●日本膜学会膜学研究奨励賞(1997年)受賞論文

逆ミセルを利用したタンパク質の抽出に関する基礎的研究

市 川 創 作

筑波大学 応用生物化学系 ☎ 305 茨城県つくば市天王台 1-1-1

Extraction of Protein Using Reversed Micelles

Sosaku Ichikawa

Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

The present paper reviews the reversed micellar extraction of protein on the basis of the author's research work on the occasion to be accorded the 1997 young investigator's award by the Membrane Society of Japan. The extraction of protein using AOT (di-2-ethylhexyl sodium sulfosuccinate)/isooctane reversed micellar system was investigated from the viewpoint of the solubilization of protein and water by amphiphilic molecules. The minimal AOT concentration required for 100% forward extraction of protein was found. At the minimal AOT concentration, the hydrophilic surroundings, i.e., the molar ratio of water to extracted protein in the organic phase, were independent of the protein concentration. The hydrophilic surroundings were related with Fisher's polarity ratio as an index of the hydrophobicity of protein. Using this relation, a procedure to estimate the sufficient AOT concentration for the protein extraction was proposed. In the cases of cytochrome *c* and lysozyme extraction, the water concentration was larger than that in the protein-free system in spite of the same AOT concentration. On the contrary, in the case of ribonuclease A, this large water uptake was not observed. These differences of water uptake were discussed in relation to the location of the protein in the AOT reversed micelles. The forward extraction was accompanied by a conformational change of protein, whereas the backward extracted protein consequently refolded in the native conformation in the aqueous phase. Therefore, the relative reactivity of recovered cytochrome *c* and ribonuclease A after forward and backward extractions showed almost 100%. The recovered activity yield showed a maximum with respect to AOT concentration because of the combined effect of both decreases in forward and backward extraction yields at low and high AOT concentrations, respectively.

Key words : reversed micelles/extraction/amphiphilic molecule/protein/solubilizing water/activity yield

1. はじめに

逆ミセルは、ある種の両親媒性分子を炭化水素などの有機溶媒に添加した際に自発的に形成される分子集合体である (Fig. 1). その内側には、ウォーター・プールと呼ばれる数ナノメートルの微小な水相を保持することができる。この逆ミセルにより、本来非極性の有機溶媒には溶解しないアミノ酸やペプチド、タンパク質などの生体関連物質が可溶化される。この特性を利用して抽出分離を行う操作が逆ミセル抽出法である¹⁾。

逆ミセルを利用したタンパク質抽出のプロセスを Fig. 1 に示した。水溶液中の目的タンパク質は、逆ミセルを含む有機相と接触させることにより正抽出される。逆ミセル有機相を分相後、新たな水相と接触させることで、目的のタンパク質が水相に逆抽出、回収される。逆ミセル有機相は分相され、正抽出に再利用される。水相の pH や塩濃度を調整することで選択的な正・逆抽出を行うことができる。本分離法を巨視的に捉えと、従来の液-液抽出操作と同様の特徴を持ち、簡便な装置で連続的な操作が可能であるため、培養液など大容量の水溶液を対象とするバイオセパレーション技術としての利用が期待されている。また、抽出の機構を微視的に捉えと、タンパク質が両親媒性分子、および、水分子と共に自己組織化して分子集合体を形成する挙動であり、分子間相互作用により機能性を有する分子集合体が形成する現象として興味深い。

本研究では、この逆ミセルを利用した新規なタンパク質抽出法の基礎的研究として、タンパク質の正抽出と逆抽出、および活性回収に対する両親媒性分子や塩の濃度、pH、温度といった操作因子の影響を定量的に評価し、効率的な抽出条件を設定する指針を示した。本稿では、タンパク質の抽出挙動に対する両親媒性分子濃度の影響とその可溶化状態を中心に記してみたい。

