



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	金属キレートポリマーを導入したミセル水性二相分配法におけるヒスチジンタグ融合チトクロムb5及びオリゴペプチドのアフィニティー分配
Author(s)	前花, 浩志; 谷, 博文; 鎌滝, 哲也 他
Citation	BUNSEKI KAGAKU, 51(1), 13-19 https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.51.13
Issue Date	2002-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71715
Type	journal article
File Information	bunseki.51-13.pdf



報 文

金属キレートポリマーを導入したミセル水性二相分配法における
ヒスチジンタグ融合チトクロム b_5 及びオリゴペプチドのアフィ
ニティー分配

前花 浩志*, 谷 博文[®]*, 鎌滝 哲也**, 上館 民夫*

Affinity partitioning of histidine-tagged cytochrome b_5 and
an oligopeptide in an aqueous micellar two-phase system
containing a metal-chelating polymer

Koji MAEHANA, Hirofumi TANI*, Tetsuya KAMATAKI** and Tamio KAMIDATE*

*Division of Molecular Chemistry, Graduate School of Engineering, Hokkaido University, Kita-13, Nishi-8, Sapporo, Hokkaido 060-8628

**Division of Medical Pharmacy, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Kita-12, Nishi-6, Sapporo, Hokkaido 060-0812

(Received 21 September 2001, Accepted 31 October 2001)

A metal affinity interaction between metals and proteins was exploited for the selective partitioning of histidine-tagged membrane proteins in an aqueous micellar two-phase system. The system used was a mixture of non-ionic surfactant micelle, Triton X-100, and a metal-chelating polymer, Ni(II)-iminodiacetic acid-poly (ethylene glycol) (Ni-IDA-PEG). The mixture separated into two phases, a polymer-enriched upper phase and a micelle-enriched lower phase, under an appropriate condition. The effect of the Ni-IDA-PEG concentration on the partitioning of cytochrome b_5 with and without a histidine-tag, and a fluorescein isothiocyanate-labeled oligopeptide containing six histidines was examined in two-phase systems containing various pH buffers. Cytochrome b_5 without a histidine-tag was partitioned into a micelle-rich phase, independent of the Ni-IDA-PEG concentration, due to a hydrophobic interaction. On the other hand, with increasing the concentration of Ni-IDA-PEG, the partitioning of histidine-tagged cytochrome b_5 was shifted to the polymer-rich phase in a system containing a phosphate or borate buffer. Upon the addition of imidazole to, or the removal of Ni(II) from the two-phase systems, the histidine-tagged protein showed the same partition behavior as that of the protein without a histidine-tag. These results indicate that the metal-chelating polymer plays the role of an affinity ligand, which enables histidine-tagged membrane proteins to move out from the micelle-rich phase to the polymer-rich phase. When Tris was used as a pH buffer, no affinity partitioning of the protein was observed. Although the oligopeptide also partitioned into the polymer phase in the presence of Ni-IDA-PEG, the partitioning was not dependent on the buffer type. Thus, the partitioning seems to be largely affected by the buffer type as well as the protein structure. The present system has a potential for a simple and rapid purification method for the histidine-tagged membrane proteins.

Keywords : aqueous micellar two-phase system; metal-chelating polymer; affinity partitioning; histidine-tagged membrane protein.

