[農化 第 50 巻, 第 8 号, p.385~387, 1976]

非イオン界面活性剤のリゾチーム 結晶化促進作用について

日高義雄, 松岡芳隆
(エーザイ株式会社研究所)

昭和 51 年 4 月 8 日受理

The Effect of Nonionic Surfactant to Accelerate the Rate of Lysozyme Crystallization

By Yoshio HIDAOKA and Yoshitaka MATSUOKA
Eisai Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.

It was found that the addition of nonionic surfactants, having polyoxyethylenic groups, could accelerate the rate of crystallization of hen egg white lysozyme (3,2,1,17) in acidic pH, to widen the conditions of lysozyme crystallization. Crystals of lysozyme hydrochloride were obtained directly from egg white with this effect.

Four types of nonionic surfactants tested, were all effective, and in the same type of the surfactant, the more hydrophilic, the more effective. Although the effect increased in proportion to the concentration of the surfactant added, the effect reached a plateau at above the definite concentration of the surfactant.

A small amount of the surfactant was detected in crystals of lysozyme obtained in the presence of the surfactant. (Received April 8, 1976)

ニワトリ卵白リゾチーム(以下 LZ と略す)と界面活性剤の相互作用については、すでに 2~3 の報告があり、陽イオン^(1,2)および陰イオン⁽³⁾, 界面活性剤については、その活性を阻害することが知られている。非イオン界面活性剤については、Glassman ら⁽⁴⁾が LZ 活性を阻害しないことをすでに報告し、筆者ら⁽⁵⁾も LZ の表面変性を防止することを報告した。さらに、ポリオキシエチレン基を有する非イオン界面活性剤(以下、単に活性剤と略す)を、LZ 溶液に少量添加することにより、LZ の結晶化が促進されることを見出したので報告する。

1) リゾチームの結晶化におよぼす活性剤の影響

LZ としては、Alderton ら⁽⁶⁾の方法により卵白から直接結晶化させ、再結晶を 4 回くり返した標品を用い、活性剤としては、ポリオキシエチレンモノステアレート(Nikkol MYS-25®)を用いて、以下の実験を行った。結晶化液の LZ と活性剤の濃度を、それぞれ 2% とした。NaCl 濃度は、結晶化速度を制御する意味で、原報⁽⁶⁾(5%) よりも低濃度(2% および 3%) にし、pH は原報どおり 4.5 に調節した。以上の操作を室温で行った後、4°C の恒温冷却槽中で、一定条件でときどき攪拌しながら、検鏡により LZ 塩酸塩の結晶化状況を観察した。結晶化液上澄の 280 nm における O. D. の減少から結晶

Fig. 1. Effect of Nonionic Surfactant on Ratio of Lysozyme Crystallization.

Conditions of crystallization: lysozyme concentration 2%, pH 4.5, temperature 4°C.

○—○, ●—●, and □—□, ■—■: NaCl added at 3%, 2% respectively in the presence (○, □) or absence (●, ■) of 2% nonionic surfactant (Nikkol MYS-25).

Fig. 2. Effect of Nonionic Surfactant on Ratio of Lysozyme Crystallization at Various Concentrations of the Surfactant.

Conditions of crystallization: lysozyme concentration 1%, NaCl 5%, pH 4.5, temperature 4°C, nonionic surfactant Nikkol MYS-25.

化率を算出し、結晶化速度の指標とした。結果は Fig. 1 に示すごとくで、この活性剤の添加による LZ の結晶化促進効果が認められた。

2) リゾチーム結晶化におよぼす活性剤濃度の影響

活性剤の添加濃度と、この結晶化促進効果との関係を検討した。結晶化液中の LZ 濃度を 1%, NaCl 濃度を 5% とし、活性剤の濃度を種々変え、その他は 1) の場合と同様な操作を行った。LZ 塩酸塩の結晶化速度を、結晶化率が 90% に達するに要した時間をもって表わした。結果は Fig. 2 に示すごとくで、LZ の結晶化促進効果を現わす活性剤濃度の上限は、ポリオキシエチレンモノステアレートでは、結晶化母液に対して 4% 付近であって、それ以上添加しても結晶化速度は変らなかった。

3) リゾチーム結晶化母液の pH を変えた場合の活性剤の影響

結晶化母液の pH を変えた場合、活性剤の添加が LZ の結晶化速度におよぼす影響につき検討した。この実験では、LZ の結晶化速度を制御するため、卵白より直接結晶化した LZ 粗結晶の溶出液を結晶化母液として用いた。この液の LZ 濃度は 1%, 卵白由来の他タンパク質濃度は 4% であった。リゾチーム量の測定は、Litwack ら⁽⁷⁾ の比濁法の変法を用いた。共存タンパク質量の測定は、ビュレット法によった。本結晶化母液に、ポリオキシエチレンオレイルアルコールエーテル (Emalex-545®) を 2%, NaCl を 5% 濃度にそれぞれ添加し、各 pH に調節後、室温 (約 20°C) に放置した。24 時間後、検鏡により LZ の結晶を確認し、各上澄中の LZ 量を測定して結晶化率を求めた。結果は Fig. 3 に示すごとくで、活性剤による結晶化促進効果は酸性 pH 領域に限られ、等電点結晶が得られるアルカリ領域では、むしろ結晶化率の低下が認められた。また注目すべきは、この温

Fig. 3. Effect of Nonionic Surfactant on Ratio of Lysozyme Crystallization at Various pH.

