水性二相分配系における非イオン性界面活性剤との疎水的相互作用を利用するタンパク質の表面疎水性の評価[†]

久保井亮一・矢野浩二・田中寿計・駒沢 勲

大阪大学基礎工学部 化学工学科^{††}

タンパク質の表面疎水性を PEG/dextran 系を用いる水性二相分配法、これに非イオン性界面活性剤 Triton を添加した Triton 添加法、および Triton/ 塩系の相分離を利用する Triton 相分離法の 3 種類の二相分配法により体系的に評価した。タンパク質としては、起源の異なる 3 種類の Lipase、オリゴマーである β -Galactosidase と、酸の添加に対応して、Native 状態、Molten-globule 状態、および Unfold 状態の 3 種類の高次構造を持つ Cytochrome c を用いた。タンパク質の疎水性は各々特徴的であり、非常に個性的であるが、これらは少なくとも表面全体の疎水性と、表面に局在する結合部位の疎水性の 2 種類に大別できる。前者は二相分配法により、後者は、他の 2 つの分配法によって定量できる。両者は、Molten-globule 状態と Unfold 状態の Cytochrome c のように、必ずしも同一の傾向を示さない。疎水クロマト法のような従来法では、後者のみが測定される。これらタンパク質の疎水性の差異を利用してタンパク質の効果的な分離が可能である。

緒 言

酵素・タンパク質・機能性ペプチド等の高次構造と生理機能の発現において、表面疎水性は表面電荷とともに最も重要かつ普遍的な因子の一つである。たとえば、環境問題に対する応用面から注目されている油脂分解特性を有する各種起源の Lipase の場合、活性部位や表面の疎水性が酵素活性に直接影響する。また、遺伝子産物の細胞内封入体(変性状態)から活性型への巻き戻し・分離・回収プロセスにおいては、巻き戻し中間体の表面疎水性変化が大きな問題となっている。

このため、タンパク質の表面疎水性の正確な情報を得る必要性があり、各種の定性的・定量的解析法が提案されている。Hjerten らは、疎水クロマトグラフィーによる保持時間を用いている⁵⁾。Shanbhag らは、水性二相系において片方のポリマーに疎水性の強いリガンドを修飾したときのタンパク質の分配係数変化で評価している¹³⁾。Keshavarz らは、これらの二つの定量結果と有機相/水相中にタンパク質を分配したときの系の界面張力との間に相関関係があると報告している⁸⁾。一方、著者らはさきに、水性二相分配系の疎水性(HF)、およびこれに基づくタンパク質の表面疎水性(HFS)の簡便な定量化法

を提出するとともに(二相分配法)¹⁰⁾、これらに及ぼす塩効果等について報告した¹¹⁾。しかし以上の方法は、測定環境がタンパク質の高次構造に及ぼす効果や測定原理も異なり、またタンパク質の高次構造と疎水性との相関まで考慮した体系的なものではなく、必ずしも統一的な結果は得られていない。

一方、非イオン性界面活性剤である Triton は、タンパク質の高次構造を変化させることなくオリゴマー・タンパク質や膜タンパク質と疎水結合することが知られている^{1,2,4,15)}。この水溶液は、温度・塩濃度等を制御することによって相分離して、これらのタンパク質のみを選択的に分配するため、タンパク質の分離法としての可能性が指摘されている^{2,12,16)}。また、これは表面全体の疎水性と、疎水結合部位に関する局所的な疎水性を区別して認識する必要があることを示している。

そこで本研究では、タンパク質の高次構造に及ぼす影響を最小限にできるポリマー/ポリマー系の水性二相分配法を基本(二相分配法)とし、これに Triton を添加する方法(Triton 添加法)、ポリマーを使用せず Triton と塩のみの水溶液で相分離を利用する方法(Triton 相分離法)の 3 種類の水性二相分配法で、体系的に各種タンパク質の表面疎水性を定量し比較した。さらに、疎水性の差に基づくタンパク質の分離精製の可能性について考察した。

[†] 1992年11月11日受理；化学工学会第57年会(1992年4月2日)にて発表

^{††} 〒560 豊中市待兼山町1-1

1. 実 験

1.1 試薬・溶液

Polyethylene Glycol (PEG) 水性二相系を構成する水溶性ポリマーとして用いたPEGは、PEG 1540, 4000, 6000で、平均分子量はそれぞれ1500, 3000, 7500であり、(株)和光純薬工業(以下、和光製と略す)一級試薬である。