* 北海道大学大学院工学研究科分子化学専攻: 060-8628 北海道札幌市北区北13条西8丁目

** 北海道大学大学院薬学研究科医療薬学専攻: 060-0812 北海道札幌市北区北12条西6丁目

1 緒 言

非イオン界面活性剤のミセル水溶液は、曇点 (cloud

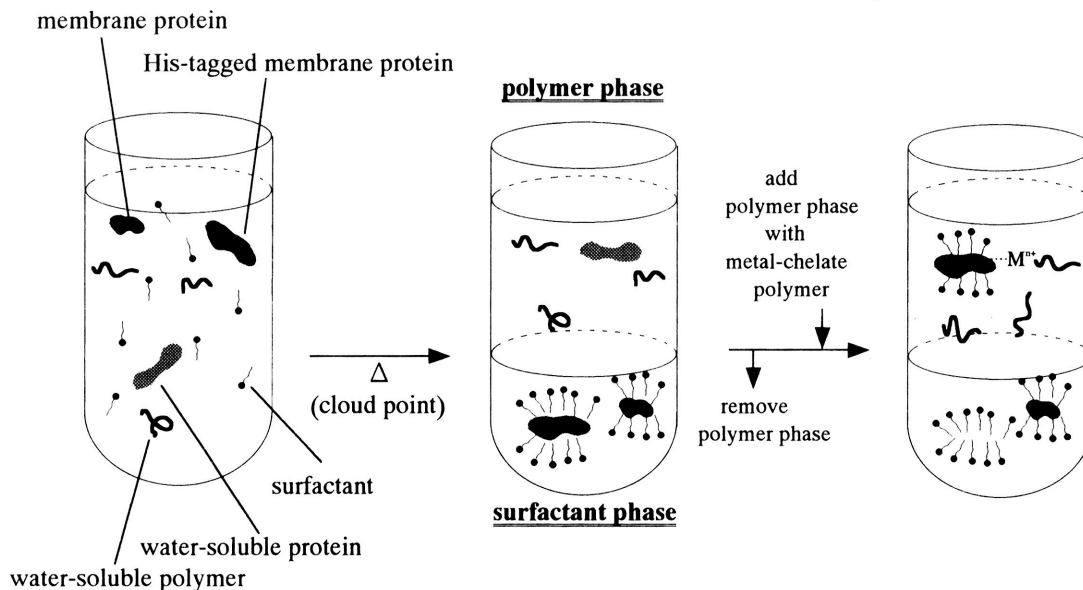


Fig. 1 Principle of the separation of proteins with aqueous micelle-polymer two-phase system

point) と呼ばれる温度以上に加温すると白濁し、二つの相に分離する。分離した二相は界面活性剤を多く含む相 (ミセル相) と、界面活性剤をほとんど含まない相 (水相) から成る。この二相間における物質の分配現象を利用したミセル水性二相分配法は、界面活性剤によって可溶化された膜タンパク質の抽出分離法として利用されている¹⁾。本法の利点として、いずれの相も水を主成分としているためタンパク質に対して変性作用が小さい、カラムクロマトグラフィーに比べ操作が簡便である、精製に要する時間が短い、スケールアップが容易である、などが挙げられる。しかし、この方法におけるタンパク質の分配は、タンパク質自身の疎水性に大きく依存しているため、疎水的な膜タンパク質間の分離は困難であり、高い精製度を得ることはできない。近年、新たな選択性を付与した系の開発が行われている。著者ら²⁾は、アルキルグルコシド系界面活性剤のミセル溶液に水溶性荷電ポリマーを導入することにより、膜タンパク質の電荷の違いに基づく分離に成功した。また、Triton X-114 ミセル水溶液に水溶性荷電ポリマーを導入することにより、ブタ肝ミクロゾーム中のチトクロム *b₅* を高い精製度で抽出することに成功した³⁾。しかし、このような膜タンパク質の選択的な抽出に成功した例は少なく、ミセル水性二相分配法を一般的な膜タンパク質の精製法として確立するためには、クロマトグラフィーのように様々な分離モードを有する系を開発することが必要である。

銅(II) やニッケル(II) 等の遷移金属イオンは、タンパク質あるいはペプチド中の窒素、硫黄及び酸素といった原子と配位結合する。したがって、ヒスチジンやシステイン等のアミノ酸残基をその表面に数多く有するタンパク質は、

これらの金属イオンと強い親和性を示す。Porath ら⁴⁾は、金属イオンとの親和性を利用したメタルアフィニティークロマトグラフィーを開発した。これは、アガロースにイミノ二酢酸やニトリロ酢酸等のキレート性化合物を共有結合させ、更に金属イオンを配位結合により固定化した担体を用いて、タンパク質間の親和性の違いを利用した分離法である。現在、このメタルアフィニティークロマトグラフィーは、遺伝子工学的に発現させたヒスチジntag融合タンパク質などの精製に用いられている^{5,6)}。このような金属キレートポリマーをミセル水性二相分配系に導入し、水相に分配させることができれば、ヒスチジntag融合膜タンパク質を選択的にポリマー相に回収することが可能である。更に、Fig. 1 に示すように、複数のタンパク質が混在する試料をミセル水性二相分配法に適用することで、膜タンパク質を分離し、その後、金属キレートポリマーを導入したミセル-ポリマー水性二相分配法に適用すれば、一連の二相分離操作だけで、迅速かつ簡便に目的とする膜タンパク質を単離できると考えられる。Sivars ら⁷⁾は、この方法を用いることで、ヒスチジntagを融合した内在性膜タンパク質であるチトクロム *b₅* ユビキノールオキシダーゼを、ポリマー相に分配させることに成功した。しかし、膜タンパク質の種類は大変多く、その性質も極めて多彩であるため、目的とする膜タンパク質に合った二相系を開発しなければならない。

本研究では、Triton X-100 (TX-100) ミセル-ポリエチレングリコール (PEG) 水性二相分配系に、ニッケルイオンを配位したイミノ二酢酸ポリエチレングリコール (Ni-IDA-PEG) を導入し、ヒスチジntagを融合したチトクロム *b₅* のアフィニティー分配を行った。また、ヒスチジン

タグを融合していないタンパク質の分配挙動と比較検討し, アフィニティー分配に及ぼす pH 緩衝剤の影響を検討した. 更に, ヒスチジントグ融合膜タンパク質のモデルとして, オリゴペプチドを用いて同様の検討を行い, チトクロム b_5 の分配挙動と比較検討した.