Conditions of crystallization: lysozyme concentration 1%, other proteins 4%, NaCl 5%, temperature about 20°C, time 24 hr.

○—○ in the presence of 2% nonionic surfactant (Emalex-545), ●—● control (without the surfactant).

度条件下では活性剤無添加の場合、酸性領域では設定時間内にほとんど結晶化が認められないにもかかわらず、活性剤添加の場合には、十分に結晶化が生じていることである。

4) 各種活性剤の影響

ポリオキシエチレン系活性剤の種類を変えた場合に、この結晶化促進効果がどうなるかを検討した。LZ 結晶化母液としては、3) の場合と同じく卵白由来の他タンパク質の共存したものを用いた。この液の LZ および共存タンパク質濃度は、それぞれ 2%, 3% であった。NaCl 5%, pH 4.5, 4°C で結晶化を行い、LZ 塩酸塩の結晶化率が 90% に達するに要する時間を測定した。結果は Table I に示すごとくで、試験したすべての活性剤でその効果が認められた。また HLB 値の高いものほど、効

Table I. Types of Nonionic Surfactants and their Effect on Lysozyme Crystallization

Nonionic surfactant	Brand name	H. L. B.	Added amount	Time to crystallize 90% of lysozyme
Polyoxyethylene oleyl alcohol ether	Emalex-510	12.2	2(%)	3.0(hr)
	Emalex-525	16.0	2	1.5
	Emalex-545	17.6	2	1.0
Polyoxyethylene sorbitanmonooleate	Nikkol TO-10	15.0	2	2.0
Polyoxyethylene monostearate	Nikkol MYS-25	15.2	2	2.0
Polyoxyethylene hydrogenated caster oil deriv.	Nikkol HCO-60	14.1	2	2.5
Control (non added)	—	—	—	10.0

Conditions of crystallization: NaCl 5%, pH 4.5, temp. 4°C, lysozyme 2%, other proteins 3%.

果的に働くことが認められた。

5) 活性剤添加によるリゾチーム塩酸塩の直接結晶化

Alderton らは, pH 9.5 付近で, 卵白から LZ を直接結晶化させているが, 酸性領域ではいまだ成功していない。そこで, 本効果の応用を試みた。すなわち, 卵白をホモジナイズ後, 2N NCl で pH を 4.5 とし, 生じた浮遊物を除いた。つぎに, 硬化ヒマシ油ポリオキシエチレン誘導体 (Nikkol HCO-60) を 2% 濃度に添加し, NaCl 5%, 4°C で 1 週間静置したところ, クリヤカットな結晶の析出を認め, 溶菌活性より LZ であることを確認した。

6) 活性剤添加リゾチーム結晶標品中の活性剤含量

1) で得られた精製 LZ 塩酸塩結晶標品中の活性剤含量を測定した。活性剤の定量には, 根本⁽⁸⁾の方法を適用し, 一定濃度 LZ 共存下で行った。すなわち, 分取した結晶を, 冷 5% NaCl 溶液で洗浄しただけの結晶 (標品-I), 標品-I を 10 倍量のアセトンで処理した結晶 (標

品-II), 標品-I を 3 日間透析処理後, 凍結乾燥した粉末 (標品-III) を調製した。これら標品中の活性剤含量は, 乾物当り, それぞれ 0.6%, 0.3%, 0.6% であった。

- (1) K. Hayashi, K. Kugimiya, T. Imoto, M. Funatu and C. C. Bigelow : *Biochem.*, **7**, 1461 (1968).
- (2) K. Hayashi, K. Kugimiya, T. Imoto, M. Funatu and C. C. Bigelow : *ibid.*, **7**, 1467 (1968).
- (3) G. N. Smith and C. Stocker : *Arch. Biochem. Biophys.*, **21**, 383 (1949).
- (4) N. N. Glassman and D. M. Molnar : *ibid.*, **32**, 170 (1951).
- (5) 松岡芳隆, 中野賢二, 日高義雄 : 薬剤学, **28**, 272 (1966).
- (6) G. Alderton and H. L. Fevold : *J. Biol. Chem.*, **164**, 1 (1946).
- (7) G. Litwack : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **89**, 401 (1955).
- (8) 根本嘉郎 : 名古屋市工研報告, **13**, 33 (1956).