The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

れ替え操作を自動的に行う抽出流加培養を試みた．結果を Fig. 1 に示す．図中の実線（グルコース濃度，ブタノール濃度，全生成ブタノール量）は，発生ガス量を指標として計算した値を示しており，分析値と良い一致を示した．さらに，発酵液中のブタノール濃度も目的どおり，2 g/l 以下に維持されていることが確認できた．以上のように，アセトン・ブタノール発酵の抽出流加培養システムの開発により，長期間にわたるブタノールの生産と分離，回収が達成されるものと考えられた．

5. おわりに

通常の回分発酵では，発酵後期になると生産物が発酵液中に蓄積し，微生物の活性を低下させることがしばしば認められる．その代表的な例がエタノール発酵あるいはアセトン・ブタノール発酵である．したがって，発酵生産物は希薄水溶液として得られるため，その分離精製に多大のエネルギーを要する場合も多い．ここで述べた抽出発酵は，有機溶媒により生産物を抽出し，発酵液系外へ除去するシステムである．抽出操作は，省エネルギー的な分離技術であり，また，高沸点の物質や水と共沸をつくるもの，さらには分子量の比較的近いものでも分離できる可能性をもっている．したがって，多くの発酵系に適用しうるものと考えられ，その有用性は今後さらに広がるであろう．

文 献

1) 小林 猛：酵素工学ニュース，第11号，10(1984).
2) Wang, H. Y., Robinson, F. M., Lee, S. S.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No. 11, 555 (1981).
3) Minier, M., Goma, G.: *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1565 (1982).
4) Matsumura, M., Märkl, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 371 (1984).
5) Ishii, S., Taya, M., Kobayashi, T.: *J. Chem. Eng. Japan*, **18**, 125 (1985).
6) 本多裕之，田谷正仁，小林 猛：化学工学協会第50年会研究発表講演要旨集，p. 300 (1985).
7) Taya, M., Honda, H., Kobayashi, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2239 (1984).
8) Taya, M., Ishii, S., Kobayashi, T.: *J. Ferment. Technol.*, **63**, 181 (1985).

5. 水性二相分配法とその生体高分子分離精製への応用

生化学，生物学研究の進歩は効率の良い分離分析方法・装置の発展に負う面が大きいが，バイオテクノロジーの効果が実用化・工業化の段階に達した現在，経済的で効率の良い大量分離製法の開発が要望されている．研究室レベルでは，クロマトグラフィー，電気泳動，超遠心分離等が日常の分離精製，分析の主な手法として用いられているが，スケールアップ・工業化の段階になるところらの手法が必ずしも万能ではないし，技術的・経済的にも未解決の問題が残されている．

1. 水性二相分配法

化学工学の分野では，溶媒抽出法が一般的な精製工程として用いられているし，多段液液分間法（向流分配分画法）も実験室から工場まで適用される分離精製法として古くから知られている．しかしながら，生体高分子，細胞を有機溶媒を用いるこれらの方法で分画精製することは特殊な場合を除いて一般に不可能である．

ポリエチレングリコール，デキストラン等の水溶性高分子，無機塩の混合水溶液が適当な濃度範囲で自発的相分離を生じる現象は良く知られているが，この二相間における生体高分子・細胞の分配係数の差を利用して分画精製する方法が Albertsson らによって提唱された.[1] 水性二相分配液中では一般に生体試料は安定であり，抽出または多段分配操作により分画精製することが可能になる．水性二相分配液系を形成する溶質の例を Table 1 に示す．溶質Aと溶質Bの組み合わせで二相分配液が調合されるが，軽液(上層液)には溶質Aの濃度が高く重液(下層液)には溶質Bの濃度が高くなる．すなわち，軽液は重液に比べてより疎水的な環境となり，水性二相液の両相の間での分配係数を決める第1の要因は，生体高分子，細胞等の表面の親水基，疎水基のバランスであると考えられている.[2] ポリエチレングリコールとデキストラン水溶液の相平衡および重液，軽液中の各溶質濃度を Fig. 1 に示す．

2. 水性二相分配液における生体高分子の分配

水性二相分配液中に無機塩が共存するとき，塩素イ

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Table 1. Solutes for aqueous two phase solution.

