

タンパク質多層集積構造を利用して バイオテクノロジーを飛躍させる研究

「形とはたらき」領域 齋藤 恭一

要 旨

多孔性中空糸膜の内部孔の表面に、放射線を利用してラジカルをつくり、それを基点として高分子鎖を取りつけた。その高分子鎖に電荷を与えると、荷電反発によって高分子鎖が孔に向かってブラシのように立ち上がる。こうしてできた鎖と鎖の間にタンパク質が多層で、例えば40層も集積することを見出した。この多孔性中空糸膜の孔の上でできた「タンパク質多層集積構造」を3つのバイオ技術に活用した。すなわち、タンパク質の高速・高濃縮な精製、アミノ酸の高速・完全なキラル分離、そして高活性な固定化酵素反応を、「タンパク質多層集積構造」をもつ多孔性中空糸膜という新材料を使って実証した。3つのケースとも、ビーズ内部にタンパク質を多くとも単層で捕まえる従来の材料では実現できなかったことである。

1. 研究のねらい

孔のたくさん開いた（多孔性）中空糸膜（内径2mm、外径3mm、孔の直径0.4 μ m、孔の体積割合70%）に、長さ0.1 μ m程度の高分子鎖を、高密度にしかも膜全体に均一にグラフト（接ぎ木）する（図1）。以後、この高分子鎖をグラフト高分子鎖と呼ぶ。このグラフト高分子鎖へ荷電基（例えば、マイナスの電荷をもつスルホン酸基）を導入すると、高分子鎖がその電荷によって互いに反発して、孔の表面から孔に向かって高分子鎖がブラシのように伸びる。

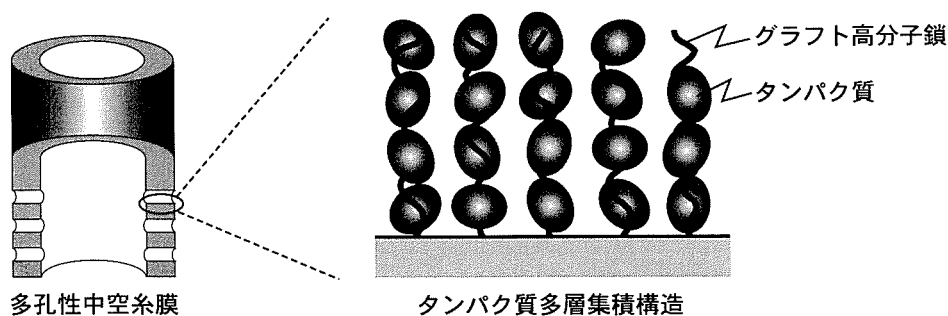


図1 マクロな形+マイクロな形

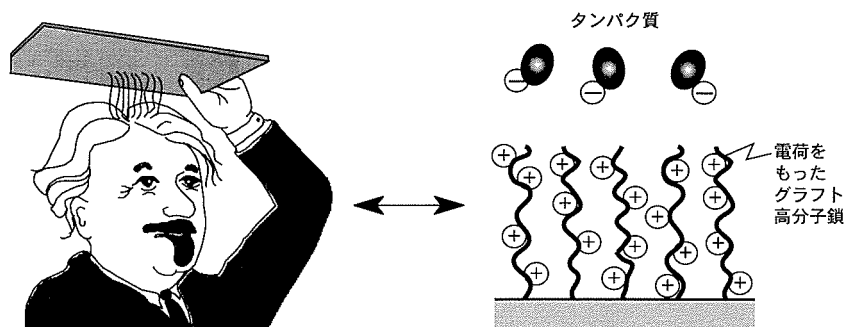


図2 グラフト高分子鎖が伸びてタンパク質を集積するしくみ

これはちょうど、髪の毛をプラスチックの下敷きでこすったときに髪の毛が帯電して立ち上がることに似ている（図2）。荷電基密度を変えることによってこの高分子鎖の伸び具合を制御できる。伸びた高分子鎖間にタンパク質を多層にぎっしり集積させた形を作り出せることを見出した。