2. タンパク質の正抽出に対する両親媒性分子濃度の影響

逆ミセル抽出法において、両親媒性分子は、逆ミセルの形成に必要不可欠な成分であり、その濃度がタンパク質の抽出挙動に及ぼす影響を検討することは重要である。そこで、両親媒性分子としてジ (2-エチルヘキシル) スルホコハク酸ナトリウム (登録商標名 Aerosol OT ; 以降 AOT と略記する)、有機溶媒としてイソオクタンを用いた逆ミセル系を用い、モデルタンパク質シトクロム *c* の正抽出挙動を実験的に検討した。

シトクロム *c* の正抽出率に対する両親媒性分子 AOT 濃度の影響を Fig. 2 に示した。正抽出率は AOT 濃度の増加に伴って増大し、ある AOT 濃度以上で 100% の正抽出率を示した。この初期小相中のタンパク質を 100% 正抽出するために最小限度必要な AOT の濃度を Minimal AOT 濃度とした²⁾。この濃度は、効率的な正抽出操作を行うための、両親媒性分子の濃度設定の指標として有用である。シトクロム *c* と同程度の分子量を持つタンパク質、リゾチームやリボヌクレアーゼ A を正抽出した場合にも Minimal AOT 濃度の存在が確認された³⁾。その結果、AOT を用いたタンパク質の逆ミセル抽出においては、Minimal AOT 濃度が存在し、この条件では抽出・可溶化機構の一般的な背景が存在すると考え、この条件における可溶化状態について検討を行った。

3. Minimal AOT 濃度におけるタンパク質と水の可溶化挙動

Minimal AOT 濃度の条件において逆ミセル有機相中に正抽出されたシトクロム *c* と水の濃度の関係を Fig. 3 に示した。シトクロム *c* と水の濃度は比例関係を示し、Minimal AOT 濃度の条件では、シトクロム *c* や AOT の濃度によらず、シトクロム *c* と水分子とが一定の比率で存在していることがわかった²⁾。Fig. 3 の傾きは、シトクロム *c* 1 分子に対して平均的に存在する水分子の数を表わすと考えられる。そこで、この傾きをタンパク質の正抽出・可溶化に必要な親水的环境 (Hydrophilic Surroundings ; H.S. と略記する) と呼ぶことにした。

Fig. 1 Extraction process of protein using reversed micelles.

Fig. 2 Effect of AOT concentration on the forward extraction percentage of cytochrome c. (cytochrome c 7.8×10^{-5} M, KCl 0.1 M, pH 7~8)

Fig. 3 Relationship between water and protein concentrations at the minimal AOT condition.

Minimal AOT 濃度の条件でリゾチームやリボヌクレアーゼ A を正抽出した場合にも、逆ミセル有機相中にタンパク質と水分子とが一定の比率で存在していることがわかり、それぞれの

H.S. が求められた³⁾. この結果は、非極性の有機溶媒には溶解しないタンパク質が、逆ミセル有機相に正抽出・可溶化されるためには、有機相に水分子による親水的な環境の形成が必要であるこ

Fig. 4 Relationship between the hydrophilic surroundings required for the solubilization of protein and the polarity ratio, p , as an index of the hydrophobicity of protein.

Fig. 6 A schematic representation of the location of protein solubilizing in AOT reversed micelles.
(a) in the interfacial area of AOT layer, (b) in water pool

とを示唆している。

各タンパク質の正抽出・可溶化に必要な $H.S.$ は、タンパク質の疎水性—親水性の程度と関係すると考えられる。その指標は種々提案されているが、この系では Fisher⁴⁾ の提案した polarity ratio (p 値) と各タンパク質の $H.S.$ が Fig. 4 に示した様に、実験の範囲で良好な相関を示すことがわかった³⁾。 p 値は、(非極性残基体積の総和) に対する「極性残基の体積の総和」の比で定義され、親水性の高いタンパク質ほど大きな値を

Fig. 5 Water concentration in the reversed micellar organic phase immediately after the forward extraction of protein.