(A)	(B)
Polyethylene glycol	Dextran
Polypropylene glycol	Dextran sulfate
Polyvinylalcohol	DEAE dextran
Polyvinylpyrrolidone	Glucose
Methylcellulose	Glycerol
	Phosphate salts
	Sulfate salts

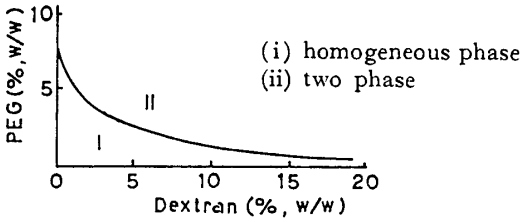
オン等一価のアニオンは両相に等濃度で分布するのに対し，硫酸イオン，リン酸イオン等の多価アニオンは重液中により高濃度で分布する．すなわち，硫酸塩，リン酸塩を添加することにより二相間にイオン強度の差(ゼータポテンシャル差)を生じることにより，タンパク質の電荷 (net charge) がその分配係数に大きな影響を与える．例えば，デキストラン／ポリエチレングリコール水性二相系において，ウシ血清アルブミンの分配係数は塩化ナトリウムが存在するとき，系の pH の影響をほとんど受けないが，硫酸ナトリウム共存下では pH によって大きく変化し，両者はウシ血清アルブミンの等電点で一致することが示された.[3]

ポリエチレングリコール水溶液に硫酸塩，リン酸塩を添加すると，塩析作用によりポリエチレングリコールが軽液相として分離する．この二相液中でタンパク質も塩析効果により上層へ分配されるが，その分配係数は使用したポリエチレングリコールの分子量により大きく変化する (Fig. 2).

水性二相分配法により生体高分子，細胞の分画精製を行う場合，目的とする物質と他の成分との分配係数の差をできるだけ大きくする必要があるが，使用する水溶性高分子の分子量，二相液系の pH，共存する無機イオンの種類と濃度などの組み合わせで望ましい条件を設定することが可能である．

膜結合タンパク質など，疎水的相互作用の著しい生体高分子はデキストラン／ポリエチレングリコール水性二相系で軽液相（ポリエチレングリコール相）に優先的に分配され，1回ないし数回の分配抽出操作で相当程度の精製効果を上げることができる．分離精製の初期段階で水性二相抽出を適用した例を Table 2 に示す.

Kula らはポリエチレングリコールに補酵素，基質，基質アナログ等を結合し，特異的相互作用により酵素を水性二相分配液の軽液相に抽出する方法を発表した.[4] 例えば，ポリエチレングリコール-N^6-アミノエチル-NADH を二相分配液の1成分とし，ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ，ホルメートデヒドロゲナーゼが抽出精製されている．市販の工業用連続遠心分離機を用いて大量処理が可能になる点で興味ある方法であるが，補酵素結合ポリエチレングリコールと酵素との分離，補酵素結合ポリエチレングリコールの回収再使用など，工業的に実施するにはまだ多くの問題点が



Total		Upper Phase		Lower Phase	
DEX %, w/w	PEG %, w/w	DEX %, w/w	PEG %, w/w	DEX %, w/w	PEG %, w/w
4.20	3.40	6.14	2.50	1.72	4.62
4.50	3.50	8.22	1.83	0.90	5.22
5.00	4.00	10.20	1.55	0.36	6.13
6.00	5.00	14.59	0.98	0.11	7.71
8.00	6.00	18.93	0.70	0.05	9.88

Fig. 1. Phase diagram of dextran D68-PEG 6000-water ternary system.
(P. A. Albertsson, Partition of Cell Particles and Macromolecules, Second Ed., John Wiley & Sons Inc., New York, 1960)

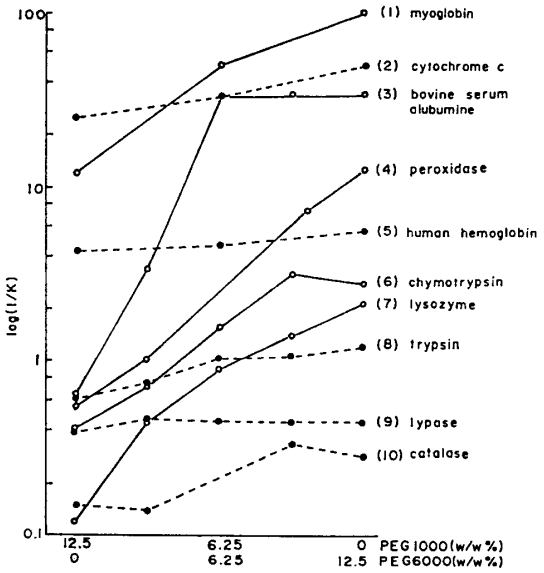


Fig. 2. Partition coefficient of proteins in PEG 6000-PEG 1000-KPB (0.6 M, pH 7.2) aqueous two phase.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Table 2. Separation of enzymes and proteins by aqueous two phase distribution.

Enzymes or proteins	Reference
Phospholipase A	(5)
S-23 myeloma protein	(6)
Steroid oxidase, steroid esterase	(7)
Leucyl-tRNA synthetase	(8)
Glutamyl-tRNA synthetase	(9)
DNA polymerase	(10-12)
RNA polymerase	(13, 14)
Peptide chain elongation factor	(15)

残されているように思われる．しかしながら，抗原抗体反応の利用など特異的分離法(アフィニティ抽出法)として今後の発展が期待される．

3. 遠心液液分配クロマトグラフの応用

水性二相分配法をより汎用性のある分離精製手法として定着，普及させるためには，効率・操作性にすぐれた多段液液分配分画装置の開発が不可欠になる．水性二相分配液は粘度が高く，重液・軽液間の比重差が少ないため，古くから知られている向流分配分画装置，天然物化学等の分野でよく用いられている液滴向流分配装置などを用いることはできない．Albertsson らは，水性二相分配液に使用する装置として薄層向流分配分画装置を製作したが,[1] 操作性，処理時間，処理量などの点で広く普及する装置にはなっていない．

著者らは，遠心力を利用する連続液液分配分画装置(遠心液液分配クロマトグラフ）を開発し，天然有機化合物，各種生理活性物質，生体高分子等の分離精製への応用を試みてきた.[16] この装置は，有機溶媒を用いる一般的な液液分配分画にも用いられるが，遠心力を利用する点で水性二相分配液を用いる連続多段分配分画装置として，他の装置より有利になる．装置の原理，基本フローシートを Fig. 3 に示す．遠心ローター上に数百～数千の分配管を配列し，固定相として使用する液相を充てん，遠心力で保持させる．他方の液相を移動相としてローター軸の一端から連続送液し，固定相液中へ送り込む．移動相液は固定相液中を遠心力の作用を受けて微細な液滴となって順次通過し，回転軸の他端より流出する．この間に，移動相中に注入された試料成分は液液分配により分離され，分画採集される．移動相の送液方向を切り換えることにより，二相分離液の重液・軽液いずれを固定相として使用することも可能である．

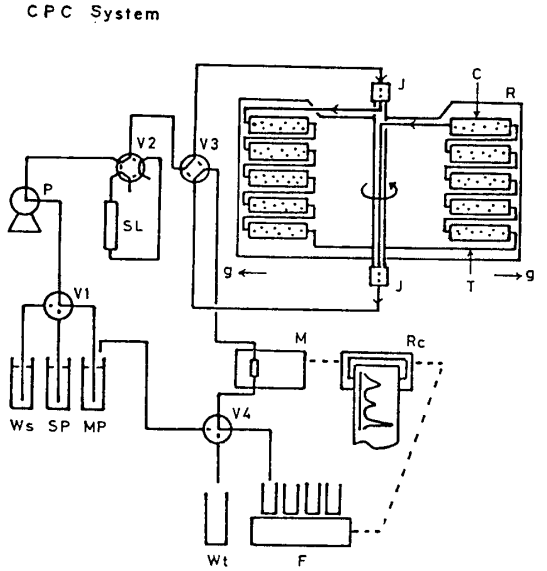


Fig. 3. CPC system.

SP Stationary phase	P Constant flow pump
MP Mobile phase	J Rotary joint
Ws Washings	R Rotor
Wt Waste	C Partition tubes
V1 4-Way rotary valve	T Connecting tubes
V2 6-Way valve	M Flow-cell monitor
V3 4-Way valve	Rc Recorder
V4 4-Way rotary valve	F Fraction collector
SL Sample soln. loop	

この装置を用いて酵素の精製を行った例を以下に述べる．微生物 (*B. sphaericus*) 菌体より得られる L-ロイシン脱水素酵素が左右田らにより報告されている.[17] われわれは，同じ酵素を水性二相分配法により抽出・精製することを試みた．ポリエチレングリコール6000 7.6%(w/w)，リン酸カリウム (1.2 M, pH 7.5), 2-メルカプトエタノール 0.1% の二相液中で菌体を超音波破砕すると，菌体破片，大部分の挟雑タンパク質は重液へ除去され，酵素は軽液中へ抽出される．酵素抽出液をさらに同じ二相分配液を用いる遠心液液分配クロマトグラフィーによって分画し，酵素活性ピークを得た．最終的に得られた酵素分画の比活性は従来法と同程度，活性収率は従来法の約2倍であった．得られたクロマトグラムを Fig. 4 に示す．