この多孔性中空糸膜という“マクロな形”の孔表面上に形成させた「タンパク質多層集積構造」という“マイクロな形”を利用して、(1)タンパク質の高速・高濃縮精製、(2)光学異性体の高速・完全分離、および(3)高活性な酵素反応という3つの高性能なはたらきを実現することを研究のねらいとした。

2. 研究方法と成果

多孔性中空糸膜というマクロな形の孔表面上に、「タンパク質多層集積構造」というマイクロな形を作るところから紹介したい。

荷電基（以後、イオン交換基）をもつグラフト高分子鎖を多孔性膜に固定する経路を図3に示す。中空糸状多孔性膜（ポリエチレン製、内径2mm、外径3mm、孔の直径0.4 μ m、孔の体積割合70%、中空糸というより管と呼ぶにふさわしい）の孔表面に、放射線グラフト重合法（なかでも、前照射法）を適用してエポキシ基をもつモノマー（グリシジルメタクリレート）をグラフト重合し、さらにグラフト高分子鎖中のエポキシ基を、適当な試薬との反応によって、カチオン交換基であるスルホン酸基に、あるいはアニオン交換基であるジエチルアミノ基に変換した。

前照射グラフト重合法では、まず、基材に電子線をあてて基材にラジカルを生成させた。つぎに、モノマー液に浸してラジカルを開始点としてグラフト重合をおこなった。この手法には、ホモポリマーができにくい、そして照射と重合の工程を分けて材料を作成できるという利点がある。ここで、グラフト重合反応およびそれに続くイオン交換基導入反応の度合い

