The Japan Society for Analytical Chemistry

BUNSEKI KAGAKU Vol. 47, No. 12, pp. 965–970 (1998)

© 1998 The Japan Society for Analytical Chemistry

報　文

Triton X-114 を用いるミセル水性二相分配法による膜タンパク質の抽出に及ぼす荷電水溶性ポリマーの添加効果

谷　博文®*，大浦　貴史*，上舘　民夫*

Effect of charged water-soluble polymers on the extraction of membrane proteins in a Triton X-114-based aqueous micellar two-phase system

Hirofumi TANI, Takashi OOURA and Tamio KAMIDATE *

*Division of Molecular Chemistry, Graduate School of Engineering, Hokkaido University, Kita-13, Nishi-8, Sapporo-shi, Hokkaido 060-8628

(Received 16 July 1998, Accepted 31 August 1998)

The effect of charged water-soluble polymers on the extractability of membrane proteins in a Triton X-114-based aqueous micellar two-phase system was examined. Cytochrome b_5 (Cyt.b_5), NADH-cytochrome b_5 reductase (fp1), and NADPH-cytochrome P450 reductase (fp2), used as model proteins, were to be well-extracted into a surfactant-rich phase without polymers. In the presence of non-charged dextran, there were no changes in their extractability. However, by the addition of cationic diethylaminoethyl-dextran at the concentration range of 0.01～0.3%, the extractability of Cyt.b_5 and fp2 was greatly reduced. In contrast, the use of anionic dextran sulfate at the same concentration range depressed the extraction of fp1 alone. A further increase in the polymer concentration or salt addition resulted in an increase in the extractability. From a calculation of net charge of the proteins, it was shown that Cyt.b_5 and fp2 are negative and fp1 is positive at pH 7.4, where the extraction was conducted. Thus, the depressed extraction of the proteins in the presence of the charged polymers is attributable to the electrostatic interaction between the proteins and the charged polymers in the aqueous phase. These results indicate that charged polymers could be effective for the selective extraction of membrane proteins in a Triton X-114-based aqueous micellar two-phase system.

Keywords : charged polymer; Triton X-114; two-phase separation; membrane protein; extraction.

1　緒　　言

ポリオキシエチレンアルキルエーテル（POEAE）系非イオン界面活性剤のミセル水溶液は曇点と呼ばれる温度以上に加温すると，ミセルの濃縮した界面活性剤相とミセルをほとんど含まない水相の二相に分離する[1)2)]．この二相間における物質の分配現象を用いたミセル水性二相分配法が金属キレートやタンパク質の分離濃縮に用いられている[3)~9)]．

ミセル水性二相分配法を用いたタンパク質の分離には，POEAE 系界面活性剤の中でも Triton X-114（TX 114）が主に用いられている．TX114 で生体膜から可溶

* 北海道大学大学院工学研究科分子化学専攻：060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

化した膜タンパク質は二相分離によって界面活性剤相に抽出されるのに対し，水溶性タンパク質は水相に分配される．従って，水溶性タンパク質と膜タンパク質を容易に分離することができる．本法は操作が極めて簡便であることから，膜タンパク質精製の初期段階における粗分離法として主に利用されている．この方法はタンパク質の疎水性の違いに基づく分離法であるため，同程度の疎水性を持つ膜タンパク質間の相互分離は困難とされている．

著者らは，アルキルグルコシド系非イオン界面活性剤が水溶性ポリマーの添加により，ポリマーを含んだ水相と界面活性剤相の二相に分相することを見いだし，これをポリマー誘起型のミセル水性二相分配法として膜タンパク質の抽出に応用してきた[10)11)]．その際，ジエチルアミノエチルデキストランや硫酸デキストランなどの荷電ポリマーを用いることにより，膜タンパク質の電荷の違いに基づく分配の制御が可能であることを見いだした[11)]．従って，より高性能で簡便な膜タンパク質の分離法としての利用が可能となった．しかし，荷電ポリマーを導入した高性能ミセル水性二相分配法をはん用性の高い分離法とするためには，膜タンパク質の分離に最も利用されているTX114ミセル水性二相分配系に適用する必要があると考えられる．本研究では，TX114ミセル水性二相分配系に荷電ポリマーを導入し，二相分離挙動並びに膜タンパク質の抽出に及ぼす影響を検討した．更に，本法による膜タンパク質の選択的分離の可能性を探索した

2 実　　験

2・1 試薬及び装置

TX-114はナカライテスク製を特に精製せず使用し，20%(w/v) 水溶液として保存した．水溶性ポリマーにはPharmacia製のデキストランT-500（Dx，平均分子量500000），ジエチルアミノエチル(DEAE)-デキストラン（DEAE-Dx）及び硫酸デキストラン，ナトリウム塩(Dx-S) の3種のデキストランを使用した．DEAE-Dx及びDx-Sはいずれも平均分子量500000のDxから合成されたものである．

膜タンパク質に用いたチトクロム b_5 (Cyt.b_5)，還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)-チトクロム b_5 還元酵素（fp1）及び還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)-チトクロムP450還元酵素（fp2）は，それぞれ既存の方法でブタ肝ミクロゾームから精製した[12)~15)]．水溶性タンパク質であるチトクロム c (Cyt.c，ウマ心臓由来)，ペルオキシダーゼ（POD，西洋わさび由来）はSigma製を使用した．カタラーゼ（クロカビ由来）はServa製のものを使用した．その他の試薬はすべて市販品の特級を特に精製せずに使用した．

温度調整にはヤマト-コマツ製CTE42A型恒温槽を使用した．分相を促進するための遠心分離には，Tomy精工製MGX-150型遠心機を使用した．吸光度の測定には日立製U-2000型ダブルビーム分光光度計を使用した．

2・2 操　作

2・2・1 曇点の測定　所定の濃度の水溶性ポリマーを含む2%(w/v) TX114水溶液をサンプルチューブに入れ，この溶液を恒温槽に浸した．その後，温度を上昇させ，溶液の濁りを観察した．溶液の白濁した温度を曇点とした．

2・2・2 タンパク質の抽出　1.5-mlサンプルチューブに所定量のTX114，タンパク質溶液，Tris-HCl緩衝液及び水溶性ポリマーを加えた後，水を加え，総量を1 mlとした．この溶液を30℃で5分間インキュベートした後，2000×gで5分間遠心分離を行い，水相と界面活性剤相に分相した．その後，各相のタンパク質濃度又は活性を測定し，界面活性剤相への抽出率を算出した．

2・2・3 タンパク質の定量　Cyt.b_5 の濃度は還元型-酸化型差スペクトルの423と409 nmの吸光度の差から，モル吸光係数185000 $cm^{-1}M^{-1}$ を用いて求めた[16)]．fp1及びfp2活性は，電子受容体としてそれぞれフェリシアン化カリウム及びCyt.cを用い，フェリシアン化物還元活性，Cyt.c還元活性として25℃において測定した[17)18)]．その他のタンパク質の定量はビシンコニン酸法[19)]により行い，ウシ血清アルブミンを用いて作成した検量線からタンパク質濃度を計算した．吸光度測定の際，TX114の存在によって溶液に濁りを生じた場合は少量の20%(w/v) Triton X-100を加えて濁りを除いた後に吸光度を測定した．

3 結果及び考察

3・1 Triton X-114の曇点に及ぼす水溶性ポリマーの影響

TX114の曇点は約25℃であることが知られている[9)]が，各種デキストランの添加によって変化することが予想される．そこで，タンパク質の抽出を行う際の相分離温度を決定するため，まず各種デキストランがTX114ミセル水溶液の曇点に及ぼす影響について検討した．デキストランの濃度を変化させて曇点を測定した．結果をFig. 1に示す．電荷を持たないDxを添加した場合，濃

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

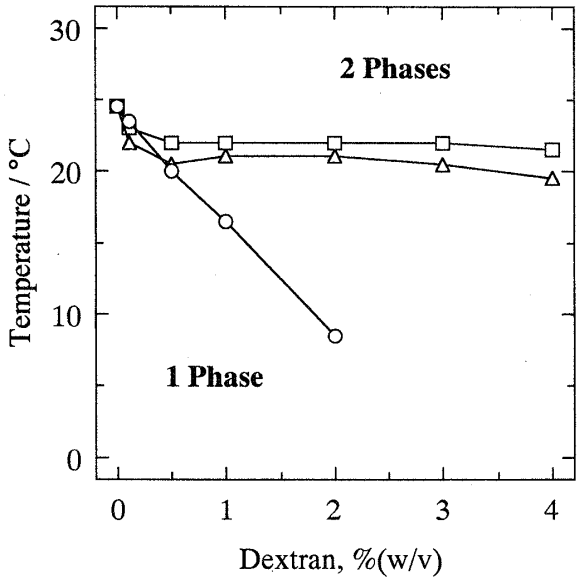

Fig. 1 Effect of dextran concentration on the cloud point of an aqueous micellar solution of 2% (w/v) Triton X-114
○: Dx; □: DEAE-Dx; △: Dx-S

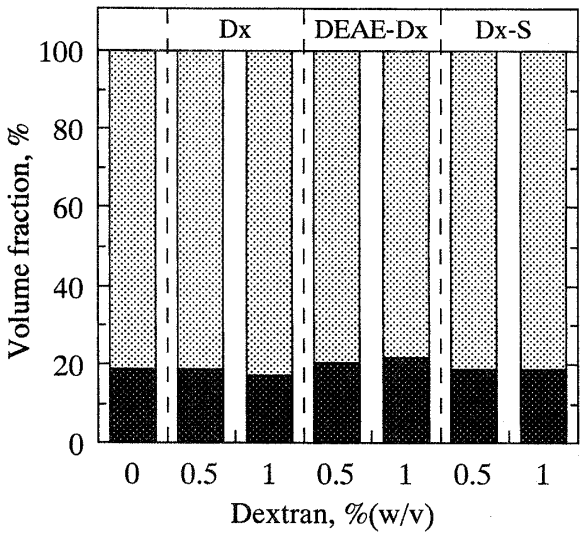

Fig. 2 Effect of dextran concentration on the phase volume in Triton X-114-based aqueous micellar two-phase system
▨: Aqueous phase; ■: Surfactant-rich phase

度の増加とともに曇点は著しく減少することが分かった．すなわち，二相分離が促進されたことを示している．同様の現象が他の POEAE 系界面活性剤とポリエチレングリコール[20]やポリビニルピロリドン[21]の組み合わせでも報告されている．ポリマーの分子量を増加させると，曇点はより一層低下する[20)21)]ことから，このような水溶性ポリマーの添加による非イオン界面活性剤ミセル水溶液の相分離の促進は，ポリマーによるミセルの立体的な排除効果によるものと考えられる．一方，水溶性ポリマーとして陽イオン性の DEAE-Dx 及び陰イオン性の Dx-S を用いた場合，低濃度で若干の曇点の低下が見られた後，ほぼ一定となった．以上の結果から，抽出の際の相分離温度は 30℃ 以上とした．

二相分離後の各相の体積は，タンパク質の抽出率を求める際に必要なパラメーターとなる．そこで，相体積に及ぼす各種デキストランの影響を検討した．結果を Fig. 2 に示す．曇点の結果とは対照的に，界面活性剤相の体積分率は 20% 程度でほぼ一定となり，デキストランの添加による目立った変化は見られなかった．

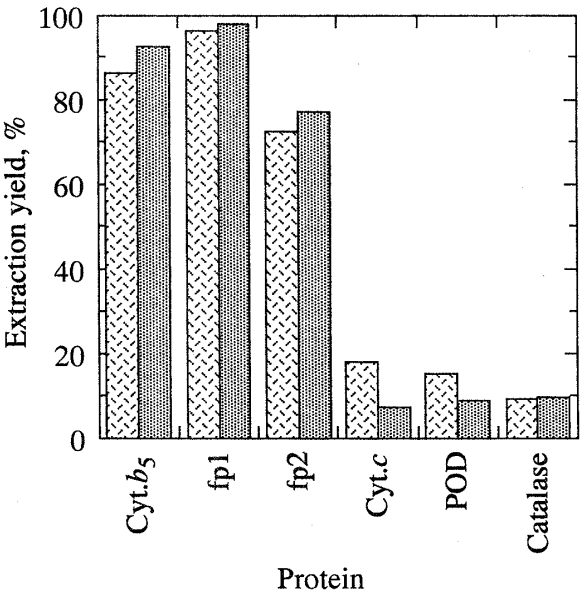

Fig. 3 Extraction of proteins in Triton X-114-based aqueous micellar two-phase system
2% (w/v) Triton X-114, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. Phase separation temperature: ▨, 30℃; ▩, 35℃

3・2　各種タンパク質の抽出

水溶性ポリマーの影響を検討するに先立って，TX114 ミセル水性二相分配系におけるタンパク質の抽出挙動を相分離温度 30℃ と 35℃ で調べた．疎水的なタンパク質には肝ミクロゾーム中の電子伝達系膜タンパク質である Cyt.b_5，fp1 及び fp2 を用いた．又，比較のために水溶性タンパク質である Cyt.*c*，POD 及びカタラーゼについて同様に抽出を行った．結果を Fig. 3 に示す．疎水

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

的な膜タンパク質はいずれもそのほとんどが界面活性剤相へ抽出され，抽出率は相分離温度の上昇に伴って増加した．一方，水溶性タンパク質であるCyt.*c*，POD及びカタラーゼの抽出率は低く，その値は相分離温度の上昇に伴って低下した．相分離温度が高いほど，二相間の界面活性剤の濃度差が大きくなり，TX114がより界面活性剤相に濃縮される[22]ことが知られている．一方，タンパク質は特別な相互作用がない限りミセルとの間に立体的な排除効果が働き，界面活性剤相にはほとんど抽出されない[23]．従って膜タンパク質の場合，TX114ミセルとの間に疎水性相互作用が働くため，界面活性剤相に抽出され，温度の上昇に伴い抽出率は更に増加したものと考えられる．これに対し，水溶性タンパク質はTX114ミセルとの間に疎水性相互作用がほとんど働かないため，温度の上昇によってミセルによる排除効果のみが強くなり，抽出率が低下したものと考えられる．以上の結果から，TX114ミセル二相分配系におけるタンパク質の抽出挙動がミセルとタンパク質との疎水性相互作用に強く依存していることが確認された．

3・3 荷電ポリマー共存下における膜タンパク質の抽出

電荷の異なる3種類のデキストラン共存下において膜タンパク質の抽出を行った．各タンパク質の抽出率と添加したデキストラン濃度との関係をFig. 4に示す．Fig. 4, aにおいて，電荷を持たないDxを添加した場合，抽出率はほとんど変化しなかった．一方，正電荷を有するDEAE-Dxを添加すると，fp1の抽出率はほとんど変化しなかったのに対し，Cyt.b_5及びfp2の抽出率はDEAE-Dx濃度の増加に伴い大きく減少した後，再び増大した．DEAE-Dx濃度が0.01%及び0.3%のとき，Cyt.b_5及びfp2の抽出率はそれぞれ最小となった（Fig. 4, b）．又，負電荷を有するDx-Sを用いた場合，Cyt.b_5及びfp2の抽出率はDx-S濃度の増加に伴いわずかに増加した．それに対し，fp1の抽出率は著しく低下し，Dx-S濃度0.1%付近で最小となった後，増大した（Fig. 4, c）．荷電デキストランによるこのような抽出率の変化は，水相中におけるデキストランと膜タンパク質との静電的な相互作用並びにデキストランの膜タンパク質に対する立体的な排除効果によるものと説明できる．すなわち，デキストランが低濃度のとき，水相中の荷電置換基と膜タンパク質は静電的に結合し，抽出率は抑制される．しかし，タンパク質の濃度が決まっている以上，荷電置換基による抽出抑制効果はデキストラン濃度の増加とともに頭打ちとなる．逆に，高濃度になるにつれ，デキストランによる排除効果のほうが強く働き，再び界面活性剤相に抽出されるものと推察される．

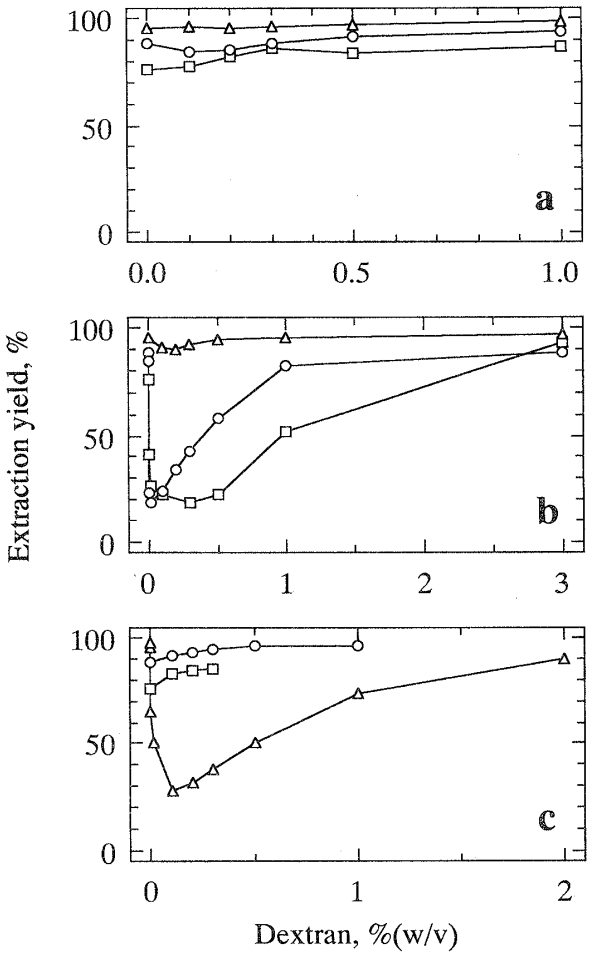

Fig. 4 Effect of dextran concentration on the extraction of membrane proteins in Triton X-114-based aqueous micellar two-phase systems
2%(w/v) Triton X-114, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. Phase separation temperature: 30℃. a: Dx; b: DEAE-Dx; c: Dx-S; ○: Cyt.b_5; △: fp1; □: fp2

水溶性ポリマーと膜タンパク質との静電的相互作用を検証するために，各膜タンパク質のアミノ酸組成から膜タンパク質の電荷を求めた．これは，荷電アミノ酸残基数とその酸解離定数から各pHにおける総電荷数を算出する方法[24]である．アミノ酸組成は，Cyt.b_5及びfp2はブタ肝ミクロゾーム[25,26]のものを，fp1はウシ肝ミクロゾーム[27]のものをそれぞれ引用した．pHと算出した総電荷数との関係をFig. 5に示す．Fig. 5から明らかなように，抽出を行うpH 7.4において，Cyt.b_5とfp2は負に，fp1は正に帯電していることが分かった．従って，Cyt.b_5及びfp2はDEAE-Dxと，fp1はDx-Sと静電的に結合することが可能となり，Fig. 4の結果と良く一致した．

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

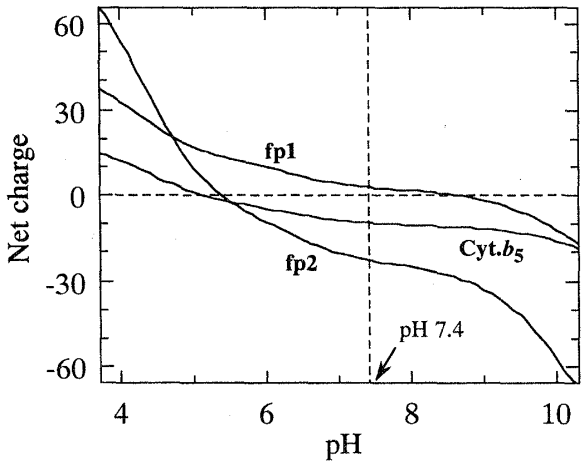

Fig. 5 Calculated net charge of Cyt.b_5, fp1, and fp2 as a function of pH

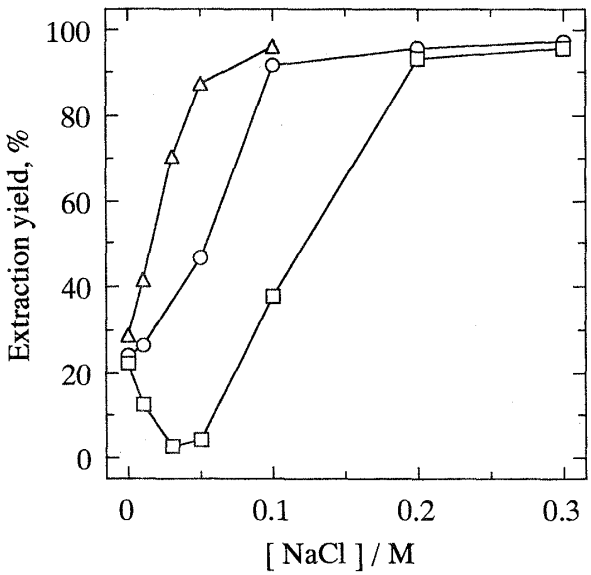

Fig. 6 Effect of NaCl concentration on the extraction of membrane proteins in Triton X-114-based aqueous micellar two-phase systems containing charged dextrans

2%(w/v) Triton X-114, 0.1%(w/v) DEAE-Dx (for Cyt.b_5: ○, and fp2: □) or Dx-S(for fp1: △), 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. Phase separation temperature: 30℃

又，各膜タンパク質の抽出率が低下するデキストラン濃度条件下で NaCl を添加し，その影響を調べた．添加した NaCl 濃度と抽出率の関係を Fig. 6 に示す．0.1% Dx-S 共存下における fp1 の抽出率並びに 0.1% DEAE-Dx 共存下における Cyt.b_5 の抽出率は，NaCl 濃度の増加に伴って単調に増加した．これは，塩の添加により静電的相互作用が弱められたためと考えられる．一方，0.1% DEAE-Dx 共存下における fp2 の抽出率は NaCl の添加によっていったん低下し，30 mM で最低となった後，増加した．Cyt.b_5 や fp1 は比較的その電荷が小さく，低濃度の NaCl によって荷電デキストランから脱着するのに対し，fp2 はより大きな負電荷を持つために低濃度の NaCl 濃度では脱着が起こらなかったものと考えられる．NaCl 濃度の増加に伴い TX114 とデキストラン混合水溶液の二相分離が促進されることから，低濃度の NaCl の添加による fp2 の抽出率の低下は，DEAE-Dx が水相中により分配したためと考えられるが，詳細は明らかになっていない．

以上の結果より，TX114 ミセル水性二相分配法において荷電ポリマーを用いることにより，膜タンパク質の電荷の違いに基づく抽出分離の可能性が示された．又，イオン強度を調節することで同じ電荷符号を持つ膜タンパク質間の分離も可能であることが分かった．従って，これまで TX114 ミセル水性二相分配法を用いて粗分離されていた多くの膜タンパク質のより精密な分離と迅速な精製が可能になると考えられる．

（1997 年 10 月，日本分析化学会第 46 年会において一部発表）

文　献

1) K. Shinoda, T. Nakagawa, B.-I. Tamamushi, T. Isemura: "*Colloidal Surfactants: Some Physicochemical Properties*", (1963), (Academic Press, New York).
2) M. J. Schick (Ed.): "*Nonionic Surfactants: Physical Chemistry*", (1987), (Marcel Dekker, New York).
3) H. Watanabe, H. Tanaka: *Talanta*, **25**, 585 (1978).
4) C. Bordier: *J. Biol. Chem.*, **256**, 1604 (1981).
5) W. L. Hinze, E. Pramauro: *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **24**, 133 (1993).
6) A. Sánchez-Ferrer, R. Bru, F. García-Carmona: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 275 (1994).
7) T. Saitoh, H. Tani, T. Kamidate, H. Watanabe: *Trends Anal. Chem.*, **14**, 213 (1995).
8) E. Pramauro, E. Pelizzetti: "*Surfactant in Analytical Chemistry: Applications of Organized Amphiphilic Media*", p. 397 (1996), (Elsevier Science B. V., Amsterdam).
9) H. Tani, T. Kamidate, H. Watanabe: *J. Chromatogr. A*, **780**, 229 (1997).
10) T. Saitoh, H. Tani, T. Kamidate, T. Kamataki, H. Watanabe: *Anal. Sci.*, **10**, 299 (1994).
11) H. Tani, T. Saitoh, T. Kamidate, T. Kamataki, H. Watanabe: *Biotechnol. