ナノ分子集合体逆ミセルの生物工学的应用

後藤雅宏

九州大学大学院工学研究院応用化学部門 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

Novel Biological Application of Nanostructured Reversed Micelles

Masahiro Goto

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering,
Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan

Reversed micelles create unique environment in organic media. They are capable of solubilizing hydrophilic biomolecules (e.g., proteins, peptides, amino acids, DNA) in their aqueous interior. This feature brings about the practical use of biomaterials in organic media because reversed micelles can solubilize them preserving their intrinsic activity. In this article, we focus on novel biological application of reversed micelles: purification of biomolecules (proteins and DNAs), protein renaturation, and the detection of unusual sequence of DNAs. In the reversed micellar phase, denatured proteins are completely reactivated under optimum conditions. This novel refolding technique facilitates a high renaturation yield at high protein concentration. Recently, the reversed micelle is found to be a useful tool not only for protein separation but also for protein renaturation. Furthermore, we achieved the extraction of DNAs from an aqueous solution into isooctane using reversed micelles. The degree of extraction of DNAs was strongly influenced by the type of surfactant in the organic solvent and ionic strength in the aqueous phase. The driving force of the DNA transfer was electrostatic interaction between cationic surfactants and the negatively charged DNA. Cationic surfactants possessing two long-alkyl chains are the best candidate for the successful transfer of DNAs from the aqueous solution to the reversed micellar solution. We also succeeded in detecting the targeted DNAs that have a mismatched sequence by utilizing a reversed micellar solution.

Key words : reversed micelles / separation / extraction / protein / nucleic acid / nanotechnology

1. はじめに

水に馴染みやすい親水部と油に馴染みやすい疎水部を合わせ持つ界面活性剤を微量の水とともに有機相中に溶かし込むと、逆ミセルという集合体を形成する。この逆ミセルが、これまでにない機能を有するナノ分子集合体として最近注目されて

いる。その応用範囲は、これまで全く油とは無縁であった生体分子にまでおよんでいる。

酵素やタンパク質といった生体分子は、それ自身ナノオーダーのスケールを有した機能性高分子である。我々は、これらの生体分子が、有機媒体中に形成されるナノ集合体と融合することによって起こる様々な機能発現について研究を行った。

本稿では、逆ミセルの生物工学的応用に焦点を当て、筆者らの最近の研究成果を紹介する。

2. ナノ分子集合体逆ミセルとは

ある種の特定の分子構造を有した両親媒性分子（界面活性剤）は、有機溶媒中で微量の水を均一に分散させる能力を持っている。これらの分子は自発的にナノスケールの分子集合体「逆ミセル」を形成し、ナノオーダーの水滴核（water poolとも呼ばれる）を安定に非水媒体中に分散させることができる。これによって、有機溶媒のもつ通常の飽和水分量に比べて数百倍もの水分子を、有機溶媒中へ均一に溶かし込むことが可能となる。また、各液滴はほぼ均一なサイズを有し、逆ミセル溶液自身は透明でかつ熱力学的に安定であるという特徴を有している¹⁾。

一般に次式で定義される充填パラメーター値 P が1を越えるような構造を有する界面活性剤が、逆ミセルを形成しやすいとされている²⁾。ここで v 、 σ 、 l はそれぞれ、界面活性剤分子の疎水部分の体積、親水部の占める面積、疎水部分の長さである。

$$P = \frac{v}{\sigma \cdot l}$$

つまり、親水部がコンパクトで疎水基が十分に発達した二鎖鎖以上の界面活性剤が逆ミセル形成に有利であると考えられる。多くの逆ミセル研究で用いられているジ-2-エチルヘキシルスルホコハク酸（AOT）は、上記の P 値が1.04（ $v=466[\text{\AA}^3]$ 、 $\sigma=56[\text{\AA}^2]$ 、 $l=8[\text{\AA}]$ ）であり、逆ミセルを形成する代表的な界面活性剤である。このような界面活性剤が有機溶媒中に分散することによって、有機溶媒-界面活性剤-水の三成分から成るナノスケールの微小液滴核が形成される（Fig. 1）。

このナノ集合体である逆ミセルを利用することによって、生体分子は有機溶媒から保護され、本来の機能を非水媒体中においても発現することができる^{3,4)}。その結果、これまで水溶液系でのみ利用されてきた生体分子の高い触媒活性や高度な分