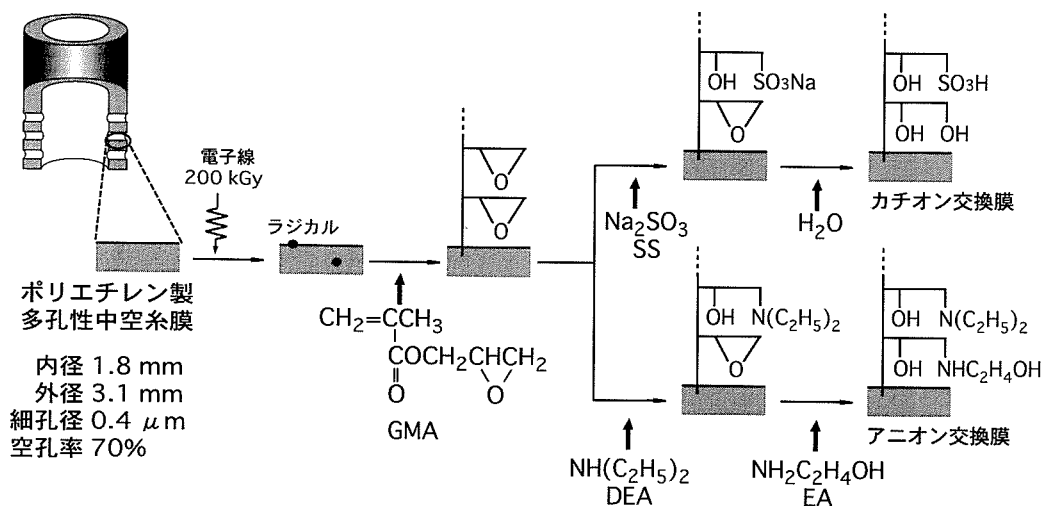


図3 イオン交換基をもつ高分子鎖を多孔性中空糸膜に取りつける経路

を示すために、それぞれグラフト率、転化率をつぎのように定義した。

$$\text{グラフト率 [\%]} = 100 (\text{グラフト高分子鎖の重量}) / (\text{基材の重量}) \quad (1)$$

$$\text{転化率 [\%]} = 100 (\text{イオン交換基のモル数}) / (\text{反応前のエポキシ基のモル数}) \quad (2)$$

得られたイオン交換多孔性中空糸膜の内面から外面へタンパク質溶液を、圧力差をあたえることによって、孔内を透過させ、タンパク質をイオン交換吸着によってイオン交換基をもつグラフト高分子鎖に結合させた。例えば、タンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA、分子量が66000、等電点が4.7) の溶液 (pH 8.0、したがって BSA はマイナスに荷電) をジェチルアミノ基型アニオン交換 (プラスに荷電) 多孔性中空糸膜に透過させるとアルブミンはグラフト高分子鎖に吸着する。このとき、タンパク質の吸着量を供給液濃度と流出液濃度との差から算出した (図4)。理論単層吸着量 (膜の孔の全表面積をタンパク質の占有面積で割ることにより算出される値) との比較によって、グラフト高分子鎖へのタンパク質の多層集積度を算出できる。

いよいよ、この多孔性中空糸膜の孔表面上に形成させた「タンパク質多層集積構造」を利用して、(1)タンパク質の高速・高濃縮精製、(2)光学異性体の高速・完全分離、および(3)高活性な酵素反応という3つのはたらきを実現できたことを紹介したい。

2-1 高濃縮なのはタンパク質多層集積構造のおかげ

食品素材中には医療に役立つタンパク質が含まれている。例えば、卵白中にはリゾチーム

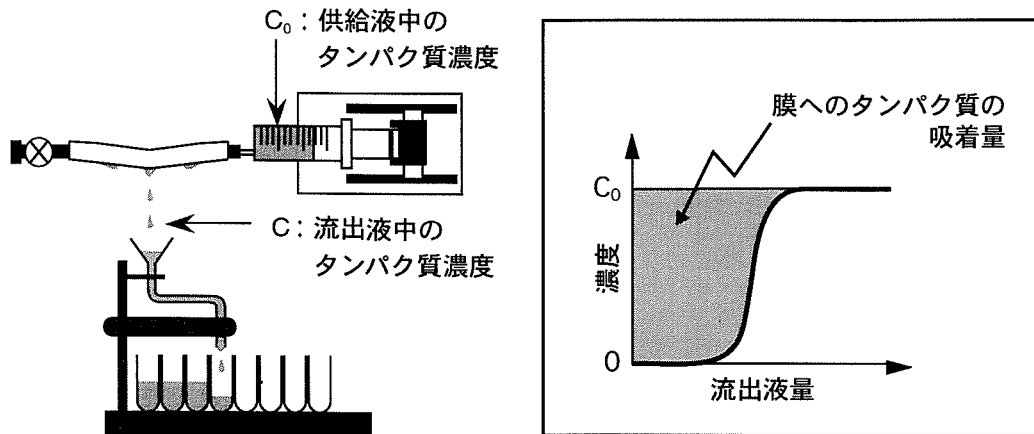


図4 多孔性中空糸膜へのタンパク質の吸着量を決定するための実験装置

(分子量が14000、等電点が11) が3.4%という濃度で溶けている。リゾチームは、菌の膜を溶かして壊す作用があるので、風邪薬の有効成分として使用されている。卵白中からリゾチームを他の成分から分けて濃縮することが要求される。

タンパク質の精製は、現状ではおもに、ビーズ充填カラムクロマト法によっておこなわれている。しかしながら、時間と手間がかかるという欠点がある。そこで、イオン交換基をもつグラフト高分子鎖を固定した多孔性膜にタンパク質を多層集積させておいて、そこへ塩(NaCl)水溶液を透過させることによって、高速しかも高濃縮率でタンパク質を溶出させるという手法を提案する(図5-1の(a))。