Dextran (Dex) 水性二相を構成するもう一つの水溶性ポリマーとして用いたDexは、分子量60K~90KDa, 100K~200KDaの和光製である。

Triton PEG/Dex系への添加には、非イオン性界面活性剤であるTriton X-405($-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$, $n=40$) (Sigma製)を用いた。Triton相分離では、白濁点が比較的常温に近いTriton X-114($n=7,8$) (Sigma製)を用いた。

添加塩 リン酸カリウム(KPi)(リン酸二水素カリウム+リン酸水素二カリウム), リン酸ナトリウム(NaPi)(リン酸二水素ナトリウム+二水和物+リン酸水素二ナトリウム), 硫酸ナトリウム(Na_2SO_4)(以上和光製特級試薬), 硫酸カリウム(K_2SO_4), チオシアン酸ナトリウム(NaSCN)(以上(株)石津製薬製特級試薬), 塩化ナトリウム(NaCl)(株)富田製薬製特級試薬)をそれぞれ使用した。

タンパク質 表面疎水性の定量に用いたタンパク質は、*Chromobacterium Viscosum* Lipase(東洋醸造製, 以下C. V. Lipaseと略す), *Candida Cylindracea* Lipase (Sigma製 Type VII, 以下C. C. Lipaseと略す), *Porcine Pancreas* Lipase (Sigma製 Type II, 以下P. P. Lipaseと略す), *E. coli* β -Galactosidase (Sigma製 Grade VI), およびCytochrome c (Sigma製 Type III)である。

1.2 操 作

二相分配法 分配系の疎水性(HF)を変化させるため、各種分子量、濃度のPEG(9~10.8%)とDex(9%)を混合して所定の分配系を調製し¹⁰⁾、振盪した後、遠心分離(5000rpm, 20min, 25°C)により二相に分離した。 β -Galactosidaseの分配係数は上・下相の活性の比により求めた。活性はo-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosideを基質として用い、生成物であるo-Nitrophenolの405nmにおける吸光度変化により定量した¹⁵⁾。その他のタンパク質濃度は、マイクロTPテストワコーを用いて600nmの吸光度より測定した³⁾。

Triton添加法 ポリエチレンオキサイド基の長さの異なる市販のTriton X-seriesの中で、添加効果、つまりタンパク質との相互作用が最も大きいTriton X-405をPEG 4000(9%)/Dex 100K~200K(9%)系に0~10mmol

/kgの濃度で添加した。

Triton相分離法 Triton X-114(1%), 塩(KPi, Na_2SO_4 , K_2SO_4 , NaCl , NaSCN)濃度(150mmol/l), Tris-HCl(pH=7.4)(10mmol/l)のタンパク質水溶液を調製する。攪拌した後、10分間氷水中で静置させ、 NaSCN を添加したときは318K, それ以外は303Kの恒温相中で1時間静置する。それぞれの温度で、遠心分離(300g, 3min)により相分離した。Triton X-114の白濁点が共存する塩の種類によって異なるため、分配温度はTritonが100%下相に分配する条件を選定した。タンパク質濃度、活性測定は二相分配法の場合と同一である。

2. 結果および考察

2.1 タンパク質の表面疎水性

Lipaseの起源による疎水性の差異 水性二相系におけるタンパク質の等電点における分配係数(K_{Pr})は、静電効果を無視することができ、分配系の疎水性(HF)とタンパク質の表面疎水性(HFS)の積として次式で関連される¹⁰⁾。PEG/Dex系ではPEG濃縮相(上相)がより疎水性が強いため、疎水性の強いタンパク質ほど上相に分配する。

$$\ln K_{Pr} = HFS \times HF \quad (1)$$

これより、分配系の疎水性(HF)が既知の各種のPEG/Dex系にタンパク質を分配させ、その分配係数変化を調べることによって、タンパク質の表面疎水性(HFS)を定量した(二相分配法)。3種類の起源の異なるLipaseの結果を併せてFig. 1に示す。図の勾配より求めたHFSの値は、C. V. Lipase, C. C. Lipase, P. P. Lipaseで各々131, 4.8, -67.3 kJ/molである。これは、親水性のタンパク質の中で比較的疎水性の強いLysozyme($HFS = -39.3$ kJ/mol)¹⁰⁾と比較して、C. V. Lipaseは強い疎水性、C. C. Lipaseはわずかに疎水性、P. P. Lipaseはより親水性の表面を持つことを示し、また酵素の加水分解活性の強さとも対応している。

