出率は各相のタンパク質濃度および相体積から算出した。

(9) タンパク質の定量：第2章に準じて行った。すなわち、Cyt. b_5 は酸化還元差スペクトルにより、Cyt.P450およびCyt.P420は一酸化炭素結合還元差スペクトルにより測定した。また、総タンパク質濃度はアルブミンを標準タンパク質としてビシンコニン酸法により求めた。

4-3 結果および考察

4-3-1 相分離条件の検討

Cyt. b_5 とCyt.P450の抽出に応用するに先立って、AGと水溶性ポリマーの混合水溶液の相分離に及ぼすCyt.P450の安定化剤であるグリセロールの影響について検討した。PEG6000濃度と20%(v/v) グリセロールを含む2%(w/v) AGミセル水溶液の相分離温度の関係をFig.4-1に示す。この図において、各曲線の低温側で二相分離は起こる。また、比較のためにグリセロールを加えていないときの相分離温度曲線を破線で示した。いずれのアルキルグルコシドについてもグリセロールの添加によって、相分離温度が低下しているこ

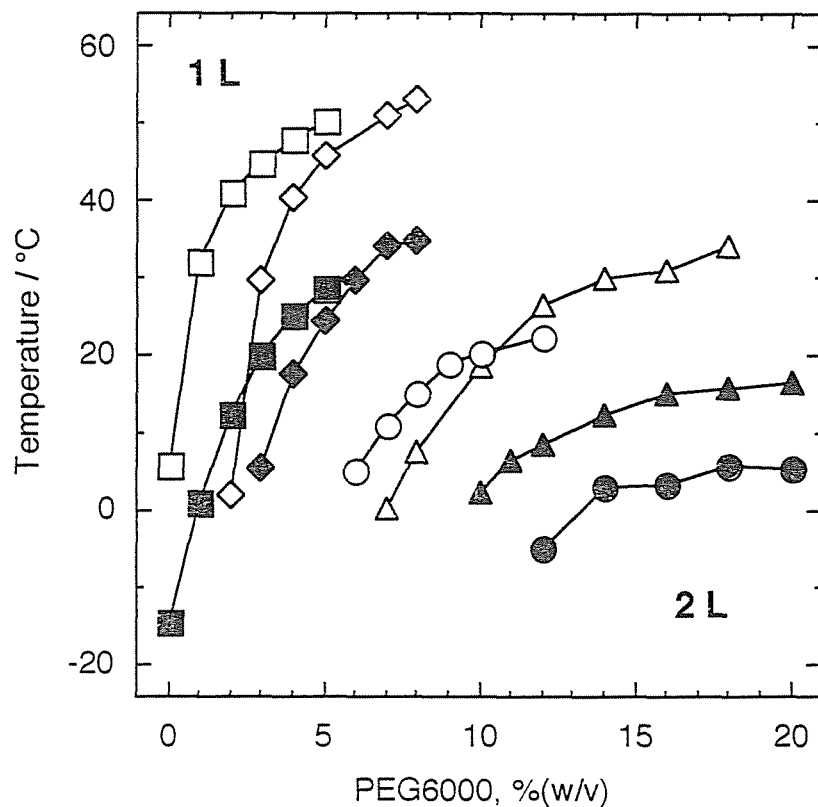


Fig. 4-1 Phase separation temperature in aqueous micellar solutions of 2%(w/v) alkylglucosides and 20%(v/v) glycerol as a function of PEG concentration. Open symbols represent phase separation temperatures in solutions contain no glycerol. One homogeneous solution (1L) is present in the region above respective curves, while two phases (2L) are in the region below the curves.

Alkylglucoside : ($\square$, $\blacksquare$) OTG, ($\diamond$, $\blacklozenge$) NG, ($\triangle$, $\blacktriangle$) OG, ($\circ$, $\bullet$) HTG.

Condition : 10 mM potassium phosphate, pH 7.4.

とが分かる。すなわち、相分離に必要なPEG6000濃度が大きくなることを意味している。グリセロールが存在するうえに、高濃度のPEG6000が加わると、溶液の粘度が増し、操作性が悪くなる。そこで、以後の検討では、二相分離に必要なPEG6000がもっとも少なくても済むOTGを用いることにした。

次に、DxおよびDEAE-Dxについても同様に検討した。結果をFig.4-2に示す。PEG6000のときと同様、グリセロールの添加によって相分離温度は著しく低下し、二相分離領域が縮小した。しかし、オクチルチオグルコシドを用い場合、PEG6000、DxおよびDEAE-Dxのいずれのポリマーの添加によっても、0℃での二相分離が可能であることが分かった。そこで、これらのポリマーを用いて、オクチルチオグルコシド水溶液の二相分離によるCyt.*b*₅とCyt.P450の抽出を行った。

4-3-2 非荷電ポリマー共存下における精製したチトクロム*b*₅およびチトクロムP450の抽出

まず、非荷電ポリマー用いたときのCyt.*b*₅とCyt.P450の抽出を行った。Fig.4-3にCyt.P450、Cyt.*b*₅およびトリプシン消化したCyt.*b*₅の親水ドメイン (t-Cyt.*b*₅) の抽出に及ぼすPEG6000濃度の影響を示す。この図から、Cyt.P450およびCyt.*b*₅は界面活性剤相によく抽出されていることが分かる。Cyt.P450に関してはほぼ定量的に抽出された。また、Cyt.*b*₅の抽出率はPEG濃度の増加とともに増大した。一方、t-Cyt.*b*₅はPEG6000濃度に関らず、界面活性剤相へは抽出されなかった。

次に、Dxを用いたときの抽出結果をFig.4-4に示す。この図から、PEG6000のときと同様、Cyt.P450はほぼ定量的に抽出され、Cyt.*b*₅の抽出はDx濃度の増加とともに増大することが分かった。以上の結果は、第2章でも述べたように、界面活性剤相への抽出にはタンパク質の疎水性が重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

Cyt.P450とCyt.*b*₅の抽出性の違いもまた、疎水性の違いによって説明することができる。両者の疎水性の違いを比較するために、Kyteら⁷⁾の提案したハイドロパシープロットを算出した。ハイドロパシープロットとは、タンパク質を構成する20種のアミノ酸個々に与えられたハイドロパシーインデックス (Table 4-1) と呼ばれる親疎水性のパラメータをタンパク質のアミノ酸配列の適当な間隔 (通常7～13の奇数残基) にまたがって合計し、その区間の中央のアミノ酸残基の位置にその合計値を割り振ったものである。Cyt.*b*₅⁸⁾およ

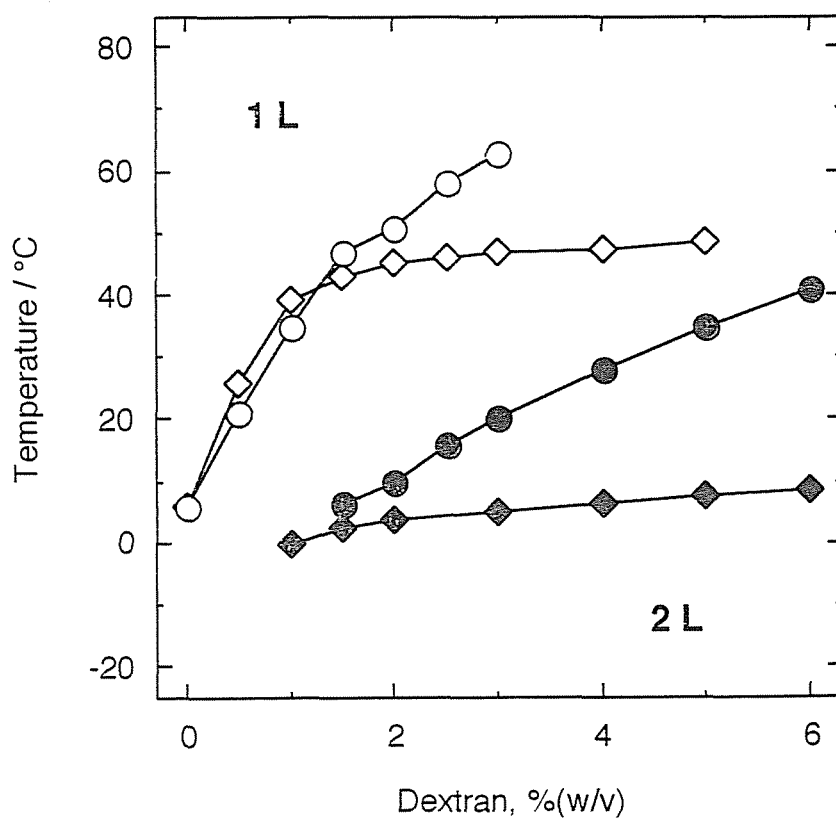


Fig. 4-2 Phase separation temperature in aqueous micellar solution of 2%(w/v) OTG and 20%(v/v) glycerol as a function of dextran concentration. Open symbols represent phase separation temperatures of the solutions contain no glycerol. 1L and 2L have the same meanings as in Fig. 4-1.

Dextran : ($\circ$, $\bullet$) Dx, ($\diamond$, $\blacklozenge$) DEAE-Dx.

Condition : 10 mM potassium phosphate, pH 7.4.

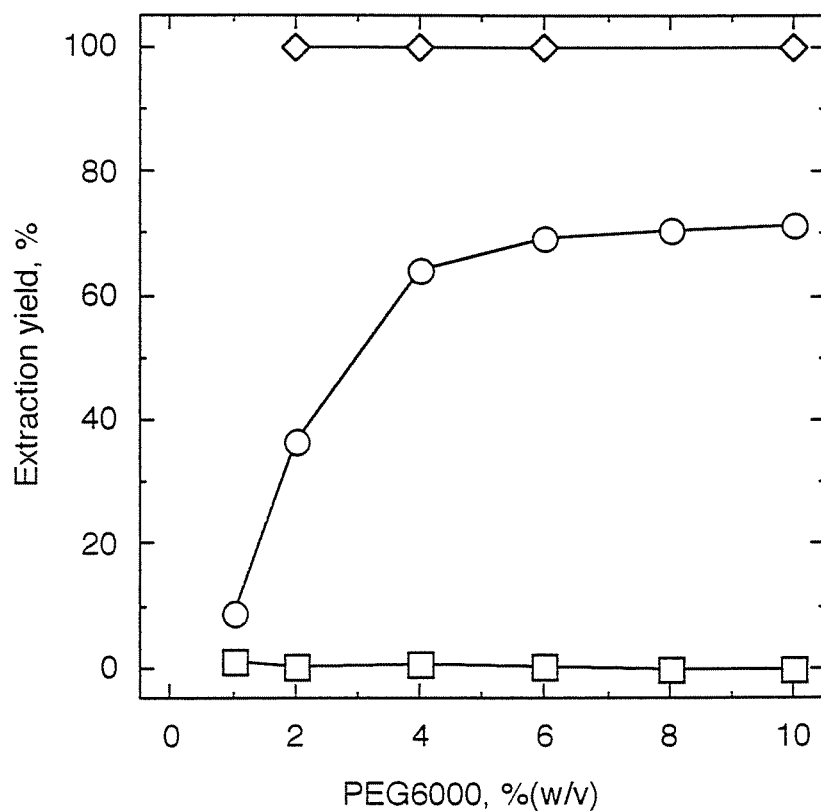


Fig. 4-3 Extraction yields of Cyt.P450, Cyt.*b*₅, and t-Cyt.*b*₅ as a function of the concentration of PEG6000.

Protein : (◇) Cyt.P450, (○) Cyt.*b*₅, (□) t-Cyt.*b*₅.

Condition : 2%(w/v) OTG, 1.3 μ M Cyt.P450, 0.84 μ M Cyt.*b*₅, or 0.25 μ M t-Cyt.*b*₅, 10mM potassium phosphate, 20%(v/v) glycerol, pH 7.4, 0°C.

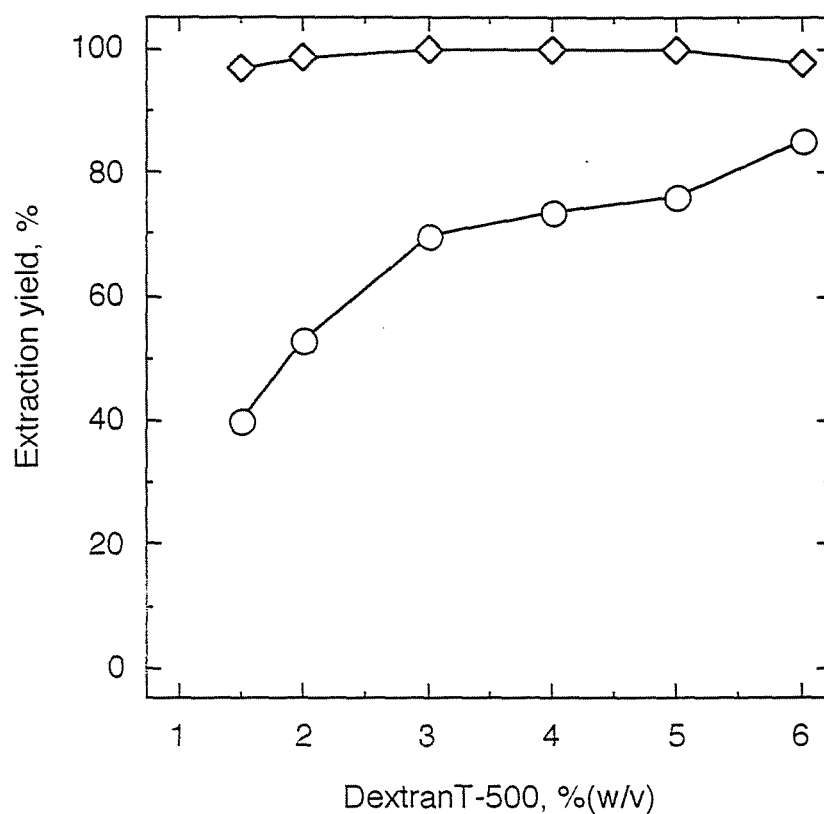


Fig. 4-4 Extraction yields of Cyt.P450 and Cyt.b₅ as a function of the concentration of DextranT-500.

Protein : (◇) Cyt.P450, (○) Cyt.b₅.

Condition : 2%(w/v) OTG, 1.3 μ M Cyt.P450 or 0.84 μ M Cyt.b₅,
10mM potassium phosphate, 20%(v/v) glycerol, pH 7.4, 0°C.

Table 4-1 Hydropathy index.

Amino acid	Hydropathy index
Ile (I)	4.5
Val (V)	4.2
Leu (L)	3.8
Phe (P)	2.8
Cys (C)	2.5
Met (M)	1.9
Ala (A)	1.8
Gly (G)	-0.4
Thr (T)	-0.7
Trp (W)	-0.9
Ser (S)	-0.8
Tyr (Y)	-1.3
Pro (P)	-1.6
His (H)	-3.2
Glu (E)	-3.5
Gln (Q)	-3.5
Asp (D)	-3.5
Asn (N)	-3.5
Lys (K)	-3.9
Arg (R)	-4.5

びCyt.P450⁹⁾のアミノ酸配列から、Table 4-1の値をアミノ酸残基11個間隔で合計したハイドロパシープロットを作成した。結果をFig.4-5に示す。

この図において、縦軸が大きいほどアミノ酸配列のその部分が疎水的であることを示している。Cyt.*b*₅に関しては、膜結合性の疎水ドメインがC末端側にはっきりと現れている。一方、Cyt.P450に関しては、多くの疎水性部分はその分子内に存在していることが分かる。このうち、膜結合ドメインはN末端の20残基程度とされている⁹⁾が詳細は分かっていない。Cyt.P450は疎水性化合物を基質とするため、それらとの結合部位も疎水性アミノ酸が多く含まれている。いずれにせよFig.4-5に表れている疎水部が膜や基質との結合に関与しているものと思われる。分子量の違いもあるが、この図から明らかなように、Cyt.*b*₅に比べCyt.P450の方がより疎水的であると言える。したがって、この疎水性の違いが、Figs. 4-3および4-4で見られた抽出性の違いに反映しているものと考えられる。

第2章でタンパク質の分配に及ぼすポリマー濃度の影響 (Fig.2-14) について検討した。その際、界面活性剤相に分配するタンパク質では、ポリマー濃度の増加に伴い抽出率がより大きくなることが分かった。Figs.4-3および4-4のポリマー濃度の増加に伴うCyt.*b*₅の抽出率の増加は、第2章の結果とよく一致している。タンパク質の抽出は、界面活性剤ミセルとの相互作用による複合体形成と水溶性ポリマーの添加による複合体の界面活性剤相への分配という過程からなると予想される。ここで、Cyt.*b*₅はオクチルチオグルコシドミセルと疎水性相互作用することは明らかである。また、Cyt.*b*₅の抽出挙動は先程の結果から分かっている。しかし、ミセルの分配に関しては明らかになっていない。そこで水溶性ポリマーの添加によりミセルが界面活性剤相に分配していることを立証するために、ポリマー濃度の増加に伴うOTGの分配の変化を調べた。二相分離後の水相中に残存するOTG濃度とPEG6000およびDx濃度の関係をFig.4-6に示す。水相中に残存するオクチルチオグルコシド濃度はPEG6000、Dxいずれのポリマーの濃度増加に伴い減少し、cmcに漸近した。すなわち、水相中のオクチルチオグルコシドミセルはポリマー濃度の増加に伴い界面活性剤相に分配していくことが分かった。したがって、Cyt.*b*₅はミセルと疎水性相互作用によって結合し、ミセルの分配に伴い界面活性剤相に抽出されることが示された。これは、ミセルの分配がCyt.*b*₅の抽出を制御していることを意味している。

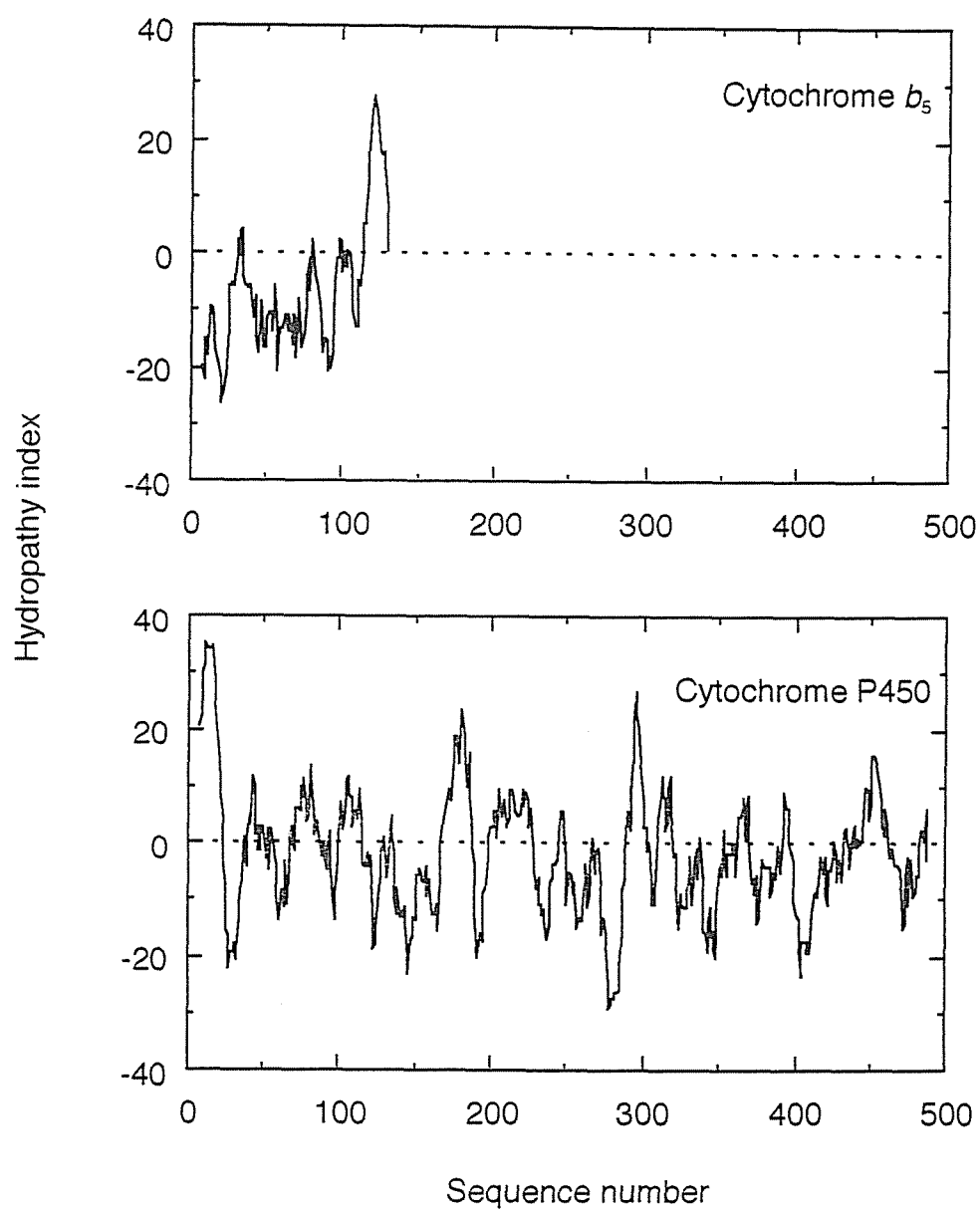


Fig. 4-5 Hydropathy plots for cytochrome b_5 and cytochrome P450.

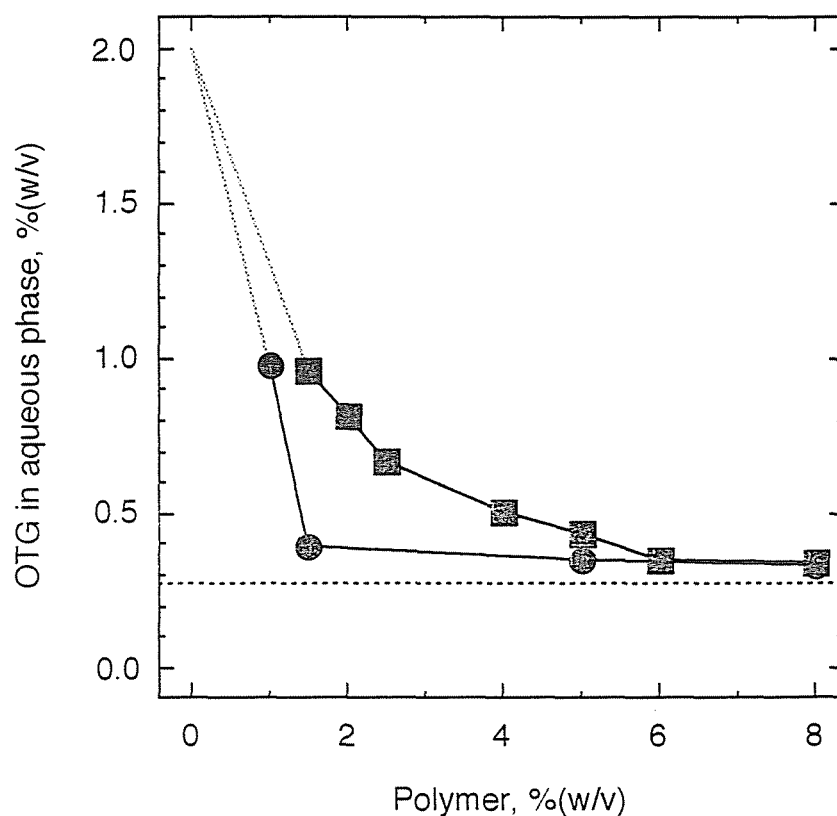


Fig. 4-6 OTG concentration in aqueous phase after phase separation at 0°C as a function of the concentration of Dx or PEG6000.

Horizontal broken line indicates the cmc of OTG.

Polymer : (■) Dx, (●) PEG6000.

Condition : 2%(w/v) OTG, 20%(v/v) glycerol, 10 mM potassium phosphate, pH 7.4, 0°C.

4-3-3 荷電ポリマー共存下における精製したチトクロム b_5 およびチトクロムP450の抽出

前節では、Cyt.P450とCyt. b_5 の疎水性の違いに基づく抽出性の違いが見られた。この結果は、タンパク質の疎水性の違いによる分離が可能であることを示唆するとともに、同様の疎水性を有する膜タンパク質間の分離は困難であることも示している。そこで、タンパク質の電荷に着目し、荷電ポリマーを用いることによる抽出の制御を試みた。

まず、Cyt.P450とCyt. b_5 の持つ電荷について調べた。電荷を有するアミノ酸にはそれぞれTable 4-2に示した酸解離定数 (pKa) を持つ。ここで、pKa値がポリペプチド形成や周囲の環境によって変化せず一定のものであると仮定すると、タンパク質の持つ電荷は個々のアミノ酸の持つ電荷の単純和として次の式により算出することができる¹⁰⁾。

$$Z_c = \sum_{i=1}^4 \frac{n(P_i)}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pKa}(P_i)}} - \sum_{i=1}^5 \frac{n(N_i)}{1 + 10^{\text{pKa}(N_i) - \text{pH}}}$$

ここで、 Z_c はタンパク質の総電荷数、 P_i および N_i はTable4-2に示した電荷を持ったアミノ酸のタイプ、 n はタンパク質に含まれている括弧で示したタイプのアミノ酸残基あるいは末端基の数を表している。Table4-2のpKa値とCyt.P450およびCyt. b_5 のそれぞれに含まれる荷電アミノ酸残基数を上式に代入してpHと Z_c の関係を得た。結果をFig.4-7に示す。この図において、 $Z_c = 0$ となるpHがそのタンパク質の等電点を表している。Cyt.P450は7.4、Cyt. b_5 は4.8であった。また、抽出を行うpH7.4において、Cyt.P450の電荷はほぼ0であり、Cyt. b_5 は負に帯電している。したがって、正電荷を有するポリマーを用いることにより、Cyt. b_5 の抽出を制御することが期待できる。

そこで、DEAE-Dxを用いてそれぞれの抽出を行った。結果をFig.4-8に示す。この図において、破線はDxを用いたときの抽出曲線を表している。Dxに比べ、DEAE-Dxを用いたときCyt. b_5 の抽出率は大きく減少した。これに対し、Cyt.P450の抽出率はほとんど変化しなかった。これは、水相中のDEAE-DxがCyt. b_5 のみと選択的に静電的相互作用により結合したためと考えられる。このことを検証するために次の二つの実験を行った。まず、DEAE-Dxを用いたときのオクチルチオグルコシドの分配を調べた。結果をFig.4-9に示す。DEAE-Dxを用いたときのオクチルチオグルコシドの分配挙動は、Dx（破線）を用いたときと比べ、ほとんど変化が見られなかった。すなわち、DEAE-DxによるCyt. b_5 の抽

Table 4-2 pKa value of charged group of amino acids,
terminal COOH and NH₂.

Type	Amino acid	pKa	Charged group
(anionic)			
N1	t-COOH	3.2	
N2	aspartate	4.0	β-carboxyl
N3	glutamate	4.5	γ-carboxyl
N4	cysteine	9.0	thiol
N5	tyrosine	10.0	phenol
(cationic)			
P1	hystidine	6.4	imidazolium
P2	t-NH	8.2	
P3	lysine	10.4	ε-ammonium
P4	arginine	12.0	guanidinium

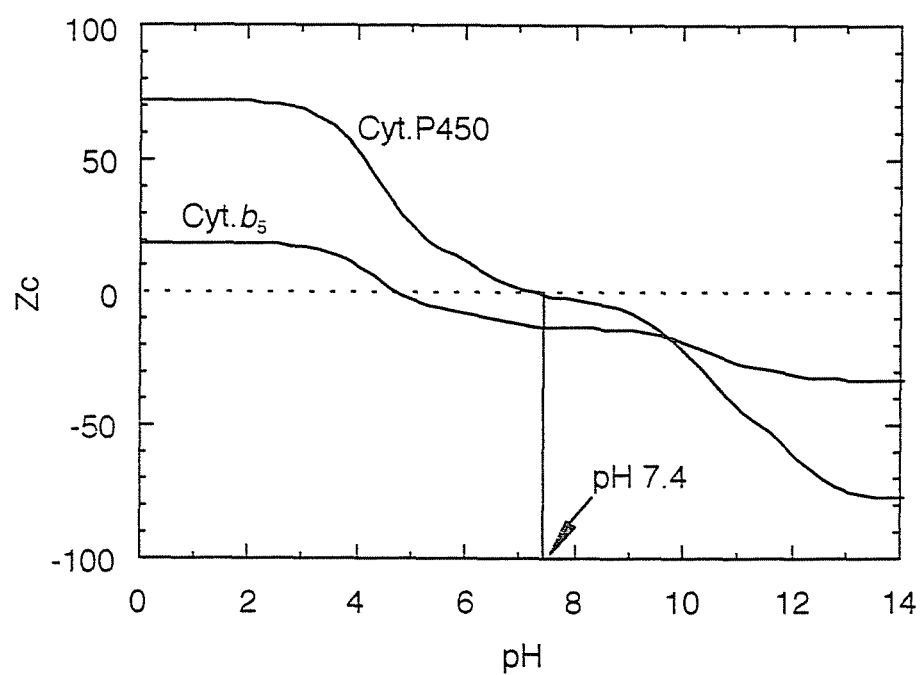


Fig. 4-7 Valences of cytochrome P450 and b_5 calculated on the basis of amino acid sequences as a function of pH.

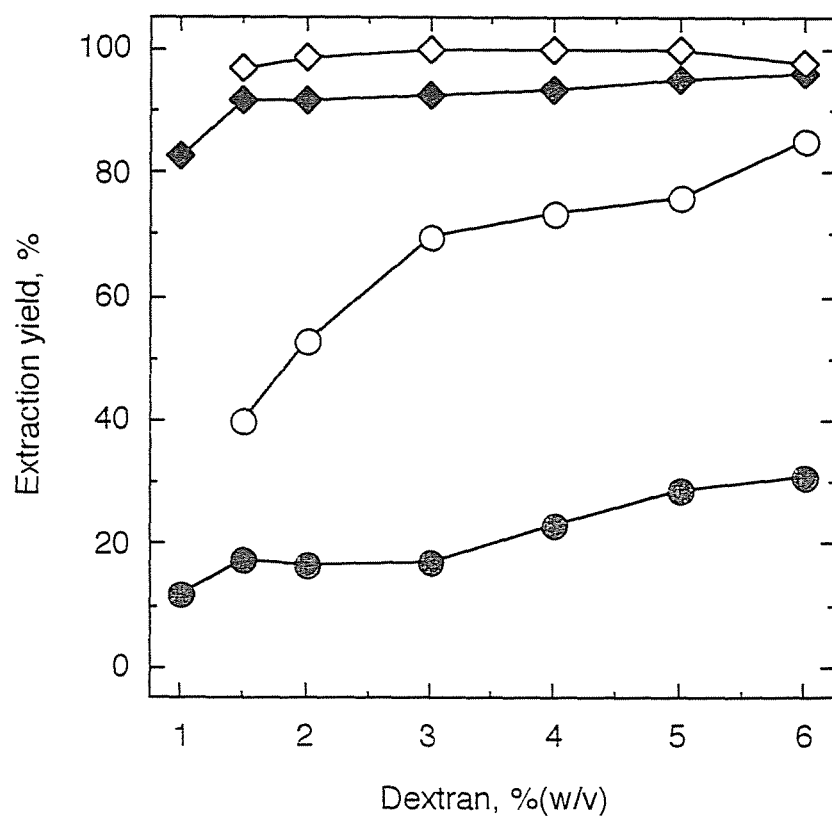


Fig. 4-8 Extraction yields of Cyt.P450 and Cyt. b_5 as a function of the concentration of DEAE-Dx. Open symbols represent extraction yields when Dx was used.

Protein : ($\blacklozenge$, $\lozenge$) Cyt.P450, ($\bullet$, $\circ$) Cyt. b_5 .

Condition : 2%(w/v) OTG, 1.3 μ M Cyt.P450 or 0.84 μ M Cyt. b_5 ,

10mM potassium phosphate, 20%(v/v) glycerol, pH 7.4, 0°C.

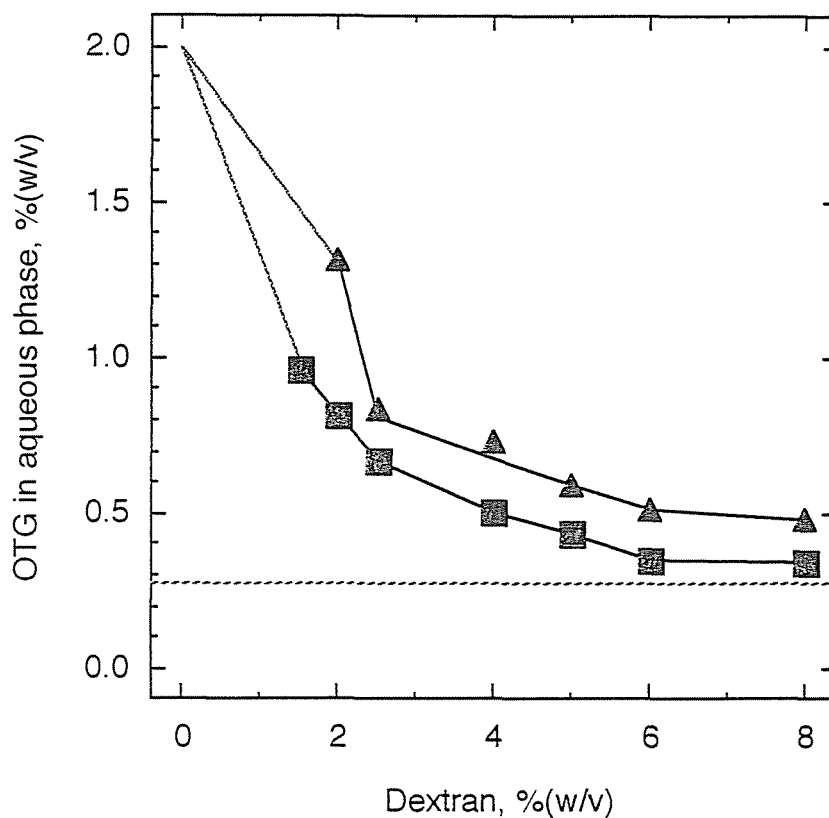


Fig. 4-9 OTG concentration in aqueous phase after phase separation at 0°C as a function of the concentration of Dx ($\square$) or DEAE-Dx ($\triangle$). Horizontal broken line indicates the cmc of OTG.

Dextran : ($\blacksquare$) Dx, ($\blacktriangle$) DEAE-Dx.

Condition : 2%(w/v) OTG, 20%(v/v) glycerol, 10 mM potassium phosphate, pH 7.4, 0°C.

出挙動の変化はOTGミセルの分配挙動の変化によるものではないことが示された。次に、DxおよびDEAE-Dxそれぞれの系でのCyt. b_5 の抽出に及ぼす塩の影響について調べた。塩としてpH緩衝剤であるリン酸カリウムを用いたときの結果をFig.4-10に示す。OTG-Dx系では、Cyt. b_5 の抽出率はリン酸塩濃度の増加とともにわずかに増大した。一方、OTG-DEAE-Dx系において、抽出率は急激に増大し、リン酸カリウム濃度0.4Mのとき、OTG-Dx系とほぼ同程度の値となった。これは、塩の共存によりCyt. b_5 とDEAE-Dxの静電的相互作用がキャンセルされたことを意味している。

これらの結果により、DEAE-Dxとの静電的相互作用が抽出を制御していることが示された。また、このような荷電ポリマーの効果は、塩の添加によって自由に制御できることが分かった。したがって、ミセル水性二相分配法において荷電ポリマーを導入することにより、膜タンパク質間の分離も可能になるもの期待される。

4-3-4 肝ミクロゾーム中のチトクロム b_5 およびチトクロムP450の抽出分離

最後に、OTG-DEAE-Dx二相分離系を用いて、肝ミクロゾーム中のCyt. b_5 とCyt.P450の抽出分離を試みた。初めに、操作(7)で得られたOTG可溶化ミクロゾーム溶液にDEAE-Dxを添加したところ、0℃において二相分離が観察されなかった。これは、もともとOTG-DEAE-Dx系の二相分離領域が狭いことに加えて、脂質などのミクロゾーム成分が二相分離を阻害しているものと考えられる。そこで、DEAE-Dxの効果を活かしつつ、二相分離を達成するために、DEAE-Dxより相分離温度の高いDxと混合する方法を採った。溶液の粘度を考慮して総ポリマー濃度を3%(w/v)に固定し、DEAE-DxとDxの混合比を変化させたときのOTGの相分離温度を調べた。結果をFig.4-11に示す。相分離温度はDEAE-Dxの割合が増すにつれ上昇したのち減少した。ここでDx:DEAE-Dxが2:1のとき、もっとも高い相分離温度が得られた。そこで、この濃度比で抽出を行うことにした。

次に、この条件下でMsの添加量の影響を検討した。結果をFig.4-12に示す。ここで、Msの添加量をタンパク質濃度として表した。Ms量の増加にともない、相分離温度は単調に減少した。すなわち、Ms成分が相分離を阻害することが分かった。Ms量が少ないと、同時に扱うことのできるタンパク質量も少なくなることから、ここでは約1.0mg/mlを抽出の際の、Msタンパク質濃度とすることにした。

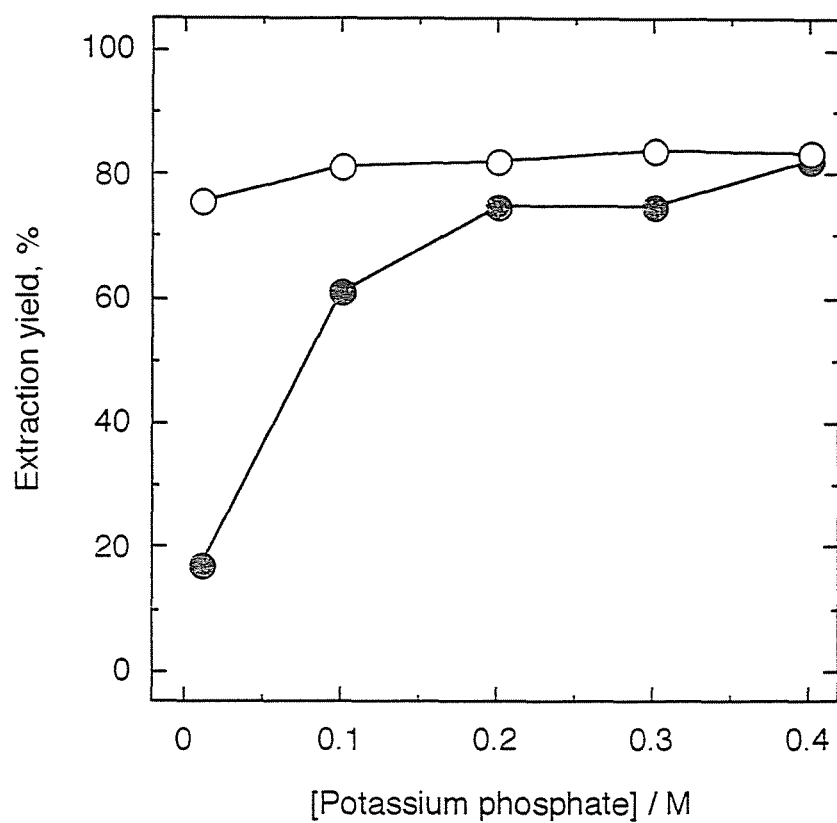


Fig. 4-10 Effect of potassium phosphate concentration on the extraction of Cyt.*b*₅ in OTG - Dx or DEAE-Dx two-phase system.

Dextran : (○) Dx, (●) DEAE-Dx.

Condition : 2%(w/v) OTG, 3%(w/v) Dx or DEAE-Dx, 0.84 μ M Cyt.*b*₅, pH 7.4, 0°C.

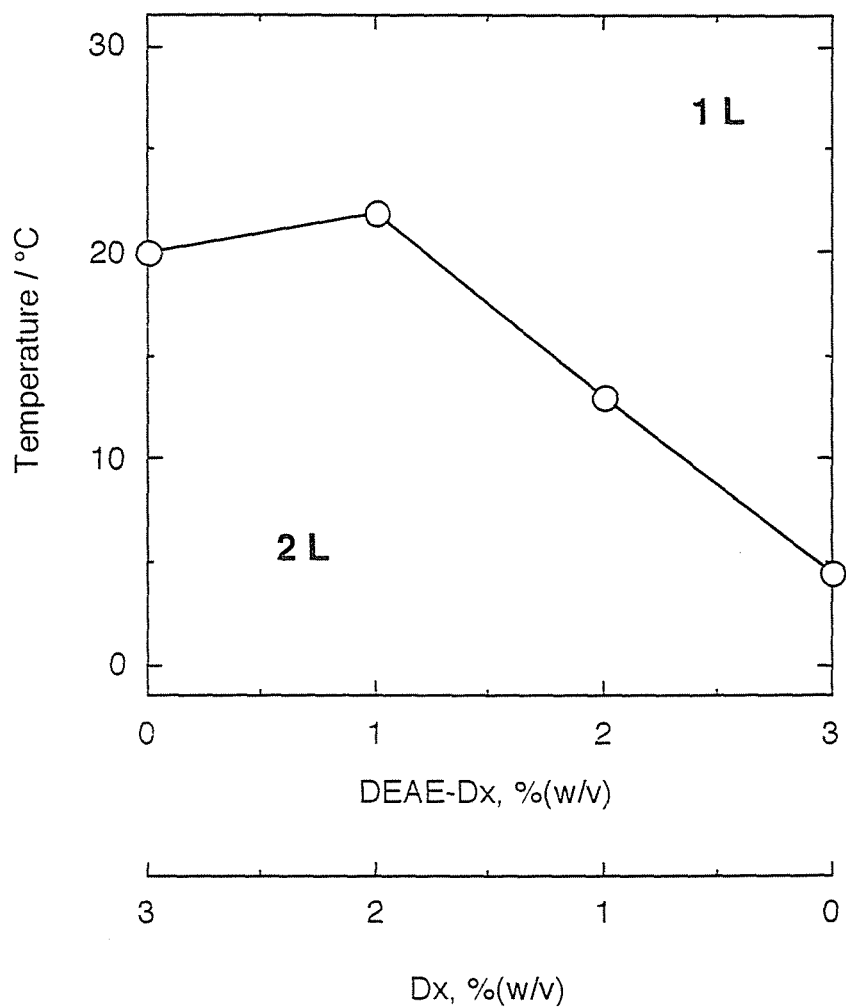


Fig. 4-11 Effect of DEAE-Dx / Dx ratio on the phase separation temperature of an aqueous OTG solution. Total polymer concentration was fixed at 3%(w/v). 1L and 2L have the same meanings as in Fig. 4-1.