スルホン酸基をもつグラフト高分子鎖を固定した多孔性中空糸膜(グラフト率220%、転化率28%)に、リゾチーム溶液(pH 9.0、したがってリゾチームはプラスに荷電)を膜内面から外面へ向かって孔内を透過させた。リゾチームは膜を透過する間に、孔表面から伸びたグラフト高分子鎖中のスルホン酸基(マイナスに荷電)に吸着する。初めのうちは膜外面からの流出液中にリゾチームは現れなかった。そのうち吸着が平衡に近づき、やがて流出液中のリゾチーム濃度が供給液中のそれと一致した。リゾチームの吸着量は、膜1グラムあたり0.42グラムに達した。この値は従来の吸着材に比べると1桁以上多い。多層集積のおかげであった。吸着操作を終えた後、洗浄および溶出操作をおこなった。一連の操作を通して流出液中のリゾチーム濃度を追跡した(図5-2の(a))。図の横軸は流出液量を膜体積(中空部分を含める)で割った値、縦軸は流出液中のリゾチーム濃度を供給液中のリゾチーム濃度で割った値である。NaClもタンパク質も透過流に乗って輸送(対流輸送)されるので、タンパク質が瞬時に全量溶出された。溶出曲線にはテーリングがなく、タンパク質が高濃縮されることがわかった。

2-2 完全分離なのはアルブミン多層集積構造のおかげ

分子内に不斉な構造をもち、立体構造の異なる異性体（光学異性体）は、生体に対する薬効や毒性が異性体間で全く異なる。そこで、特に医薬や食品分野では、これらの異性体を完全に分離する必要性が高まっている。そこで、グラフト高分子鎖を固定した多孔性膜に光学異性体を識別するタンパク質の一つであるウシ血清アルブミン（BSA）を多層集積させておいて、そこへ光学異性体を透過させることによって、光学異性体を高速しかも完全に分離するという手法を提案する（図5-1の(b)）。

ジエチルアミノ基をもつグラフト高分子鎖を固定した多孔性中空糸膜（グラフト率150%）に、アルブミン溶液（pH 8.0）を膜内面から外面へ向かって孔内を透過させた。膜を作成するときの転化率を変えてグラフト高分子鎖中のイオン交換基密度を振ることによって、アルブミンの多層集積度を1から6まで変化させた。膜の孔に移動相を透過させておいてそこへ光学異性体としてDL-トリプトファンを一定量注入した。膜外面からの流出液中のトリプトファンを吸光度により検出した。得られるクロマトグラフから保持時間を調べ、つぎの式に従い分離係数を算出した（図5-2の(b)）。

$$\text{分離係数 [-]} = (t_L - t_0) / (t_D - t_0) \quad (3)$$

ここで、 t_L 、 t_D はそれぞれL体、D体の保持時間、 t_0 はむだ時間（中空糸膜をモジュールにただけで生じる保持時間）である。図の横軸はアルブミンの多層集積度、縦軸は分離係数である。多層集積度が高いほど分離係数も大きくなった。多層集積を利用した甲斐があった。また、移動層の流量を上げても分離係数は低下することなく一定であった。これはビーズ充填カラムクロマト法に比べて有利である。

2-3 高活性なのは酵素多層集積構造のおかげ

多孔性膜に固定したグラフト高分子鎖間にタンパク質を多層集積させた構造が、タンパク質の精製や光学異性体の分割に好都合であることを実証してきた。さて、タンパク質として酵素を使うと多層集積構造は高活性な反応場となることを実証する（図5-1の(c)）。

アミノアシラーゼ（分子量が86000）溶液をジエチルアミノ基をもつグラフト高分子鎖を固定した多孔性中空糸膜にこれまでと同様に透過させて、15層分を多層集積させた。さらに、酵素の脱落（反応操作で溶液のpHが変わると起こりうる）を防ぐためにグルタルアルデヒドを使って酵素間を架橋した。こうして作成した固定化酵素膜に、アセチル-D,L-メチオニ