PEG/Dex系にTriton X-405を添加すると、TritonはPEG相に偏って分配するために、Tritonと疎水結合するタンパク質はPEG相に偏って分配する¹⁵⁾。したがって、これを利用して、Triton濃度の増加に対するタンパク質の分配係数の変化の大きさから、Tritonとの疎水性相互作用の強さを定量することができる(Triton添加法)。ただし、ここでTritonは $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 基の親水基を持つため、Tritonの添加はPEG濃度の増加と類似の効果、すなわちHFをわずかに増加させる効果もある。分子量の大きなタンパク質ほど、分配系の疎水性の変化に敏感であるので、分子量が数十万以上になると、Tritonとの相互作用以外に、Triton濃度によるHFの増加も分

Fig. 1 Effect of hydrophobic factor of phase systems, HF , on K_{Pr} of lipases from different origins

配係数に影響すると考えられる¹¹⁾. Triton濃度を増加させた時の、各 Lipase の分配係数の変化を併せて Fig. 2 に示す. Triton添加による分配係数の増加は、先の HFS の大きさに対応しており、C. V. Lipase が最も大きく、C. C. Lipase もわずかに影響を受けるが、P. P. Lipase はほとんど影響を受けない.

Triton 相分離法にはポリマーを使用せず、Triton X-114 と塩のみで形成される水性二相系を用いた. このとき、Triton と疎水結合しないタンパク質は上相に、疎水結合するものは下相の Triton 相に分配する²⁾. 下相は粘度が高く界面活性剤の濃度も非常に高いためタンパク質濃度の測定は困難であった. そこで、タンパク質収支から下相のタンパク質濃度を計算し、次式で定義した分配係数 K の値を本法による疎水性の尺度とした (Triton 相分離法).

$$K = \frac{C_{Pr, \text{bottom}}}{C_{Pr, \text{top}}} \quad (2)$$

この分配係数 K の定義は、従来の水性二相系の分配係数 K_{Pr} とは見かけ上、分子・分母が逆転しているが、いずれも疎水性の強い相におけるタンパク質濃度を分子に用いる点で一致している. 各種の塩を用いて、Triton 相分離系における各 Lipase の分配係数を測定した結果を Table 1 に示す. C. V. Lipase は K の値が大きく下相の Triton 相に偏って分配しているが、C. C. および P. P. Lipase はすべて上相に分配し、下相には分配しない.

以上より、本実験で用いた Lipase の場合、起源が異なるとその表面の疎水性に大きな差があるが、二相分配法、

Fig. 2 Effect of addition of Triton X-405 on K_{Pr} of lipases from different origins

Triton 添加法および Triton 相分離法のすべての定量法で対応する結果が得られた. すなわち、局所的な結合部位の疎水性の強さの序列が表面全体の疎水性の強さの序列とよく対応している.

β -Galactosidase の塩効果による疎水性変化 二相分配法により、中性 pH 付近 (pH 7.6) で分配系の疎水性 HF を変化させたときの *E. coli* 起源の β -Galactosidase の分配係数変化を Fig. 3 に示す. β -Galactosidase の分配係数は HF の変化に非常に敏感である. しかし、疎水性が強く PEG 相に偏って分配されるという従来の予測⁹⁾ に反して、中性 pH 付近で強い親水性の表面を持ち下相の Dex 相に分配した. 図より求めた HFS は -453 kJ/mol であり、他のタンパク質と比較して非常に親水性の強い表面を持つことがわかる.

Fig. 4 に β -Galactosidase の分配係数に対する各種の塩の添加効果を、Fig. 5 には KPi の添加系と非添加系における Triton の添加効果を示す. 塩を添加すると β -Galactosidase の分配係数は大きく増減する. この原因は一般的には、分子量が数十万以上の大きなタンパク質の場合、静電・疎水・塩効果のいずれもが分配特性に大きく影響するためであるが、ここでは主として以下の因子が重要と考えられる.

