

# 界面活性剤による沈殿生成とアセトンによる沈殿溶解を利用したタンパク質の回収・分離

衣笠 巧\* 直井美幸\* 石川圭太\*\* 青野綾太\*  
内田 唯\* 伊藤仁美\* 西井靖博\*

## Recovery and Separation of Proteins using Precipitate Formation by Surfactants and Precipitate Solubilization by Acetone

Takumi KINUGASA\* Miyuki NAOI\* Keita ISHIKAWA\*\* Ryota AONO\*  
Yui UCHIDA\* Hitomi ITOH\* Yasuhiro NISHII\*

The separation of proteins, lysozyme and ribonuclease A, was attempted by using the precipitate formation of surfactants, sodium di(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT), and proteins in an aqueous solution. The AOT molecules bonded to the protein surface by electrostatic interaction to form the water insoluble complex, and then the complexes were aggregated and precipitated. The ratio of precipitation was decreased with an increase in salt concentration because of the electrostatic screening effect, and increased with an increase in AOT concentration. No precipitate was formed in the pH range above the isoelectric point of protein, because the protein was electrostatically repulsed with the AOT molecules. The precipitate was dissolved in acetone and the surfactant-free-protein was recovered by addition of a small amount of salt solution into the acetone phase. The ratio of protein recovery was influenced by the salt concentration in the feed protein solution. The conformation and enzyme activity of lysozyme recovered were kept with the native ones. Ribonuclease-A retained its original conformation in the range of an AOT concentration below  $0.05 \text{ kmol/m}^3$ .

### 1. 緒言

酵素をはじめとするタンパク質は、化学合成、食品、医薬品、洗剤、環境、エネルギーなどの分野で広く用いられている。一般に、タンパク質は微生物細胞や植物抽出物などから回収され、その精製にはクロマトグラフィや電気泳動が利用される。しかし、これらの方法は高価であり、スケールアップが難しい。そのため新しいタンパク質分離法の開発が求められている。

近年、これらに代わる方法として逆ミセル抽出法が提案されている<sup>[1-3]</sup>。逆ミセルは無極性溶媒中で微量の水をコアとして界面活性剤が会合したナノスケールの自発的分子集合体である。この微小水相は界面活性剤分子によって有機溶媒から隔離されているため、タンパク質が変性することなく逆ミセルの内部に取り込まれる。通常、逆ミセル抽出法ではタンパク質水溶液と逆ミセルを形成した有機溶液を接触させることで、タンパク質を逆ミセル溶液へと抽出する。多くの研究において、逆ミセルへのタンパク質抽出

の推進力がタンパク質と界面活性剤親水基との静電的相互作用であることが示唆されている<sup>[4,7]</sup>。抽出されたタンパク質を逆ミセル内に取り込んだまま利用することはほとんどなく、逆ミセル溶液から回収しなければならない。回収のためには逆抽出法がよく用いられる。すなわち、タンパク質を含む逆ミセル溶液を新たな水溶液と接触させ、界面活性剤との相互作用を弱くして水相へ移動させる。しかし、タンパク質の逆抽出率は低いことが多く、逆抽出速度も小さい<sup>[6,8]</sup>。そのため、タンパク質回収のための別の方法が試みられてきた<sup>[9-12]</sup>。

Shin ら<sup>[13,14]</sup>は、逆ミセル抽出法の原理を応用して界面活性剤との沈殿形成および極性有機溶媒による回収という方法を提案した。タンパク質は水中でイオン性界面活性剤と不溶性の複合体を形成し、凝集して沈殿する。この沈殿は極性有機溶媒に溶解し、これに電解質水溶液を極少量添加することでタンパク質の結晶が極性有機溶媒から沈殿分離し、界面活性剤は極性有機溶媒に残る。この方法は、逆ミセル抽出法に比べて、低い界面活性剤濃度で分離が可能

平成 26 年 10 月 6 日受付 ( Received Oct.6, 2014 )

\* 新居浜工業高等専門学校生物応用化学科 ( Department of Applied Chemistry and Biotechnology, National Institute of Technology, Niihama College, Niihama, 792-8580 Japan )

\*\* 新居浜工業高等専門学校専攻科生物応用化学専攻 Advanced Engineering Course Applied Chemistry and Biotechnology Program, National Institute of Technology, Niihama College, Niihama, 792-8580 Japan )

あり、かつ無極性溶媒を使用しない点が特徴である。Shinらの研究では、タンパク質と界面活性剤との沈殿形成については論じているが、アセトンによる沈殿の回収に関しては詳しくない。逆ミセル抽出法においても回収過程がキープポイントであったように、回収法の確立が非常に重要である。そこで本研究では、この界面活性剤を用いた沈殿分離法を利用してリゾチームとリボヌクレアーゼ-A の分離を試み、沈殿回収についても詳細に検討する。