Condition : 2%(w/v) OTG, 10 mM potassium phosphate, pH 7.4.

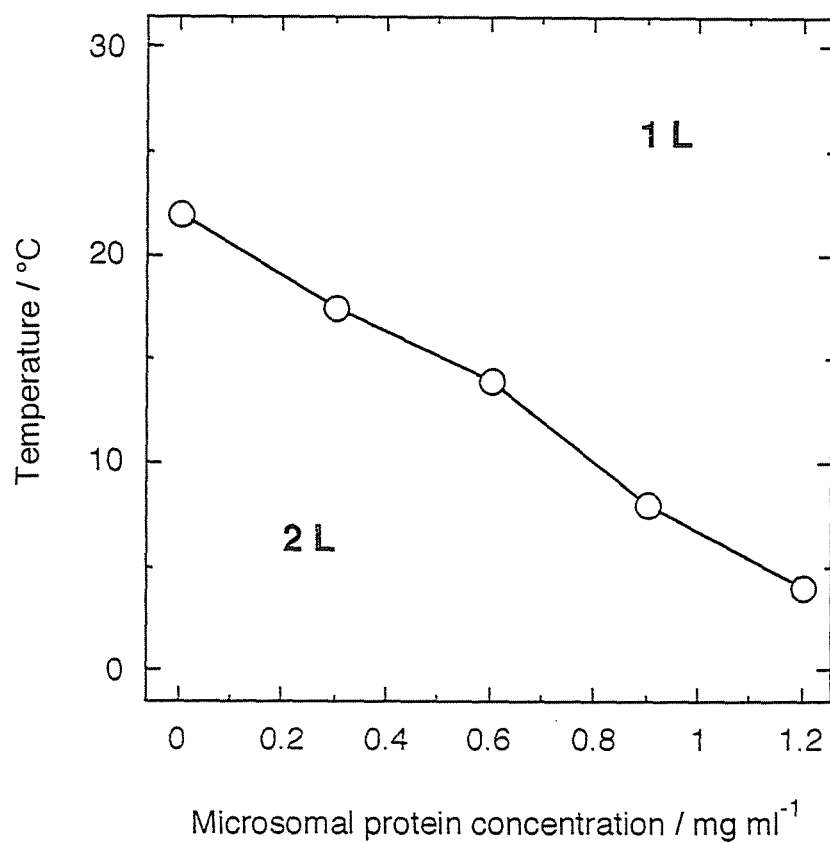


Fig. 4-12 Effect of microsomal proteins on the phase separation temperature of an aqueous mixture of OTG, DEAE-Dx, and Dx. 1L and 2L have the same meanings as in Fig. 4-1.

Condition : 2%(w/v) OTG, 1%(w/v) DEAE-Dx, 2%(w/v) Dx, 10 mM potassium phosphate, pH 7.4.

以上の条件下で、Ms中のCyt.P450とCyt.*b*₅の抽出分離を試みた。比較のために、Dxのみを用いたときの抽出も併せて検討した。Fig.4-13に各相の体積分率およびCyt.P450とCyt.*b*₅の各相への分配を示す。この図から、界面活性剤相の体積が非常に小さいことが分かる。また、DxとDx/DEAE-Dxの系で総体積にほとんど変化のないことが分かった。3%(w/v)Dxを用いた場合、総タンパク質、Cyt.P450およびCyt.*b*₅の抽出率は、それぞれ52, 73および50%であった。一方、Dx/DEAE-Dx(2%/1%)の系では、それぞれ41, 55および21%となり、Cyt.*b*₅とCyt.P450の分離能を向上させることができた。また、可溶化Msにおいても、DEAE-Dxの導入によりCyt.*b*₅の抽出を抑制できることが明らかになった。さらに、以上の抽出操作において、吸収スペクトルから見たCyt.*b*₅の変性は観察されなかった。非常に不安定なCyt.P450についても、その変性の割合は0~30%と低く、ミセル水性二相分配法の特徴である低温での二相分離がこのような安定性に寄与しているものと思われる。

しかし、ここで得られた抽出率はFigs.4-4や4-9で得られた値に比べかなり小さくなっている。これは、可溶化Ms中に存在するリン脂質によるものと思われる。Schürholzら¹¹⁾は、オクチルグルコシドとリン脂質の混合水溶液が二相分離することを見出している。その系ではオクチルグルコシドとリン脂質の混合ミセルが水相中にかなりの量で存在していることを報告している。本二相分離系においても同様の現象が起こっていると考えられ、水相中のリン脂質との混合ミセルがCyt.*b*₅やCyt.P450と相互作用し、抽出を抑制していると考えられる。このような問題は、ミセル水性二相分配法を行う前に、短いイオン交換などのカラムを用いて脂質を除去することによって回避できると考えられる。

4-4 結言

本章では、第2章で見出した新たなミセル水性二相分配系であるオクチルチオグルコシド-水溶性ポリマー混合水溶液を用いて、精製した二つの膜タンパク質、チトクロム*b*₅とチトクロムP450の抽出を行った。非荷電ポリマーであるPEG6000やDxを用いたとき、Cyt.*b*₅の抽出率はポリマー濃度の増加とともに増大した。水相中のOTGを測定した結果、Cyt.*b*₅の抽出率の変化はOTGミセルの分配によって制御されていることが分かった。それに対し、Cyt.P450はポリマー濃度に依存せず、ほぼ定量的に抽出された。ハイドロパシープロットから、二つの膜タンパク質の抽出性の違いは疎水性の違いに起因していることが

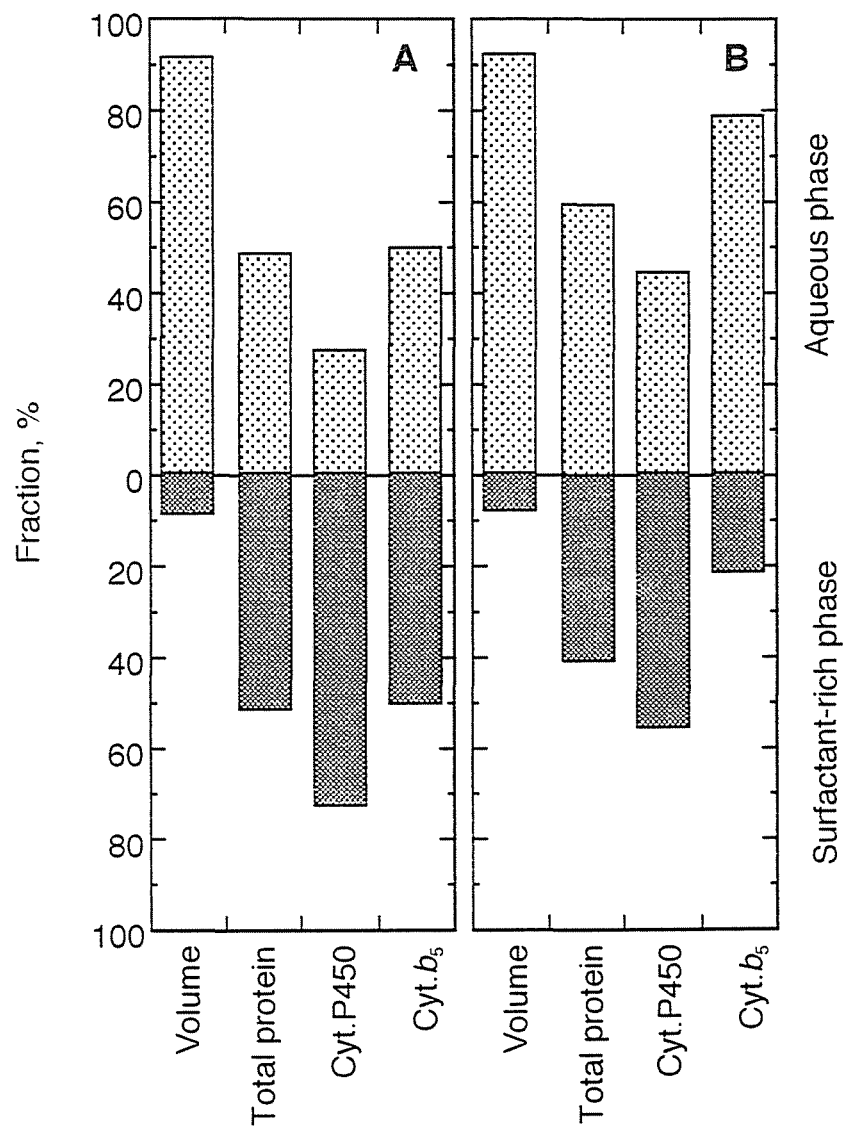


Fig. 4-13 Extraction features of microsomal total protein, Cyt.P450, and Cyt.b₅ in 2%(w/v) OTG two-phase system containing Dx or DEAE-Dx.

Condition : 2%(w/v) OTG, (A) 3%(w/v) Dx, (B) 1%(w/v) DEAE-Dx and 2%(w/v) Dx, 1.0 mg/ml microsomal protein, 10 mM potassium phosphate, pH 7.4, 0°C.

示唆された。

抽出を行うpH7.4においてCyt. b_5 は負に帯電し、Cyt.P450は中性である。そこで、この電荷の違いに着目して、荷電ポリマーの導入によるCyt. b_5 の選択的な抽出の制御を試みた。水溶性ポリマーに正電荷を有するDEAE-Dxを用いたとき、Cyt. b_5 の抽出率のみ選択的に抑制させることができた。OTGの分配はDxを用いた場合とDEAE-Dxを用いた場合とで変化がないこと、塩を添加することによって抑えられていた抽出率が増大することから、Cyt. b_5 の抽出性の変化は水相中のDEAE-Dxとの静電的相互作用によるものであることが確認された。この結果から、ミセル水性二相分配法において、タンパク質を親疎水性だけでなく電荷の違いによっても分離できることが明らかになった。

最後に、荷電ポリマーを導入したOTGミセル水性二相分配法を可溶化ミクロゾーム中のCyt. b_5 とCyt.P450の分離に応用した。疎水性のみによって抽出が制御されるDxを導入した系に比べ、DEAE-Dxを導入した系ではCyt. b_5 とCyt.P450の分離能が優れていることが明らかになった。さらに、抽出操作を低温で行うことができるため、タンパク質の変性がほとんど見られなかった。したがって、ここに荷電ポリマーを導入した膜タンパク質の高性能なミセル水性二相分配法を確立することができた。さらに本章で得られた結果は、荷電ポリマーに限らず、アフィニティリガンドなど様々な機能性置換基を有するポリマーを導入することにより、さらに高性能なミセル水性二相分配系が設計できることを示唆するものであり、その意味においても、本章の結果は有意義であると考えられる。

引用文献

- 1) W. L. Hinze and E. Pramauro, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **24**, 133-177 (1993).
- 2) A. Sánchez-Ferrer, R. Bru, and F. García-Carmona, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 275-313 (1994).
- 3) T. Saitoh, H. Tani, T. Kamidate, and H. Watanabe, *Trends Anal. Chem.*, **14**, 213-217 (1995).
- 4) H. Tani, T. Kamidate, and H. Watanabe, *J. Chromatogr. A*, **780**, 229-241 (1997).
- 5) H. Tani, T. Saitoh, T. Kamidate, T. Kamataki, and H. Watanabe, *Biotechnol. Bioeng.*, **56**, 311-318 (1997).
- 6) T. Kamataki, K. Maeda, Y. Yamazoe, T. Nagai, and R. Kato, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 1-7 (1981).
- 7) J. Ozols, *Biochim. Biophys. Acta*, **997**, 121-130 (1989).
- 8) D. R. Nelsona and H. W. Strobel, *J. Biol. Chem.*, **263**, 6038-6050 (1988).
- 9) J. Kyte and R. F. Doolittle, *J. Mol. Chem.*, **157**, 105-132 (1982).
- 10) A. Sillero and J. M. Ribeiro, *Anal. Biochem.*, **179**, 319-325 (1989).
- 11) T. Schürholz, A. Gieselmann, and E. Neumann, *Biochim. Biophys. Acta*, **986**, 225-233 (1989).

第5章 ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系界面活性剤ミセル水溶液の 二相分離による膜タンパク質の抽出分離

5-1 緒言

ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系界面活性剤であるTritonX-114 (TX114) ミセル水溶液の二相分離現象は、現在さまざまな膜タンパク質の分離やキャラクタリゼーションに広く利用されている¹⁻⁴⁾。このミセル水性二相分配法では、二相分離の際、約30℃にまで加温されるため、熱変性しやすいタンパク質には適用できない。そこで、低温で二相分離を行う試みがなされている。Ganongら⁵⁾は、TX114より相分離温度の低いTritonX-45を混合することによって、低温で相分離抽出を行っている。また、Werck-Reichhartら⁶⁾は、グリセロールがTX114の相分離温度を低下させることを利用して、可溶化から相分離抽出までの一連の操作を4℃で行うことに成功している。しかしその一方で、分離選択性の改善に関する研究は行われておらず、本法は膜タンパク質精製の前処理法としての域を脱していない。ミセル水性二相分配法における選択性の向上は、膜タンパク質の精製をより簡便なものとするうえで重要である。

第4章において、第2章で新たに見出したアルキルグルコシド-水溶性ポリマー混合水溶液からなる二相分離系を用いて膜タンパク質の抽出を行った。その際、荷電ポリマーを導入することにより、膜タンパク質間の電荷の違いに基づく選択的な分離が可能になること明らかにした。そこで本章では、同じく第2章で見出した二相分離系であるTX114-水溶性ポリマー混合水溶液を用いて、膜タンパク質チトクロム b_5 (Cyt. b_5) およびNADH-Cyt. b_5 還元酵素 (fp1) の抽出を行い、荷電ポリマーの導入による抽出選択性の制御を試みた。さらにその結果から、肝ミクロゾーム中のCyt. b_5 の簡便な分離法を確立した⁷⁾。

5-2 実験

5-2-1 試薬および装置

TX114はナカライテスク社製のものを使用し、10(w/v)溶液として保存した。デキストランT-500 (Dx) , DEAE-デキストラン (DEAE-Dx) および硫酸デキストラン (Dx-S) はいずれもPharmacia社製 (分子量500,000) を使用し、100℃で乾燥、恒量したのち、

20%(w/v)溶液とした。アクリルアミド、N,N'-ビス（アクリルアミド）は和光純薬製・電気泳動用を，ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）は和光純薬製・生化学用を使用した。クマジーブリリアントブルーG250はFluka社製を使用した。

その他の試薬は市販の特級品を特に精製せずに使用した。

水溶液の温度調整にはヤマト-コマツ製CTE42A型恒温槽を使用した。吸光度の測定には日立製U-2000型ダブルビーム分光光度計を使用した。ミセル-ポリマー混合水溶液の分相を促進するための遠心分離には国産製H-200NR型冷却小型高速遠心機を使用した。電気泳動はアト-製AE-6400型電気泳動装置およびAE-3105型電気泳動電源装置を使用した。

5-2-2 操作

(1) 相分離温度の測定：第2章に準じて行った。

(2) 相体積の測定：第2章に準じて行った。

(3) ブタ肝ミクロゾームの調製：第3章に準じて行った。

(4) チトクロム b_5 の精製：第2章に準じて行った。

(5) NADH-チトクロム b_5 の精製：Miharaらの方法⁸⁾を一部改変して行った。操作は全て4℃で行った。ブタ肝ミクロゾームを2%(w/v) Triton X-100および1 mM EDTAを含む0.1M Tris緩衝液（pH8.0）で可溶化した。次に，可溶化ミクロゾーム溶液をDE-52カラムに流し，同じ緩衝溶液で洗浄したのち，得られたオレンジ色の画分を回収した。この画分を透析チューブに入れ，ショ糖をふりかけて一晩放置，濃縮した。濃縮液を0.5%(w/v) Triton X-100および1 mM EDTAを含む20mM Tris緩衝液（pH8.0）で希釈したのち，DEAE Sephadex A-50カラムに流した。同緩衝溶液で洗浄したのち，50mM KClを含む同緩衝液でfp1を溶出した。次に，得られたfp1画分を10mM リン酸カリウム緩衝液（pH6.5）で3倍に希釈し，ヒドロキシアパタイトカラムに流した。0.2%(w/v) TritonX-100を含む10, 50, 70mMリン酸カリウム緩衝液（pH6.5）を順に流し，fp1画分を回収した。この画分を20%(w/v)ショ糖および0.4%(w/v)TritonX-100を含む150mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.5）2000mlで24時間透析，濃縮を行い，これを最終標品とした。精製標品は使用時

まで -80°C で保存した。

(6) ブタ肝ミクロゾームの可溶化：9.3mg/mlタンパク質を含むミクロゾームを10mM Tris-HCl (pH7.4)，1 mM EDTAおよび1 mM ジチオスレイトールを含む2 % (w/v) TX 114で1時間， 0°C でインキュベートした。その後，105,000gで1時間遠心分離し，得られた上清を可溶化Ms溶液とした。

(7) チトクロム b_5 およびNADH-チトクロム b_5 還元酵素の抽出：操作(4)～(6)で得られたCyt. b_5 およびfp1を含む溶液を所定量1.5-mlサンプルチューブに加え，これにTX114およびデキストランを添加し，総量1 mlとした。このとき，TX114の終濃度が2 % (w/v)となるようにした。この溶液を混合し， 30°C で10分間インキュベートしたのち，2,000gで5分間遠心分離した。抽出率は各相のタンパク質濃度または活性と相体積から算出した。

(8) ミセル水性二相分配法によるチトクロム b_5 の分離：可溶化ミクロゾームを10mM Tris-HCl (pH7.4)を含む2 % (w/v)TX114溶液で10倍に希釈した。この溶液2 mlを 30°C で10分間インキュベートしたのち，2,000gで5分間遠心分離した（一回目の相分離抽出）。上相1.2mlを取り除いたのち，残った下相（界面活性剤相）0.8mlに10mM Tris-HCl (pH7.4) および0.1% (w/v) TX114を含む0.2% (w/v) Dx-Sを加え，混合した。次いで，前述のようにインキュベート，遠心分離した（二回目の相分離抽出）。上相を除去したのち，同様の操作を10mM Tris-HCl (pH7.4) および0.3M NaClを含む1 % (w/v) TX114溶液を加えて行った（三回目の相分離抽出）。得られた界面活性剤相中の総タンパク質およびCyt. b_5 濃度を定量した。

(9) タンパク質濃度および活性の測定：第2章に準じて行った。すなわち，Cyt. b_5 は酸化還元差スペクトルにより，fp1はフェリシアン化カリウム還元活性として測定した。また，総タンパク質濃度はアルブミンを標準タンパク質としてビシンコニン酸法により定量した。

(10) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動：SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動はLaemmli⁹⁾の方法に準じて，厚さ2 mm，12.5% (w/v) アクリルアミドゲルで行った。泳動後のゲルは，クマジーブリリアントブルーを用いて染色した。

5-3 結果および考察

5-3-1 相分離条件の検討

はじめに2%(w/v)TX114水溶液の相分離に及ぼす各種デキストランの濃度の影響を検討した。結果をFig.5-1に示す。第2章でも見られたように、TX114の相分離温度はデキストラン濃度の増加とともに減少した。アルキルグルコシドのときとは逆に、二相分離は相分離温度の高温域で見られた。すなわち、デキストランの添加によって、より低温での二相分離が可能になる。しかし、第4章で行ったように、0℃付近で二相分離を達成するためには高濃度のデキストランが必要となる。これでは、溶液の粘度が高くなってしまい、操作性が悪くなる。また、デキストランの添加効果を明らかにするためにも、デキストランを含んでいないときの抽出を行う必要がある。そのため、抽出の際の相分離温度は、従来のTX114ミセル水性二相分配法と同様に30℃とすることにした。本章では、荷電ポリマーの効果を検証することを目的とし、比較的安全性の高いCyt. b_5 とfp1を対象に抽出を行った。

5-3-2 各種デキストラン共存下における精製したチトクロム b_5 およびNADH-チトクロム b_5 還元酵素の抽出

Cyt. b_5 とfp1の抽出におけるポリマーの電荷効果を検証するにあたって、まずそれぞれの電荷について調べた。4-3-2節で用いた式とTable4-2のアミノ酸の酸解離定数ならびにCyt. b_5 とfp1のアミノ酸組成^{10,11)}から計算した電荷ZcとpHの関係をFig.5-2に示す。4-3-2節でも見たように、Cyt. b_5 は抽出を行うpH7.4において負に帯電している。一方、fp1はわずかに正に帯電していることが分かる。したがって、正負それぞれのポリマーを用いることによってCyt. b_5 およびfp1の抽出を制御できると考えられる。まず初めに、精製したCyt. b_5 の抽出を行った。結果をFig.5-3に示す。デキストランを含んでいないときCyt. b_5 はその疎水性により、約90%が界面活性剤相に抽出されている。Dxならびに負電荷を持つDx-S濃度が増加すると、Cyt. b_5 の抽出率はわずかに増加した。一方、正電荷を有するDEAE-Dxを用いたとき、0.1%(w/v)においてCyt. b_5 の抽出率は著しく減少し、その値は約20%となった。その後、DEAE-Dx濃度の増加に伴い、抽出率は増加した。

次に、fp1の抽出を行った結果をFig.5-4に示す。Cyt. b_5 と同様、デキストランを含まないときfp1は約90%が界面活性剤相に抽出された。また、DxおよびDEAE-Dxの添加に伴

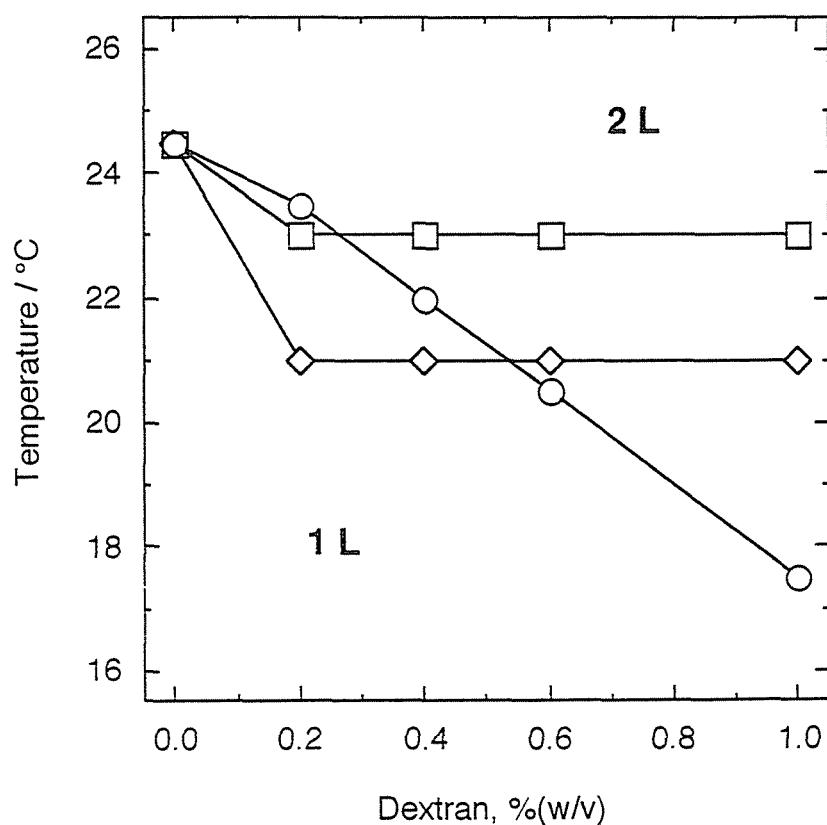


Fig. 5-1 Effect of dextran concentration on the cloud point of 2%(w/v) Triton X-114 micellar solution. 1L refers single isotropic phase and 2L means the presence of two isotropic phase.

Dextran : (○) Dx, (□) DEAE-Dx, (◇) Dx-S.

Condition : 10 mM Tris-HCl, pH 7.4.

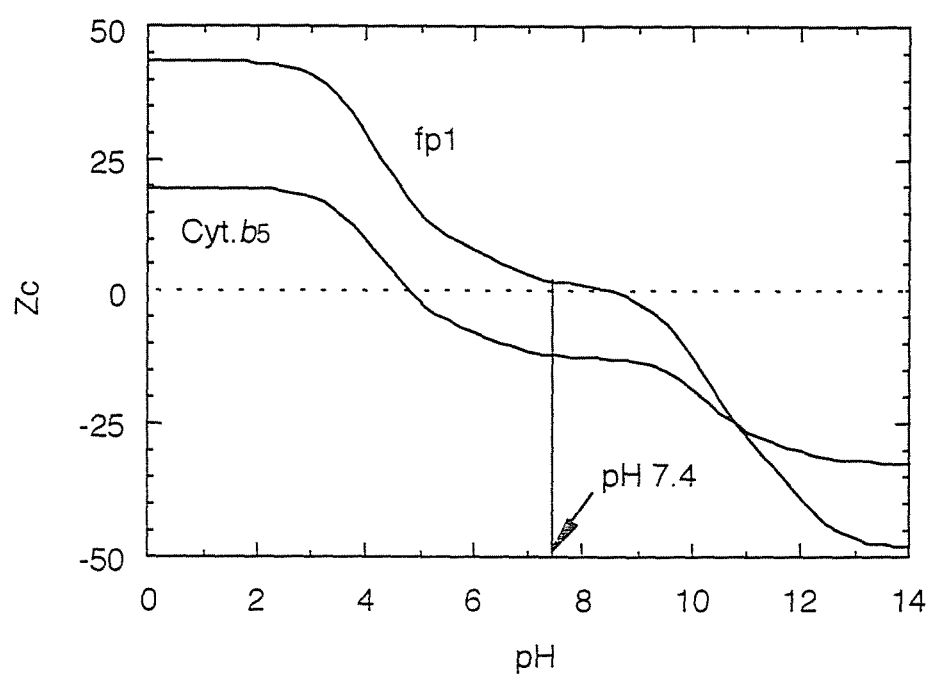


Fig. 5-2 Valences of cytochrome b_5 and NADH-cytochrome b_5 reductase (fp1) calculated on the basis of amino acid sequences as a function of pH.

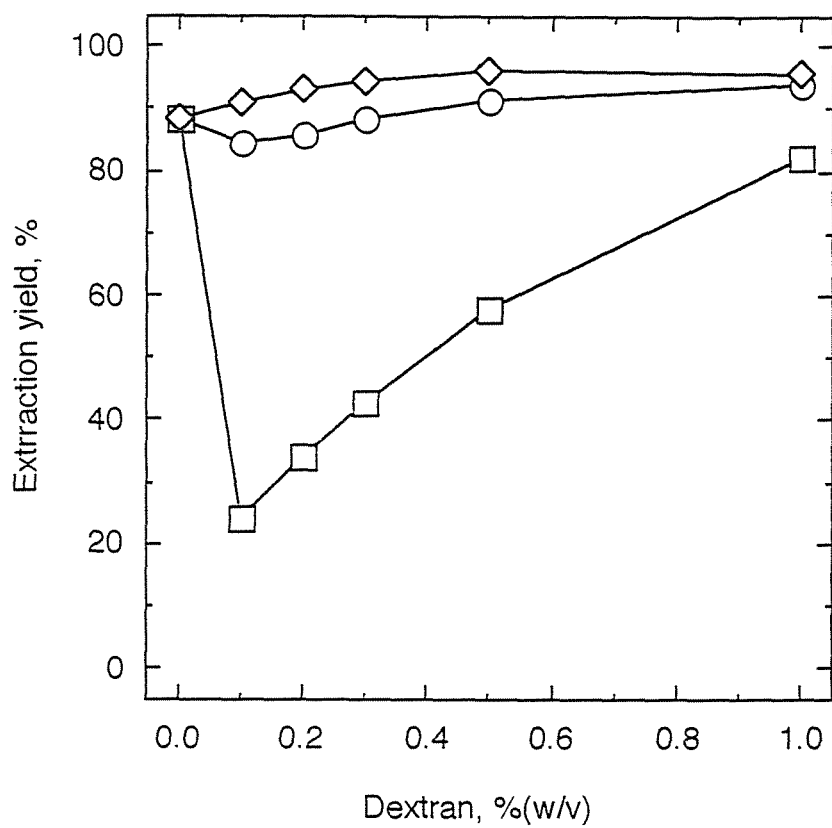


Fig. 5-3 Extraction yield of cytochrome b_5 as a function of dextran concentration.

Dextran : (○) Dx, (□) DEAE-Dx, (◇) Dx-S.

Condition : 2%(w/v) Triton X-114, 1 μ M cytochrome b_5 , 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 30°C.

う抽出率の変化はほとんど見られなかった。一方、Cyt. b_5 とは逆に、負電荷を有するDx-Sを添加したとき、fp1の抽出率は55%程度まで減少した。減少した抽出率は、Dx-S濃度の増加とともに増大した。

また、Figs.5-5および5-6に、Cyt. b_5 およびfp1の抽出率が最も低下した条件下における塩の添加効果について検討した結果を示す。Cyt. b_5 およびfp1のいずれの抽出率も、NaClの添加によって増加した。

これらの結果について以下のように考察した。

Figs.5-5および5-6のいずれにおいても電荷効果を示さないポリマー（Cyt. b_5 に対するDxおよびDx-S、fp1に対するDxおよびDEAE-Dx）を用いたとき、AG-水溶性ポリマー混合水溶液のときのように、ポリマー濃度に伴い抽出率がほとんど増加していない。これは、いずれの膜タンパク質も、ほぼ定量的に抽出されているためであり、AGに比べTX114の疎水性が大きいことによるものと考えられる。

一方、Cyt. b_5 の抽出に対するDEAE-Dxならびにfp1の抽出に対するDx-Sの影響は、荷電ポリマーによる抽出の抑制およびポリマー濃度増加に伴う抽出率の増加の両方において、AG系の場合とよく一致している。また、Figs.5-5および5-6において、塩が荷電ポリマーによる抽出の抑制をキャンセルしていること分かる。このことから、本ミセル水性二相分配系においても水相中における荷電ポリマーと膜タンパク質との静電的相互作用が抽出の抑制に働いていると考えられる。ここで、Cyt. b_5 とfp1に対する荷電ポリマーの抽出抑制効果の違いは、Fig.5-2で見られた抽出pHにおけるCyt. b_5 とfp1の電荷数の絶対値に依存しているためである。すなわち、pH7.4においてより大きく荷電しているCyt. b_5 の方が、荷電ポリマーの影響を大きく受けたものと思われる。

以上の結果から、本ミセル水性二相分配系においても荷電ポリマーとの静電的相互作用により、膜タンパク質の抽出が制御されることが明らかになった。また、塩の添加によって、このような荷電ポリマーの効果を操作できることも示された。

5-3-3 各種デキストラン共存下における肝ミクロゾーム中のチトクロム b_5 およびNADH-チトクロム b_5 還元酵素の抽出

前節で、TX114ミセル水性二相分配系においても荷電ポリマーの導入により、膜タンパク質の抽出の制御が可能になることが明らかになった。そこで、実試料である可溶化

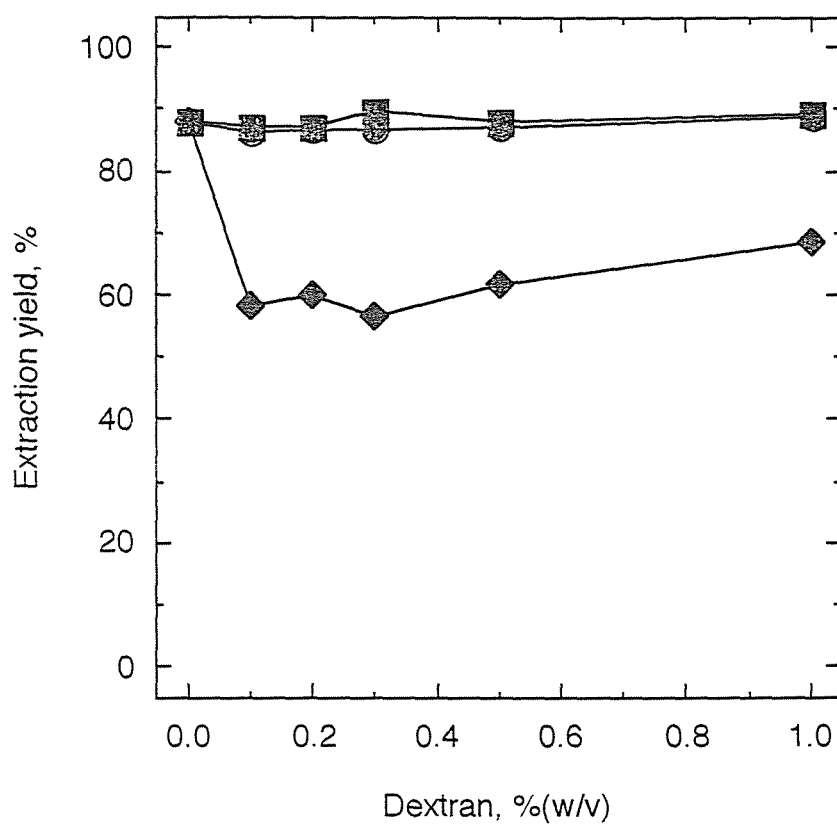


Fig. 5-4 Extraction yield of NADH-cytochrome b_5 reductase as a function of dextran concentration.

Dextran : (○) Dx, (□) DEAE-Dx, (◇) Dx-S.

Condition : 2%(w/v) Triton X-114, 5 U/ml NADH-cytochrome b_5 reductase, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 30°C.

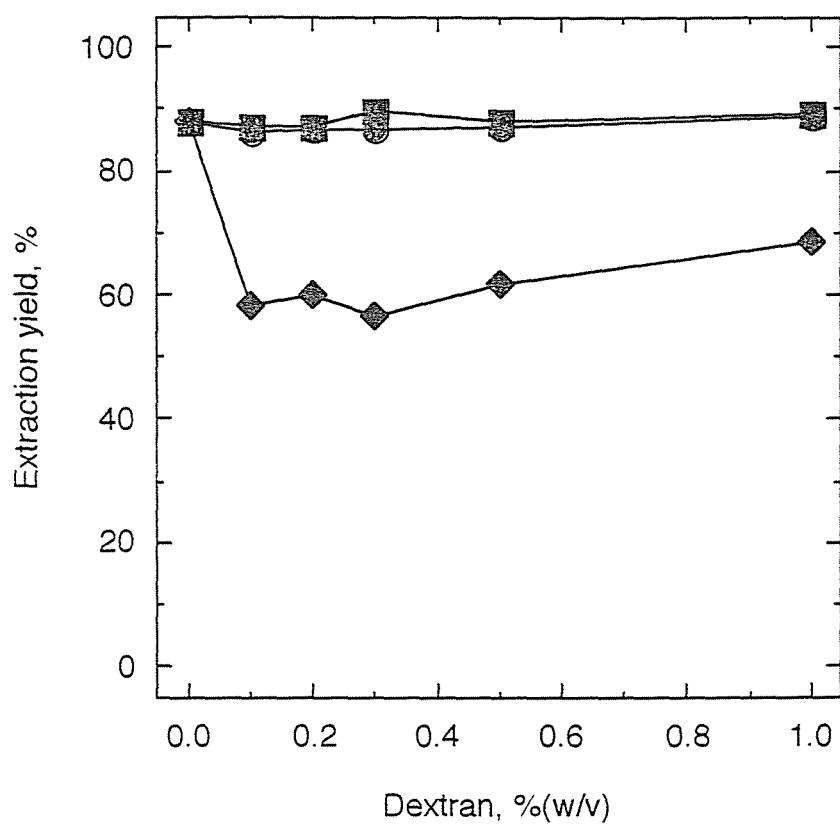


Fig. 5-4 Extraction yield of NADH-cytochrome b_5 reductase as a function of dextran concentration.

Dextran : (○) Dx, (□) DEAE-Dx, (◇) Dx-S.

Condition : 2%(w/v) Triton X-114, 5 U/ml NADH-cytochrome b_5 reductase, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 30°C.

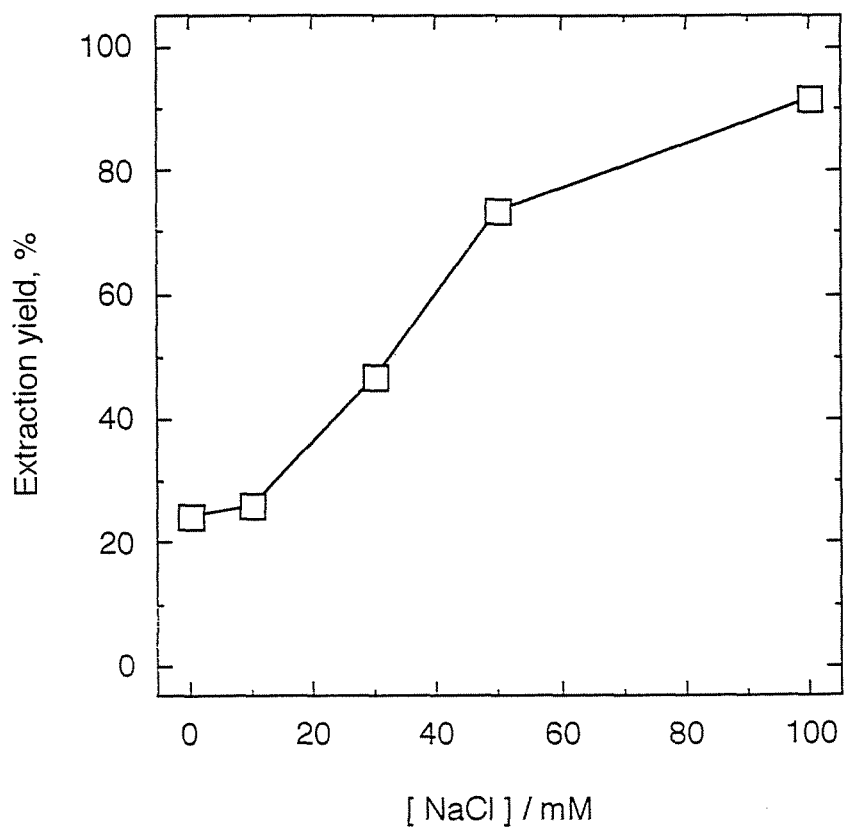


Fig. 5-5 Effect of potassium phosphate concentration on the extraction of Cyt. b_5 in TX114 - DEAE-Dx two-phase system.
Condition : 2%(w/v) Triton X-114, 0.1%(w/v) DEAE-Dx, 1 μ M cytochrome b_5 , 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 30°C.

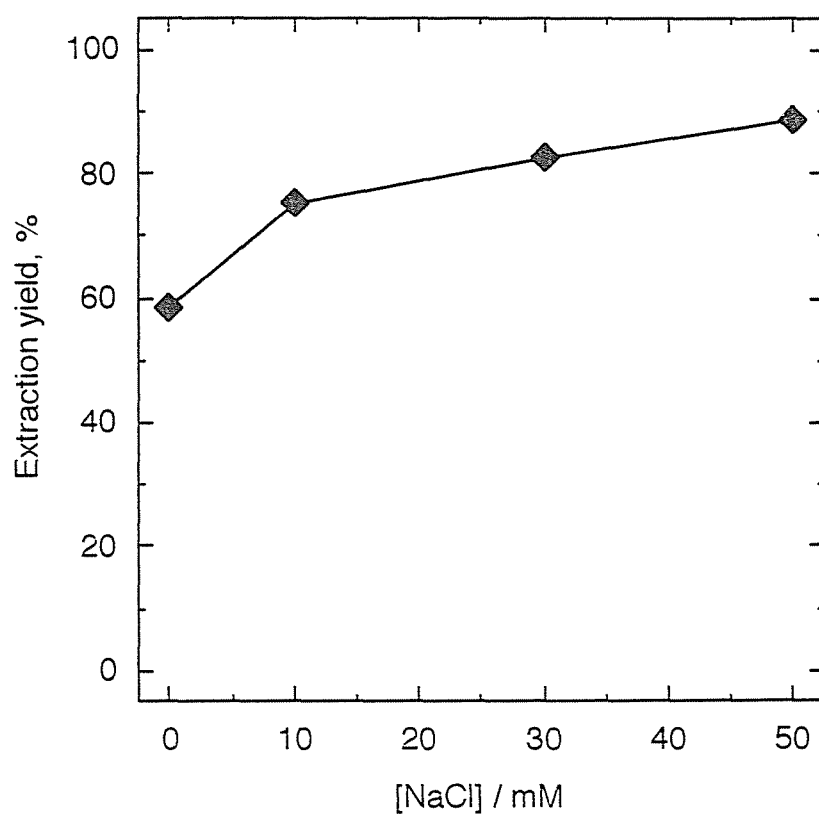


Fig. 5-6 Effect of potassium phosphate concentration on the extraction of NADH-cytochrome b_5 reductase in TX114 - Dx-S two-phase system.

Condition : 2%(w/v) Triton X-114, 0.1%(w/v) Dx-S, 5 U/ml NADH-cytochrome b_5 reductase, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 30°C.

Ms中のCyt. b_5 とfp1の抽出を行い、荷電ポリマーの導入によるこれらの膜タンパク質のミクロゾームからの分離の可能性を検討した。

初めに、電荷を持たないDxを用いたときの抽出結果をFig.5-7に示す。Cyt. b_5 、fp1および総タンパク質の抽出率はDx濃度の増加に伴いわずかに増大した。ここでは主にタンパク質の疎水性によって抽出が制御されていると思われる。Cyt. b_5 とfp1の抽出率はDxのどの濃度域においてもほとんど一致しており、両者の分離が困難であることを示している。また、Cyt. b_5 およびfp1と総タンパク質との抽出率の差は約30%であった。

次に、DEAE-Dxを用いたときの抽出結果をFig.5-8に示す。fp1および総タンパク質の抽出率は、Dx濃度0.1%(w/v)のときやや増大したものの、ほとんど変化が見られなかった。一方、Cyt. b_5 についても、はじめ抽出率は増大し、その後はDx濃度の増加に伴いわずかに減少した。これは、精製Cyt. b_5 のときと大きく抽出挙動が異なっている。第4章においても述べたが、Ms中に存在するリン脂質が大きく影響しているものと考えられる。リン脂質がDEAE-Dxの働きを阻害しているのは、Figs.5-3と5-8の比較から明らかであるが、その原因については現在のところ分かっていない。いずれにせよ、Fig.5-7と同様、Cyt. b_5 とfp1の抽出率の差はほとんどなく、また、Cyt. b_5 およびfp1と総タンパク質との抽出率の差は約20~30%と小さい値である。

最後に、Dx-Sを用いたときの抽出結果をFig.5-9に示す。Cyt. b_5 の抽出率はDx-S濃度の増加とともにわずかに増大した。これに対しfp1と総タンパク質の抽出率はDx-Sの添加により著しく減少したのち、Dx-S濃度の増加につれて増大した。fp1については、精製fp1のときよりも荷電ポリマーの効果が大きく表れている。Fig.5-10に示すように、NaClの添加によって抽出率は増大することから、このような抽出率の低下が静電的相互作用によるものであることが分かる。Fig.5-9において、fp1と総タンパク質の抽出率が最も低かったのは、Dx-S濃度0.1%(w/v)のときで、抽出率はそれぞれ20%と9%であった。また、このときのCyt. b_5 の抽出率は約90%であった。したがって、Cyt. b_5 とfp1の分離のみならず、MsからのCyt. b_5 の選択的な分離が可能になると考えられる。そこで、次節ではDx-Sや塩を導入したTX114ミセル水性二相分配法を繰り返すことによるMs中のCyt. b_5 の分離を行った。

5-3-4 ミセル水性二相分配法による肝ミクロゾーム中のチトクロム b_5 の分離

ここで行った抽出操作の手順は、以下の通りである。はじめに、MsからTX114を用

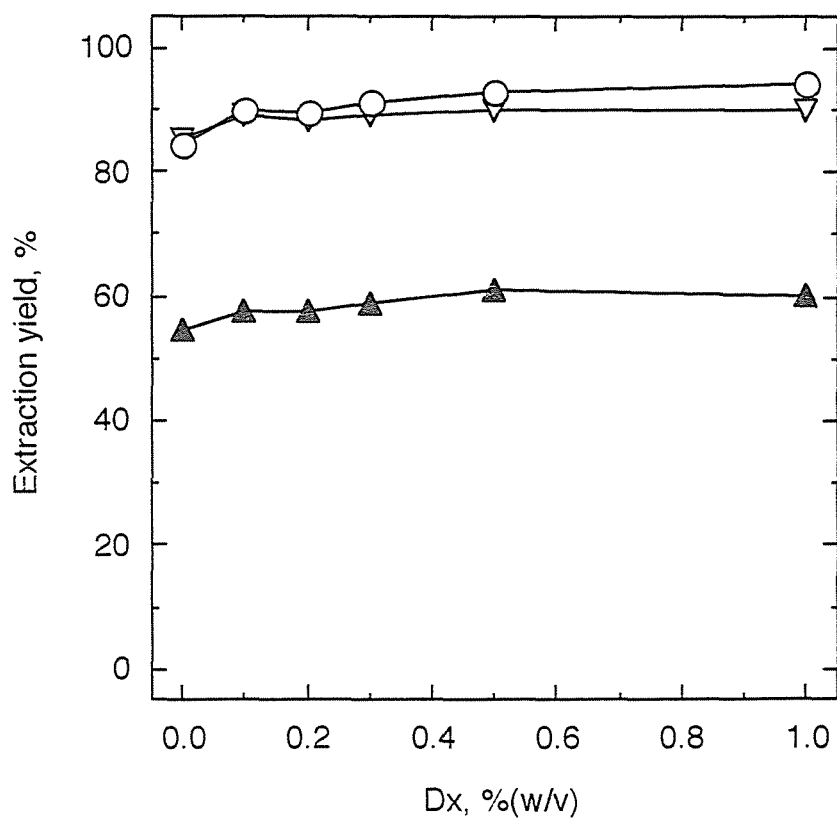


Fig. 5-7 Extraction yield of microosomal proteins as a function of Dx concentration.

Protein : ($\bigcirc$) cytochrome b_5 , (∇) NADH-cytochrome b_5 reductase, ($\blacktriangle$) total protein.

Condition : 2%(w/v) Triton X-114, 0.78 mg/ml microosomal proteins, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 30°C.

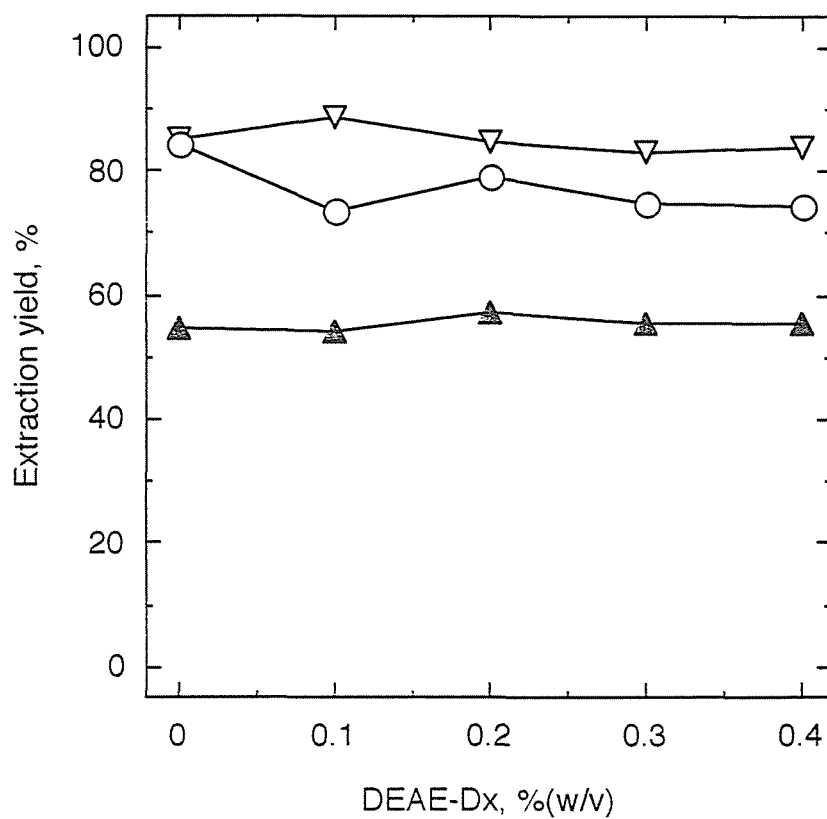


Fig. 5-8 Extraction yield of microosomal proteins as a function of DEAE-Dx concentration.

Protein : ($\bigcirc$) cytochrome b_5 , (∇) NADH-cytochrome b_5 reductase, ($\blacktriangle$) total protein.

Condition : 2%(w/v) Triton X-114, 0.78 mg/ml microosomal proteins, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 30°C.

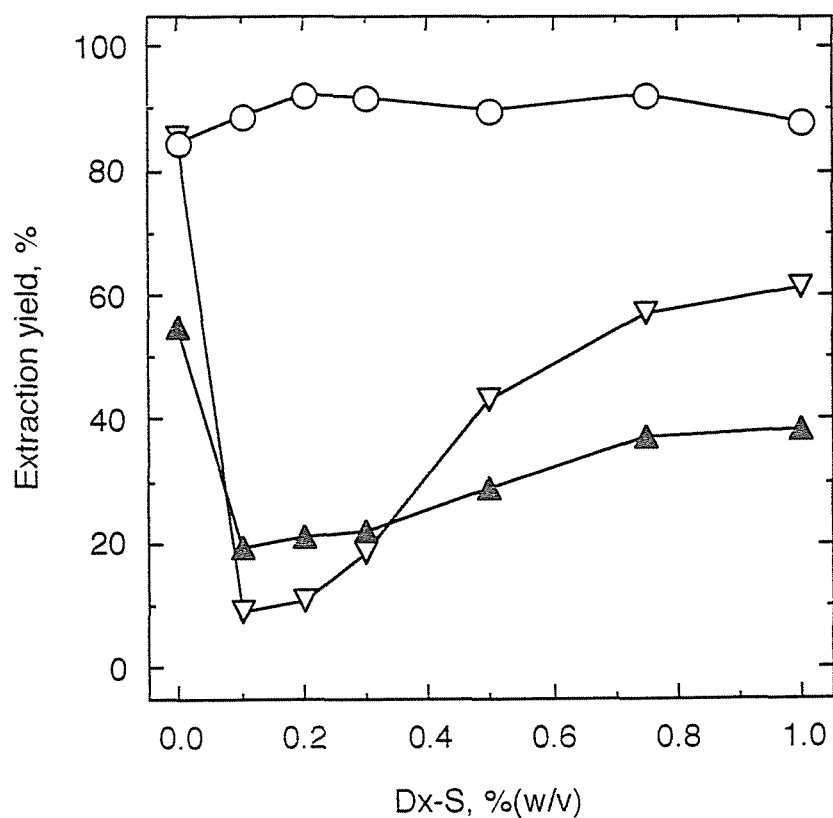


Fig. 5-9 Extraction yield of microosomal proteins as a function of Dx-S concentration.

Protein : ($\bigcirc$) cytochrome b_5 , (∇) NADH-cytochrome b_5 reductase, ($\blacktriangle$) total protein.

Condition : 2%(w/v) Triton X-114, 0.78 mg/ml microosomal proteins, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 30°C.

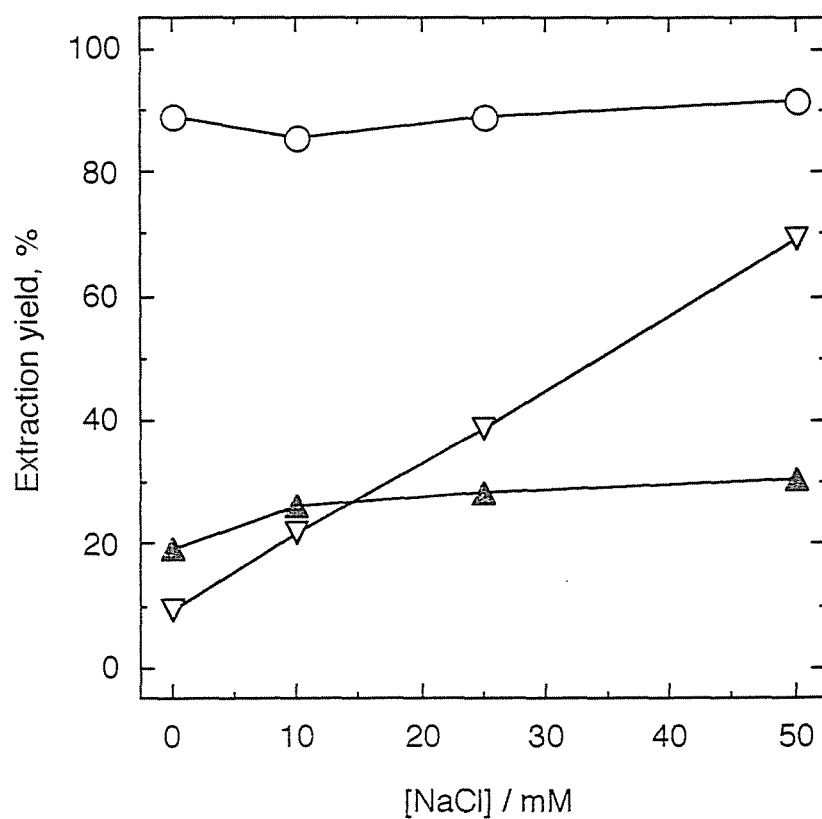


Fig. 5-10 Effect of NaCl concentration on the extraction of microsomal proteins.

Protein : ($\bigcirc$) cytochrome b_5 , (∇) NADH-cytochrome b_5 reductase, ($\blacktriangle$) total protein.

Condition : 2%(w/v) Triton X-114, 0.1%(w/v) Dx-S, 0.78 mg/ml microsomal proteins, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 30°C.

いてCyt.*b*₅の可溶化を行った。次に、この可溶化溶液を30℃に加熱し相分離抽出を行った。ここでは、ポリマーを添加せずに、比較的親水的なタンパク質を水相に除去する目的で行った。次に、水相を除去してCyt.*b*₅が抽出されている界面活性剤相を取りだし、これにDx-Sを加えて再び相分離抽出を行った。ここで、fp1を含むほとんどのMsタンパク質は水相に回収され、逆にCyt.*b*₅は高い抽出率で界面活性剤相に回収される。水相を除去したのちNaCl溶液を加え、もう一度相分離抽出を行った。この操作は、界面活性剤相の洗浄のために行い、塩はCyt.*b*₅の水相へのロスを防ぐために加えた。最後に得られた界面活性剤相を回収し、Cyt.*b*₅の分離画分とした（操作（7）を参照）。

以上3回の相分離抽出操作で得られた界面活性剤相中に含まれるCyt.*b*₅と総タンパク質濃度を測定し、Cyt.*b*₅の分離効率を検討した。結果をTable5-1に示す。この表において、Specific content（比含量）は総タンパク質単位mg中に含まれるCyt.*b*₅のnmol量を表している。また、Purification factorは出発原料であるMs中のCyt.*b*₅の比含量を1としたときの、各ステップにおける比含量の比である。通常この値により、どの程度精製が行われたかを表すことができる。

可溶化からはじまって、3回の繰り返し抽出を行ったあとのCyt.*b*₅の回収率は91%であった。また、Purification factorは10.6であった。最近、Yangら¹²⁾によって報告されたポリエチレングリコール（PEG）沈殿法とカラムクロマトグラフィーを組合せたCyt.*b*₅の分離法では、可溶化からPEG沈殿までの回収率とPurification factorはそれぞれ、79%および2である。この数字から比べてみても本法はCyt.*b*₅の優れた分離法であることが分かる。回収率に関してみれば、カラム法を優に上回る数字であり、さらに数段の抽出操作を加えることにより、カラム法に匹敵する分離効率を得られるものと思われる。

Fig.5-11に、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果を示す。この図には、Cyt.*b*₅の精製において一本目のカラムとしてよく用いられているDEAE-セルロースによる精製の結果も併せて示した。Msならびに可溶化Msでは多数のバンドが確認されたの対し（レーンAおよびB）、3回の繰り返し抽出によって得られた界面活性剤相では分子量17,000付近のCyt.*b*₅のバンド以外はほとんど見えなくなっている（レーンC）。また、DEAE-セルロースを通して得られたCyt.*b*₅の画分には、Cyt.*b*₅以外に4本の明確なバンドが現れている（レーンD）。すなわちCyt.*b*₅の精製に関してみれば、本法はカラム一本分よりも優れた分離能を有することが明らかになった。一本につき数日から数週間を要して

Table 5-1 Purification of cytochrome b_5 from pig liver microsomes.

Fraction	Total protein (mg)	Total content (nmol)	Specific content (nmol/mg)	Recovery (%)	Purification factor
Microsomes	1.86 ^a	0.78 ^a	0.42	100	1
Solubilized microsomes	1.56	0.78	0.50	100	1.2
Surfactant-rich phase ^b	0.16	0.71	4.44	91	10.6

^a Contents represent for 0.2 ml starting microsomes.

^b Surfactant-rich phase was obtained after triplicated phase separation.

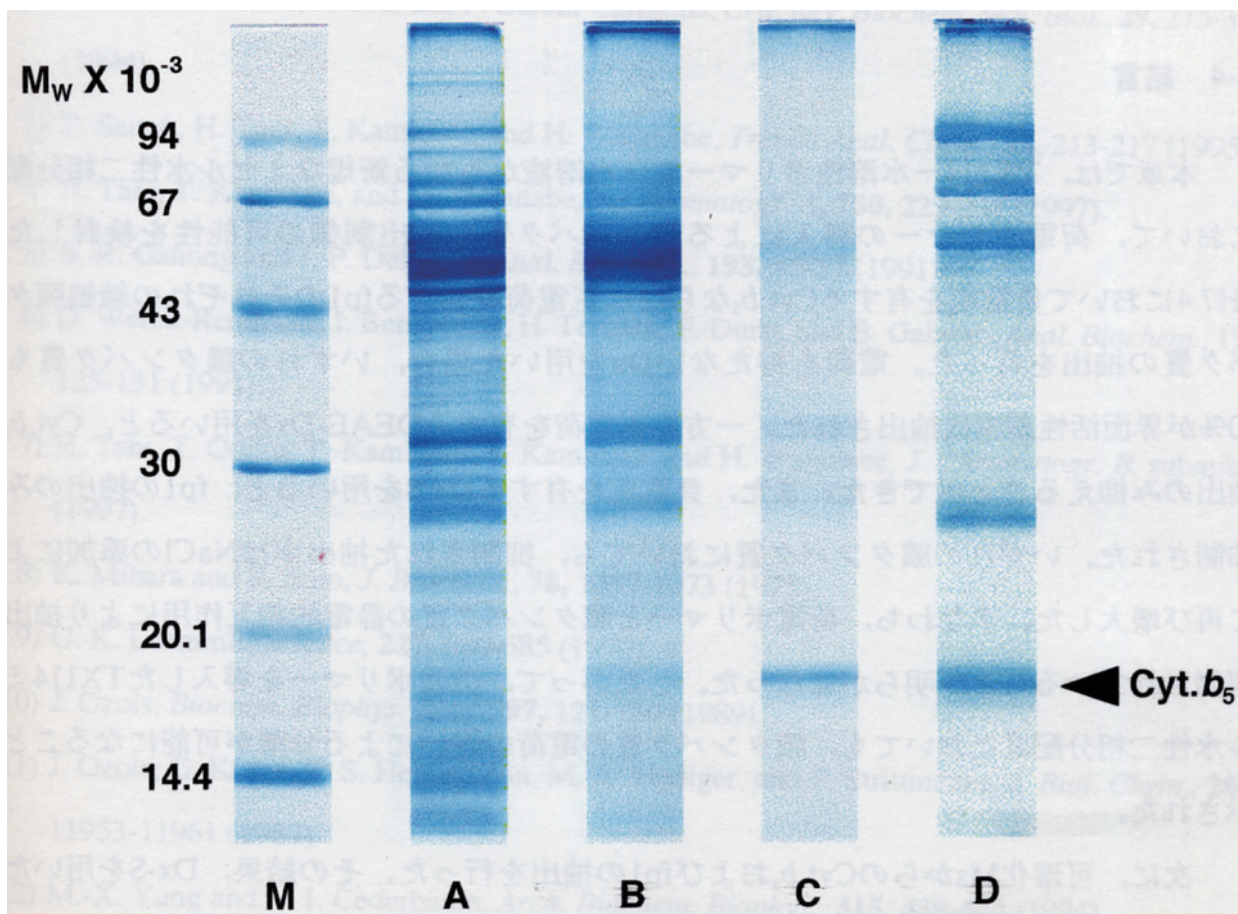


Fig. 5-11 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of cytochrome b_5 .
 Lane : (M) marker proteins, (A) pig liver microsomes, (B) solubilized
 microsomes, (C) TX114 phase after triplicate extraction, (D) cytochrome
 b_5 fraction from DEAE-cellulose.