2 実 験

2.1 試薬及び装置

TX-100 はナカライテクス製を特に精製せずに使用し, 30% (w/v) 水溶液として保存した. 水溶性ポリマーは, 和光純薬製のポリエチレングリコール (PEG, 平均分子量 20000) を使用した.

ヒスチジントグを融合したチトクロム b_5 (H-cyt. b_5) は, ヒト H-cyt. b_5 発現大腸菌から, ヒスチジントグを持たないチトクロム b_5 (cyt. b_5) は, ブタ肝ミクロゾームから既存の方法で精製した^{8)~11)}. オリゴペプチドは N 末端からグリシン 1 残基, ロイシン 3 残基及びヒスチジン 6 残基が順次結合した 10 アミノ酸で構成し, 標識体として蛍光物質であるフルオレセインイソチオシアネート (FITC) をグリシンに結合したものを, シグマジェノシスより購入した (immunological grade, 純度 90.5%). その他の試薬はすべて市販品の特級を特に精製せずに使用した.

温度調節にはヤマト-コマツ製 CTE42A 型恒温槽を使用した. 相分離を促進するための遠心分離には, Tomy 製工製 MGX-150 型遠心機を使用した. 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, 蛍光強度の測定には日立製 F-2000 型分光蛍光光度計を使用した.

2.2 操 作

2.2.1 Ni-IDA-PEG の合成 Ni-IDA-PEG は既存の方法に従って合成した^{12)~16)}. PEG 200 g を 75°C で融解した後, 塩化チオニル 4 ml を加え窒素雰囲気中で 5 時間反応させた. 得られた結晶を精製水 400 ml に溶解後, 25% アンモニア溶液 400 ml を加え, 55°C で 90 時間反応させた. 過剰な水及びアンモニアを除去して得られた試料を乾燥した. これをアミノポリエチレングリコール (Amino-PEG) とした. Amino-PEG 60 g とプロモ酢酸 60 g を 400 ml の精製水に溶解し, 水酸化ナトリウムで pH を 8.5 に維持しながら 12 時間反応させた. 反応溶液をクロロホルムで抽出した. クロロホルムを留去して得られた結晶を IDA-PEG とした. IDA-PEG 10 g を 20 mmol の硫酸ニッケル (II) を含む 50 mM 酢酸緩衝溶液 (pH 4.0) 50 ml に溶解し, 室温で 1 時間反応させた. 反応溶液をクロロホルムで抽出した. クロロホルムを留去して得られた結晶を Ni-IDA-PEG とした. Ni-IDA-PEG の構造を Fig. 2 に示す. 誘導結合プラズマ発光分析法により IDA-PEG 1 mol 当たり 1.77 mol の Ni が結合していることが分かった.

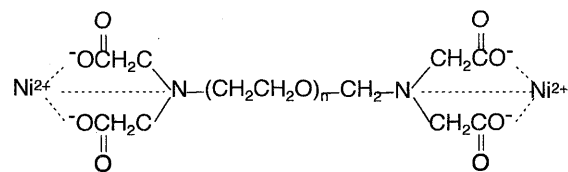


Fig. 2 Structure of Ni-IDA-PEG

2.2.2 曇点及び相体積の測定 15 ml サンプルチューブに 13% (w/v) TX-100 及び所定の濃度の PEG を 10 ml 入れ, これを所定の温度で 15 分間インキュベートした. その後, 試料が白濁しているかどうか目視により確認した. 白濁していない場合は, 恒温槽の設定温度を 0.5°C ずつ上昇させ, 白濁したときの温度を曇点とした. また, 相分離後の水相とミセル相の体積比を測定した.