## 2. 実験

タンパク質として、ニワトリ卵白リゾチーム (分子量 14,300、等電点 11) とウシ膀胱リボヌクレアーゼ-A (分子量 13,700、等電点 9.6)、界面活性剤としてビス(2-エチルヘキシル)スルホコハク酸ナトリウム (AOT) を用いた。

タンパク質-界面活性剤複合体の沈殿形成と極性有機溶媒によるタンパク質回収は次の手順で行った (Fig.1)。

- Step 1 0.5 kg/m<sup>3</sup> タンパク質水溶液 5 mL に様々な濃度  $C_S$  の AOT 水溶液 0.5 mL を加え、5 秒間振り混ぜた後、しばらく静置する。このときタンパク質-界面活性剤複合体が形成される。
- Step 2 これを遠心分離して沈殿と上澄みに分け、上澄みを取り除いた後、沈殿を蒸留水で洗浄する。
- Step 3 沈殿に極性有機溶媒 5 mL を加えて溶解させると透明な液を得る。
- Step 4 これに 0.1 kmol/m<sup>3</sup> の NaCl 水溶液 10  $\mu$ L を加えると、タンパク質が沈殿する。
- Step 5 静置後、遠心分離して沈殿と上澄みに分け、上澄みを取り除いた後、沈殿を極性有機溶媒で洗浄する。
- Step 6 極性有機溶媒を完全に除去した後、沈殿に蒸留水 5 mL を加えて溶解し、回収タンパク質水溶液を得る。

原料タンパク質濃度  $C_F$ 、Step 2 の上澄み水溶液中のタンパク質濃度  $C_{CL}$ 、回収タンパク質濃度  $C_R$  は紫外分光光度計 (島津 UV-1600) で測定された。沈殿生成率  $P$ 、沈殿溶解率  $S$ 、タンパク質回収率  $R$  をそれぞれ次式で定義した。

$$P = \frac{C_F V_F - C_{CL} V_{CL}}{C_F V_F} \quad (1)$$

$$S = \frac{C_R V_R}{C_F V_F - C_{CL} V_{CL}} \quad (2)$$

$$R = P \times S = \frac{C_R V_R}{C_F V_F} \quad (3)$$

ただし、 $V_F$ 、 $V_{CL}$ 、 $V_R$  はそれぞれ原料水溶液、Step 2 の上澄み水層、Step 6 の回収水溶液の体積である。タンパク質混合物の分析は液体クロマトグラフィ (日立 L-2130, L-4250, D-2500) によって、陽イオン交換カラム (東ソー TSKgel BioAssist S) を用いて行った。

タンパク質の CD スペクトルは円二色性分散計 (日本分光 J-805) によって測定し、アミノ酸残基当たりのモル楕円率を求めた。また、水溶液中の AOT の濃度はローダミン 6G 色素法によって測定した [15]。

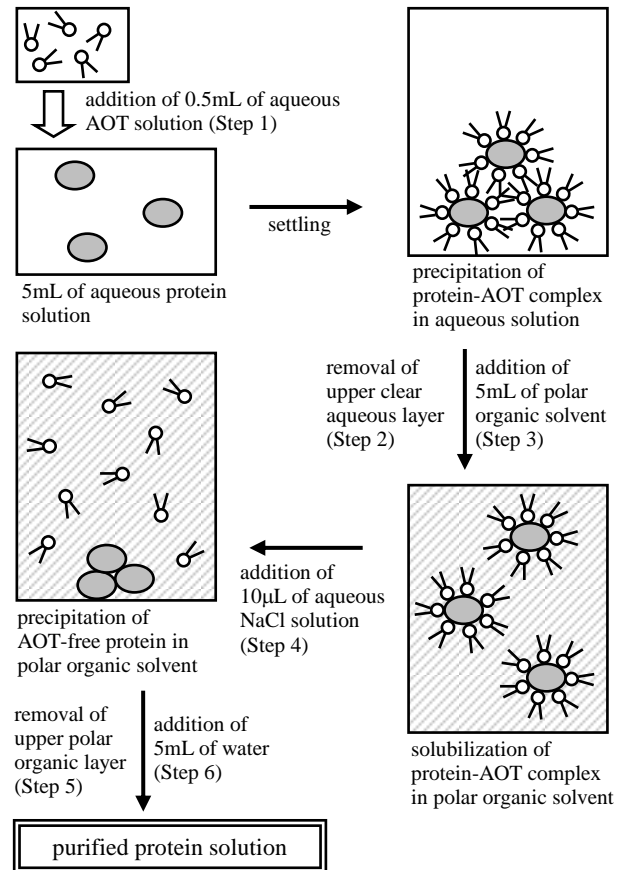


Fig.1 Schematic procedure of the protein recovery method performed in this study<sup>[13,14]</sup>.