いたカラム法に比べ、本法はわずか1時間程度で完了することのできる非常に迅速な方法である。したがって、このミセル水性二相分配法を用いることによりCyt.*b*₅の極めて迅速かつ簡便な分離精製が可能になるものと思われる。

5-4 結言

本章では、TX114-水溶性ポリマー混合水溶液からなる新規なミセル水性二相分配系において、荷電ポリマーの導入による膜タンパク質の抽出制御の可能性を検討した。pH7.4において負電荷を有するCyt.*b*₅ならびに正電荷を有するfp1のそれぞれの精製膜タンパク質の抽出を行った。電荷を持たないDxを用いた場合、いずれの膜タンパク質も約90%が界面活性剤相に抽出された。一方、正電荷を有するDEAE-Dxを用いると、Cyt.*b*₅の抽出のみ抑えることができた。また、負電荷を有するDx-Sを用いると、fp1の抽出のみが抑制された。いずれの膜タンパク質においても、抑制された抽出率はNaClの添加によって再び増大した。すなわち、荷電ポリマーと膜タンパク質の静電的相互作用により抽出が制御されていることが明らかになった。したがって、荷電ポリマーを導入したTX114ミセル水性二相分配系においても、膜タンパク質の電荷の違いによる分離が可能になることが示された。

次に、可溶化MsからのCyt.*b*₅およびfp1の抽出を行った。その結果、Dx-Sを用いたとき、Cyt.*b*₅の高い抽出率を維持したまま、総タンパク質の抽出率が大きく低下した。そこで、このようなCyt.*b*₅に対する高い抽出選択性を利用して、MsからのCyt.*b*₅の分離を試みた。

MsをTX114で可溶化したのち、まずポリマーを加えず相分離抽出を行った。水相を除去し、残った界面活性剤相にDx-Sを添加して、再び抽出を行った。得られた界面活性剤相に今度はNaClを添加し、さらに抽出を行った。最終的に得られた界面活性剤相中のCyt.*b*₅と総タンパク質を測定した結果、Cyt.*b*₅が回収率91%、Purification factor 10.6という高い値で精製された。本法は迅速かつ簡便な方法であることから、Cyt.*b*₅の効率的分離法として極めて有用である。

また、第4章で行ったアルキルグルコシド-水溶性ポリマーの系と同様、ポリマーの置換基の効果を利用した高性能なミセル水性二相分配系の設計が可能になるとともに、その際の界面活性剤の選択肢が広がったことにおいても有意義と考える。

引用文献

- 1) W. L. Hinze and E. Pramauro, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **24**, 133-177 (1993).
- 2) A. Sánchez-Ferrer, R. Bru, and F. García-Carmona, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 275-313 (1994).
- 3) T. Saitoh, H. Tani, T. Kamidate, and H. Watanabe, *Trends Anal. Chem.*, **14**, 213-217 (1995).
- 4) H. Tani, T. Kamidate, and H. Watanabe, *J. Chromatogr. A*, **780**, 229-241 (1997).
- 5) B. R. Ganong and J. P. Delmore, *Anal. Biochem.*, **193**, 35-37 (1991).
- 6) D. Werck-Reichhart, I. Benveniste, H. Teutsch, F. Durst, and B. Gabriac, *Anal. Biochem.*, **197**, 125-131 (1991).
- 7) H. Tani, T. Ooura, T. Kamidate, T. Kamataki, and H. Watanabe, *J. Chromatogr. B*, submitted (1997).
- 8) K. Mihara and R. Sato, *J. Biochem.*, **78**, 1057-1073 (1975).
- 9) U. K. Laemmli, *Science*, **227**, 680-685 (1970).
- 10) J. Ozols, *Biochim. Biophys. Acta*, **997**, 121-130 (1989).
- 11) J. Ozols, G. Korza, F. S. Heunemann, M. A. Hediger, and P. Strittmatter, *J. Biol. Chem.*, **260**, 11953-11961 (1987).
- 12) M.-X. Yang and A. I. Cederbaum, *Arch. Biochem. Biophys.*, **315**, 438-444 (1994).

第6章 トリブロックコポリマー水溶液の二相分離によるタンパク質の抽出分離

6-1 緒言

非イオン界面活性剤のミセル水溶液は、曇点と呼ばれる温度に加温することによって、界面活性剤をほとんど含まない水相と界面活性剤相の二相に分離する。この相分離現象を利用した抽出法は、ミセル水性二相分配法として金属キレートや有機化合物、膜タンパク質の分離に利用されている^{1,2)}。第4章ならびに第5章では、これをさらに高性能化したアルキルグルコシドならびにTX114と水溶性ポリマーの混合水溶液からなる新規なミセル水性二相分配系を用いて、膜タンパク質の選択的な分離を行った。

一方、二種の水溶性ポリマーの混合水溶液からなる二相分離系はポリマー水性二相分配法として古くから生体物質の分離に利用されてきた³⁾。ミセル水性二相分配法では疎水性の物質が主に取り扱われるのに対し、このポリマー水性二相分配法においては、専ら水溶性の物質が分離対象とされている。しかし、親水性、疎水性の両方の物質の分離に対応した水性二相分配系はまだ登場していない。

二つの水性二相分配系で用いられているポリマーと界面活性剤の両方の性質を兼ね備えた物質としてトリブロックコポリマーがある。この中でも、ポリエチレンオキシド（PEO）とポリプロピレンオキシド（PPO）からなるトリブロックコポリマー（Pluronic）は一連の非イオン性のポリマー界面活性剤として知られている。このPluronicにおいて、PEOとPPOはそれぞれ親水部および疎水部としての役割を果たしており、Pluronic水溶液は従来のポリオキシエチレンアルキルエーテル型の非イオン界面活性剤と同様、曇点以上に加温することによって水相と界面活性剤相の二相に分離することが知られている⁴⁾。一連のPluronic界面活性剤は安定化剤や化粧品、ドラッグキャリアならびに乳化剤といった幅広い分野に利用されている。加えて、それらの濃度や構造に応じてミセルの形態が変化することやミセル形成が非常に温度に敏感であることなど⁵⁾、興味深い物理化学的性質を有している。そのため、現在この界面活性剤は非常に注目されており、その溶液特性に関する多くの報告がなされている⁵⁻¹⁴⁾。一方、分離科学の分野においても、Svenssonら¹⁵⁾によって、Pluronic P105とデキストランの混合水溶液からなる水性二相分配系において、疎水性アミノ酸やそのオリゴペプチドの分配挙動が検討された。しかしながら、タンパク質の分離に応用した例はまだ報告されていない。ポリマーと界面活性剤

の両方の性質を有するPluronic界面活性剤は、その疎水性をPEOとPPOの比率を変えることによって自在に操作できることから、水溶性タンパク質から膜タンパク質まで幅広いタンパク質の分離に応用できる可能性がある。さらに、上述した特殊な性質のため全く新しい分離挙動も期待される。そこで本章では、親水性ならびに疎水性のタンパク質について、Pluronic界面活性剤水溶液の二相分離を利用した抽出を行った。また、PPO-PEO-PPO型とPEO-PPO-PEO型の二つの異なる構造のPluronicを用いて、その構造の違いによる抽出性の違いについて検討した¹⁶⁾。

6-2 実験

6-2-1 試薬および装置

用いた全てのPluronicはBASF社から供与されたものを、特に精製せずに使用した。チトクロム c (Cyt. c) は和光純薬製のものを使用した。チトクロム b_5 (Cyt. b_5) は第3章で精製したものを使用した。クマジーブリリアントブルーG250はFluka社製のものを使用した。

その他の試薬は市販の特級品を特に精製せずに使用した。

Pluronic水溶液の温度調整にはヤマト-コマツ製CTE42A型恒温槽を使用した。吸光度の測定には日立製U-2000型ダブルビーム分光光度計を使用した。Pluronic水溶液の分相を促進するための遠心分離には国産製H-200NR型冷却小型高速遠心機を使用した。

6-2-2 操作

(1) 相分離温度の測定：第2章に準じて行った。

(2) 相体積の測定：第2章に準じて行った。

(3) Pluronic濃度の測定：Nagら¹⁷⁾のポリエチレングリコールの定量法に準じて行った。塩化鉄(III)とチオシアン酸アンモニウムを混合し、チオシアン酸鉄(III)アンモニウム水溶液を調整した。これにPluronic水溶液およびクロロホルムを加え、激しく攪拌したのち、3,000gで2分間遠心分離した。クロロホルム相を分取し、Pluronicによって抽出されたチオシアン酸鉄(III)アンモニウムの510nmの吸光度し、あらかじめ作成した検量線によりPluronicの濃度を決定した。

(4) タンパク質の抽出：タンパク質と10mM Tris-HCl (pH7.45) を含む Pluronic 溶液を1.5-mlサンプルチューブに入れた。これを30℃もしくは35℃で10分間インキュベートしたのち、3,000gで10分間遠心分離した。各相中のタンパク質濃度を測定し、抽出率を算出した。

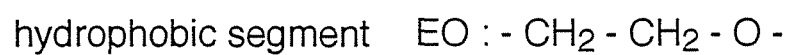
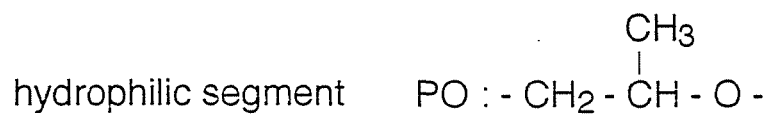
(5) タンパク質の定量：Cyt.b₅およびCyt.cいずれのタンパク質も400～420nmのヘムの吸収から濃度を算出した。

6-3 結果および考察

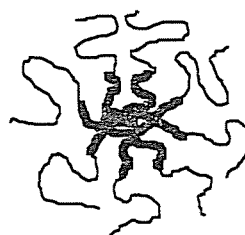
6-3-1 トリブロックコポリマー水溶液の曇点ならびに二相分離特性

PEOおよびPPOからなるトリブロックコポリマーには基本的に二つの構造が考えられる。この二つの構造はそれぞれ、PPOが二つのPEOに挟まれたPEO-PPO-PEO型とその逆のPPO-PEO-PPO型である。Fig.6-1にそのPluronicの分子構造を示した。PluronicはPEOを親水部、PPOを疎水部とした界面活性剤であり、水溶液中においてミセルを形成することが知られている。ミセル構造をFig.6-1に併せて示した。Pluronicはポリマーでもあるため、Fig.6-1に示したように単分子でもミセルを形成し、その濃度増加にあわせて多分子ミセルを形成すると考えられている^{9,13)}。また、PPO-PEO-PPO型Pluronicでは、ミセルが数珠繋ぎになったような構造を取ることが明らかにされている^{10,14)}。このように特徴的なミセル構造が抽出にどのような影響を及ぼすかは興味深い。そこで、まず初めに、PEO-PPO-PEO型とPPO-PEO-PPO型のそれぞれについて、タンパク質の抽出を扱えるような低温で二相分離するPluronicを探索した。PEOおよびPPOの長さの異なるいくつかのPluronicについて、その1%(w/v)溶液の相分離温度を測定した結果をTable 6-1に示す。またこの表には、構造式、エチレンオキシド (EO) 含量および分子量も併せて示した。いずれのタイプのPluronicも、EO含量および分子量が大きいほど、相分離温度は高温になる傾向が見られた。そこで、調べたPluronicの中でもっとも相分離温度の低かったPluronic L61 (L61) およびPluronic 25R2 (25R2) について、以後の検討を行った。

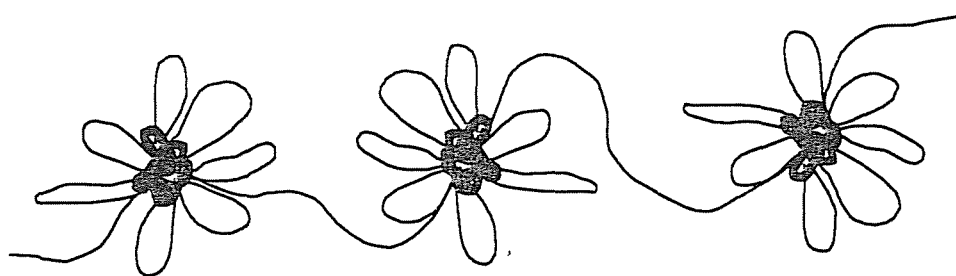
Fig.6-2にL61および25R2の相分離温度に及ぼすそれぞれの濃度の影響について検討した結果を示す。二相分離現象はそれぞれの曲線の高温域で観察された。これはTX114のようなポリオキシエチレンアルキルエーテル型の非イオン界面活性剤に見られる相分離挙動



Monomolecular micelle



Polymolecular micelle



Micellar network

Fig. 6-1 Structures of Pluronics and their micelles.

Table 6-1 Structure and cloud point of Pluronics

Pluronic	Formula	EO, %	MW	Cloud point/°C
(PEO-PPO-PEO)				
L61	EO ₂ PO ₃₁ EO ₂	10	2000	25
L62	EO ₆ PO ₃₄ EO ₆	20	2500	31
L64	EO ₁₃ PO ₃₀ EO ₁₃	40	2900	60.5
(PPO-PEO-PPO)				
17R2	PO ₁₅ EO ₉ PO ₁₅	20	2150	36
17R4	PO ₁₅ EO ₂₂ PO ₁₅	40	2650	46.5
25R2	PO ₂₂ EO ₁₄ PO ₂₂	20	3100	30

EO : ethylene oxide, PO : propylene oxide, MW : molecular weight

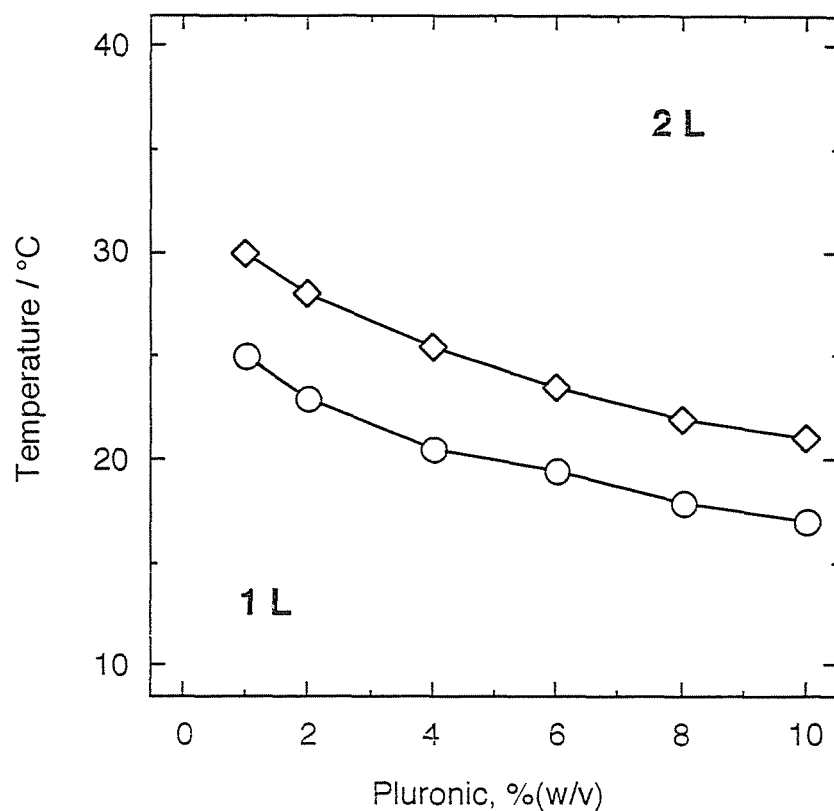


Fig. 6-2 The cloud points of Pluronic L61 and 25R2 as a function of their concentrations. Above the respective curves, the solutions separate two isotropic phases (2L) while single homogeneous solution exists below the curves (1L).

Pluronic : (○) L61, (◇) 25R2.

Condition : 10 mM Tris-HCl, pH 7.45.

とよく一致している。また、いずれの相分離温度もPluronic濃度の増加に伴い減少した。タンパク質の抽出性を広いPluronic濃度範囲で検討するために、以後の検討ではL61については30℃で、25R2については35℃で相分離を行うことにした。

Fig.6-3にL61の界面活性剤相における回収率（すなわちL61の抽出率）と、界面活性剤相の体積分率を示した。回収率ならびに体積分率はL61濃度の上昇に伴い増大した。検討した濃度範囲において、界面活性剤相の体積分率は13%以下で、L61の回収率は40%以上であった。25R2を用いた場合の結果をFig.6-4に示す。25R2に関しても同様の結果が得られた。非常に小さい体積に多くのPluronicが回収されていることから、界面活性剤相中ではPluronicが非常に高濃度に存在していることが分かる。その濃度は、L61で50%(w/v)、25R2で65%(w/v)と見積もることができた。

ミセル水性二相分配法やポリマー水性二相分配法において様々な添加物が、二相分離挙動やタンパク質の分配挙動を制御するために用いられている。そこで、添加物として、塩を用いPluronicの二相分離に及ぼす影響について検討した。Fig.6-5に2%(w/v) Pluronic水溶液の相分離温度とNaCl濃度との関係を示す。いずれのPluronicの相分離温度もNaCl濃度の増加とともに減少し、ポリオキシエチレンアルキルエーテル型の非イオン界面活性剤と同様の現象が見られた。すなわち、Pluronic界面活性剤においても、塩析効果が働いていることを示している。L61が5%(w/v)のときの、L61の界面活性剤相における回収率ならびに界面活性剤相の体積分率に及ぼすNaCl濃度の影響をFig.6-6に示す。相体積はNaCl濃度に依存せず、ほぼ一定であったのに対し、L61の界面活性剤相での回収率はNaCl濃度の上昇とともに増大した。すなわち、L61はNaCl濃度の増加に伴い、塩析効果によって界面活性剤相に押し出される一方で、水分子は界面活性剤相から搾り出されていること意味している。これにより、界面活性剤相中のL61濃度はますます増大し、より疎水的な環境が界面活性剤相において形成されているものと思われる。この結果は、25R2に関しても全く同様に観察された（Fig.6-7）。

6-3-2 チトクロムcおよびチトクロム b_5 の抽出

L61および25R2水溶液の相分離によるタンパク質の抽出を行った。タンパク質には、疎水性の膜タンパク質としてチトクロム b_5 (Cyt. b_5)、水溶性タンパク質としてチトクロムc (Cyt.c) を用いた。初めに、L61水溶液におけるそれぞれの抽出に及ぼすL61濃度の影

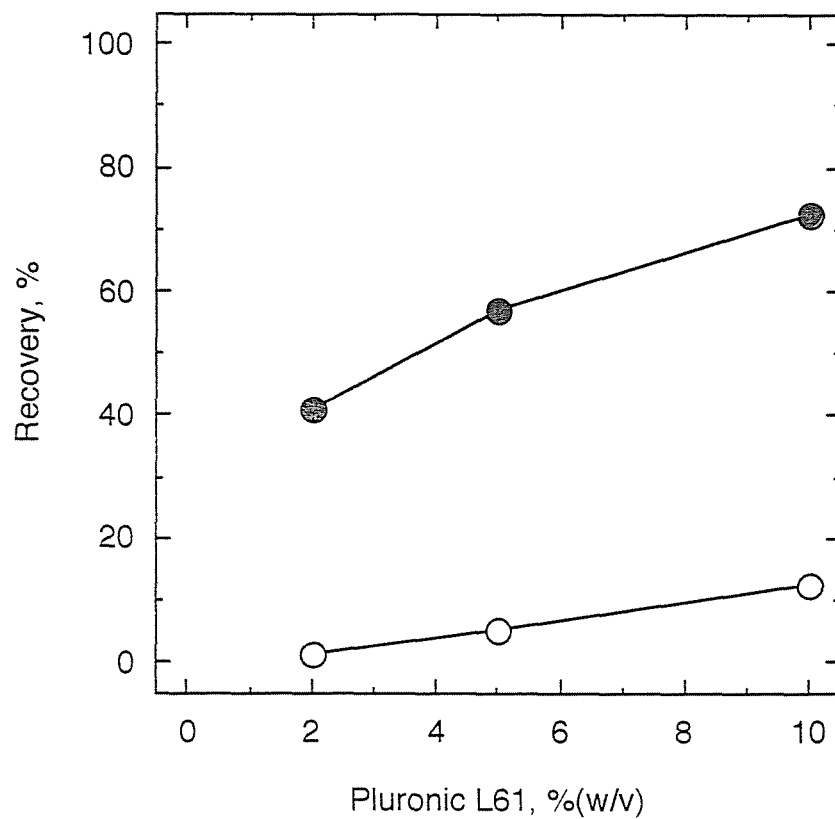


Fig. 6-3 The recoveries of Pluronic L61 (●) and volume (○) in the surfactant-rich phase as a function of total Pluronic L61 concentration.