2.2.3 タンパク質の抽出 1.5 ml ミクロチューブに 10 mM pH 緩衝溶液, 13% (w/v) TX-100, 6.0% (w/v) PEG (Ni-IDA-PEG 含む) 及び 1 μ M H-cyt. b_5 , cyt. b_5 又は 43 μ M オリゴペプチドを含む水溶液 1 ml を入れ, 25°C で 15 分間インキュベートした. その後, 2000 g で 10 分間遠心分離し, 相分離後の上相及び下相のチトクロム b_5 又はオリゴペプチド濃度を測定した.

2.2.4 タンパク質の定量と分配比の算出 チトクロム b_5 濃度は, 412 nm のピークの吸光度から, モル吸光係数 130000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ を用いて求めた¹⁷⁾. オリゴペプチドの濃度は, 標識化したフルオレセインの蛍光強度から求めた. 490 nm の励起波長で 520 nm の蛍光強度を測定した.

3 結果及び考察

3.1 TX-100 の曇点に及ぼす水溶性ポリマー濃度の影響 相分離条件を決定するため, TX-100 の曇点に及ぼす PEG 濃度の影響について検討した. 結果を Fig. 3 に示す. この図において, 曇点を結ぶ線の下側が一相, 上側が二相の領域である. PEG 濃度の増加に伴って曇点が低下した. 水溶性ポリマーの添加による曇点の低下は, ポリマーの濃度並びに分子量に依存し, それらの増加に伴い曇点も低下することが知られている¹⁸⁾. この理由として, ミセルに対する水溶性ポリマーの立体的排除効果, 並びにミセル表面からの水の脱離効果が考えられている. 本研究では, 相分離温度を室温である 25°C とするために, 全 PEG 濃度を 6.0% (w/v) とした. また, ミセル相の体積は界面活性剤濃度に依存することから, TX-100 濃度を 13% (w/v) と高濃度にするすることで, ミセル相の体積を増加させ分配比による検討が容易となるようにした. 相分離後の体積比は下相 1 に対して上相が 1.72 となった.

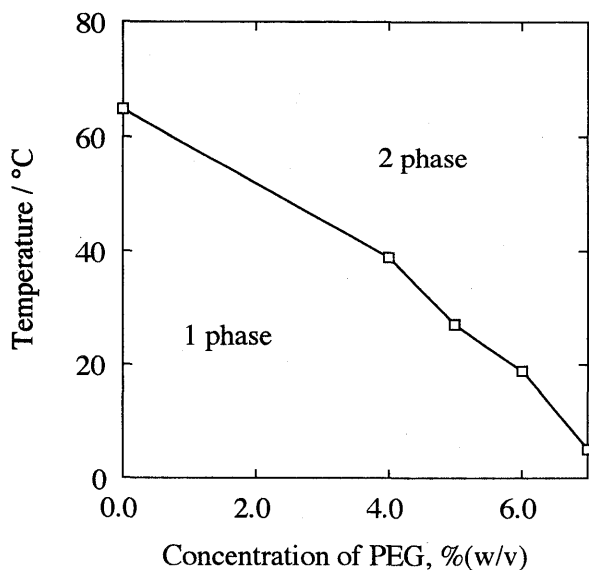


Fig. 3 Effect of PEG concentration on cloud point of Triton X-100 solution
13% (w/v) Triton X-100

3.2 相分離後の TX-100 及び Ni-IDA-PEG の分配

相分離後の TX-100 及び Ni-IDA-PEG の各相の濃度を調べた。結果を体積比と併せて Fig. 4 に示す。6.0% (w/v) PEG を含む 13% (w/v) TX-100 混合水溶液を 25°C で相分離させ、相分離後の各相の TX-100 の濃度を、TX-100 の吸収極大波長である 277.1 nm の吸光度から求めた。その結果、上相の TX-100 濃度は 6.4% (w/v)、下相では 41.2% (w/v) となり、TX-100 の約 80% が下相に存在していることが分かった。次に、相分離後の Ni-IDA-PEG の分配挙動について検討した。6.0% (w/v) Ni-IDA-PEG を含む 13% (w/v) TX-100 混合水溶液を相分離させ、各相の Ni-IDA-PEG の吸光度を 630 nm で測定した。その結果、Ni-IDA-PEG 濃度は上相 10.5% (w/v)、下相 0.4% (w/v) となり、Ni-IDA-PEG の約 95% が上相に存在していることが分かった。以上の結果から、上相をポリマー相、下相をミセル相とする二相分配系となっていることが分かった。

