

水性二相分配法によるタンパク質の表面疎水性の評価と 疎水性差に基づく分離

矢野浩二, 若山昭大, 久保井亮一[®], 駒沢 勲*

(1993 年 6 月 21 日受理)

タンパク質表面全体の疎水性を, ポリエチレングリコール/デキストラン (PEG/Dex) 系を用いる水性二相分配法により, 一方表面に局在する結合部位の疎水性を, PEG/Dex 系に非イオン性界面活性剤 Triton を添加した Triton 添加法により体系的に評価した. タンパク質としては, lipase, α -chymotrypsin, cytochrome *c* などを用いた. これらタンパク質の疎水性は各々特徴があり, 構造変化や環境との相互作用により変化する. この差を用いて, タンパク質の効果的な分離が可能である. チーズホエー中の主タンパク質である α -lactalbumin と β -lactoglobulin を例にとり, 表面疎水性の分析結果に基づいて, 両者を効果的に分離できることを示した. EDTA による Ca^{2+} イオンの除去によって生成するアボタンパク質の局所的な疎水性に基づく分離は特に効果的であった.

1 緒 言

酵素・タンパク質・機能性ペプチドなどの生理活性物質の表面疎水性は表面電荷と共に高次構造と生理機能の発現のために, 最も重要な因子の一つである. 例えば, 油脂分解能を有する各種起源のリパーゼの場合, 活性部位や表面の疎水性が酵素活性に直接影響する. 又, 遺伝子産物の細胞内封入体 (変性状態) から活性型への巻き戻し・分離・回収プロセスにおいては, 巻き戻し中間体の表面疎水性変化が大きな問題となっている³⁾¹⁴⁾. 又, タンパク質の分離精製を合理的に行うためにも, タンパク質の表面特性, 特に表面疎水性の正確な情報を得る必要がある. これまで, 疎水クロマト法, 沈殿法, 表面張力法など多くの測定法も報告されている⁸⁾⁹⁾. しかし, これら生体高分子の表面特性は高次構造によって複雑に変化する¹⁷⁾. 従って, 従来の多くの測定法や測定結果については, 高次構造の変化を考慮して検討する必要がある. 表面疎水性についても, タンパク質表面に存在する残基の疎水性の和である表面全体の疎水性と, 局所的に疎水基の集中した結合部位の疎水性の二つを明確に区別して検討した報告はほとんど見られない.

水性二相分配系はポリエチレングリコール (PEG), デキストラン (Dex) などの親水性ポリマーが自己組織的に相分離して形成する水-水系の二相分配系である

が, タンパク質の高次構造に及ぼす影響を最小限にでき, タンパク質を安定に保持しながら表面特性を解析することができるという特徴がある. 異なる疎水性差を持つ各種の水性二相分配系を用いて, タンパク質の二相間分配から表面全体の疎水性を, 又, 非イオン性界面活性剤である Triton との疎水結合の大きさより局所的な結合部位の疎水性を求める方法については, 先に提案した¹³⁾. Triton は, タンパク質の高次構造を変化させることなくオリゴマータンパク質や膜タンパク質と疎水結合することが知られている²⁾⁶⁾.

本研究では, 二相間の疎水性差 (分配系の疎水性, *HF*) を, 疎水性が既知であるアミノ酸の分配係数から定量すると共に, これに基づいて, 各種ペプチド・タンパク質の表面疎水性の定量を行った. 2 種類の水性二相分配法を用い, 各種タンパク質の表面全体の疎水性及び局所的な疎水性を区別して, 両者を定量化した. 更に, これら 2 種類の疎水性差に基づくタンパク質の分離精製の具体例として, チーズホエー中の主タンパク質であり, Ca^{2+} との結合部位をもつことが知られている α -ラクトアルブミンと β -ラクトグロブリンの新しい分離プロセスを提出した.