Fig.1 Schematic illustration of reversed micelles

子認識能力を非水媒体中で発揮させることが可能となった⁵⁾。

3. タンパク質の分離場としてのナノ集合体

1985年にMITのHattonらにより、水相中に溶解しているタンパク質が、接触した有機相中へ移動すること、つまり逆ミセルにタンパク質の抽出能力があることが示された⁶⁾。液液抽出操作は連続操作が可能な点やスケールアップが容易であることから実用化への期待も高まり、1985年以降、タンパク質の分離場としての逆ミセルに関する研究が盛んに行われた。

逆ミセルによるタンパク質分離は、選択的な抽出と定量的な逆抽出（回収）操作によって構成さ

Fig.2 Separation of proteins by reversed micelles

れる (Fig.2). 単なる可溶化とは異なり, 逆ミセル相へ抽出されるための駆動力が必要であり, 抽出・逆抽出機構に関する知見は極めて重要である. その後次第に, タンパク質抽出における主な駆動力は, タンパク質-界面活性剤間の静電的相互作用であることが明らかとなった. 先述の AOT は, アニオン性の親水基を有する界面活性剤であり, カチオン性を帯びたタンパク質に対して, 強い抽出能力を示す. そのため, タンパク質の抽出効率は水相の pH に強く依存する. タンパク質の有する等電点より低い pH の水相では, そのタンパク質はカチオン性を帯びており, 極めて効率良く逆ミセル相中へと抽出される. 逆に, 等電点以上の pH の水相では, タンパク質がアニオン性を帯び, 界面活性剤との静電的な反発のため抽出は起こらない. このように等電点を境に抽出の ON-OFF 制御が可能であり, 異なる等電点をもつ複数のタンパク質を分離することが可能となった^{7,8)}.

しかし, タンパク質表面は極めて多様であり, このような静電的な相互作用だけで分離することは難しい. このため, 分離能力の観点からは, 目的タンパク質に応じた逆ミセル系の設計が重要となる⁹⁾.

また, タンパク質-界面活性剤間の組合せだけではなく, 界面活性剤の疎水基部分の構造も抽出効率に大きな影響を与える. ヘモグロビン (分子量: 64,500) ほどの大きなタンパク質の場合, 十分な静電的相互作用が得られる条件においても通常の AOT 逆ミセル系では抽出することは困難である. これに対して, ジオレイルリン酸 (DOLPA)¹⁰⁾ やジトリデシルリン酸 (DTDPA)¹¹⁾ のように疎水性の高い長鎖のアルキル基を有する界面活性剤を用いると抽出が可能となる (Fig.3). これらの結果は, タンパク質抽出における界面活性剤疎水基の役割を明確にしたのみならず, タンパク質の抽出機構に大きな指針を与えるものとなった. つまり, タンパク質-界面活性剤間の相互作用による複合化の第一段階と, その後のタンパク質-界面活性剤複合体が有機溶媒中へ移動していく第二段階を経てタンパク質は抽出される. 界

Fig.3 Effect of the structure of surfactants on protein extraction

面活性剤の疎水部の構造は, その第二段階に大きく関与し, アルキル鎖が十分に発達した場合にのみ大きなタンパク質を有機溶媒中に安定に分散させることが可能となる⁷⁾.

一方, 逆ミセル溶液からの逆抽出もタンパク質抽出において極めて重要なプロセスである. 逆抽出を促進させるためには, アルコール等の添加によって逆ミセル系の不安定化を引き起こす必要がある. しかしこの場合, 逆ミセル相の再利用性に問題を残している¹⁰⁾.

4. DNAの分離場としてのナノ集合体

生物の遺伝情報を保存し, 医学や農学の分野などで盛んに研究に用いられている核酸 (DNA) もまた, 逆ミセルによって抽出できることが, 最

Fig.4 Three-dimensional structure of cytochrome c and DNA

Table 1 Effect of surfactants on the DNA transfer into reversed micelles

Surfactants	Degree of DNA transfer into reversed micelles [%]	Residual ratio of DNA in aqueous solution [%]
AOT	3.1	100
DOLPA	0	turbid
Lecithin	0	100
1C ₁₀ QAB	8.5	7.3
1C ₁₆ QAB	35	85
1C ₁₈ QAB	66	13
2C ₁₀ QAB	75	9.0
2C ₁₂ QAB	78	33
2C ₁₄ QAB	78	22
2C ₁₆ QAB	87	13
2C ₁₈ QAB	85	17
2C ₁₈ QAC	100	3.5
3C ₈ QAC	34	76
4C ₁₀ QAB	0	100

nCmQA : n is the number of alkyl chain, and m is the length of the alkyl chain.

B and C : bromide anion and chloride anion as the counter anion of quaternary ammonium surfactant.

近明らかになった¹²⁾。これまで数多くの抽出例が報告されているタンパク質に対してDNAの形状や表面の性質は大きく異なる (Fig.4)。分子量が数万のタンパク質はナノメートルオーダーの球形をしているのに対し、DNAの分子量は数百万にも及び二重らせん構造によって細長い形状をとっている。さらにDNA表面は均一なアニオン性を帯びており、溶液中では単なるポリアニオンとして振る舞う。これまでのタンパク質抽出に関する研究が、主にアニオン性界面活性剤を用いて行われてきたため、対象となるタンパク質は操作条件下でカチオン性のものが多かったことを考えると、DNAの抽出にはアニオン性界面活性剤は適さない。様々なタイプの界面活性剤を用いてDNA抽出の検討を行った結果、2本のアルキル鎖を有するカチオン性界面活性剤ではほぼ完全にDNAを抽出できることを明らかにした (Table.1)。この傾向は、高分子量のDNA表面をいかに効率よく界面活性剤が覆い、有機相に溶解するための十分な疎水性を付与できるかを反映した結果である。

また、DNA抽出はタンパク質抽出の場合と同様、水溶液中に存在する塩濃度にも大きな影響を受けた。その程度はタンパク質の場合に比べて著しく、特に1価の陽イオンに比べてカルシウムのような2価の陽イオンを含む塩に対しては極めて敏感である。例えば、100 mMほどの塩存在下で、ほとんどDNAは抽出されなくなった。これは塩濃度の増加にともなってDNA-界面活性剤間の静電的相互作用が遮蔽されたことが原因と考えられる。やはりDNAの抽出においても、抽出の主な推進力は、界面活性剤との静電的相互作用であることを明らかにした。

逆抽出に関してはタンパク質の場合の知見に基づき、比較的容易に行うことができた。アルコールの添加により、定量的に回収が可能となり、回収されたDNAは抽出前のDNAと同様の二重らせん構造を有していることが、円偏光二色性 (CD) スペクトルの結果からも支持された。

5. ナノ集合体による変性タンパク質の再生

近年の遺伝子工学・タンパク質工学の発展によって、目的のタンパク質を得るために、大腸菌などを利用するケースが多くなってきた。しかしながら、目的タンパク質の大量発現が可能である反面、しばしば細胞内にインクルージョンボディと呼ばれる不溶体を形成してしまう。通常、この不溶成分は強力な変性剤である高濃度の塩酸グアニジンや尿素水溶液を用いて溶解させる。この段階でタンパク質は変性状態にあり、変性剤を取り除くことによって、本来の高次構造へと巻き戻し、活性を再生するプロセスが必要となる。この過程をリフォールディングと呼ぶ。このとき、高タンパク質濃度でのリフォールディングは、不適切な分子間相互作用によって再び不溶体の形成を引き起こすため、数十～数百倍もの高度希釈が必要となる。その結果、目的タンパク質を得るためには大量の溶液を処理しなくてはならず、希釈法に代わる新しいリフォールディング方法の開発が望まれている。組み換え遺伝子を用いた異種細胞での有用タンパク質生産が活発に行われている今日でもな

Fig.5 Schematic illustration of protein refolding by reversed micelles

お、このような希釈法を用いた地道なリフォールディング操作が行われているのが現状である。

逆ミセルは既に述べたようにタンパク質分子とほぼ同等のサイズを有することから、逆ミセル内に変性タンパク質を可溶化できれば、個々のタンパク質をそれぞれ隔離して不適切な分子間相互作用を抑制した高タンパク質濃度でのリフォールディング操作が可能となると期待される。1990年にはHagenらによって逆ミセルがタンパク質のリフォールディング媒体として有効なことが初めて示された¹³⁾。しかしながら、変性剤溶液中から逆ミセル溶液への変性タンパク質の抽出効率が低く、高タンパク質濃度でタンパク質回収は困難であった。これに対して我々は、固体の変性タンパク質を直接逆ミセル溶液へ可溶化し、高タンパク質濃度条件下でリフォールディングが行える手法を開発した¹⁴⁻¹⁶⁾ (Fig.5)。本手法はタンパク質を高濃度

Fig.6 Hybridization of DNAs in reversed micelles (k_{target} : hybridization rate of the targeted DNA containing a missmatch sequence. k_{normal} : hybridization rate of normal DNA containing the fullmatch sequence.)