3.3 cyt. b_5 の分配挙動に及ぼす Ni-IDA-PEG 濃度及び pH 緩衝剤の種類の影響

H-cyt. b_5 及び cyt. b_5 の分配に及ぼす Ni-IDA-PEG 濃度の影響を検討するために、全 PEG 濃度を 6.0% (w/v) として、Ni-IDA-PEG を 0.0~6.0% (w/v) の濃度範囲で変化させ、H-cyt. b_5 及び cyt. b_5 の分配比 D を測定した。分配比 D はポリマー相に対するミセル相のタンパク質濃度と定義した。また、pH 緩衝剤として Tris-HCl, リン酸ナトリウム, ホウ酸ナトリウム (いずれも 10 mM, pH 8.0) を用いた。Ni-IDA-PEG を含まないとき、いずれの膜タンパク質も分配比は約 0.7 となり、ミセル相に分配していることが分か

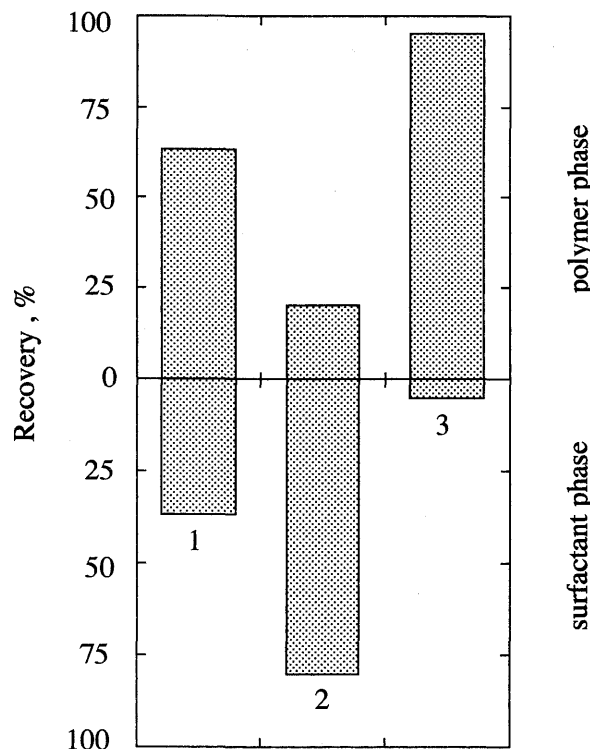


Fig. 4 Recovery of Triton X-100 and Ni-IDA-PEG in aqueous micelle-polymer two-phase system
13% (w/v) Triton X-100, 6.0% (w/v) Ni-IDA-PEG
1: volume; 2: Triton X-100; 3: Ni-IDA-PEG

った。そこで、Ni-IDA-PEG 濃度の増加に伴う分配比の変化を比較するために、Ni-IDA-PEG 濃度が 0 のときの $\log D$ を基準とした $\Delta \log D$ で評価した。結果を Fig. 5 に示す。cyt. b_5 についてはリン酸ナトリウムを用いたときの結果のみ示したが、いずれの pH 緩衝剤を用いた場合でも、Ni-IDA-PEG 濃度に依存せず $\Delta \log D$ はほぼ一定であった。また、H-cyt. b_5 はリン酸ナトリウムを用いた場合、Ni-IDA-PEG 濃度の増加に伴い分配比が低下し、ポリマー相に分配していくことが分かった。ホウ酸ナトリウムを用いた場合でも同様に、H-cyt. b_5 は Ni-IDA-PEG 濃度の増加に伴いポリマー相に分配される結果となった。一方、Tris-HCl を用いた場合、H-cyt. b_5 の分配比は Ni-IDA-PEG 濃度の増加に伴い増加し、よりミセル相へ分配される結果となった。緩衝剤として用いた Tris は窒素原子を持つため、金属イオンに配位し、H-cyt. b_5 との親和力を低下させていることも考えられるが¹⁹⁾、それだけではミセル相への分配比の増加を説明することはできない。詳細な原因については不明である。以上の結果から、Ni-IDA-PEG 濃度の増加に伴う H-cyt. b_5 の分配挙動の変化は、緩衝剤の種類に依存していることが分かった。

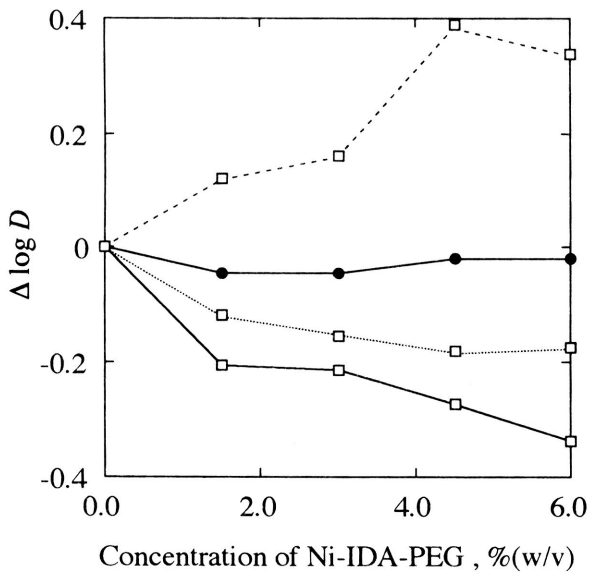


Fig. 5 Effect of Ni-IDA-PEG concentration on distribution ratio of H-cyt. b_5 and cyt. b_5
13%(w/v) Triton X-100, 6.0%(w/v) total PEG, 10 mM buffer pH 8.0. □: H-cyt. b_5 ; ●: cyt. b_5 ; - - - - : Tris-HCl; —: sodium phosphate; ·····: sodium borate

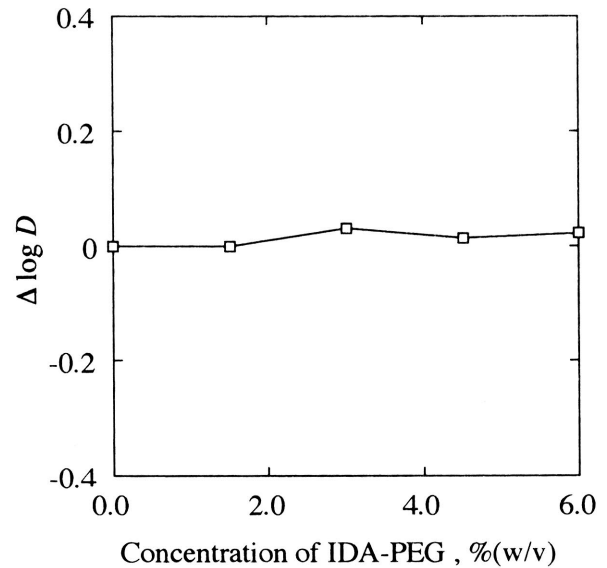


Fig. 6 Effect of IDA-PEG concentration on distribution ratio of H-cyt. b_5
13%(w/v) Triton X-100, 6.0%(w/v) total PEG, 10 mM sodium phosphate, pH 8.0

3・4 アフィニティー相互作用の確認

3・4・1 IDA-PEG を用いた H-cyt. b_5 の分配 Ni-IDA-PEG 濃度の増加に伴う H-cyt. b_5 のポリマー相への分配が, Ni^{2+} とヒスチジンとのアフィニティー相互作用によることを確認するために, Ni-IDA-PEG の代わりに, Ni^{2+} が結合していない IDA-PEG を用いて H-cyt. b_5 の分配挙動を検討した. 全 PEG 濃度を 6.0%(w/v) として, IDA-PEG を 0.0~6.0%(w/v) の濃度範囲で変化させ, H-cyt. b_5 の分配比を算出した. なお, 緩衝溶液には 10 mM リン酸ナトリウム (pH 8.0) を用いた. 結果を Fig. 6 に示す. H-cyt. b_5 の分配比は IDA-PEG 濃度に依存せず, ほぼ一定であった. つまり, IDA-PEG とヒスチジンとの間に相互作用がなかったことを表している. 以上の結果並びに 3・3 との結果から, Ni^{2+} とヒスチジンとのアフィニティー相互作用が確認された.

3・4・2 イミダゾールの添加 ヒスチジンはイミダゾール基を持ち, これを介して金属イオンに配位するため, 外部からイミダゾールを添加することで金属イオンに対して競争反応を行うことができる²⁰⁾. そこで, イミダゾールの添加が H-cyt. b_5 の分配に及ぼす影響を検討した. イミダゾールは相分離前の溶液中に 1 mM から 30 mM まで濃度を変化させて添加した. また, Ni-IDA-PEG は 6.0%(w/v) とし, 緩衝溶液には 10 mM リン酸ナトリウム (pH 8.0) を用いた. 結果を Fig. 7 に示す. H-cyt. b_5 は 1 mM のイミダゾールの添加により分配比が増加し, 10 mM 以上ではほぼ一定となった. つまり, イミダゾールの添加によって,

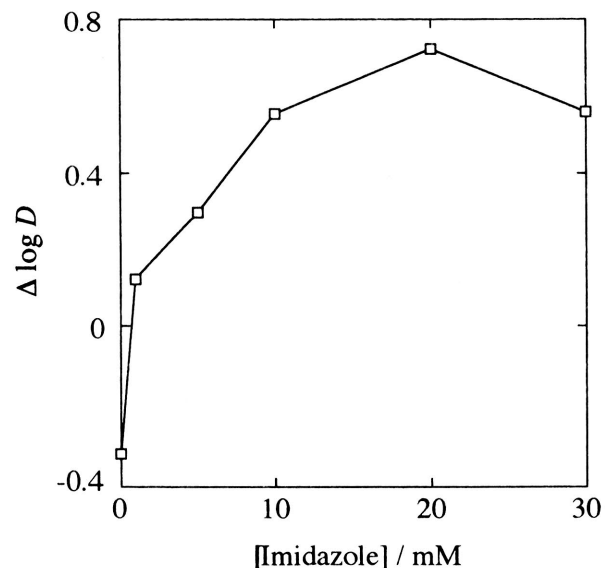


Fig. 7 Effect of imidazole concentration on distribution ratio of H-cyt. b_5
13%(w/v) Triton X-100, 6.0%(w/v) Ni-IDA-PEG, 10 mM sodium phosphate, pH 8.0

ヒスチジンとの競争反応が起こり, Ni-IDA-PEG と H-cyt. b_5 の相互作用が阻害されたことを表している. 以上の結果から, Ni-IDA-PEG との親和力を失った H-cyt. b_5 がミセル相に抽出されることが確認された.

3・5 オリゴペプチドの分配挙動

アフィニティー分配は, ヒスチジントグ的存在だけでな

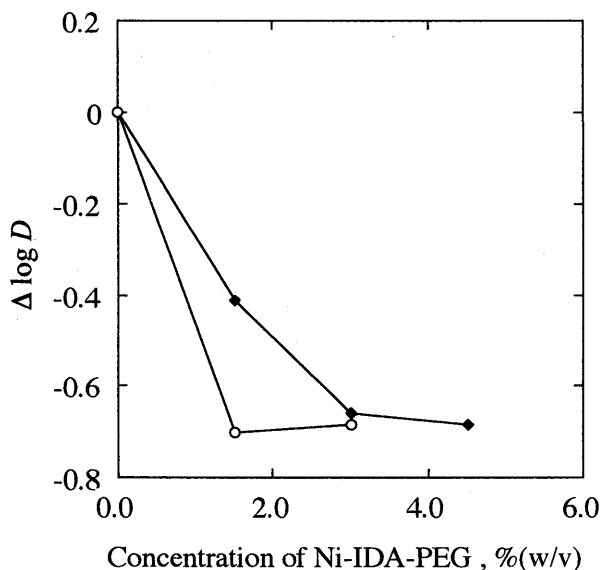


Fig. 8 Effect of Ni-IDA-PEG concentration on distribution ratio of FITC-oligopeptide

13%(w/v) Triton X-100, 6.0%(w/v) total PEG, 10 mM buffer, pH 8.0. ◆: Tris-HCl; ○: sodium phosphate

くタンパク質の疎水性、分子量並びに構造などにも依存すると考えられる。そこで、ヒスチジントグを融合した膜タンパク質のモデルとして、ヒスチジン6残基を含むオリゴペプチドを用いて、Tris-HCl並びにリン酸ナトリウム(いずれも10 mM, pH 8.0)で3・3と同様の検討を行った。結果をFig. 8に示す。どちらの緩衝剤においても、Ni-IDA-PEG濃度の増加に伴いオリゴペプチドの $\Delta \log D$ は大きく低下し、ポリマー相に分配することが分かった。以上の結果から、オリゴペプチドのアフィニティー分配は、H-cyt. b_5 のような緩衝剤の依存性が見られないことが分かった。また、Fig. 5とFig. 8の結果から、オリゴペプチドに比べてH-cyt. b_5 の分配比の変化が小さく抑えられていることが分かった。この原因としては以下のようなことが挙げられる。すなわち、H-cyt. b_5 の分子量がオリゴペプチドに対して約10倍大きいこと、ポリマーによる立体障害によってH-cyt. b_5 が十分にポリマー相に分配されなかった、あるいは、H-cyt. b_5 のミセルとの強い疎水性相互作用により、アフィニティー相互作用が十分に働かなかった、などが考えられる。

4 結 言

本研究では、TX-100及びNi-IDA-PEGを用いた新規ミセル-ポリマー水性二相分配系を開発し、H-cyt. b_5 のアフィニティー分配を行った。その結果、pH緩衝剤としてリン酸及びホウ酸を用いた場合、Ni-IDA-PEG濃度の増加に

伴ってH-cyt. b_5 がポリマー相へ分配した。Ni²⁺を持たないIDA-PEGを用いた実験並びにイミダゾールを添加した実験では、ポリマー相への分配が見られなかったことから、Ni-IDA-PEGとH-cyt. b_5 でアフィニティー相互作用が働いていることが分かった。一方、Tris-HClを用いた場合、Ni-IDA-PEG濃度の増加に伴ってH-cyt. b_5 がよりミセル相に抽出される結果となり、アフィニティー相互作用が十分に働いていないことが示唆された。また、H-cyt. b_5 の代わりにヒスチジントグ6残基を含むオリゴペプチドを用いた実験では、いずれのpH緩衝剤を用いても、Ni-IDA-PEG濃度の増加に伴いポリマー相への分配が見られ、緩衝剤の種類に依存しないことが分かった。本研究で用いた系では、アフィニティー分配がヒスチジン以外のタンパク質部分の構造に大きく依存することが示唆された。

文 献

- 1) C. Bordier: *J. Biol. Chem.*, **256**, 1640 (1981).
- 2) H. Tani, T. Saitoh, T. Kamidate, T. Kamataki, H. Watanabe: *Biotechnol. Bioeng.*, **56**, 311 (1997).
- 3) H. Tani, T. Ooura, T. Kamidate, T. Kamataki, H. Watanabe: *J. Chromatogr. B*, **708**, 294 (1998).
- 4) J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage: *Nature (London)*, **258**, 598 (1988).
- 5) J. E. Dyr, J. Suttner: *J. Chromatogr. B*, **699**, 383 (1997).
- 6) J. Schmitt, H. Hess, H. G. Stunnenberg: *Mol. Biol. Rep.*, **18**, 223 (1993).
- 7) U. Sivers, J. Abramson, S. Iwata, F. Tjernelid: *J. Chromatogr. B*, **743**, 307 (2000).
- 8) T. Kamataki, K. Maeda, Y. Yamazoe, T. Nagai, R. Kato: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 1 (1981).
- 9) A. I. Tauber, J. Wright, F. K. Higson, S. A. Edelman, D. J. Waxman: *Blood*, **66**, 673 (1985).
- 10) M. S. Shet, K. Sathasivan, M. A. Arlotto, M. C. Mehdy, R. W. Estabrook: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2890 (1993).
- 11) Y. Imai: *J. Biochem.*, **80**, 267 (1976).
- 12) G. Birkenmeyer, M. A. Vijayalakshmi, T. Stigbrand, G. Kopperschlager: *J. Chromatogr.*, **539**, 267 (1991).
- 13) A. F. Buckmann, M. Morr, M. R. Kula: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **9**, 258 (1987).
- 14) M. E. van Dam, G. E. Wuenschell, F. H. Arnold: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **11**, 492 (1989).
- 15) E. Nanak, M. A. Vijayalakshmi, K. C. Chandha: *J. Mol. Recogn.*, **8**, 77 (1995).
- 16) S-S. Suh, F. H. Arnold: *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 682 (1989).
- 17) S. B. Bodman, M. A. Schuler, D. R. Jollie, S. G. Sligar: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9443 (1986).
- 18) M. Yamazaki, M. Ohnishi, T. Ito: *Biochim. Biophys. Acta*, **1063**, 175 (1991).
- 19) S. A. Margolis, A. J. Alexander, J. J. Edwards: *Anal. Biochem.*, **183**, 108 (1989).
- 20) R. D. Johnson, R. J. Todd, F. H. Arnold: *J. Chromatogr. A*, **725**, 225 (1996).

要 旨

非イオン界面活性剤である Triton X-100 を用いたミセル水性二相分配系に Ni^{II} を配位したイミノジ酢酸ポリエチレングリコール (Ni-IDA-PEG) を導入し, Ni^{II} とのアフィニティー相互作用による膜タンパク質チトクロム b_5 及びオリゴペプチドの分配の制御を試みた. チトクロム b_5 は, Ni-IDA-PEG 濃度に依存せずミセル相に分配したのに対し, ヒスチジントグを融合したチトクロム b_5 及びオリゴペプチドは Ni-IDA-PEG 濃度の増加に伴いポリマー相に分配された. Ni^{II} を配位していない IDA-PEG 並びにイミダゾールを用いた実験から, ヒスチジントグ融合チトクロム b_5 のポリマー相への分配は, ヒスチジンと Ni^{II} とのアフィニティー相互作用によることが分かった. 更に, ヒスチジントグ融合チトクロム b_5 のアフィニティー分配は pH 緩衝剤の種類に大きく依存することが明らかとなった.