## 3. 結果と考察

### 3-1 回収溶媒の選択

Step 3 で沈殿溶解に用いる適切な極性有機溶媒を選定するために 5 種類の溶媒を試した。その結果を Table 1 に示す。Step 3 において、リゾチーム-AOT 複合体の沈殿は 1-プロパノール、2-プロパノール、アセトンには溶解したが、エタノールには少量のみが溶解、エチレングリコールにはほとんど溶けなかった。複合体の沈殿はオクタノール/水分配係数  $P_{OW}$  が大きく、親水性の低い溶媒の方が溶けやすかった。リゾチームは AOT で疎水化されて水中で沈殿すると考

Table 1 Effect of kind of polar solvents on solubilization and precipitation of lysozyme.

solvent	solubilization	precipitation	$\log P_{OW}$ <sup>[16]</sup>
1-propanol	○	×	0.25
2-propanol	○	×	0.02
acetone	○	○	-0.24
ethanol	△	—	-0.32
ethylene glycol	×	—	-1.93

※  $P_{OW}$ : octanol/water partition coefficient

えられるので、親水性の高い溶媒には溶けにくいと推測できる。また、複合体の沈殿が溶解した3種類の溶媒の中で、Step 4においてリゾチームの沈殿が確認されたのはアセトンのみであった。この理由は明確ではないが、アセトン以外では NaCl 水溶液の添加による静電遮蔽効果が小さく、AOT がリゾチームから離れなかったと考えるべきであろう。以上より、アセトンが最も適切であるとわかった。

### 3-2 リゾチームの沈殿生成と回収

Fig.2(a)は、様々な NaCl 濃度  $C_E$  におけるリゾチームの沈殿生成率  $P$  を AOT 濃度  $C_S$  に対してプロットしたものである。 $C_S$  はタンパク質水溶液に添加する前の AOT 水溶液の濃度であることに注意する必要がある。これによると、AOT 濃度が高くなるにつれて沈殿生成率は高くなっており、AOT がリゾチームに結合して沈殿を生成していることがわかる。また、NaCl 濃度が高いほど沈殿生成率は低くなっている。高い NaCl 濃度では、静電遮蔽効果によって AOT とタンパク質の間の静電的引力が弱くなったためと考えられる。Fig.2(a)より、NaCl を含まないとき、 $C_S = 4 \text{ mol/m}^3$  で沈殿生成率が 100%に達した。このとき、リゾチーム 1 分子当たり結合している AOT の分子数は 11.4 個である。この値は、Shin ら<sup>[13]</sup>が求めたリゾチームの沈殿生成に最小限必要な AOT 分子数 10 にほぼ一致する。中性付近のリゾチーム表面の正電荷は 18 であり、その約 6 割に AOT が結合することにより、リゾチームの水への溶解性が低下して沈殿生成したと考えられる。

Fig.2(b)は、リゾチームの沈殿溶解率  $S$  を AOT 濃度  $C_S$  に対してプロットしている。NaCl を含まないとき沈殿溶解率はかなり小さく、NaCl 濃度が高くなるにつれて大きくなり、 $1.0 \text{ kmol/m}^3$  のとき、AOT 濃度  $3 \text{ mol/m}^3$  以上の範囲で 90%に達した。NaCl はタンパク質と AOT の静電的引力を弱めるのに寄与する。そのため、Step 1 で沈殿が生成するときに共沈した NaCl が Step 3 の沈殿溶解を促進したと考えられる。また、NaCl 濃度 0 および  $1.0 \text{ kmol/m}^3$  のとき、AOT 濃度の増加につれて沈殿溶解率は単調に増加したが、NaCl 濃度  $0.1 \text{ kmol/m}^3$  では AOT 濃度  $4 \text{ mol/m}^3$  付近で最大となった。AOT が少ないと沈殿の疎水性が小さく、Step 3 でアセトンに溶解しにくかったと考えられる。一方、AOT が多すぎると Step 4 で余分な AOT が完全にタンパク質から離れず、アセトン中でタンパク質の沈殿が生成しにくかったと推測される。

Fig.2(c)は、リゾチームの回収率  $R$  を示す。NaCl 濃度  $0.1 \text{ kmol/m}^3$ 、AOT 濃度  $4 \sim 5 \text{ mol/m}^3$  のときが最も回収率が高く、90%以上となった。

Fig.3 は、NaCl 濃度がリゾチームの沈殿生成率および回収率に及ぼす影響を示している。上で述べたように、NaCl 濃度が高くなるほど静電遮蔽効果によって沈殿生成率は低くなった。回収率は NaCl 濃度  $0.1 \sim 0.2 \text{ kmol/m}^3$  のときが最も高くなり、これ以上の NaCl 濃度では沈殿生成率と回収率はほぼ等しくなった。沈殿生成率  $P$  と回収率  $R$  の差は、沈殿がアセトンに溶解する過程 (Step 3) や NaCl 水溶液の添加

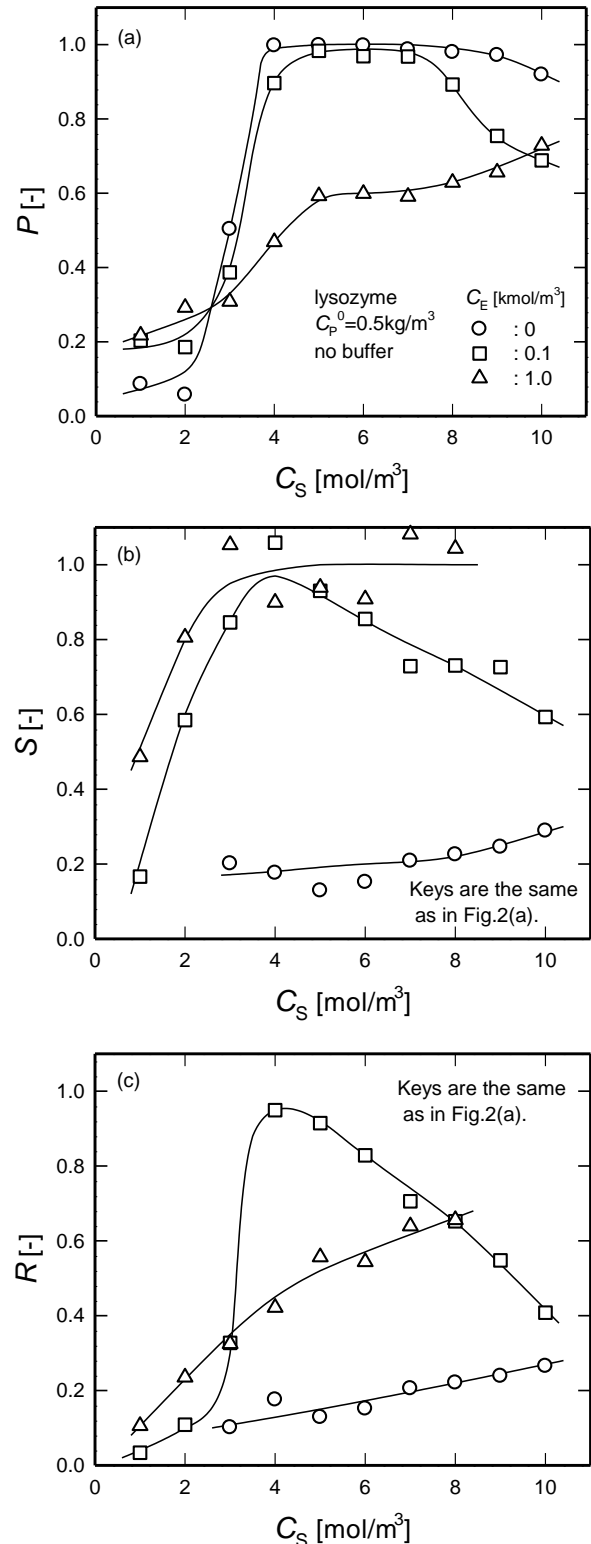


Fig.2 Effect of AOT concentration on (a) the precipitation ratio, (b) solubilization ratio, and (c) recovery ratio of lysozyme.

で再沈殿する過程 (Step 4) において回収されずに損失したタンパク質の割合を示す。すなわち、NaCl 濃度  $0.1 \text{ kmol/m}^3$  以上では、沈殿したタンパク質のほとんどが回収可能であることがわかる。しかし、NaCl を含まないときは AOT とタンパク質の静電的引力が強すぎて沈殿からタンパク質を回

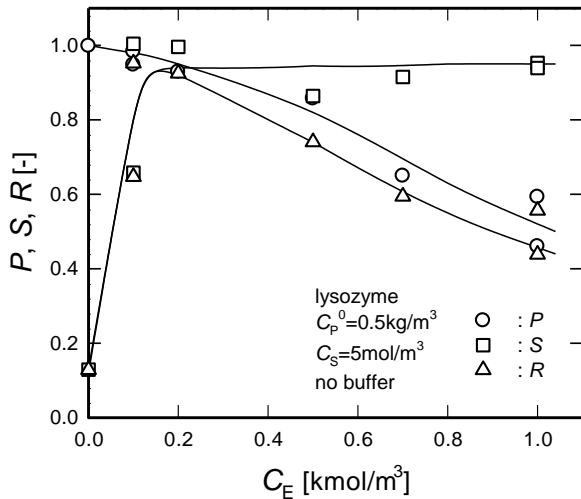


Fig.3 Effect of NaCl concentration on the precipitation, solubilization and recovery ratio of lysozyme.