示す。 Fig. 4 の相関は、親水性の高いタンパク質ほど、逆ミセル有機相中に、正抽出・可溶化のための水分子が多く必要であることを示している。

タンパク質の疎水性—親水性の指標と $H.S.$ との一般的な相関が得られると、タンパク質の正抽出に必要な両親媒性分子 AOT の濃度を推算することができる。すなわち、目的とするタンパク質の疎水性—親水性の指標から、得られた相関を用いて親水的環境 $H.S.$ を求め、可溶化に必要な逆ミセル有機相中の水濃度を求める。 AOT 濃度と有機相水濃度の相関は求められており、これより正抽出に必要な AOT 濃度が推算できる。

4. タンパク質の可溶化状態

タンパク質を正抽出・可溶化した直後の逆ミセル有機相の水濃度と、タンパク質を含まない逆ミセル有機相の飽和水濃度を Fig.5 に示した⁵⁾。 シトクロム c を抽出した場合、飽和水濃度より多くの水が可溶化されていることがわかる。また、リゾチームを正抽出した場合にも、シトクロム c と同様に過剰な水の可溶化が観察された³⁾。一方、リボヌクレアーゼ A を正抽出した場合、過剰な水の可溶化は測定されなかった (Fig.5)。

Fig. 7 Circular dichroism spectra of cytochrome *c* in aqueous and reversed micellar organic phases.

これらタンパク質の正抽出に伴う水分子の可溶化挙動は、AOT 逆ミセル中でのタンパク質の可溶化位置と関連付けて考察することができる。逆ミセルのウォーター・プールと有機溶媒の界面には、両親媒性分子 AOT により分子膜が形成されている。シトクロム *c* とリゾチーム分子の一部は、この AOT の分子膜に入り込んだ状態で抽出されることで、ウォーター・プールと有機溶媒との界面積を拡大し、過剰な水の可溶化を促したと考えられる (Fig.6 (a))⁵⁾。シトクロム *c* の可溶化については、小角 X 線散乱による分析から逆ミセルの界面に可溶化することが示唆されており^{6, 7)}、本研究で観察された過剰な水の可溶化挙動と対応すると考えられる。

一方、逆ミセル有機相に正抽出されたリボヌクレアーゼ A の円偏光二色性 (CD) 分析を行うと、水相中とは異なるスペクトルを示し、立体構造の変化を伴って逆ミセルに抽出・可溶化されていることがわかる⁵⁾。しかしながら、その変化は顕著でなく、親水的なリボヌクレアーゼ A は、よりバルク水相に近い環境であるウォーター・プール内に可溶化されていると考えられる (Fig.6 (b))⁵⁾。リボヌクレアーゼ A が逆ミセルのウォーター・プールに可溶化された場合、界面は拡大されず、過剰な水の可溶化は観測されなかったと考えられ

Fig. 8 Effect of AOT concentration on the recovered activity yield of cytochrome *c* after forward and backward extractions.

る。

5. タンパク質の活性収率に対する AOT 濃度の影響

酵素などのバイオ生産物は、希薄な濃度で生産され、また、活性を有するものが多い。従って、分離操作を経て得られる目的物質の活性と回収率が重要となる。そこで、AOT 逆ミセルを利用してタンパク質の正・逆抽出操作を行い、得られた活性収率に対する両親媒性分子 AOT 濃度の影響を検討した。

正抽出と逆抽出を行った後に回収されたシトクロム *c* の反応活性は、いずれの AOT 濃度においても、ほぼ 100% 保持されていた⁸⁾。シトクロム *c* の CD スペクトルを Fig. 7 に示した。正抽出を行う前の水相中のスペクトルと、逆ミセル有機相に抽出されたシトクロム *c* のスペクトルとを比較すると、著しく変化していることがわかる⁸⁾。この結果、シトクロム *c* は構造の変化を伴って逆ミセル有機相に正抽出・可溶化されていることがわかる。前述した様に、シトクロム *c* は逆ミセル界面の AOT 分子膜に入り込むかたちで可溶化していると考えられ、その状態では AOT 分子と強く相互作用し構造が変化したものと考えられる。

しかしながら、水相に逆抽出すると初期水相中と同じスペクトルを示し、逆抽出を行うとタンパ

ク質がリフォールディングし水相中でのネイティブな構造に回復することがわかった。この結果は、正・逆抽出操作後の反応活性が、ほぼ 100% 保持されていた結果と対応している。