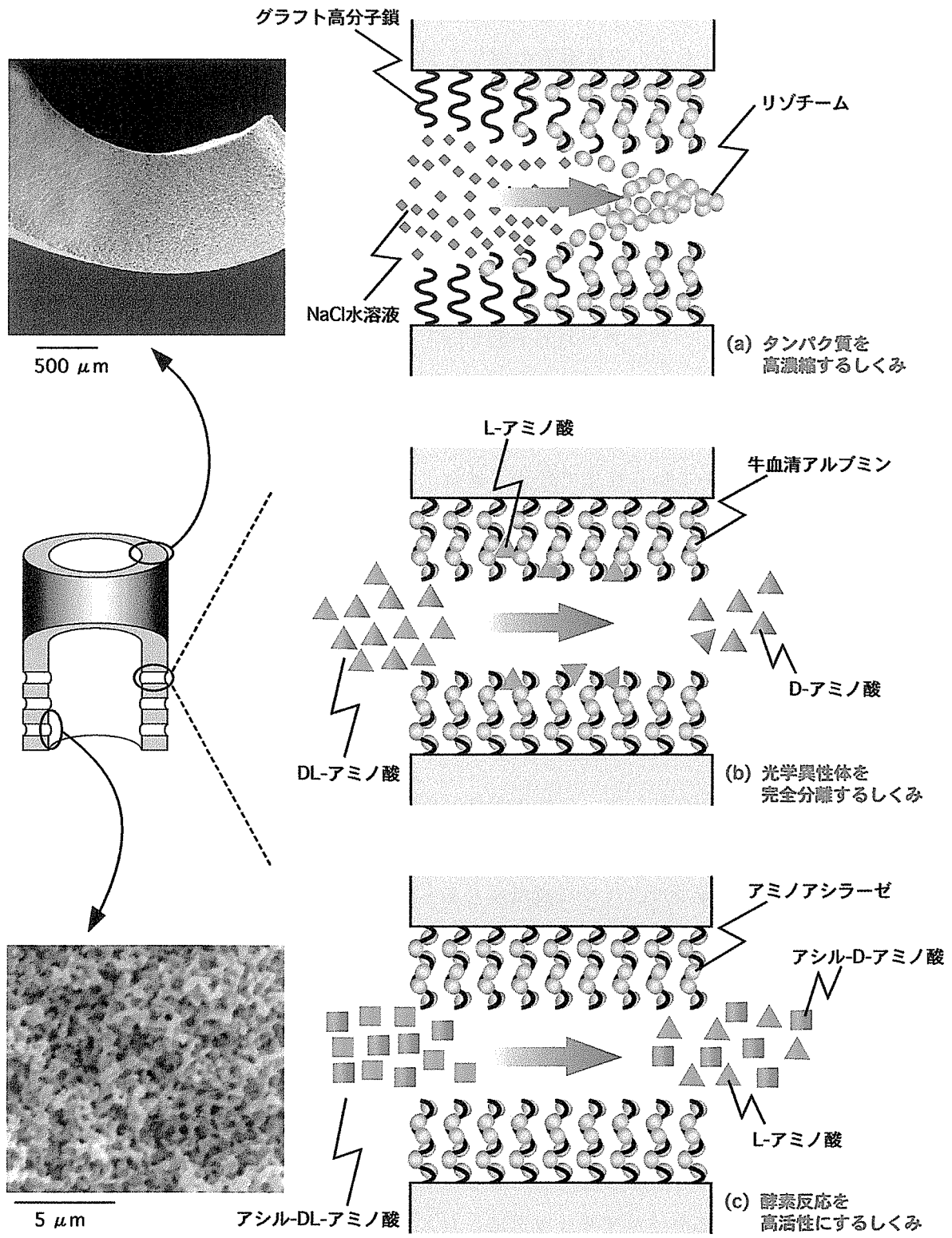


図5-1 タンパク質多層集積構造を活かすしくみ

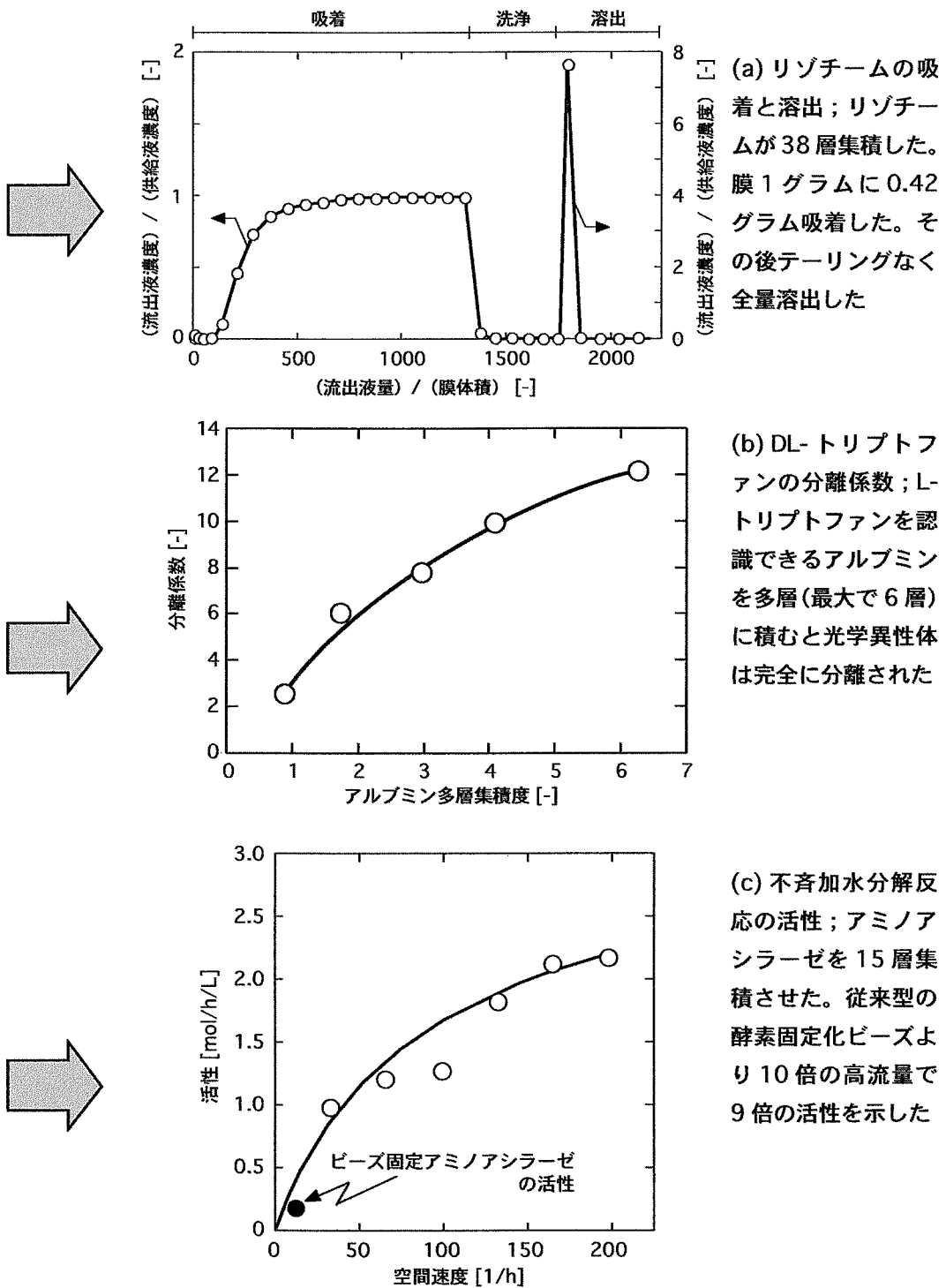


図5-2 バイテクノロジーを飛躍させた研究成果

ン溶液を透過させた。膜外面からの流出液中の不斉加水分解されて生成したL-メチオニン濃度を測定した。つぎの式に従って活性を算出した。

$$\begin{aligned} & \text{不斉加水分解活性} [\mu\text{mol/h/mL}] \\ & = (\text{L-メチオニンの生成濃度}) (\text{流量}) / (\text{中空部分を含めた膜体積}) \quad (4) \end{aligned}$$

これまでに報告されている活性の値に比べて、高流量にしても活性が高くなった (図5-2の(c))。

この酵素反応の他にも、アスコルビン酸オキシダーゼを多層集積した膜を使ったアスコルビン酸による脱酸素、環状イソマルトオリゴ糖合成酵素を多層集積した膜を使ったデキストランからの環状イソマルトオリゴ糖の製造、そしてウレアーゼを多層集積した膜を使った高濃度尿素の加水分解でも、多層集積構造が強みを見せている。

3. 今後の展望

マクロな形としての多孔性中空糸膜の利点は、内面から外面へ (逆でもよい) 液をその孔を通して透過させることができることである。官能基をもつグラフト高分子鎖がその内部の孔の上に配置されている。目的の分子やイオンを官能基の近傍まで透過流に乗せて運べるので、拡散移動抵抗を無視でき、理想的な吸着や反応操作を実現できる。マイクロな形としてのタンパク質多層集積構造が、多孔性中空糸膜の孔の上に乗っていけば、または乗ったのならば、それぞれタンパク質の回収またはタンパク質の機能抽出に役立てることができる。「多孔性中空糸膜+タンパク質多層集積構造」には、まだまだ使い途がある。

“バイオ技術を飛躍させる”ための材料を作成するために多孔性中空糸膜にタンパク質 (酵素) を孔表面に高密度で集積させるテクノロジーを確立してきたけれども、バイオ技術を高速化させた実施例には到っていないので反省している。バイオ技術に役立つ材料の開発を目的に進めた研究のなかから、基礎研究では辿り着けない新しい現象やしくみ、例えば、多層したタンパク質が偏在するとグラフト高分子鎖内でタンパク質が拡散する現象、集積させるだけでなく適度に集積構造に隙間をつくと酵素の総括活性が向上する現象、そしてグラフト高分子鎖の鎖長方向に荷電基の分布をつけてタンパク質の集積度を制御できるしくみを見つけた。けれども、そのサイエンスの解明には到っていない。今後、科学と技術の両輪をフル回転させてゴールに向かっていきたい。

4. 発表リスト

(1) 論文

- 1) M. Nakamura, S. Kiyohara, K. Saito, K. Sugita, and T. Sugo, High resolution of DL-tryptophan at high flow rates using a bovine serum albumin-multilayered porous hollow-fiber membrane, *Anal. Chem.*, **71**, 1323-1325(1999).
- 2) I. Koguma, K. Sugita, K. Saito, and T. Sugo, Multilayer binding of proteins to polymer chains grafted onto porous hollow-fiber membranes containing different anion-exchange groups, *Biotechnol. Prog.*, **16**, 456-461(2000).
- 3) T. Kawai, K. Sugita, K. Saito, and T. Sugo, Extension and shrinkage of polymer brush grafted onto porous membrane induced by protein binding, *Macromolecules*, **33**, 1306-1309(2000).
- 4) H. Ito, M. Nakamura, K. Saito, K. Sugita, and T. Sugo, Comparison of L-tryptophan binding capacity of BSA captured by a polymer brush with that of BSA adsorbed onto a gel network, *J. Chromatogr. A*, **925**, 41-47(2001).
- 5) T. Kawai, M. Nakamura, K. Sugita, K. Saito, and T. Sugo, High conversion in asymmetric hydrolysis during permeation through enzyme-multilayered porous hollow-fiber membranes, *Biotechnol. Prog.*, in press.
- 6) T. Kawai, K. Saito, K. Sugita, T. Sugo, and H. Misaki, Immobilization of ascorbic acid oxydase in multilayers onto porous hollow-fiber membrane, *J. Membrane Sci.*, **191**, 207-213(2001).
- 7) S. Miura, N. Kubota, H. Kawakita, K. Saito, K. Sugita, K. Watanabe, and T. Sugo, High-throughput hydrolysis of starch during permeation across α -amylase-immobilized porous hollow-fiber membranes, *Radiat. Phys. Chem.*, in press.
- 8) K. Saito, Charged polymer brush improves separation and reaction in biotechnology, *Sep. Sci. Technol.*, in press.
- 9) H. Ogawa, K. Sugita, K. Saito, M. Kim, M. Tamada, A. Katakai, and T. Sugo, Binding of ionic surfactants to charged polymer brushes grafted onto porous substrates, *J. Chromatogr. A*, in press.
- 10) D. Okamura, K. Sugita, K. Saito, M. Tamada, and T. Sugo, Solvent effect of length of polymer brush grafted onto porous membranes, submitted to *Chem. Mater.*
- 11) T. Kawai, H. Kawakita, K. Sugita, K. Saito, M. Tamada, and T. Sugo, Conversion of

- dextran to cyclisomaltooligosaccharides using enzyme-immobilized porous hollow-fiber membrane, submitted to *J. Agric. Food Sci.*
- 12) H. Kawakita, K. Sugita, K. Saito, M. Tamada, T. Sugo, and H. Kawamoto, Yield of cyclisomaltooligosaccharides from dextran using enzyme immobilized in multilayers onto porous membranes, submitted to *Biotechnol. Prog.*
 - 13) T. Kawai, K. Sugita, K. Saito, and T. Sugo, Conditioning effect of charged polymer brush on multilayer binding of enzyme, submitted to *J. Membrane Sci.*
 - 14) H. Kawakita, K. Sugita, K. Saito, M. Tamada, T. Sugo, and H. Kawamoto, Optimization of reaction conditions in production of cyclisomaltooligosaccharides using enzyme immobilized in multilayers onto pore surface of porous hollow-fiber membranes, submitted to *J. Membrane Sci.*
 - 15) S. Yonezu, H. Kawakita, K. Sugita, K. Saito, M. Tamada, and T. Sugo, Multilayering of proteins into positively ionizable polymer brushes grafted onto pore surface of porous hollow-fiber membranes, submitted to *Macromolecules*.
 - 16) M. Toyahara, K. Sugita, K. Saito, M. Tamada, and T. Sugo, Order variation in successive modification of polymer brushes governs the degrees of their expansion and protein multilayering, submitted to *Macromolecules*.
 - 17) S. Yonezu, H. Kawakita, K. Sugita, K. Saito, M. Tamada, and T. Sugo, Urea hydrolysis using urease immobilized in multilayers onto porous hollow-fiber membrane, submitted to *J. Chromatogr. A*.

(2) 総・解説

- 1) 斎藤恭一、高性能な分離を生み出す孔の開いた中空糸、日本繊維学会誌、55、P334-337(1999).
- 2) 斎藤加織、杉田和之、斎藤恭一、多孔性膜の孔表面に接ぎ木した高分子鎖の架橋とその応用、表面、39、226-231(2001).
- 3) K. Saito and T. Sugo, High-performance polymeric materials for separation and reaction, prepared by radiation-induced graft polymerization, Radiation Chemistry: Present Status and Future Trends, C. D. Jonah and B. S. M. Rao (Eds.), Elsevier, 671-704(2001).

(3) 口頭発表 計7件

イオン交換学会、日本膜学会、高分子学会 SST 研究会自由討論会、日本化学会秋季年会