2 実 験

2・1 試薬・溶液

2・1・1 ポリエチレングリコール (PEG) 水性二相分配系を構成する水溶性ポリマーとして用いた PEG

* 大阪大学基礎工学部化学工学科: 560 大阪府豊中市待兼山町 1-1

は、PEG1540, 4000, 6000, 20000 で、平均分子量はそれぞれ 1500, 3000, 7500, 20000 であり、和光純薬工業（以下、和光製と略記）一級試薬である。

2・1・2 デキストラン (Dex) 水性二相を構成するもう一つの水溶性ポリマーとして用いた Dex は、分子量 60000~90000, 100000~200000 の和光製である。

2・1・3 塩 リン酸カリウム (KPi) (リン酸二水素カリウム+リン酸水素二カリウム), 硫酸ナトリウム (Na_2SO_4) (以上和光製特級試薬), 硫酸マグネシウム ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (石津製薬製特級試薬, 以下、石津製と略記), 塩化ナトリウム (NaCl) (富田製薬製特級試薬) をそれぞれ使用した。

2・1・4 アミノ酸 分配物質として用いたアミノ酸は、glycine (Gly), L-threonine (Thr), L-methionine (Met), L-valine (Val), L-phenylalanine (Phe), L-tryptophan (Trp) であり、石津製である。

2・1・5 ペプチド 分配物質として用いたペプチドは、Gly-Gly (G-G), Trp-Gly (W-G), Phe-Phe (F-F), Trp-Phe (W-F), Gly-Gly-Gly (G-G-G), Gly-Phe-Ala (G-F-A), Gly-Phe-Phe (G-F-F) であり、Sigma 製である。

2・1・6 タンパク質 分配物質として用いたタンパク質は、*Chromobacterium viscosum* lipase (東洋醸造製, 以下 C. V. Lipase と略記), lysozyme, α -chymotrypsin (以上、和光製), malate dehydrogenase (MDH, オリエン特酵母製) である。その他のタンパク質は、Sigma 製である。Apomyoglobin の調製は、2-ブタノールによる myoglobin からのヘムの抽出により行った⁵⁾。

2・1・7 その他の試薬 PEG/Dex 系への添加には、非イオン性界面活性剤である Triton X-405 (Sigma 製) を用いた。その他の試薬は和光製特級である。

2・2 操作

2・2・1 二相分配系の調製 分配系の疎水性 (HF) を変化させるため、各種分子量、濃度の PEG と、Dex あるいは塩を混合し、分配物質を含む所定の分配系を調製した¹²⁾。振り混ぜた後、遠心分離 (5000 rpm, 20 min, 25°C) により二相に分離した。二相分配系の pH 調整は少量の HCl 及び NaOH の添加により行った。又、Triton 添加系では、二相系調製時に、Triton X-405 を PEG 4000 (9%)/Dex 100000~200000 (9%) 系に 0~5 mM の濃度で添加した。

2・2・2 分配物質濃度の定量 アミノ酸濃度は、*o*-フタルアルデヒド (OAP) 反応を用いた高速液体クロマトグラフ (島津製作所製, アミノ酸分析システム) を用いて定量した。ペプチド濃度はニンヒドリン反応を用

いて定量した¹⁾。又、タンパク質濃度は、マイクロ TP テストワコーを用いて 600 nm の吸光度より測定した⁴⁾。

2・2・3 α -ラクトアルブミンと β -ラクトグロブリンの分離 2・2・1 の水性二相分配系を用い、各タンパク質濃度は 1~2.4 mg ml⁻¹ とした。又、Triton 添加系による分離では、タンパク質表面に結合している Ca^{2+} イオンを除去するために、100 mM の EDTA を添加した。本実験は、実験操作上各タンパク質単独系の分配について検討しているが、混合タンパク質の分配が単独系の分配とよく対応していることを、島津製作所製 Shim-pack DIOL-150 カラムを用いた HPLC (LC-6AV, 島津製作所製) により確認している。