リボヌクレアーゼ A の場合にも、僅かな構造変化を伴って逆ミセル有機相に正抽出されたが、水相に逆抽出すると構造を回復し、初期水相中と同等の活性を示した⁵⁾。正・逆抽出率と相対活性の積として求められるシクロクロム c の活性収率に対する AOT 濃度の影響を Fig. 8 に示した⁸⁾。活性収率は、AOT 濃度に対して極大を示し、至適な AOT 濃度が存在した。低 AOT 濃度側、および、高 AOT 濃度側での活性収率の低下は、それぞれ正抽出と逆抽出の際の抽出率の低下が原因であった。

6. おわりに

逆ミセルを利用したタンパク質の抽出分離法は、工業的な実用化をめざす分離操作であるという観点から、今後もより効率的な操作条件を明らかにしていくと共に、新規な機能を付与した逆ミセル系を構築していくことが必要であろう。特に、バイオセパレーションに利用するためには、生体適合性の高い逆ミセル系の開発と、バイオアフィニティーなどを導入した選択性の向上が必要であると考え検討を進めている^{9, 10)}。

逆ミセルは、幾多の分子が自己組織化した分子集合体である。このため、種々の機能を持った分子を導入し、目的に沿った分子集合体の設計が可能になるものと期待される。そのためには、逆ミセルの界面に形成される両親媒性分子の分子膜とこれに内包されるウオーター・プール、そしてタンパク質などの可溶化物質との相互作用を系統的に明らかにし、機能性分子集合体の設計の基礎を集積していくことが重要であると考えている。

謝 辞

この度は、1997 年度日本膜学会研究奨励賞を賜り、学会長をはじめとする諸先生方、ならびに諸先輩方に

篤くお礼申し上げます。身に余る栄誉とそれに伴う今後の責務の重さを実感しております。本研究を進めるに際し、温かくご指導いただいた古崎新太郎先生、清水賢先生、今井正直先生には、心からお礼申しあげるとともに、深く感謝致します。また、分子集合体に関する研究を発展的に導いていただいた中嶋光敏先生、佐野洋先生、鍋谷浩志先生に深く感謝致します。さらには、共に研究を行った同窓の諸氏に篤くお礼申し上げます。皆様のご指導、御協力なしに本研究は成し得なかったものと痛感しております。有り難うございました。今後とも、膜学の発展に寄与できるよう微力ながら力を尽くしていきたいと思ひます。ご指導ご鞭撻の程、よろしくお願い申し上げます。

文 献

- 1) 市川創作, 古崎新太郎:「新タンパク質応用工学」, 篠野昌弘監修, p.547-555, フジテクノシステム (1996)
- 2) Ichikawa S, Imai M, Shimizu M: *Biotechnol. Bioeng.*, **39** 20-26, (1992).
- 3) Imai M, Natsume T, Naoe K, Shimizu M, Ichikawa S, Furusaki S: *Bioseparation*, **6** 325-333, (1997).
- 4) Fisher H. F.: *Biochemistry*, **51** 1285-1291, (1964).
- 5) Ichikawa S, Hattori N, Furusaki S: "Value Adding Through Solvent Extraction", Shallcross D C, Paimin R, Prvcic L M eds., p. 1423-1428, The University of Melbourne (1996).
- 6) Pileni M P, Zemb T, Petit C: *Chem. Phys. Lett.*, **118** 414-420, (1985).
- 7) Adachi M, Harada M: *J. Phys. Chem.*, **97** 3631-3640, (1993).
- 8) Ichikawa S, Furusaki S: *Trans. IChemE.*, **73** 33-39, (1995).
- 9) 市川創作, 杉浦慎治, 中嶋光敏, 佐野洋, 関 実, 古崎新太郎: 日本膜学会第 19 年会講演要旨集, p.96, (1997).
- 10) Ichikawa S, Koyama K, Seki M, Nakajima M, Sano Y, Kameyama M, Nagata T, Furusaki S: *Proceedings of The 1996 International Congress on Membranes & Membrane Processes*, p.682-683, (1996).

(受付 1997 年 9 月 30 日 掲載決定 10 月 2 日)