Condition : 10 mM Tris-HCl, pH 7.45, 30°C.

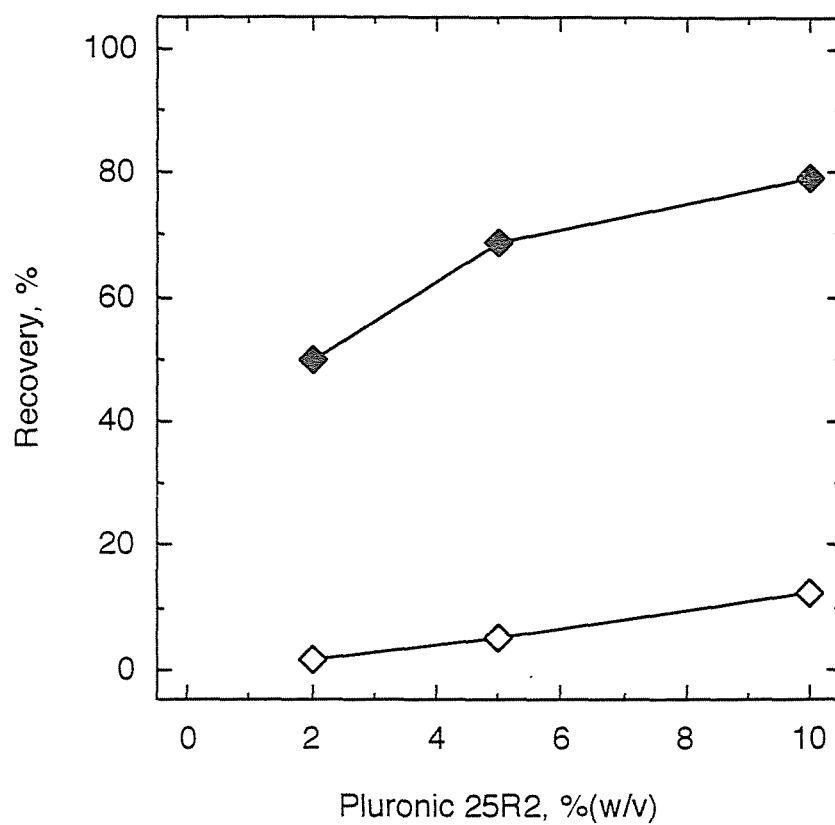


Fig. 6-4 The recoveries of Pluronic 25R2 (◆) and volume (◇) in the surfactant-rich phase as a function of total Pluronic 25R2 concentration.

Condition : 10 mM Tris-HCl, pH 7.45, 35°C.

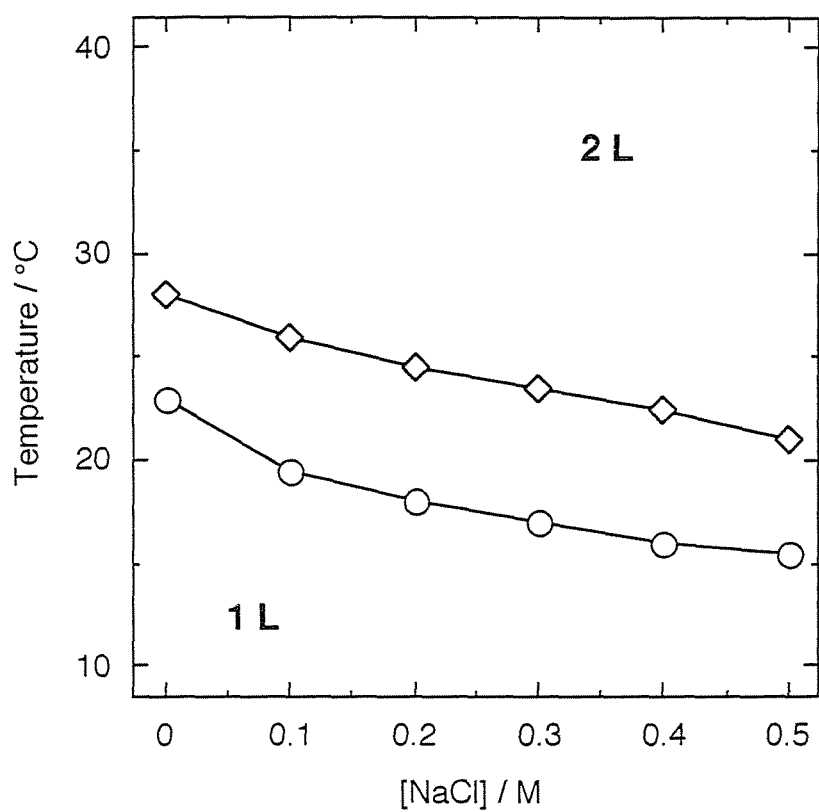


Fig. 6-5 Effect of NaCl concentration on the cloud points in 2 %(w/v) L61 and 25R2 solutions. 1L and 2L have the same meanings as in Fig. 6-2.

Pluronic : (○) L61, (◇) 25R2.

Condition : 10 mM Tris-HCl, pH 7.45.

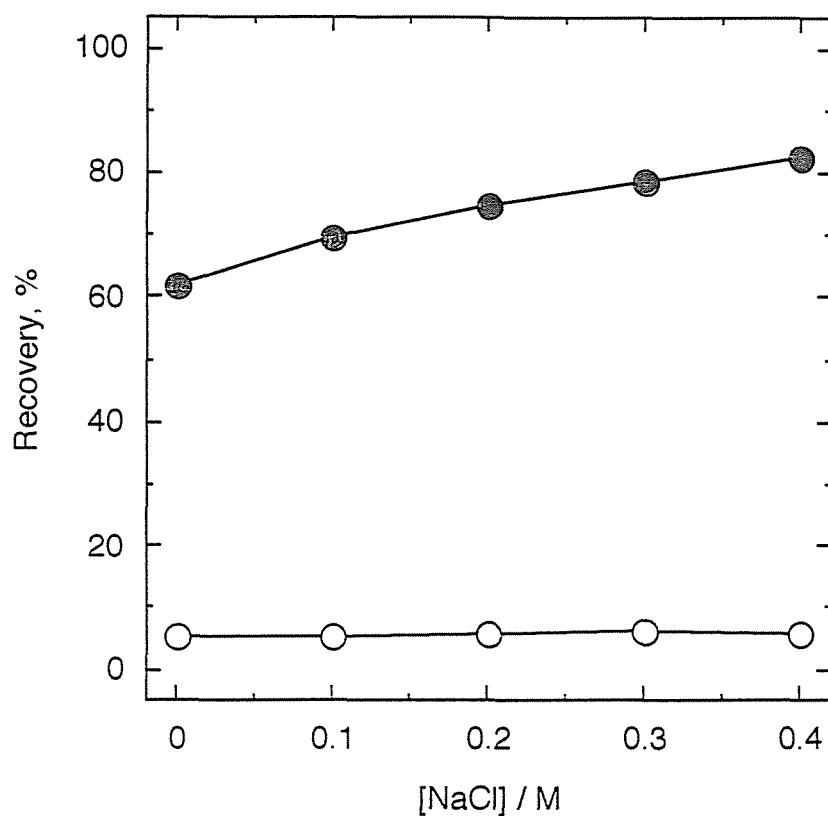


Fig. 6-6 Effect of NaCl concentration on the recoveries of Pluronic L61 (●) and volume (○) in the surfactant-rich phase.

Condition : 2%(w/v) Pluronic L61, 10 mM Tris-HCl, pH 7.45, 30°C.

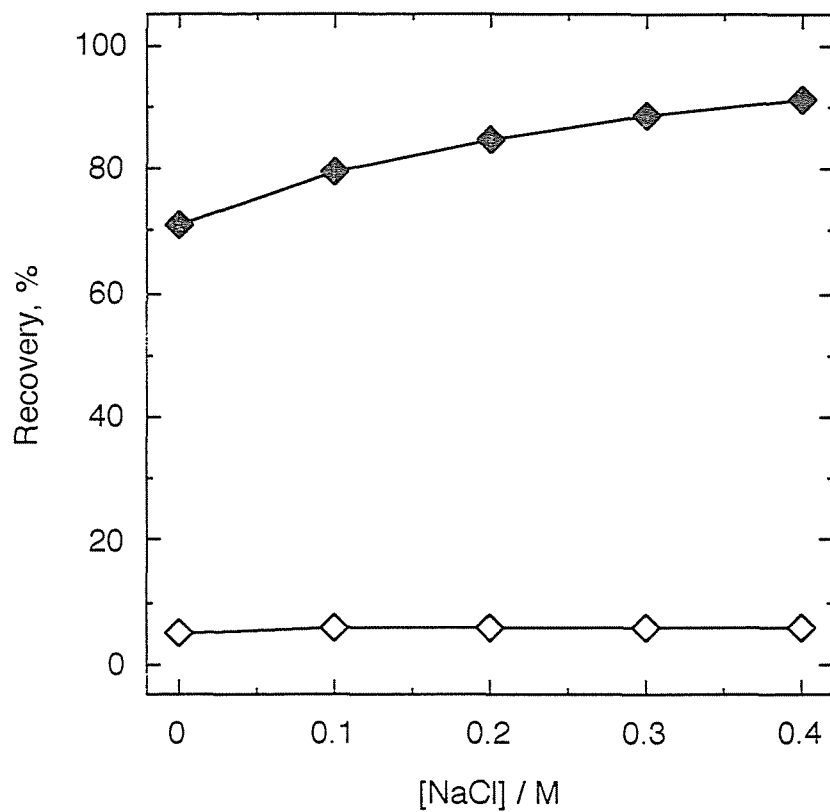


Fig. 6-7 Effect of NaCl concentration on the recoveries of Pluronic 25R2 (◆) and volume (◇) in the surfactant-rich phase.

Condition : 2%(w/v) Pluronic 25R2, 10 mM Tris-HCl, pH 7.45, 35°C.

響を検討した。結果をFig.6-8に示す。Cyt.*b*₅の抽出率は、L61濃度の上昇に伴い増大し、L61濃度10%(w/v)のとき約90%が抽出された。一方、Cyt.*c*はほとんど抽出されず、水相中に保持された。また、抽出率のL61濃度依存性も見られなかった。Cyt.*b*₅の抽出挙動は、Fig.6-3におけるL61の分配挙動とよく一致している。すなわち、Cyt.*b*₅はL61の界面活性剤相への分配に伴い抽出されている。これは、従来のTX114ミセル水性二相分配系と同様、L61とCyt.*b*₅の疎水性相互作用が抽出過程において重要な役割を果たしていることを示している。

次に、25R2水溶液を用いたときのCyt.*b*₅およびCyt.*c*の抽出に及ぼす25R2濃度の影響をFig.6-9に示す。L61のときと同様、Cyt.*c*の抽出率は低く、25R2濃度依存性も見られなかった。しかし、Cyt.*b*₅に関しても、その抽出率は非常に低く、Cyt.*c*と同様、25R2濃度依存性は見られなかった。

Fig.6-10に、L61および25R2それぞれの5%(w/v)溶液における、Cyt.*b*₅の抽出に及ぼすNaClの影響を示した。L61の系において、Cyt.*b*₅の抽出率はNaCl濃度の上昇とともに増加した。これも、NaCl濃度の増加に伴う界面活性剤相へのL61の分配によるものと考えられる (Fig.6-6)。一方、25R2を用いた場合、Cyt.*b*₅は抽出されず、NaCl濃度依存性も見られなかった。以上の結果から、Cyt.*b*₅の抽出に関してL61と25R2の系で大きな違いのあることが分かった。

相体積とPluronicの分配はL61と25R2でほぼ同じ結果が得られていることから、このような抽出性の違いは、両者の疎水性あるいは構造の違いに起因しているものと考えられる。Table 6-1より、L61および25R2のEO含量はそれぞれ10%と20%とL61の方が小さいものの、POの絶対量は25R2の方が大きく、単純に比較はできない。L61の方が25R2に比べてより疎水的な環境を界面活性剤相中に提供しており、そのため、Cyt.*b*₅が抽出されるのかも知れない。しかし、NaClの添加によりPluronicは界面活性剤相中に濃縮されている (Fig.6-6)。これは、25R2の系においても、NaClの添加によって、より疎水的な環境を提供できることを意味している。Cyt.*b*₅の抽出率はNaClの添加によっても向上しなかった (Fig.6-10) ことから、L61と25R2の系におけるCyt.*b*₅の抽出性の違いは、単に疎水性の違いによるものではないと考えられる。

次に、この考察を検証するために、疎水性の低分子量物質であるクマジーブリリアントブルーG250 (CBB) の抽出を行った。結果をFig.6-11に示す。L61、25R2いずれの系に

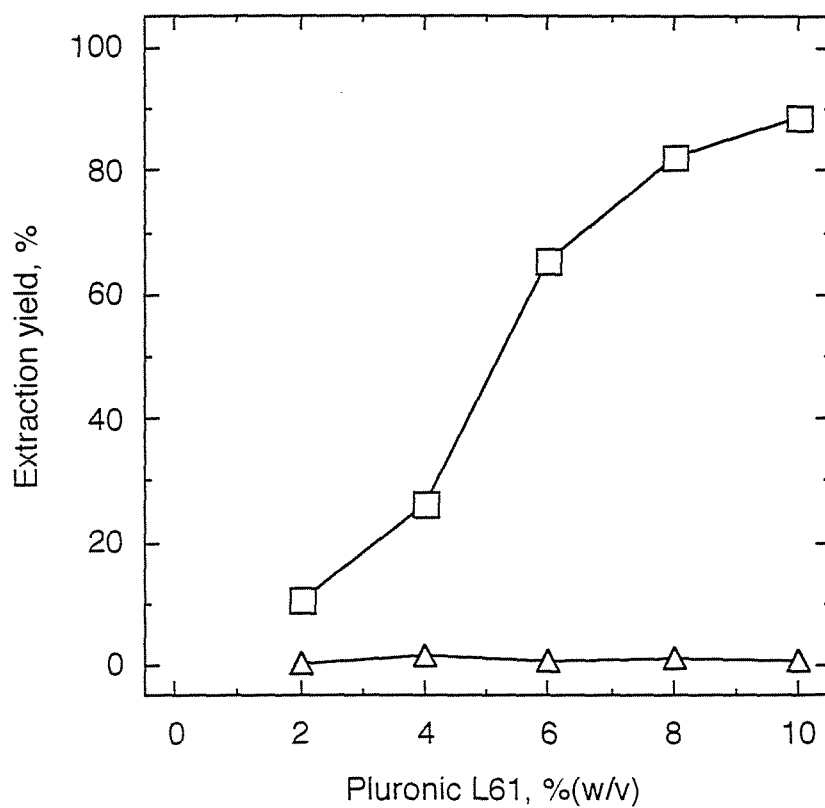


Fig. 6-8 Extraction of cytochrome b_5 and cytochrome c in the surfactant-rich phase upon phase separation in aqueous solutions contain various concentrations of Pluronic L61.

Protein : ($\square$) cytochrome b_5 , ($\triangle$) cytochrome c

Condition : 0.4 μ M cytochrome b_5 or 8 μ M cytochrome c , 10 mM Tris-HCl, pH 7.45, 30°C.

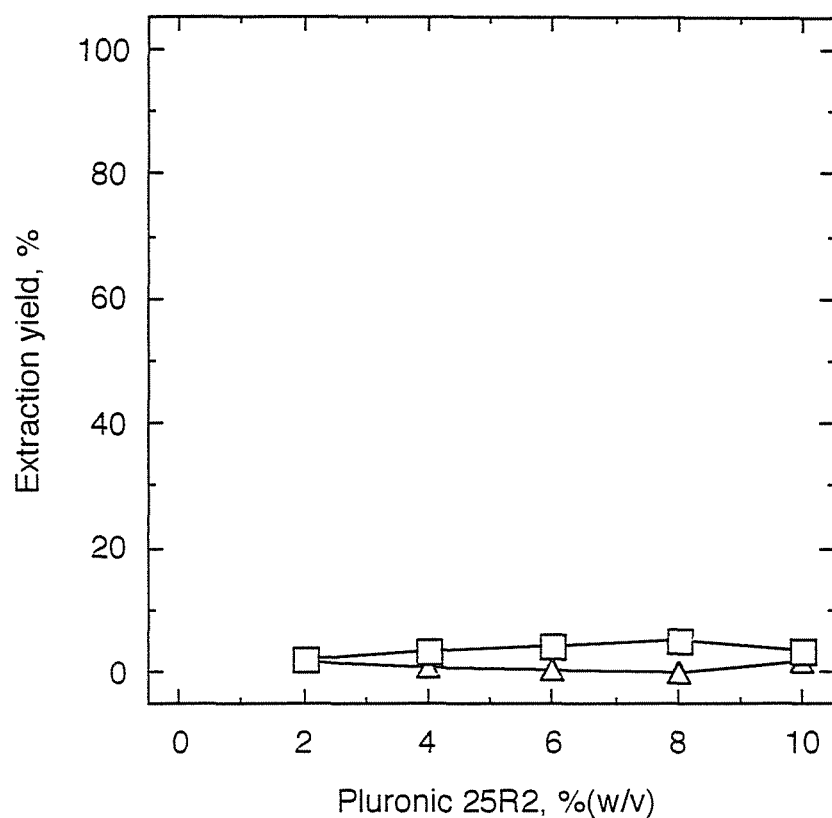


Fig. 6-9 Extraction of cytochrome b_5 and cytochrome c in the surfactant-rich phase upon phase separation in aqueous solutions contain various concentrations of Pluronic 25R2.

Protein : ($\square$) cytochrome b_5 , ($\triangle$) cytochrome c

Condition : 0.4 μ M cytochrome b_5 or 8 μ M cytochrome c , 10 mM

Tris-HCl, pH 7.45, 35°C.

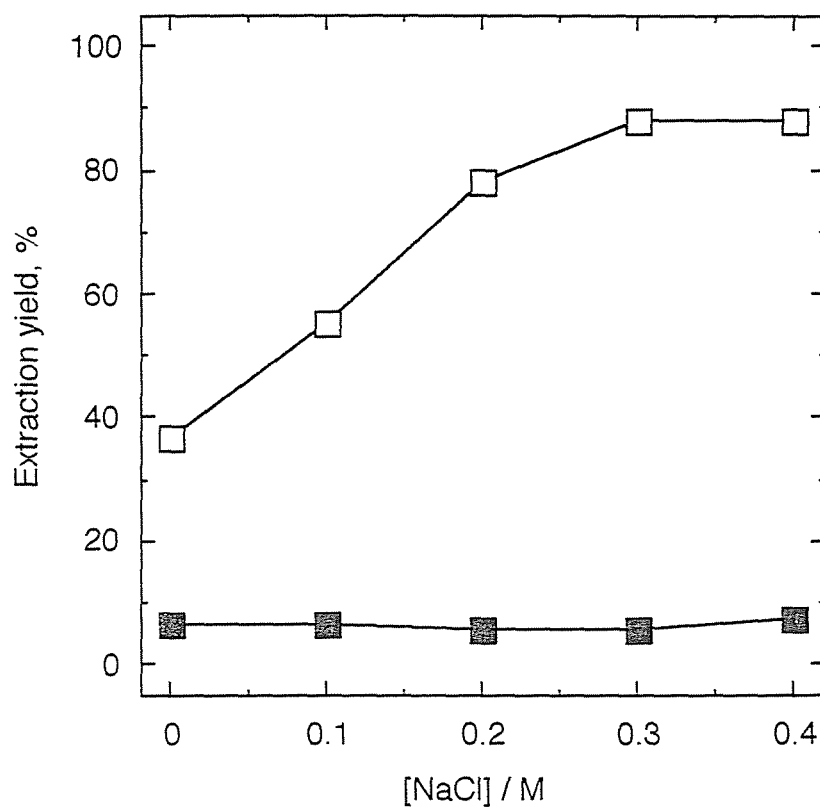


Fig. 6-10 Effect of NaCl concentration on the extraction of cytochrome b_5 in the surfactant-rich phase upon phase separation in 5 % (w/v) Pluronic L61 ($\square$) and 25R2 ($\blacksquare$) solutions.

Pluronic : ($\square$) L61, ($\blacksquare$) 25R2.

Condition : 0.4 μ M cytochrome b_5 , 10 mM Tris-HCl, pH 7.45, 30°C (L61) or 35°C (25R2).