収できない。Shin ら<sup>[13]</sup>は、アセトンによる回収率について詳細なデータを提示しておらず、単に NaCl を含む場合について完全に回収できたと報告しているが、本研究の結果とは一致しない。

Fig.4 は、様々な pH におけるリゾチームの沈殿生成率、沈殿溶解率、回収率を示す。沈殿生成率は、pH 12 ではほぼ 0 だが、pH 4~11 の広い範囲でほとんど同じであった。リゾチームの等電点は 11 なので、それより高い pH ではリゾチームの表面電荷は負となり、AOT と静電的に反発してタンパク質-AOT 複合体を形成できないため、沈殿が生成しなかったと考えられる。等電点以下の pH では pH が低いほど AOT との相互作用が強いと推測されるが、沈殿生成率に差は見られなかった。沈殿溶解率はある AOT 濃度で最大値を示し、その値は pH が低いほど大きかった。この理由は明らかでない。回収率は沈殿溶解率と似た傾向になり、pH 4、AOT 濃度  $3 \sim 4 \text{ mol/m}^3$  のときが最も回収率が高く、約 90% となった。なお、 $C_s = 8 \text{ mol/m}^3$  以上でやや沈殿生成率が低下した結果については、タンパク質-AOT 複合体が形成された後、その疎水性表面に過剰の AOT の疎水基が結合することで、複合体が親水化することが原因と推測される。

### 3-3 リボヌクレアーゼ-A の沈殿生成と回収

Fig.5 には、様々な NaCl 濃度  $C_E$  の系におけるリボヌクレアーゼ-A の沈殿生成率、沈殿溶解率、回収率を示す。NaCl を含まない場合に、AOT 濃度  $6 \text{ mol/m}^3$  以上のデータがないのは、沈殿ができずに上澄み相が濁ってしまい吸光度法によるタンパク質濃度測定ができなかったためである。この原因としてタンパク質-AOT 複合体の凝集度が小さいことが考えられるが、24 時間経過しても改善されなかった。リボヌクレアーゼ-A の沈殿生成率は、AOT 濃度が高くなるほど高く、NaCl 濃度が高い方が小さくなった。これはリゾチームと同様の傾向である。また、リゾチームに比べてリボヌクレアーゼ-A の方が全般に沈殿生成率は小さかった。

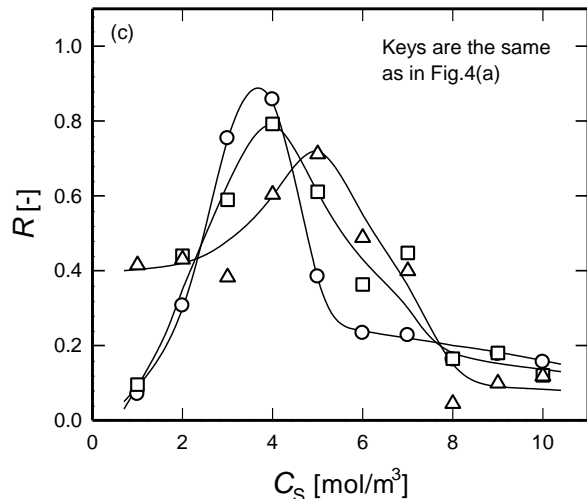
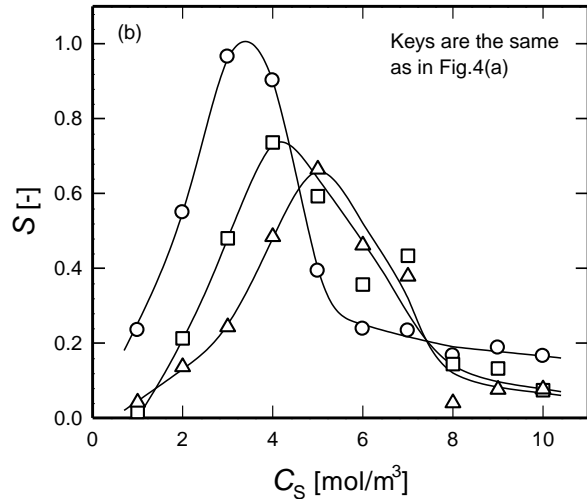
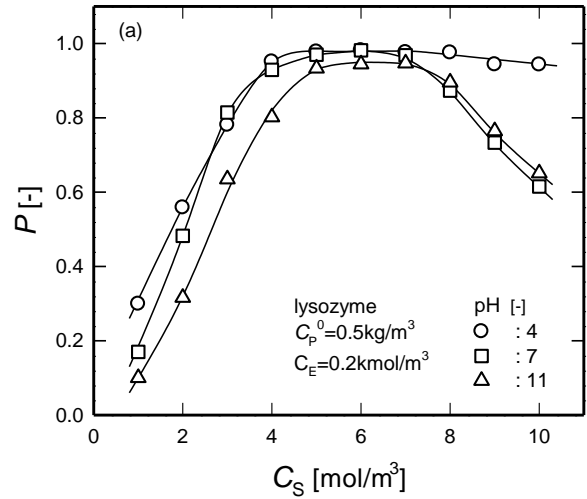


Fig.4 Effect of pH on (a) the precipitation ratio, (b) solubilization ratio, and (c) recovery ratio of lysozyme.

リボヌクレアーゼ-A の等電点は 9.6 はリゾチームの等電点 11 より小さく、同じ pH においてリボヌクレアーゼ-A の方がリゾチームに比べて表面の正電荷が少ないためと考えられる。逆ミセル抽出法においても、リボヌクレアーゼ-A の抽出率はリゾチームに比べて小さく、その原因のひとつに

AOT との静電的相互作用が弱いことが挙げられている<sup>6)</sup>。

リボヌクレアーゼ-A の沈殿溶解率は、NaCl を含まないときはほとんど 0 であり、 $1.0 \text{ kmol/m}^3$  のときは AOT 濃度  $2 \text{ mol/m}^3$  以上でばらつきはあるものの 40~70% の範囲にあった。リゾチームと比べて全般的な低い値となったが、AOT

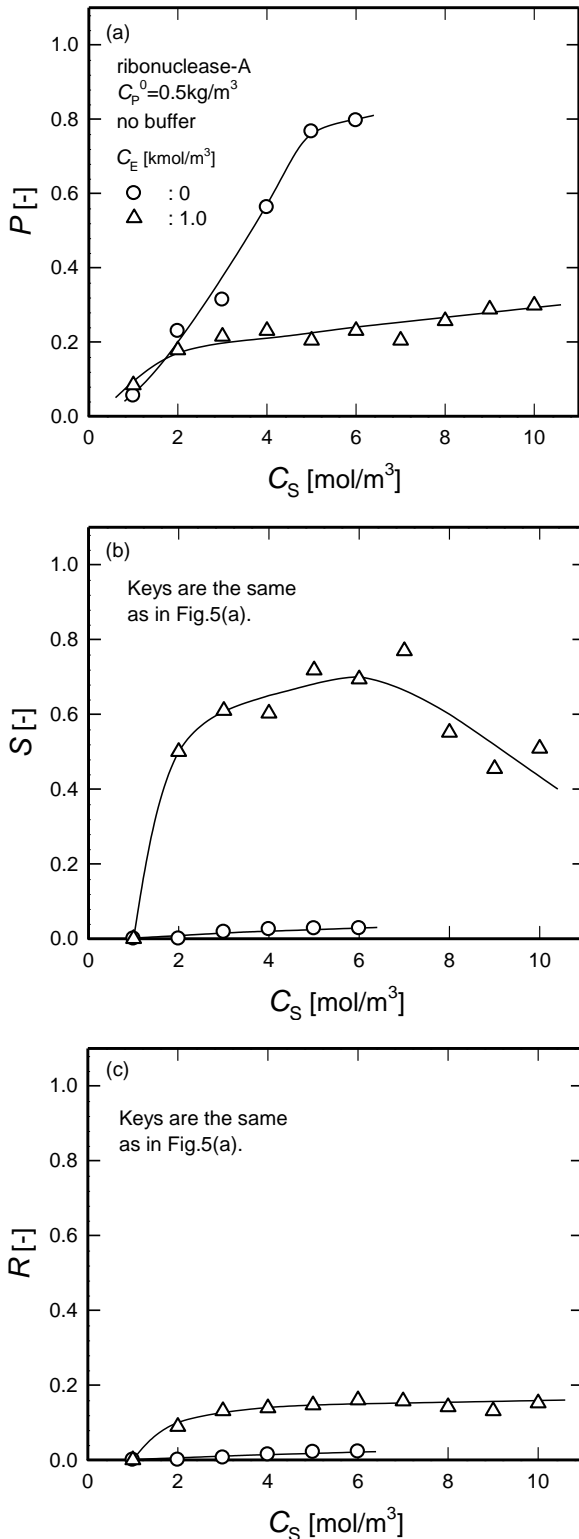


Fig.5 Effect of AOT concentration on (a) the precipitation ratio, (b) solubilization ratio, and (c) recovery ratio of ribonuclease-A.

との静電的相互作用が小さいとすれば、リボヌクレアーゼ-A の沈殿溶解率の方が高くなると推測される。この不一致の原因は明らかでない。以上の結果としてリボヌクレアーゼ-A の回収率は 20% に満たなかった。なお、Shin ら<sup>14)</sup> はリボヌクレアーゼ-A について沈殿からの回収率が 50~100% であったと報告しているが、回収率に与える操作パラメータの影響については触れていない。

リボヌクレアーゼ-A の沈殿生成率に及ぼす pH の影響を調べたところ、AOT 濃度  $5 \text{ mol/m}^3$ 、緩衝液濃度  $0.01 \text{ kmol/m}^3$  のとき、pH 9.4~10.4 の範囲でそれぞれ沈殿生成率は約 7% の一定値であった。リボヌクレアーゼ-A の等電点 9.6 に近い、あるいはこれより高い pH であるため、AOT が静電的に結合しなかったためと考えられる。