(1) β -Galactosidase の分子量 (464 KDa) が大きいためタンパク質の表面疎水性 HFS が塩の添加により大き

Table 1 Partition coefficients of lipases in various Triton X - 114/salt two - phase systems

Protein	Salt	$K [-]$
C.V. Lipase	KPi	2.43
	K ₂ SO ₄	2.13
	Na ₂ SO ₄	2.67
	NaCl	2.84
	NaSCN	3.01 *
C.C. Lipase	KPi	0
	K ₂ SO ₄	0
	Na ₂ SO ₄	0
	NaCl	0
	NaSCN	0.45 *
P.P. Lipase	KPi	0
	K ₂ SO ₄	0
	Na ₂ SO ₄	0
	NaCl	0
	NaSCN	0 *

* phase separation at 318K

Fig. 3 Effect of HF of phase systems on K_{Pr} of β - galactosidase

Fig. 4 Effect of addition of various salts on K_{Pr} of β - galactosidase

Fig. 5 Effect of addition of Triton X-405 on K_{Pr} of β - galactosidase

く増加する^{10,11)}。(2)中性 pH 付近で β -Galactosidase は負の電荷を持つため、塩の分配の偏り(界面電位)に起因する静電効果も分配に大きく影響する¹¹⁾。

これらのうち(2)は、他の塩とは逆に上相に偏って分配する NaSCN¹¹⁾ の場合のみ、塩濃度とともに分配係数が低下すること、低塩濃度域で分配係数に大きく影響することなどに対応している。一方(1)は、分配係数に影響を及ぼす塩の効果が Hofmeister⁶⁾ の順列に一致していること、1 mol/kg の NaCl の添加による分配係数の増加が、これによる表面疎水性の増加(表面疎水性に及ぼす塩効果)¹¹⁾ からの予測とほぼ一致することなどに対応している。(1)はさらに、Fig. 5 において、水の構造形成を促進する KPi を添加した系では Triton 濃度の増加とともに分配係数が増加するが、添加しない場合には逆に減少することとも対応している。すなわち、50 mM の KPi を添加した系では、塩および Triton との相互作用による表面疎水性 HFS の増加と、Triton 濃度の増加による系の疎水性 HF の増加が全て同じ方向に作用するために、Eq. (1) から、Triton 濃度の増加に伴って分配係数は単調に増加する。一方 KPi を添加しない場合は親水性の表面(HFS が負の値)を持つため、Triton 低濃度域では分配係数が一時的に増加するが、この Triton との相互作用による HFS のわずかな増加と比較して、Triton 濃度の増加による系の疎水性(HF) 変化が及ぼす効果の方が大きいと大部分の領域で分配係数が減少すると考えられる。

次に、KPi, NaCl, NaSCN (150 mM) を用いて、Triton 相分離法による検討を行った。上述の考察から、塩の添加により表面疎水性が増加しているにもかかわらず、いずれの塩を用いたときも、 β -Galactosidase の Triton 相への分配は全く認められなかった。以上より、 β -Galactosidase と Triton との相互作用は弱く、また Triton 相分離法では、Triton との疎水結合が弱いタンパク質は Triton 相に分配されない。

Cytochrome c の構造変化による疎水性変化 Cytochrome c の Native な状態に塩酸を添加すると、濃度の増加とともにランダムコイル状の変性(Unfold) 状態になるが、さらに添加すると、逆に部分的な巻き戻りが生じ、三次構造にゆらぎのある巻き戻り中間体(Molten-globule 状態、ないし State A) へと構造が変化することについてはすでに報告した¹⁴⁾。この構造変化に伴って Cytochrome c の表面疎水性 HFS も変化するが、前報¹⁴⁾ の Fig. 1(C) に示したように、HFS は Unfold 状態が最も大きく、Molten-globule 状態、Native 状態の順に減少した。これは、タンパク質内部に存在した疎水性アミノ酸残基の外表面への露出の程度に対応している。

Fig. 6 Effect of addition of Triton X-405 on K_{Pr} of cytochrome c

上の各状態の Cytochrome c に対し、Triton 添加法により分配係数変化を測定した結果を Fig. 6 に示す。Molten-globule 状態では大きな分配係数変化があり、Native 状態では Triton 濃度に関係なく一定値となる。Unfold 状態は、HFS が大きく Triton 非添加系の分配係数がすでにきわめて大きいと、Triton 添加効果を測定するのは困難であった。