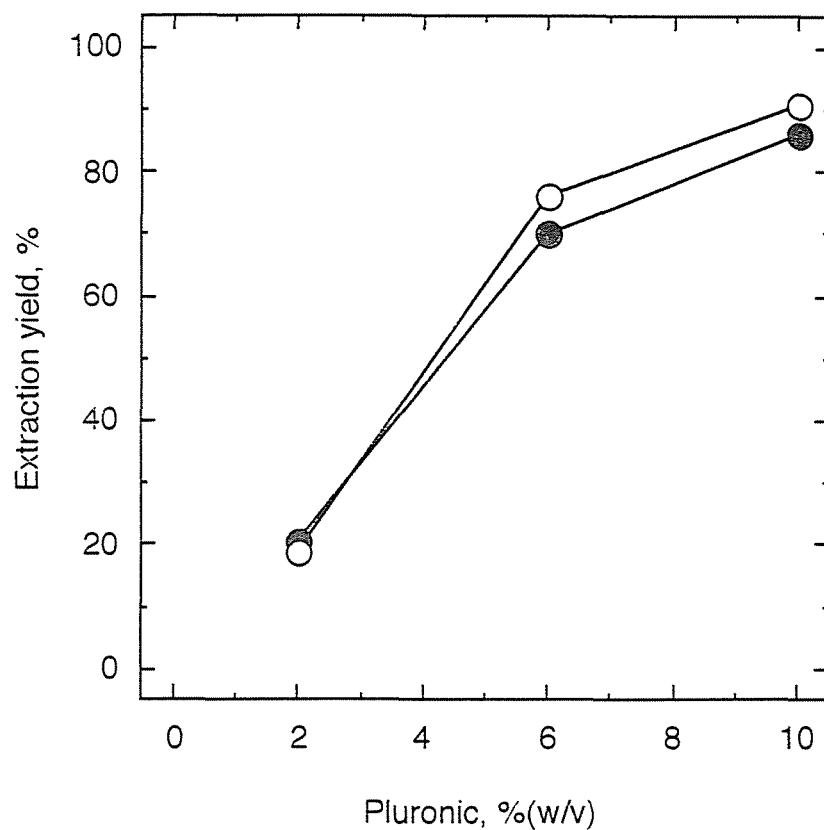


Fig. 6-11 Extraction of Coomassie Brilliant Blue G250 in the surfactant-rich phase upon phase separation in aqueous solutions of L61 and 25R2.

Pluronic : (○) L61, (●) 25R2.

Condition : 0.0025%(w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 10 mM

Tris-HCl, pH 7.45, 30°C (L61) or 35°C (25R2).

においてもCBBの抽出率はPluronic濃度の増加とともに増大し、L61の系におけるCyt. b_3 の抽出挙動とよく一致した。すなわち、L61と25R2が形成する界面活性剤相の疎水性にはほとんど違いのないことが示された。したがって、前述したようにCyt. b_3 の抽出性の違いが系の疎水性の違いによるものではないことが明らかになった。また、低分子量の色素であるCBBの抽出挙動が二つの系でよく一致していることから、Cyt. b_3 の抽出性の違いは抽出される分子の大きさとL61および25R2間の構造の違いに起因していると考えられる。

最近、Pluronicの相挙動とミセル構造の研究から、PEO-PPO-PEO型のPluronicの球状ミセルが通常为非イオン界面活性剤と同様、濃度や温度の上昇とともに棒状あるいは層状ミセルに成長し、相分離を起こすことが明らかになっている。一方、PPO-PEO-PPO型のPluronicも同様に球状ミセルを形成する。しかし、Fig.6-1で見たように、1分子中の二つのPPOがそれぞれ別のミセルに結合することにより、ミセルのネットワークが構築されている。球状ミセルはこの状態のまま、層状や棒状に成長し相分離すると考えられる。また、25R2ではEOは14ユニットしかなく、これに対してPOは片側で22ユニットである。したがって、界面活性剤相中において、このネットワーク構造によりミセルは非常に密につながっていることが予想される。Fig.6-12にL61および25R2それぞれの層状ミセルの模式図を示した。ここで、Cyt. b_3 はその分子内に親水部と疎水部の両方を持っているため、界面活性剤相においても親水部が存在するためにはミセルとミセルの間の親水的な「すき間」が必要となる。25R2の上述したようなミセル構造では、この「すき間」が形成されないために、Cyt. b_3 が界面活性剤相に抽出されなかったものと考えられる。一方、低分子量の疎水性物質であるCBBの場合、このような「すき間」はほとんど必要としないため、いずれの系においても界面活性剤相に抽出されたものと考えられる。

ここで得られた膜タンパク質の抽出挙動は、従来のミセル水性二相分配系においては見られない現象である。ポリマー水性二相分配系も含めたいずれの水性二相分配系でも、各相に存在する界面活性剤分子やポリマー分子との相互作用によって、タンパク質の分配は支配されている。例えばミセル水性二相分配法では、単一成分系のため、片方の相に濃縮される界面活性剤との相互作用、主に疎水性相互作用が重要な役割を果たしてきた。また第4章や第5章で用いた系は、これに二番目の成分として荷電ポリマーを加え、疎水性相互作用の他にポリマーとの静電的相互作用を利用したものである。

しかし、本章で用いた二つのPluronicミセル水性二相分配系では特別な置換基も導入

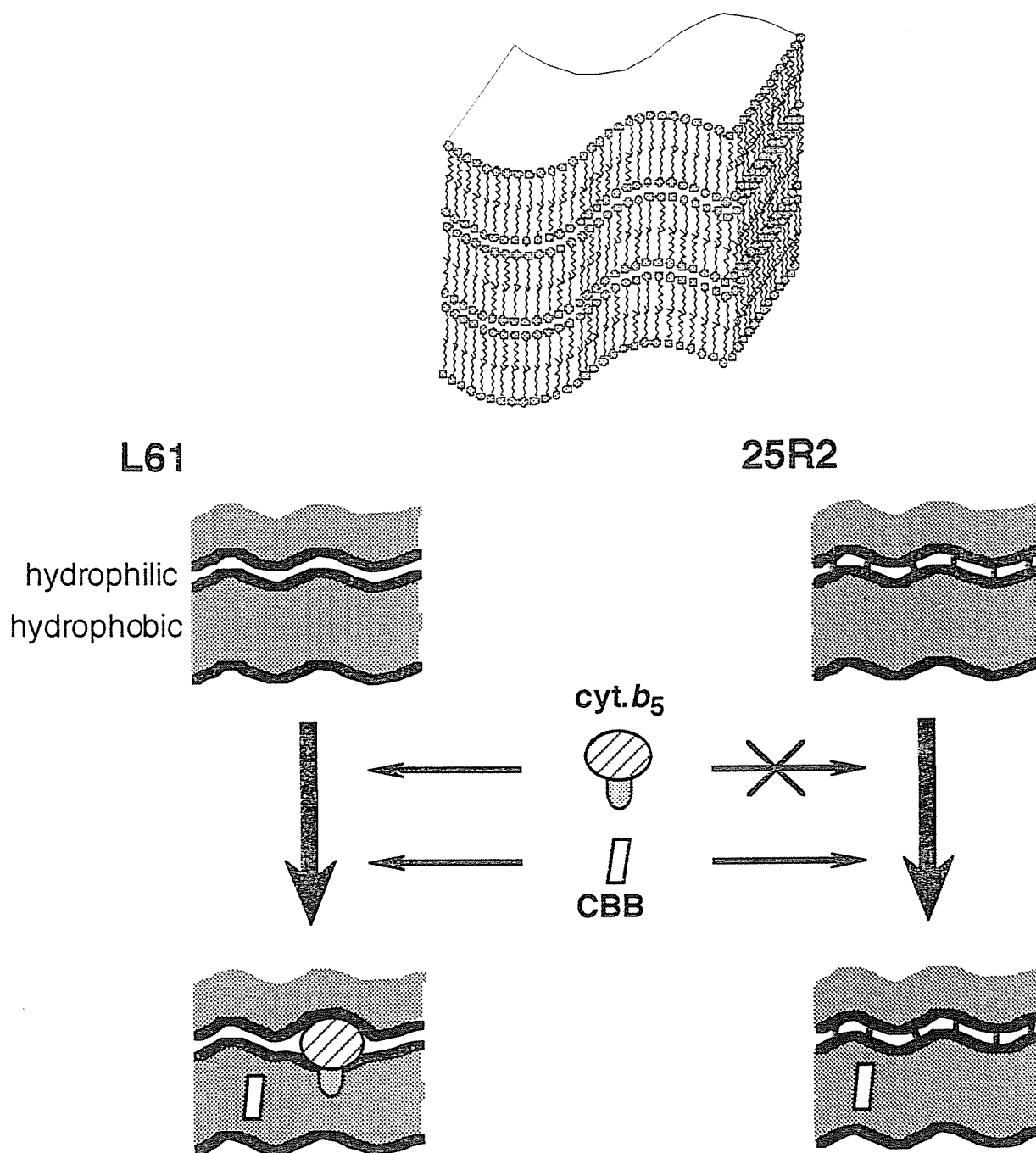


Fig. 6-12 Model for the extraction of cytochrome b_5 and Coomassie Brilliant Blue G250 in L61 and 25R2 two-phase systems.

しておらず、また用いているPluronic分子の化学組成や疎水性もほとんど同じである。すなわち、タンパク質分子とPluronic分子間の相互作用が抽出を制御しているのではなく、単に分子構造における配列の違いに基づくミセル構造の違いが、大きな抽出性の違いとなって表れているものである。このことは、ミセル、ポリマーいずれの水性二相分配法においても、今までになかった全く新しい分離モードの発見を意味するものである。Pluronicミセル水性二相分配系を利用することにより、構造選択的な分離が可能になるものと期待される。

6-4 結言

本章ではポリエチレンオキシド (PEO) とポリプロピレンオキシド (PPO) からなるトリブロックコポリマー (Pluronic) を用いた新規なミセル水性二相分配法を提案した。Pluronicの中でも相分離温度の低いPluronic L61 (L61) とPluronic 25R2 (25R2) を用いて、膜タンパク質チトクロム b_5 および水溶性タンパク質チトクロム c (Cyt. c) の抽出を行った。L61を用いたとき、Cyt. b_5 は界面活性剤相に抽出されたのに対し、Cyt. c はほとんど抽出されなかった。L61の分配挙動から、タンパク質とL61との疎水性相互作用が抽出性を支配していることが示唆された。一方、25R2を用いた場合、Cyt. b_5 、Cyt. c いずれも界面活性剤相に抽出されなかった。また、L61系では、NaClの添加によってCyt. b_5 の抽出は増加したものの、25R2系では低抽出率のまま変化しなかった。いずれの系もNaClの添加によって、界面活性剤相にPluronicが濃縮されること、ならびに疎水性低分子物質であるクマジーブリリアントブルーG250がいずれの系においてもよく抽出されることから、二つの系におけるCyt. b_5 の抽出性の違いは、疎水性の違いによるものではないことが分かった。また、この結果から、L61と25R2の分子構造上の配列の違いが抽出性の違いの原因になっていると考えた。PEO-PPO-PEO型のL61は独立したミセルを形成するが、PPO-PEO-PPO型の25R2ではミセルのネットワークが構成されており、このネットワーク構造がCyt. b_5 の界面活性剤相への抽出を抑えているものと考えられた。

Pluronicミセル水性二相分配系は、従来では見られないタンパク質の分配挙動を示すことから、全く新しい選択性に基づく新規な分離システムとして有用であると考えられる。

引用文献

- 1) W. L. Hinze and E. Pramauro, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **24**, 133-177 (1993).
- 2) H. Tani, T. Kamidate, and H. Watanabe, *J. Chromatogr. A*, **780**, 229-241 (1997).
- 3) H. Walter, D. E. Brooks, and D. Fisher (Eds.), "*Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems Theory, Methods, Uses, and Applications to Biotechnology*", Academic Press, Inc., Orlando, 1985.
- 4) I. R. Schmolka, in "*Nonionic Surfactants*", M. J. Schick (Ed.), p. 300-371, Marcel Dekker, Inc., New York, 1967.
- 5) Z. Zhou and B. Chu, *J. Colloid Interface Sci.*, **126**, 171-180 (1988).
- 6) P. N. Hurter, J. M. H. M. Scheutjens, and T. A. Hatton, *Macromolecules*, **26**, 5592-5601 (1993).
- 7) P. Linse, *Macromolecules*, **26**, 4437-4449 (1993).
- 8) P. Linse, *J. Phys. Chem.*, **97**, 13896-13902 (1993).
- 9) K. Mortensen and J. S. Pedersen, *Macromolecules*, **26**, 805-812 (1993).
- 10) K. Mortensen, W. Brown, and E. Jørgensen, *Macromolecules*, **27**, 5654-5666 (1994).
- 11) F. Gadelle, W. J. Koros, and R. S. Schechter, *Macromolecules*, **28**, 4883-4892 (1995).
- 12) A. V. Kabanov, I. R. Nazarova, I. V. Astafieva, E. V. Batrakova, V. Y. Alakhov, A. A. Yaroslavov, and V. A. Kabanov, *Macromolecules*, **28**, 2303-2314 (1995).
- 13) K. Zhang and A. Khan, *Macromolecules*, **28**, 3807-3812 (1995).
- 14) K. Mortensen, *Macromolecules*, **30**, 503-507 (1997).
- 15) M. Svensson, F. Joabsson, P. Linse, and F. Tjerneld, *J. Chromatogr. A*, **761**, 91-101 (1997).
- 16) H. Tani, A. Matsuda, T. Kamidate, and H. Watanabe, *Anal. Sci.*, **13**, 925-929 (1997).
- 17) A. Nag, G. Mitra, and P. C. Ghosh, *Anal. Biochem.*, **237**, 224-231 (1996).

第7章 総括

ミセル水性二相分配法は、バイオテクノロジーの実用化において必要となるプロセス生産技術に対応しうるタンパク質の分離法として注目されている。しかし、従来のミセル水性二相分配法は、膜タンパク質と水溶性タンパク質の分離という前処理のみを目的とし、その分配挙動の検討や系の制御によるタンパク質分配の制御などの高性能化に関する試みは行われていない。

本研究では、界面活性剤ミセルと水溶性ポリマーの混合水溶液の水溶液の相分離現象に着目し、タンパク質の分配挙動ならびに分配の制御を試みた。その結果、荷電ポリマーを導入することにより、ミセル水性二相分配法では困難とされていた膜タンパク質間の分離が可能となった。

以下に、各章ごとにまとめて本研究の総括を行う。

第1章は序論であり、タンパク質の分離精製法の現状と問題点を述べた。また、界面活性剤ミセル水溶液の二相分離現象ならびにミセル水性二相分配法を用いたタンパク質の分離に関する研究を概観し、本論文の背景と目的を明らかにした。

第2章では、タンパク質の分離に用いることのできる界面活性剤ミセル水溶液の二相分離系の探索を行った。その結果、TX114ミセル水溶液が水溶性ポリマーや塩の添加によって二相分離が促進されることを見出した。さらに、単独では二相分離しないAG系界面活性剤ミセル水溶液が水溶性ポリマーの添加によって二相分離する現象を見出した。次に、これら二相分離系を用いてタンパク質の抽出を行った。いずれの系も水溶性タンパク質は水相に回収されたのに対し、膜タンパク質は界面活性剤相に抽出された。したがって、本相分離系が水溶性タンパク質と膜タンパク質の分離に応用可能であることが明らかになった。また、ポリマー水性二相分配系におけるタンパク質の分配挙動と比較したところ、ミセル水性二相分配系における水溶性タンパク質の分配挙動は、ポリマー水性二相分配系における分配挙動とよく一致していることを見出した。したがって、界面活性剤との特異的相互作用を利用したり、ポリマー濃度や分子量を変化させるなど系の設計次第で水溶性タンパク質の選択的な分離が可能になることが示された。

第3章では、ミセル水性二相分配に先立って行われる可溶化について、肝ミクロゾーム中の4つ電子伝達系膜タンパク質を対象に検討した。アルキルグルコシド（AG）系、

ショ糖エステル系，胆汁酸系およびポリオキシエチレンアルキルエーテル系の各界面活性剤を用いて可溶化を行ったところ，AG系界面活性剤がCyt. b_5 およびfp2に対し高い可溶化選択性を有することが明らかになった。さらに，この選択性を利用してCyt.P450からのCyt. b_5 の分離を試みた。OTGで可溶化した後の残渣を，SCで再可溶化することにより，Cyt. b_5 ならびにCyt.P450の変性型であるCyt.P420から完全に分離したCyt.P450を得ることができた。

第4章では，第2章で見出した新たなミセル水性二相分配系であるオクチルチオグルコシド－水溶性ポリマー混合水溶液を用いて，精製した二つの膜タンパク質，チトクロム b_5 とチトクロムP450の抽出を行った。非荷電ポリマーであるPEG6000やDxを用いたとき，二つの膜タンパク質の抽出性の違いは疎水性の違いに起因していることが明らかになった。。

抽出を行うpH7.4においてCyt. b_5 は負に帯電し，Cyt.P450は中性であることから，荷電ポリマーの導入によるCyt. b_5 の選択的な抽出の制御を試みた。水溶性ポリマーに正電荷を有するDEAE-Dxを用いたとき，Cyt. b_5 の抽出率のみ選択的に抑制させることができた。この結果から，ミセル水性二相分配法において，タンパク質を親疎水性だけでなく電荷の違いによっても分離できることが明らかになった。

荷電ポリマーを導入したOTGミセル水性二相分配法を可溶化ミクロゾーム中のCyt. b_5 とCyt.P450の分離に応用した。疎水性のみによって抽出が制御されるDxを導入した系に比べ，DEAE-Dxを導入した系ではCyt. b_5 とCyt.P450の分離能が優れていることが明らかになった。したがって，ここに荷電ポリマーを導入した膜タンパク質の高性能なミセル水性二相分配法を確立することができた。

第5章では，TX114－水溶性ポリマー混合水溶液からなる新規なミセル水性二相分配系において，荷電ポリマーの導入による膜タンパク質の抽出制御の可能性を検討した。pH7.4において負電荷を有するCyt. b_5 ならびに正電荷を有するfp1のそれぞれの精製膜タンパク質の抽出を行った結果，正電荷を有するDEAE-Dxを用いると，Cyt. b_5 の抽出のみ抑えることができた。また逆に，負電荷を有するDx-Sを用いると，fp1の抽出のみが抑制された。したがって，荷電ポリマーを導入したTX114ミセル水性二相分配系においても，膜タンパク質の電荷の違いによる分離が可能になることが明らかになった。

次に，可溶化MsからのCyt. b_5 およびfp1の抽出を行った結果，Dx-Sを用いたとき，

Cyt. b_5 の高い抽出率を維持したまま、総タンパク質の抽出率が大きく低下することを見出した。そこで、このようなCyt. b_5 に対する高い抽出選択性をMsからのCyt. b_5 の分離を応用した。三回の相分離抽出を行った結果、Cyt. b_5 が回収率91%、Purification factor 10.6という高い値で精製された。

第6章ではポリエチレンオキシド (PEO) とポリプロピレンオキシド (PPO) からなるトリブロックコポリマー (Pluronic) を用いた新規なミセル水性二相分配法を提案した。Pluronic L61 (L61) とPluronic 25R2 (25R2) を用いて、膜タンパク質チトクロム b_5 および水溶性タンパク質チトクロム c (Cyt. c) の抽出を行った。L61を用いたとき、Cyt. b_5 は界面活性剤相に抽出されたのに対し、Cyt. c はほとんど抽出されなかった。L61の分配挙動から、タンパク質とL61との疎水性相互作用が抽出性を支配していることが示唆された。一方、25R2を用いた場合、Cyt. b_5 、Cyt. c いずれも界面活性剤相に抽出されなかった。二つの系におけるCyt. b_5 の抽出性の違いは、L61と25R2の分子構造上の配列の違いによるものであることが示唆された。Pluronicミセル水性二相分配系は、従来では見られないタンパク質の分配挙動を示すことから、全く新しい選択性に基づく新規な分離システムとなりうることを述べた。

第7章は、本研究の総括である。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました北海道大学大学院工学研究科 渡辺寛人教授ならびに上舘民夫助教授に深甚なる謝意を表します。

また、本論文の副査として御審査賜りました北海道大学大学院工学研究科 木下晋一教授ならびに棟方正信教授に深く感謝いたします。

本研究を進めるうえで、多くの貴重な御助言、御提言を賜りました北海道大学大学院薬学研究科 鎌滝哲也教授、東京薬科大学生命科学部 齋藤徹講師ならびに北海道大学大学院工学研究科 故瀬川規助手に深く感謝いたします。

さらに、本研究を共に進めてきた大浦貴史、松田暁両氏をはじめ、北海道大学大学院工学研究科生物計測化学分野の皆様には、研究成果等の討議において有意義な御助言を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。