### 3-4 リゾチームとリボヌクレアーゼ-A の分離

これらの結果から、リゾチームとリボヌクレアーゼ-A の分離の可能性が示された。そこで、リゾチームとリボヌクレアーゼ-A 混合液に対して分離実験を行った。いくつかの条件で試みた結果、AOT 濃度  $5 \text{ mol/m}^3$ 、緩衝液濃度  $0.01 \text{ kmol/m}^3$ 、pH 9.6 のとき、リゾチームの沈殿生成率 98.4%、

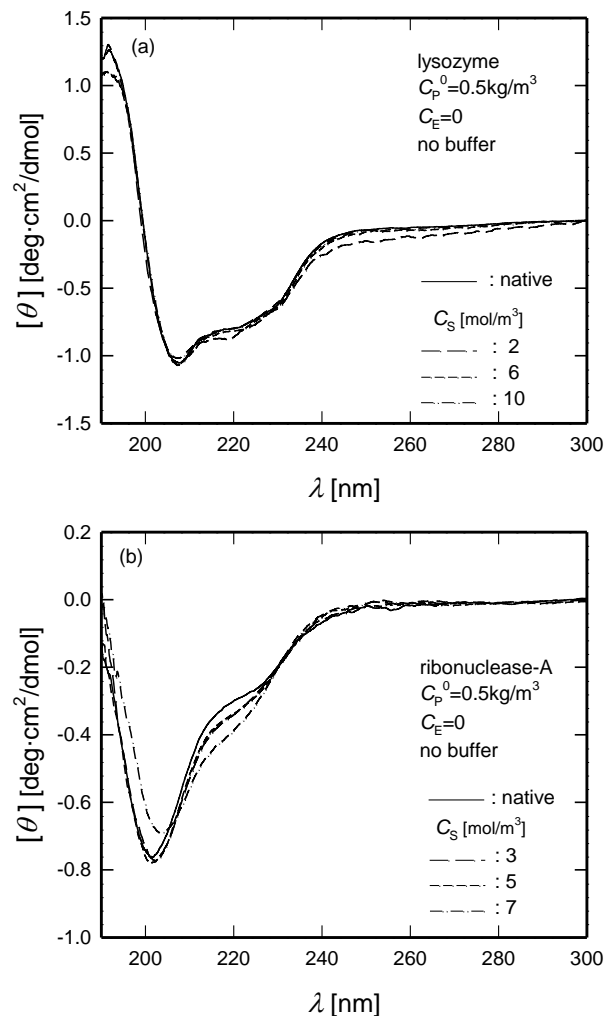


Fig.6 Effect of AOT concentration on CD spectra for (a) lysozyme and (b) ribonuclease-A recovered.

リボヌクレアーゼ-A の沈殿生成率 4.4%、分離度  $1.3 \times 10^3$  の最もよい値を得た。これにより、沈殿生成率の違いを利用したリゾチームとリボヌクレアーゼ-A の分離が可能であることが示された。しかし、実用的には分離度は一般に  $10^4$  以上が必要とされるので、リボヌクレアーゼ-A の沈殿率をさらに下げるとの検討が必要である。

### 3-5 回収されたタンパク質の構造

Fig.6 は、それぞれ様々な AOT 濃度で沈殿された後、回収されたリゾチームとリボヌクレアーゼの CD スペクトルである。回収されたリゾチームの CD スペクトルは、いずれもネイティブなリゾチームとよく一致し、構造変化がないことが明らかになった。一方、回収されたリボヌクレアーゼ-A の CD スペクトルは、AOT 濃度  $5 \text{ mol/m}^3$  以下のときはネイティブなリボヌクレアーゼ-A とほぼ一致した。AOT 濃度  $7 \text{ mol/m}^3$  のときは、ネイティブな構造から少しずれた。202 nm 付近の負のピークが長波長側にシフトし、ピークが小さくなっており、 $\alpha$ -ヘリックス含有量が減少しているように見える。したがって、AOT 濃度は  $5 \text{ mol/m}^3$  以下で操作する必要がある。