3 結果及び考察

3・1 水性二相分配系の疎水性

液-液二相系において、溶質の分配平衡が成立する条件では、二相における溶質の化学ポテンシャルが等しく、溶質の二相間分配係数を K とすると、自由エネルギー変化は式(1)で表される。

$$-\Delta G^\circ = RT \ln K \quad (1)$$

水性二相分配系における分配係数は、既往の研究²⁰⁾により低塩濃度条件では、塩析効果を無視でき、式(2)で表すことができる。

$$\ln K = \ln K_{\text{el.}} + \ln K_{\text{hphob.}} \quad (2)$$

右辺第一項は静電効果による寄与を表し、分離物質の表面電荷と二相間の静電ポテンシャル差に依存する。等電点においては、これらのうち第一項を無視することができ、第二項の疎水効果による寄与のみで近似できる。従って、分配系の疎水性を HF, 分離物質の表面疎水性を HFS とすると、分配係数は次式で与えられる¹¹⁾。

$$\ln K = \ln K_{\text{hphob.}} = HF \times HFS \quad (3)$$

ここで、分離物質がアミノ酸の場合、HFS は Tanford ら¹⁵⁾が水/ジオキサン系及び水/エタノール系において測定したアミノ酸側鎖の疎水性 RH に対応する。従って、異なる RH を持つアミノ酸を水性二相分配系で分配し、その分配係数を測定することにより、分配系の疎水性 (HF) を一義的かつ簡便に定量することができる¹²⁾。

PEG/Dex 系及び PEG/KPi 系に 7 種類のアミノ酸を分配したときの、分配係数に対する RH の依存性を Fig. 1 に示す。いずれの系においても、アミノ酸の分配

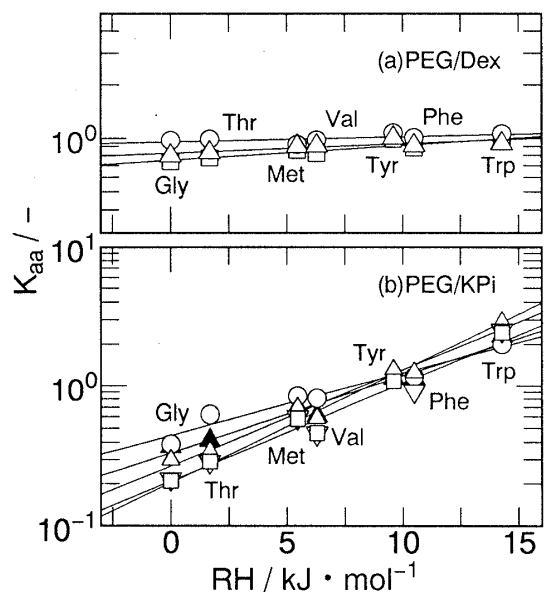


Fig. 1 Effect of the relative hydrophobicity (RH) defined by Nozaki and Tanford on the partition coefficients of amino acids (K_{aa}) in (a) PEG/Dex and (b) PEG/KPi systems

(a) ○: PEG1540 (10.8%)/Dex 100 K-200 K (9%), △: PEG4K (9%)/Dex 100 K-200 K (9%), □: PEG6K (9%)/Dex 100 K-200 K (9%); (b) ○: PEG1540 (14%)/KPi (14%) pH=6, ▲: PEG4K (10%)/KPi (14%) pH=6, △: PEG4K (14%)/KPi (14%) pH=6, □: PEG6K (14%)/KPi (14%) pH=6, ▽: PEG20K (14%)/KPi (14%) pH=6

係数 K_{aa} と RH の間には直線関係が成立し、この直線のこう配が分配系の疎水性 (HF) となる。本実験で使った PEG/Dex 系及び PEG/塩系において、 HF をどの程度の範囲で変化できるかを Fig. 2 に示す。PEG/Dex 系の HF は、異なる分子量や濃度のポリマーを組み合わせることで変化させることができるが、PEG/塩系と比べて、絶対値及び変化できる範囲の両者はともに小さい。PEG/塩系では、一価と二価の塩の濃度比が変化する場合、系の pH によっても HF が変化する。又、系を構成する塩以外の塩を第三成分として添加することによって大きく変化させることができる。例えば、PEG/MgSO₄ 系への Na₂SO₄ の添加の場合、 HF は 0.1 から 0.35 mol kJ⁻¹ となる。

3・2 ペプチドの疎水性

各種のジペプチド及びトリペプチドの分配係数 K_{pe} を、3・1 で求めた分配系の疎水性 HF に対してプロットした結果を、Fig. 3 に示す。各ペプチドに対して、

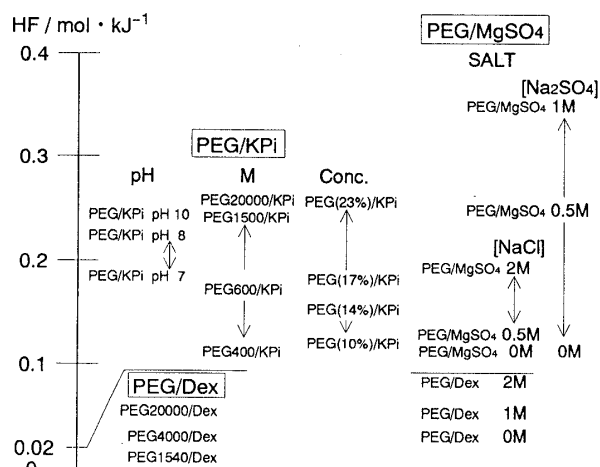


Fig. 2 HF ladder of PEG/Dex and PEG/salt systems measured under different conditions

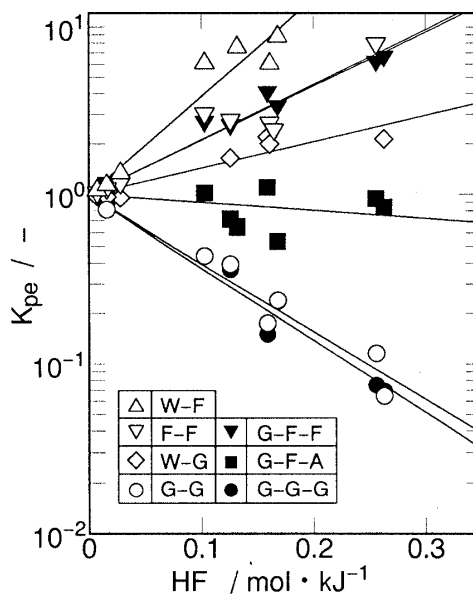


Fig. 3 Effect of HF of phase systems on the partition coefficients of peptides (K_{pe})

($HF, \ln K_{pe}$) = (0, 0) を通る直線関係が得られることから、ペプチドに対しても式 (3) が成立することが分かる。直線のこう配がペプチドの疎水性 HFS を表す。これより求めたペプチドの疎水性 HFS と Tanford¹⁹⁾ によるアミノ酸側鎖の疎水性 (RH) の線形和として求めた計算値とを比較すると、両者の間には良好な相関関係が得られた。従って本法によって、直接かつ簡便にペプチドの疎水性の定量が可能である。

3・3 タンパク質の疎水性

3・3・1 表面全体の疎水性 幾つかのタンパク質の等電点における分配係数 (K_{pr}) を分配系の疎水性 (HF) に対してプロットした結果を Fig. 4 に示す. 分子量や等電点の異なる各種のタンパク質についても, アミノ酸やペプチドと同様, 式(3)の直線関係が成立している. 従って, このよう配より, タンパク質の表面全体の疎水性として HFS を求めることができる. 種々のタ

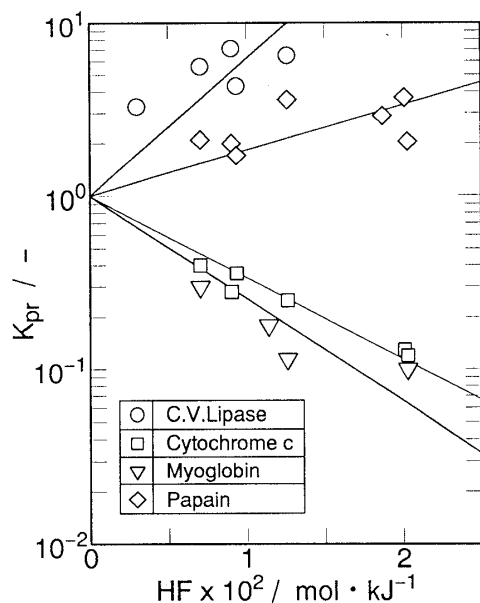


Fig. 4 Effect of HF of phase systems on the partition coefficients of proteins (K_{pr})

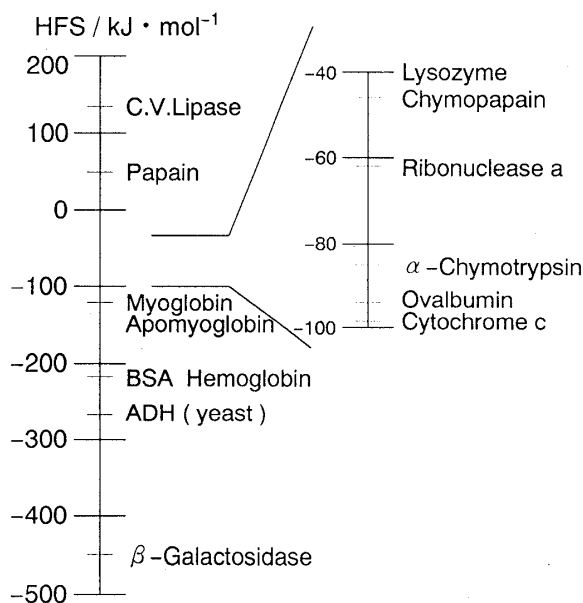


Fig. 5 HFS ladder of proteins and enzymes

ンパク質・酵素について本定量法により求めた HFS を Fig. 5 に示す. 一般的に, タンパク質は疎水基を内側に折り畳むように高次構造が形成されるため, α -chymotrypsin, ヘモグロビン, 各種脱水素酵素など, 分子量の大きい大部分のタンパク質の HFS は負の値となり親水的な表面をもつ. 一方, lysozyme は比較的疎水性が強く, 又, 基質との疎水結合部位を有し, 酵素活性の高い微生物起源の C. V. Lipase や papain は表面全体としても疎水性が大きい. 以上のように, 各タンパク質は特有の表面疎水性 HFS をもち, HFS に差がある場合には, 疎水性 (HF) の大きな分配系を選択することによって, 効果的にタンパク質を分離することができる.

3・3・2 局所的な疎水性 PEG/Dex 系に Triton X-405 を添加すると, Triton は PEG 相に偏って分配するために, Triton と疎水結合するタンパク質は PEG 相に偏って分配する¹⁸⁾. 従って, これを利用して, Triton 濃度の増加に対するタンパク質の分配係数の変化の大きさから, Triton との疎水性相互作用の強さを定量することができる¹³⁾ (Triton 添加法). 本法はタンパク質と疎水的プローブとの相互作用を利用しているため, 従来法である疎水クロマトグラフィー⁸⁾や PEG の末端を疎水性リガンドで修飾した水性二相系を利用する方法¹⁶⁾と同様, タンパク質の局所的な疎水性を定量することが可能である.

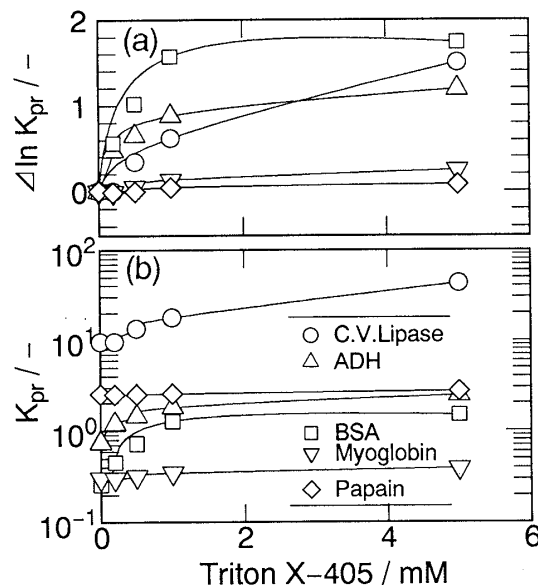


Fig. 6 Effect of the addition of Triton X-405 on (a) the increase in the natural logarithm of the partition coefficients of proteins, $\Delta \ln K_{pr}$ and (b) the partition coefficient, K_{pr}

Triton 濃度を増加させたときの各タンパク質の分配係数変化と Triton 非添加時との分配係数の差 ($\Delta \ln K_{pr}$) を併せて Fig. 6 に示す. 各タンパク質は表面全体の疎水性 (HFS) が異なるために, Triton 非添加時の分配係数の絶対値は異なるが, Triton (5 mM) 添加時と非添加時の分配係数の差をとることで, 局所的な疎水性を統一的に表すことができると考えられる. 種々のタンパク質・酵素について本定量法により求めた $\Delta \ln K_{pr}$ (5 mM) を Fig. 7 に示す. Fig. 5 と比較すると, 局所的な疎水性は表面全体の疎水性 (HFS) の順列とは, その傾向が大きく異なっている. ちなみに, myoglobin とそのアポタンパク質である apomyoglobin では HFS がほとんど同じであるにもかかわらず, 局所的な疎水性はアポ体のほうが 7 倍程度大きい.

高次構造にゆらぎのある巻戻り中間体である molten-globule 状態や高次構造の壊れた変性状態のタンパク質は, 局所的な疎水性は強い. 又, 単量体であるが疎水結合部位をもつことが知られている BSA, 及び各種脱水素酵素などの多量体は, 表面全体の疎水性 (HFS) は小さいが, 局所的な疎水性は強い. これらオリゴマータンパク質はサブユニット接触界面付近に強い疎水結合部位をもつと考えられる. 一方, ほとんどの単量体では局所的な疎水性は小さく, HFS の大きな papain, lysozyme も例外ではない. 従って, HFS に差がない場合でも, 局所的な疎水性に差があるときやアポ体に変換できる場合には, Triton 添加条件での, 分配係数変化を利用する分離が可能となる.

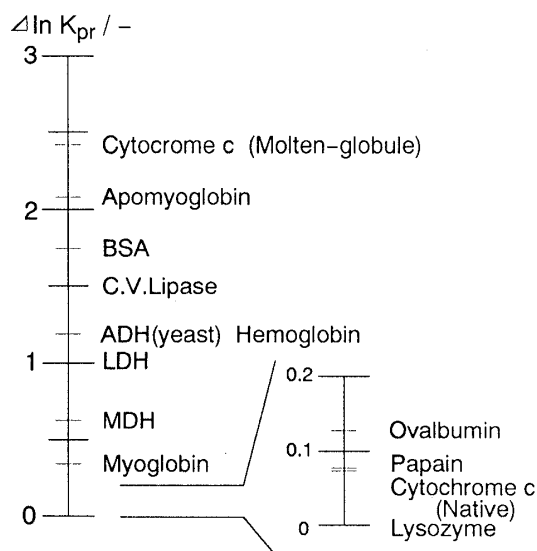


Fig. 7 $\Delta \ln K_{pr}$ ladder of proteins and enzymes

3.4 α -ラクトアルブミン (α -LA) と β -ラクトグロブリン (β -LG) の疎水性差に基づく分離法

タンパク質の 2 種類の疎水性差を利用した分離の具体例として, α -LA と β -LG の分離プロセスの検討を行った. これらは, ミルクなどの食品の添加剤として利用されているチーズホエー中の主タンパク質であり, Ca^{2+} との結合部位をもつことが知られている⁷⁾¹⁰⁾.

α -LA と β -LG の PEG/Dex 系における疎水性プロット (分配係数 K_{pr} vs. 分配系の疎水性 HF) を Fig. 8 に示す. α -LA, β -LG の HFS は, 各々, -31.4 , -83.8

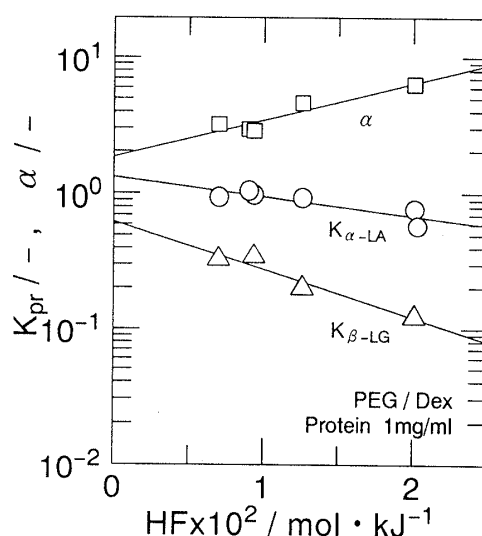


Fig. 8 Effects of HF of phase systems on the partition coefficients of α -lactalbumin and β -lactoglobulin and separation factor (α)

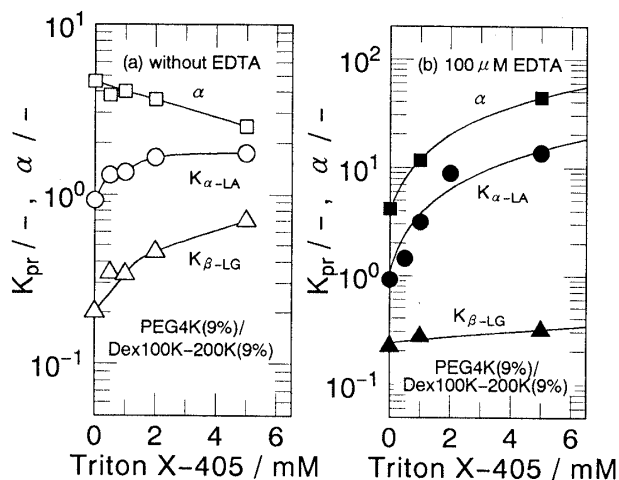


Fig. 9 Effect of the addition of Triton X-405 on the partition coefficients of α -lactalbumin and β -lactoglobulin and the separation factor (α) (a) without and (b) with 100 μ M EDTA

kJ mol^{-1} であり、いずれも親水性の表面をもつが、両者を比較すると、 α -LA のほうが 2 倍程度疎水性が強い。両者の分離係数 $\alpha\{K(\alpha\text{-LA})/K(\beta\text{-LG})\}$ は、系の疎水性 (HF) の増加につれて増加し、PEG/Dex 系において 5 まで増加した。更に、 HF の大きな PEG/塩系を用いることにより、分離係数の改善は可能と考えられる。

両タンパク質の Triton 添加効果を Fig. 9(a) に示す。局所的な疎水性に対応して、Triton 添加効果は二量体である β -LG のほうが大きく、分離係数は Triton 濃度の増加により逆に減少した。そこで、局所的な疎水性による分離法を改善するため、タンパク質のアポ体への変換を検討した。EDTA は Ca^{2+} と錯体を形成することから、 Ca^{2+} と相互作用するタンパク質から Ca^{2+} を除去し、アポタンパク質を形成することができる¹⁰⁾。EDTA を添加したときの Triton 効果を Fig. 9(b) に示す。100 μM の EDTA を添加することによりアポ体が生成し、 α -LA では局所的な疎水性が増加し、逆に、 β -LG では減少した。従って、両タンパク質の分離係数は飛躍的に増加し、一段の操作で α -LA と β -LG をほぼ完全に分離できることを示している。本分離法は表面全体の疎水性差を利用したプロセスよりもはるかに効率的である。

本研究は平成 5 年度文部省科学研究費補助金 (日本学術振興会特別研究費 No. 5-1333) の援助を受けた。ここに謝意を表します。

文 献

- 1) 赤堀四郎, 水島三一郎: “蛋白質化学”, p. 201 (1954), (共立出版).
- 2) C. Bordier: *J. Biol. Chem.*, **256**, 1604 (1981).
- 3) D. A. Dolgish, A. P. Kolomiets, I. A. Bolotina, O. B. Ptitsyn: *FEBS Lett.*, **165**, 88 (1984).
- 4) Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano: *Bunseki Kagaku*, **32**, E379 (1983).
- 5) K. D. Hapner, P. A. Bradshaw, C. R. Hartzell, F. R. N. Gurd: *J. Biol. Chem.*, **243**, 683 (1968).
- 6) A. Helenius, K. Simons: *J. Biol. Chem.*, **247**, 3656 (1972).
- 7) Y. Hiraoka, T. Segawa, K. Kuwajima, S. Sugai, N. Murai: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 1098 (1980).
- 8) S. Hjerten, J. Rosengren, S. Pahlman: *J. Chromatogr.*, **101**, 281 (1974).
- 9) E. Keshavarz, S. Nagai: *Biochim. Biophys. Acta*, **576**, 269 (1979).
- 10) M. J. Kronman, S. K. Sinha, K. Brew: *J. Biol. Chem.*, **256**, 8582 (1981).
- 11) 久保井亮一, 田中寿計, 駒沢 勲: 化学工学論文集, **16**, 775 (1990).
- 12) 久保井亮一, 田中寿計, 駒沢 勲: 化学工学論文集, **17**, 67 (1991).
- 13) 久保井亮一, 矢野浩二, 田中寿計, 駒沢 勲: 化学工学論文集, **19**, 446 (1993).
- 14) A. Mitraki, J. King: *Bio/Technology*, **7**, 690 (1989).
- 15) Y. Nozaki, C. Tanford: *J. Biol. Chem.*, **246**, 2211 (1971).
- 16) V. P. Shanbhag, G.-G. Axelsson: *Eur. J. Biochem.*, **60**, 17 (1975).
- 17) H. Tanaka, R. Kuboi, I. Komasa: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **24**, 661 (1991).
- 18) H. Tanaka, R. Kuboi, I. Komasa: “Advances in Bioseparation Engineering 91”, p. 51, SCEJ (1991).
- 19) C. Tanford: *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 4240 (1962).
- 20) B. Yu. Zaslavsky, N. M. Mestechkina, L. M. Miheeva, S. V. Rogozhin: *J. Chromatogr.*, **240**, 21 (1982).



Evaluation of the surface hydrophobicities of proteins using aqueous two-phase partitioning systems and application to the separation process. Koji YANO, Akihiro WAKAYAMA, Ryoichi KUBOI and Isao KOMASAWA (Department of Chemical Engineering, Osaka University, 1-1, Machikaneyama-cho, Toyonaka-shi, Osaka 560)

A systematic investigation of the surface hydrophobicity of proteins was carried out. Hydrophobicity can be classified into at least two groups: one is the surface net hydrophobicity, which can be quantified by examining the partition behavior of various proteins with differing properties in polyethylene glycol (PEG)/dextran (Dex) systems; the other is the local hydrophobicity originating from the hydrophobic binding site on the surface, and can be evaluated from the increment in the partition coefficient of proteins in PEG/Dex caused by a nonionic surfactant, Triton. Some of the proteins examined were lipase, α -chymotrypsin and cytochrome *c*. Each protein has its own characteristic hydrophobic nature depending on both its conformational change and the interaction with its environment. These hydrophobicity differences can be systematically exploited in order

to achieve an effective separation. As a case study, the separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin, the major proteins in cheese whey, was examined. A highly effective separation was achieved by an enlarged difference in the local hydrophobicities of the apo-proteins formed by removing calcium ion using EDTA.

(Received June 21, 1993)

Keyword phrases

evaluation of surface hydrophobicities of proteins; determination of surface net hydrophobicity and local hydrophobicity; separation using aqueous two-phase partitioning systems; separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin.