一方、各種の塩を用いて Triton 相分離法により求めた、各状態の Cytochrome c の分配係数を Table 2 に示す。これより、Native 状態では表面に疎水結合部位を持たないため、予想通り Triton 相へは分配しないが、Unfold 状態や Molten-globule 状態では分配する。Molten-globule 状態は、Unfold 状態と比較すると高次構造の再形成が進んでいるが、Native 状態よりは高次構造のゆらぎが大きいことが知られている。この時、K の値は、Unfold 状態よりも Molten-globule 状態の方が大きいという、興味ある結果が得られた。

以上より、二相分配法ではランダムコイル状の Unfold 状態の表面疎水性(HFS) が最も大きく、一方 Triton 相分離法では高次構造にゆらぎのある巻き戻り中間体 Molten-globule 状態の疎水性(K) が最大となり、2つの疎水性の定量結果に明らかな差異を生じた。

2.2 疎水性定量法の比較

本研究における3種類の疎水性定量法による結果の比較を、他のタンパク質に関する従来の測定結果¹⁵⁾も含めて、Figs. 7, 8 に示した。ここで、Triton 添加法における疎水性の強さの指標を、Triton 5 mM の添加に伴う(非添加系からの)分配係数の増加量($\Delta \ln K_{Pr}$)で表し、Triton 分離法における疎水性の強さの指標を Triton 相

Table 2 Partition coefficients of cytochrome c in various Triton X - 114/salt two - phase systems

Protein	Salt	$K [-]$
Native state	KPi	0
	K ₂ SO ₄	0
	Na ₂ SO ₄	0
	NaCl	0
	NaSCN	0 *
Unfold state	KPi	1.21
	K ₂ SO ₄	0.90
	Na ₂ SO ₄	1.21
	NaCl	7.44
	NaSCN	>100 *
Molten-globule state	KPi	7.44
	K ₂ SO ₄	8.14
	Na ₂ SO ₄	10.6
	NaCl	54.5 *
	NaSCN	>100 *

* phase separation at 318K

への分配係数の大きさ (K) で評価する。これらの指標と二相分配法による表面疎水性 (HFS) との比較を行った。Fig. 7 より、 K と $\Delta \ln K_{Pr}$ との間には良好な相関がみられた。しかし、Fig. 8 の HFS と $\Delta \ln K_{Pr}$ の比較では良い相関は見られず、特に Triton に対して強い疎水結合部位を有する Molten-globule 状態の Cytochrome c や、オリゴマータンパク質で subunit 接触界面付近に疎水結合部位を有すると考えられる ADH¹⁵⁾ で大きく偏倚していることがわかる。

以上の各種タンパク質の疎水性の比較を総合すると、タンパク質の表面疎水性は、表面全体の疎水性と表面に局在した疎水結合部位の疎水性の少なくとも2種類の疎水性に大別され、前者は二相分配法により HFS として定量され、一方後者は Triton 添加法ないし Triton 相分離法によって、 $\Delta \ln K_{Pr}$ あるいは K として定量される。特に Triton 相分離法では、表面全体の疎水性にはほとんど関係せず、Triton に対する強い疎水結合部位を持つタンパク質のみが下相の Triton 相に分配するため、結合部位の局所的な疎水性の強さを、より明確に K の値によって比較・定量できることがわかる。

次に、従来のタンパク質の疎水性定量法による測定結果^{5,13)} と $\Delta \ln K_{Pr}$ 、 HFS との比較をそれぞれ Figs. 9, 10 に示す。Hjerten ら⁵⁾ による疎水クロマトグラフィーの保持時間から評価したパラメータ R_c 、および Shanbhag, Axelson¹³⁾ による疎水性のリガンドで PEG を修飾したときの分配係数変化から求めたパラメータ $\Delta \log K$ は、いずれも本実験による $\Delta \ln K_{Pr}$ との間に一定の相関が認められる。しかし Fig. 10 より、いずれも HFS との相関

Fig. 7 Correlation between K measured by phase separation of Triton and $\Delta \ln K_{Pr}$ measured by addition of Triton in PEG/Dex systems
1. P.P. Lipase, 2. Cytochrome c (Native state)
3. C.C. Lipase, 4. Alcohol Dehydrogenase (ADH), 5. C.V. Lipase, 6. Cytochrome c (Molten-globule state)

Fig. 8 Correlation between HFS measured in PEG/Dex systems and $\Delta \ln K_{Pr}$ measured by addition of Triton in PEG/Dex systems.
Key numbers as shown in Fig. 7.

は認められなかった。したがって、従来法で求められるパラメータは、タンパク質表面に局在する疎水結合部位の疎水性に対応するが、表面全体の疎水性とは必ずしも一致しない。したがって、タンパク質の表面特性として重要な疎水性パターンを定量的、かつ体系的に比較するうえで、水性二相分配法をベースにした本定量法が有効かつ合理的であることがわかる。

Fig. 9 Correlation between R_c measured by hydrophobic chromatography on alkyl-Sepharose 4B⁸⁾ or $\Delta \log K$ measured by hydrophobic partition⁸⁾ and $\Delta \ln K_{Pr}$ in the present experiment.
1. Cytochrome c (Native state), 2. Ovalbumin, 3. Myoglobin, 4. Bovine serum albumin (BSA)

2.3 疎水性パターンによるタンパク質の分離法

以上3種類の定量法により、多様なタンパク質表面の疎水性パターンの差異を定量的に評価できることから、これを用いたタンパク質の分離精製プロセスの合成も可能である。目的タンパク質と共存タンパク質の疎水性パターンの間に次の関係が成立するとき、本疎水性定量法を分離法として適用できる。

(1) タンパク質の表面疎水性 HFS に大きな差がある。または(分子量に差があり)塩添加によって HFS の差を大きくできる。

(2) HFS は同程度であるが、一方のタンパク質のみが疎水結合部位を持つ。

(3) 一方のタンパク質にのみ、強い疎水結合部位がある。

たとえば、*C. V.* Lipase と Cytochrome c、あるいは Cytochrome c と β -Galactosidase が(1)の場合であり、二相分配法を適用できる。*C. C.* Lipase と *P. P.* Lipase が(2)に相当し、Triton 添加法を適用できる。また、*C. V.* Lipase と塩存在下での β -Galactosidase が(3)の場合に相当するので Triton 相分離法を適用できる。多種類のタンパク質混合物の分離には、各タンパク質の疎水性パターンを検討したうえで、3種類の分離法を適切に組み合わせる必要がある。

Fig. 10 Correlation between R_c measured by hydrophobic chromatography on alkyl-Sepharose 4B or $\Delta \log K$ measured by hydrophobic partition and HFS .
1. BSA, 2. Myoglobin, 3. Cytochrome c (Native state), 4. Ovalbumin, 5. α -Chymotrypsin, 6. Lysozyme

結 言

水性二相系を利用する3種類の疎水性定量法、a) 二相分配法、b) Triton 添加法、c) Triton 相分離法を用いて、起源の異なる3種類のLipase、 β -Galactosidase、Cytochrome c の疎水性を検討し、以下の結果を得た。

1) タンパク質の疎水性は、表面全体の疎水性と疎水結合に関与する局所的な結合部位の疎水性の、少なくとも2種類に大別され、タンパク質は各々特徴的な疎水性パターンを有している。a) が表面全体の疎水性を定量するのに対して、b), c) はタンパク質表面にある局所的な結合部位の疎水性を定量しており、これは従来の疎水クロマトグラフィーやPEGの末端を疎水性リガンドで修飾した水性二相系を利用する方法と対応している。この疎水性パターンの差異は、タンパク質混合物の分離に有用である。

2) 起源の異なる3種類のLipaseにおいては、結合部位の疎水性が*C. V.*、*C. C.*、*P. P.* Lipaseの順に強くなっており、これが表面全体の疎水性の強さに対応している。

3) *E. coli* 起源の β -Galactosidase は、疎水性が強くPEG相に分配されるという従来の予測に反して、中性pH付近で強い親水性の表面を持ち下相のDex相に分配する。しかし、塩添加効果は大きく、微量添加によ

て分配係数を1万倍～0.01倍程度容易に増減できる。Triton添加効果は小さく、Tritonの疎水結合部位との相互作用は弱い。

4) Native状態のCytochrome cは表面に疎水結合部位を持たず、表面疎水性も小さい。塩酸を添加すると、濃度の増加とともにランダムコイル状の変性状態を経て、高次構造の部分的な巻き戻りが起こったMolten-globule状態となる。このとき、表面疎水性は変性状態とNative状態の間にあるが、Tritonとの結合に関する局所的な疎水性は変性状態より大きい。

Nomenclature

C_{Pr} , bottom = protein concentration in bottom phase	[mg/ml]
C_{Pr} , top = protein concentration in top phase	[mg/ml]
HF = hydrophobic factor	[mol/kJ]
HFS = hydrophobic factor of solutes	[kJ/mol]
ΔHFS = difference of HFS caused by the addition of salts	[kJ/mol]
K = partition coefficient of protein with Triton phase separation method	[-]
K_{Pr} = partition coefficient of protein	[-]
$\Delta \ln K_{Pr}$ = increase in partition coefficient of protein due to addition of Triton X-405 from 0 to 5 mM	[-]
$\Delta \log K$ = increase in partition coefficient of protein due to introduction of PEG-palmitate by Shanbhag et al.	[-]
R_c = retention coefficient on hydrophobic	

chromatography by Hjerten et al. [-]

Literature cited

- 1) Albertsson, P.A.: "Partition of Cell Particles and Macromolecules", John Wiley, New York (1986)
- 2) Bordier, C.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 1604-1606 (1981)
- 3) Fujita, Y., I. Mori and S. Kitano: *Bunseki Kagaku*, **32**, E379-E386 (1983)
- 4) Helenius, A. and K. Simons: *J. Biol. Chem.*, **247**, 3656-3661 (1972)
- 5) Hjerten, S., J. Rosengren and S. Pahlman: *J. Chromatogr.*, **101**, 281-288 (1974)
- 6) Hofmeister, F.: cited from page 21 of ref. 7
- 7) Horio, T. and J. Yamashita: "Tanpakushitu Kousono Kiso Jikkenhou (Experimental Method for Proteins and Enzymes)", p.49, Nankoudou, Tokyo (1981)
- 8) Keshavarz, E. and S. Nakai: *Biochim. Biophys. Acta*, **576**, 269-279 (1979)
- 9) Kohler, K., A. Veide and S.O. Enfors: *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 204-209 (1991)
- 10) Kuboi, R., H. Tanaka and I. Komasa: *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **16**, 755-762 (1990)
- 11) Kuboi, R., H. Tanaka and I. Komasa: *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **17**, 67-74 (1991)
- 12) Ramelmeier, R.A., G.C. Terstappen and M.-R. Kula: *Bioseparation*, **2**, 315-324 (1991)
- 13) Shanbhag, V.P. and G.-G. Axelsson: *Eur. J. Biochem.*, **60**, 17-22 (1975)
- 14) Tanaka, H., R. Kuboi and I. Komasa: *J. Chem. Eng. Japan*, **24**, 661-664 (1991)
- 15) Tanaka, H., R. Kuboi and I. Komasa: "Advances in Bioseparation Engineering 91", p.p.51-55, SCEJ (1991) submitted to *J. Chem. Eng. Japan*
- 16) Yoshimura, T., S. Maezawa and K. Hong: *J. Biochem.*, **101**, 1265-1272 (1987)

Evaluation of Surface Hydrophobicities of Proteins Using Hydrophobic Interaction with Non-ionic Surfactants in Aqueous Two-Phase Partitioning Systems

Ryoichi Kuboi, Koji Yano, Hisakazu Tanaka
and Isao Komasaawa

Dept. of Chem. Eng., Osaka Univ., Toyonaka 560

Key Words : Hydrophobicity, Non-Ionic Surfactant, Lipase, β -Galactosidase, Cytochrome c, Molten-Globule, Triton, Partition Coefficient

A systematic investigation of surface hydrophobicity of proteins was carried out by examining the partition behaviors of various proteins with differing properties in three aqueous two-phase systems such as PEG/dextran, PEG/dextran spiked with a non-ionic surfactant, Triton, and Triton/salt systems. The proteins examined were three lipases from different origins, oligomeric β -galactosidase, and cytochrome c in native, acid-induced molten-globule, and denatured states. Although each protein has its own characteristic hydrophobic nature, the hydrophobicity can be classified at least into two groups. One is surface net hydrophobicity, which can be quantified by the first method. The other is the local hydrophobicity originating from the hydrophobic binding site on the surface evaluated by the latter two methods. These two hydrophobicities showed different tendencies, especially for the cytochrome c in acid-induced molten-globule and denatured states. Conventional methods such as hydrophobic chromatography can be applied only for the measurement of local hydrophobicity. These hydrophobicity differences can be exploited for effective separation of proteins.