また、回収後のタンパク質水溶液中に残存する AOT 濃度はいずれも測定限界以下であり、AOT はほぼ完全に除去されていることがわかった。

## 4. 結論

界面活性剤 AOT を用いたタンパク質の沈殿生成およびアセトンによるタンパク質回収法について、特に沈殿溶解に関して詳しく検討し、以下の結論を得た。

- (1) 界面活性剤として AOT を用いた水溶液中でのタンパク質の沈殿生成は、AOT-タンパク質間の静電的相互作用によって生じることがわかった。沈殿生成率は添加塩による静電遮蔽効果に影響された。
- (2) タンパク質-AOT 複合体の沈殿は、アセトンを用いて溶解・回収できた。沈殿溶解率は、原料タンパク質溶液中の塩濃度が低いと小さくなり、沈殿生成時に共沈した塩が沈殿溶解に寄与していることが示唆された。
- (3) リゾチームの回収率は、沈殿生成と沈殿溶解のバランスに適した塩濃度が存在し、NaCl 濃度  $0.1 \sim 0.2 \text{ kmol/m}^3$  のときが最も高かった。
- (4) リボヌクレアーゼ-A はリゾチームに比べて沈殿生成率も沈殿溶解率も低かった。沈殿生成率が低かった原因は AOT との静電的相互作用が弱いためだと考えられるが、沈殿溶解率が低くなった理由は明らかでない。
- (5) リゾチームとリボヌクレアーゼ-A の沈殿生成挙動の違いを利用して、相互分離が可能であった。
- (6) 回収されたリゾチームはネイティブなコンフォメーションを維持していた。リボヌクレアーゼ-A は、AOT 濃度が  $5 \text{ mol/m}^3$  以下では構造変化が観測されなかったが、それ以上では若干の変化が見られた。

## 引用文献

- [1] P.L. Luisi, M. Giomini, M.P. Pileni, B.H. Robinson: "Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules", *Biocim. Biophys. Acta*, Vol.947, pp.209-246 (1991)
- [2] T.A. Hatton: "Reversed micellar extraction of proteins", in "Surfactant-based separations", ed. by J.F. Scamehorn, J.H. Harwell, Marcel Dekker Inc., New York, pp.55-90 (1989)
- [3] M. Dekker, R. Hilhorst, C. Laane: "Isolating enzymes by reversed micelles", *Anal. Biochem.*, Vol.178, pp.217-226 (1989)
- [4] K.E. Goklen, T.A. Hatton: "Liquid-liquid extraction of low molecular-weight proteins by selective solubilization in reversed micelles", *Sep. Sci. Technol.*, Vol.22, pp.831-841 (1987)
- [5] M.E. Leser, P.L. Luisi: "Application of reverse micelles for the extraction of amino acids and proteins", *Chimica*, Vol.44, pp.270-282 (1990)
- [6] T. Kinugasa, S. Tanahashi, H. Takeuchi: "Extraction of lysozyme using reversed micellar solution: Distribution equilibrium and extraction rates", *Ind. Eng. Chem. Res.*, Vol.30, pp.2470-2476 (1991)
- [7] T. Kinugasa, A. Kondo, E. Mouri, S. Ichikawa, S. Nakagawa, Y. Nishii, K. Watanabe, H. Takeuchi: "Effects of ion species in aqueous phase on protein extraction into reversed micellar solution", *Sep. Purif. Technol.*, Vol.31, pp.251-259 (2003)
- [8] T. Nishiki, I. Sato, A. Muto, T. Kataoka: "Mass transfer characterization in forward and back extractions of lysozyme by AOT-isoctane reverse micelles across a flat liquid-liquid interface", *Biochem. Eng. J.*, Vol.1, pp.91-97 (1998)
- [9] M.E. Leser, K. Mrkoci, P.L. Luisi: "Reverse micelles in protein separation: The use of silica for the back-transfer process", *Biotechnol. Bioeng.*, Vol.41, pp.489-492 (1993)
- [10] S. Jarudilokkul, L.H. Poppenborg, D.C. Stuckey: "Backward extraction of reverse micellar encapsulated proteins using a counterionic surfactant", *Biotechnol. Bioeng.*, Vol.62, pp.593-601 (1999)
- [11] D.S. Mathew, R.S. Juang: "Improved back extraction of papain from AOT reverse micelles using alcohols and a counter-ionic surfactant", *Biochem. Eng. J.*, Vol.25, pp.219-225 (2005)
- [12] X.H. Sun, K.X. Zhu, H.M. Zhou: "Optimization of a novel backward extraction of defatted wheat germ protein from reverse micelles", *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.*, Vol.10, pp.328-333 (2009)
- [13] Y.O. Shin, M.E. Weber, J.H. Vera: "Reverse micellar extraction and precipitation of lysozyme using sodium di(2-ethylhexyl) sulfosuccinate", *Biotechnol. Prog.*, Vol.19, pp.928-935 (2003)
- [14] Y.O. Shin, E. Rodil, J.H. Vera: "Surfactant precipitation and polar solvent recovery of  $\alpha$ -chymotrypsin and ribonuclease-A", *Biochem. Eng. J.*, Vol.17, pp.91-97 (2004)
- [15] E. Orthgeiss, B. Dobias: "Colorimetric determination of anionic surfactants", *Tanside, Surfactants and Detergents*, Vol.27, pp.226-228 (1990)
- [16] 国際化学物質安全性カード (ICSC) 日本語版, 国立医薬品食品衛生研究所, <http://www.nihs.go.jp/ICSC/>