水性二相分配法が Albertsson らによって提唱されて以来，約30年が経過している．由来，特異的な分離精製法として期待されながら，なお一部の研究者によって実行されているにすぎない．その理由は多々あるが，この方法が有効に適用できる分離精製装置の開発が遅れているのも一つの原因である．今後とも，生化

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

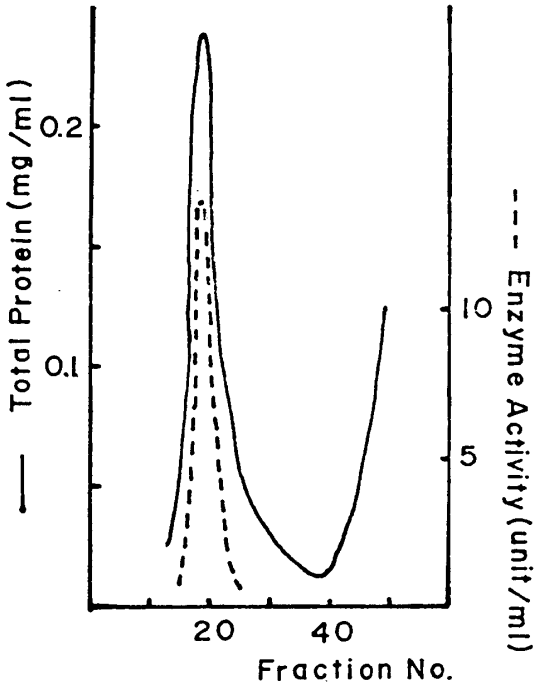


Fig. 4. Separation of leucine dehydrogenase from *B. sphaericus*.

Two phase soln.
PEG 6000 9%
KPB (pH 7.5) 0.6 M
Stationary phase=Lower
Flow rate=0.16 ml/min
Rotational rate=2000 rpm
Column volume=60 ml
I Fraction=1.6 ml

学分野の研究者と協力して装置の開発・応用を精力的に進めてゆく必要がある.

文 献

1) Albertsson, P. A.: *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, Jon Wiley & Sons, New York (1971).
2) Albertsson, P. A.: *J. Chromatography*, **159**, 111 (1978).
3) Sasagawa, S., Walter, H.: *Biochemistry*, **11**, 2760 (1972).
4) Kula, M. R.: *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 1967 (1978).
5) Albertsson, P. A.: *Biochemistry*, **12**, 2525 (1973).
6) Franagan, S. D., Barondes, S. H.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 1484 (1975).
7) Hubert, P., Dellacherie, E., Neel, J., Baulieu, E. E.: *FEBS Lett.*, **65**, 169 (1976).
8) Hayashi, H., Knowles, J. R., Katze, J. R., Lapointe, J., Söll, D.: *J. Biol. Chem.*, **245**, 1401 (1970).
9) Lapointe, J., Söll, D.: *J. Biol. Chem.*, **247**, 4966 (1972).
10) Okazaki, T., Kornberg, A.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 259 (1964).
11) Falaschi, A., Kornberg, A.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 1478 (1966).
12) Loeb, L. A.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 1672 (1969).
13) Babinet, C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 639 (1967).
14) Alberts, B. M., Amodis, F. J., Jenkins, M., Gutmann, E. D., Ferris, F. L.: *Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28, 289 (1968).
15) Gordon, J.: *Biochemistry*, **9**, 912 (1970).
16) Murayama, W.: *J. Chromatogaphy*, Proc. 18-th International Symp., Tokyo, p. 343 (1982).
17) Soda, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 931 (1971).

6. 等速電気泳動法のタンパク質分離への応用

1. 緒 言

等速電気泳動法は次のような特徴を有している. 1) 分離に及ぼす拡散の影響が, 通常の電気泳動法に比べて小さい. 2) 等電点付近で不安定になるタンパク質に対しても, その pH を避けて泳動できる. 3) 先導液の濃度を上げることによって, 濃縮も可能である. 4) 適当な両性物質を泳動物質間のスペーサーとして用いることにより, 目的物質を高純度で分離することができる.

このような特徴から, 無機イオン, 有機酸, アミノ酸およびペプチドなどの低分子量の物質の定性定量分析に応用され, さらにタンパク質等の高分子化合物にもその応用が試みられている.[1-4] また最近では, 特にわが国において, 医薬品および臨床試験への応用も報告されている.[5,6]

しかし, この電気泳動法は, これまで主に分析用として用いられ, タンパク質の分離精製用としての利用は非常に少ない.[1,7] これは, 緩衝液の組成および目的タンパク質の分離に適したスペーサーの選定が困難で

NII-Electronic Library Service