で処理できるだけでなく、ジスルフィド結合形成時に用いる高価な酸化還元試薬も極めて少量で済むといった利点を有している。最近では、固体変性タンパク質の逆ミセル溶液への抽出効率が、尿素添加法によって一層改良され、インクルージョンボディの直接可溶化・高濃度リフォールディングへの道を開く手法として期待されている¹⁷⁾。

6. ナノ集合体による遺伝子変異の検出

逆ミセル中に種々の遺伝子を取り込ませ、ハイブリダイゼーションを行った。その結果、正常な遺伝子(フルマッパ)のハイブリダイゼーション速度が、他の異常遺伝子の速度に比べて非常に速いことが示された。変異が、最末端に一カ所見られる場合でも、ハイブリダイゼーション速度は抑制され(70%)、中心付近に変異がある場合、その速度は、正常遺伝子のそれに比べて10分の1以下に低下した(Fig. 6)。これより、遺伝子の配列に異常がある場合、逆ミセル中で起こる二重らせんの形成速度が著しく抑制されることが明らかとなった。

水相中での二重らせん形成は、数秒で達成されるため、遺伝子に異常がある場合でもそのハイブリダイゼーション速度の差異を明確にすることはできない。しかしながら、逆ミセルというナノ集

合体に遺伝子を取り込みそれぞれを隔離することによって、その二重らせん形成の速度を制御することができた。実際に、ハイブリダイゼーションの速度は、数時間のオーダーまで抑制され、遺伝子の異常をナノ集合体を用いて検出することができた。

7. おわりに

逆ミセルは、非水媒体中に形成される流動性のある特異なナノ分子集合体である。酵素やタンパク質といった生体分子とほぼ同一の大きさを有しているため、これら生体分子の新たな機能発現の場として注目されてきた。最近では、さらに分子設計されたナノ集合体を用いることによって、機能改変素子としての利用に関心が寄せられている。これまで、生体分子は水相中で機能するものと考えられてきたが、ナノ集合体の利用によって、非水媒体中における生体分子の様々な活躍が期待されている。

謝 辞

本研究は、中塩文行九州大学名誉教授（現崇城大学教授）ならびに古崎新太郎東京大学名誉教授（現崇城大学教授）のご指導の下で行ったものである。ここに改めて感謝の意を表したい。

文 献

- 1) Ono T, Goto M, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2**, 397-401 (1997)
- 2) Mitchell, D. J, Ninham, B. W., *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, **77**, 601-605 (1981)
- 3) Ono T, Goto M, Nakashio F, Hatton T. A, *Biotechnol. Tech.*, **10**, 141-144 (1996)
- 4) Okazaki S, Uchimura Y, Goto, M, Furusaki S, *Biochem. Eng. J.*, **6**, 103-109 (2000)
- 5) 後藤雅宏, 小野努, 古崎新太郎, 膜, **25**, 23-31 (2000)
- 6) Goklen, K. E., Hatton, T. A., *Biotechnol. Prog.*, **1**, 69-76 (1985)
- 7) Ono T, Goto M, Nakashio F, Hatton T. A : *Biotechnol. Prog.*, **12**, 793-800 (1996)
- 8) Ono T, Goto M, *Biotechnol. Prog.*, **14**, 903-908 (1998)
- 9) Goto M, Ono T, Nakashio F, Hatton T. A : *Biotechnol. Bioeng.*, **54**, 26-32 (1997)
- 10) Goto M, Ishikawa Y, Ono T, Nakashio F, Hatton T A : *Biotechnol. Prog.*, **14**, 729-734 (1998)
- 11) Goto M, Kuroki M, Ono T, Nakashio, F : *Sep. Sci. Technol.*, **30**, 89-99 (1995)
- 12) Goto M, Ono T, Horiuchi A, Furusaki S, : *J. Chem. Eng. Japan*, **32**, 123-125 (1998)
- 13) Hagen A, Hatton T A, Wang D. I. C., *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 955-961 (1990)
- 14) Hashimoto Y, Goto M, Furusaki S, Hatton A. T., *Biotechnol. Bioeng.*, **57**, 620-623 (1998)
- 15) Goto M, Hashimoto Y, Fujita T, Ono T, Furusaki S, *Biotechnol. Prog.*, **16**, 1079-1085 (2000)
- 16) Goto M, Ono T, Furusaki S, *ACS Symposium Series 740: Chapter 22*, 374-383 (2000)
- 17) Sakono M, Goto M, Furusaki S, *J. Biosci. Bioeng.* **89**, 458-462 (2000)

(受付 2001年5月25日 掲載決定 6月2日)