

学位論文題名

ミセル水性二相分配法によるタンパク質の

高性能分離に関する研究

学位論文内容の要旨

バイオテクノロジーの実用化において、それを支援するための分離・精製・回収といったプロセス生産技術の確立は重要な課題である。現在、タンパク質の分離精製は主にカラム法によって行なわれているが、熟練と数週間の時間を要するため、プロセス工学的に望ましい分離法とは言い難い。

工学的生産プロセスに応用しうるタンパク質の分離法として、ミセル水性二相分配法が有望視されている。これは、非イオン界面活性剤ミセル水溶液が曇点と呼ばれる温度以上で、界面活性剤ミセルが濃縮した相（界面活性剤相）と界面活性剤をほとんど含まない相（水相）の二相に分離する現象に基づいた液液抽出法である。しかし、この方法は、実験室レベルでの分離、中でも前処理法としての利用にとどまっており、タンパク質の分配挙動に関する詳細な検討はなされていない。そのため、分離法としての基礎が充分確立されていないのが現状である。

このような観点から本論文では、ミセル水性二相分配法によるタンパク質の高性能分離法の確立を目的とし、新規な二相分離系を探索するとともに、タンパク質の分配挙動の解明ならびにその制御に関する検討を行った。タンパク質として肝ミクロゾーム中の電子伝達系膜タンパク質について検討した結果、界面活性剤と水溶性ポリマーの混合水溶液という新たな二相分離系を用いることにより、従来のミセル水性二相分配法では困難であった膜タンパク質間の分離が可能になることを明らかにした。本論文はそれらの経緯をまとめたもので、全7章から構成されている。各章の概要は以下の通りである。

第1章は序論であり、タンパク質分離精製の現状と問題点を述べている。また、界面活性剤ミセル水溶液の二相分離現象ならびにミセル水性二相分配法を用いたタンパク質分離に関する研究を概観し、本論文の背景と目的とを明らかにしている。

第2章では、タンパク質の分離に用いることのできる界面活性剤ミセル水溶液の二相分離系の探索を行っている。ミセル水溶液の相分離温度に及ぼす塩や水溶性ポリマー、ポリオールなどの添加効果を検討した結果、単独では二相分離しないアルキルグルコシド系界面活性剤がポリエチレングリコールやデキストランなどの水溶性ポリマーの添加によって二相分離する新規な現象を見出している。この二相分離系は従来の相分離系と異なり、相

分離温度の低温側で二相分離することを明らかにしている。また、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤であるTriton X-114も水溶性ポリマーや塩の添加によって相分離が促進されることを見出している。次いで、これら二相分離系を用いてタンパク質の分配挙動を検証している。さらに、Triton X-114とアルキルグルコシド系界面活性剤の系とを比較し、両系におけるタンパク質の分配挙動の違いが界面活性剤とタンパク質との特異相互作用の違いに起因していることを論証している。

第3章では、膜タンパク質のミセル水性二相分配に先立って行う可溶化について、ミクロゾーム中の電子伝達系膜タンパク質を対象に検討している。アルキルグルコシド系界面活性剤を用いたとき、チトクロム b_5 とNADPH-チトクロムP450還元酵素はそのほとんどが可溶化されたのに対し、チトクロムP450およびNADH-チトクロム b_5 還元酵素は可溶化されないことを見出している。また、このような高い選択性は他の界面活性剤では見られないことを明らかにしている。さらに、アルキルグルコシド系界面活性剤の高い可溶化選択性を利用して、チトクロムP450とチトクロム b_5 を簡便に分離する方法を提案している。

第4章では、アルキルグルコシド系界面活性剤ミセル水溶液と水溶性ポリマー混合水溶液からなる二相分離系において、タンパク質の分配に及ぼすポリマー電荷の影響について検討している。ポリエチレングリコールやデキストランのような非荷電ポリマーを用いると、水溶性タンパク質はポリマーを含んだ水相に、疎水的な膜タンパク質は界面活性剤相に抽出されることを見出している。一方、ジエチルアミノエチルデキストランのような荷電ポリマーを用いると、タンパク質の分配は親疎水性だけでなく、タンパク質の電荷によっても大きく左右されることを見出し、水溶性ポリマーに機能性置換基を導入することにより膜タンパク質の選択的な分離が可能になると述べている。実際に、オクチルチオグルコシド-ジエチルアミノエチルデキストラン二相分離系において、肝ミクロゾーム中のチトクロム b_5 とチトクロムP450の迅速分離が可能になり、電荷の効果を検証している。

第5章では、Triton X-114ミセル水溶液と水溶性ポリマーの混合水溶液のからなる二相分離系について、第4章と同様にタンパク質の分配に及ぼす電荷の効果について検討している。この二相分離系においても、非荷電ポリマーを用いた場合には、主にタンパク質の親疎水性によって、荷電ポリマーを用いるとタンパク質との静電的相互作用によって分配が制御されることを見出している。さらにTriton X-114-硫酸デキストラン二相分離系でチトクロム b_5 の選択的な分離が可能であることを見出し、実際に肝ミクロゾーム中のチトクロム b_5 の精製に応用して有効性を確かめている。

第6章では、ポリエチレンオキシド(PEO)とポリプロピレンオキシド(PPO)からなるトリブロックコポリマー(Pluronic)の水溶液が二相分離することに着目し、この二相分離系におけるタンパク質の分配挙動について検討している。PPO-PEO-PPO型とPEO-PPO-PEO型のPluronicについてタンパク質の抽出を行った結果、水溶性タンパク質であるチトクロム c はいずれの場合もほとんど抽出されないのに対し、疎水性のチトクロム b_5 はPEO-PPO-PEO型のPluronicを用いた場合のみ界面活性剤相に抽出されることを見出している。また、チトクロム b_5 の抽出挙動の違いは、二つのタイプのPluronicのミセル構造の違いに起因することを示唆している。従来 of 界面活性剤単独の二相分離系において、このような界

面活性剤の構造のわずかな違いに起因する抽出挙動の極端な違いが見られないことから、この二相分離系を用いた膜タンパク質の新たな分離法の可能性を論証している。

第7章では、以上の結果を総括している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 寛 人
副 査 教 授 木 下 晋 一
副 査 教 授 棟 方 正 信
副 査 助 教 授 上 館 民 夫

学 位 論 文 題 名

ミセル水性二相分配法によるタンパク質の 高性能分離に関する研究

タンパク質は生体の構造と機能の基本的な担い手であり、構造と機能の解明にはまず、個々のタンパク質を単離することが必要である。タンパク質の中でも、膜内在性の疎水性タンパク質は疎水性相互作用によって膜と強固に結合しているため、その単離は面倒である。疎水性膜タンパク質の分離の第一段階は、膜タンパク質を水溶液中に可溶化することであり、現在この目的に、界面活性剤ミセル溶液への可溶化がよく利用されている。第二段階は、可溶化された膜タンパク質をカラムクロマトグラフィーで精製する過程である。実際にはイオン交換、ゲルろ過、疎水性、アフィニティーなど、分離モードの異なる各種カラムをシリーズにつなぎ、吸脱着操作を繰り返すため、精製に長時間を要する。従って、迅速、簡便な前分離法を併用して、カラムクロマトグラフィーの負荷を低減することが重要となる。

このような見地から、非イオン界面活性剤ミセル水溶液が曇点と呼ばれる温度以上で、界面活性剤の濃厚相（界面活性剤相）と水相に分離することを利用するミセル水性二相分配法が注目されている。しかし利用し得る界面活性剤が限られ、それらの相分離温度が比較的高いなどの問題が多く、従って、膜タンパク質の分離技術として高度化をはかることが重要な課題となる。

本論文は、このような観点から、新規な二相分離系を探索して、それら系における膜タンパク質の分配挙動を検討し、ミセル水性二相分配法の高性能化をはかる方法を提案したもので、主な成果は次の点に要約される。

(1) 非イオン界面活性剤ミセル溶液の相分離に及ぼすポリエチレングリコールなどの水溶性ポリマーの効果を調べ、単独では相分離しないアルキルグルコシド系界面活性剤ミセル溶液が相分離温度の低温側で二相分離することを明らかにし、低温で、膜タンパク質を界面活性剤相に抽出できることを見いだした。これにより、可溶化から相分離に至る操作を一貫して行うことができることを指摘した。また、単独でも相分離する Triton X-114 の相分離温度も水溶性ポリマーにより、低下することを見いだした。さらに、水溶性ポリマーと界面活性剤の性質を併せ持つトリブロックコポリマー水溶液の二相分離系を着想して、タンパク質の分配挙動を検討し、この新規二相分

離系も膜タンパク質の分離に有効であることを見いだした。

(2) 肝ミクロゾーム中の電子伝達系膜タンパク質を対象に、アルキルグルコシド系界面活性剤ミセル溶液への可溶化を検討し、チトクロム b_5 と NADPH-チトクロム P450還元酵素が可溶化されるのに対し、チトクロム P450 及び NADH-チトクロム b_5 還元酵素は可溶化されないことを見だし、このような可溶化選択性を利用して、チトクロム P450 とチトクロム b_5 を迅速に分離できることを明らかにした。

(3) 非イオン性の水溶性ポリマー共存下で、タンパク質の抽出は主にその親・疎水性に依存するが、陽イオン性のジエチルアミノエチルデキストランあるいは陰イオン性の硫酸デキストラン共存下では、膜タンパク質の分配がそれ自身の電荷に強く依存することを見だし、機能性置換基をもつ水溶性ポリマーによって、膜タンパク質の分配を制御できることを明らかにした。また、トリブロックコポリマーの二相分離系では、膜タンパク質の抽出選択性がトリブロックコポリマーのミセル構造に強く依存することを見だし、膜タンパク質の分配を制御する新たな可能性を指摘した。

(4) 陽イオン性あるいは陰イオン性の水溶性ポリマーを併用するミセル水性二相分配法を実試料に応用し、肝ミクロゾーム中のチトクロム b_5 とチトクロム P450 の精製における有用性を実証した。

これを要するに、著者は、ミセル水性二相分配法における膜タンパク質の二相間分配を水溶性ポリマーで規制する新手法を提案しているもので、分離化学と生物機能化学の進歩に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。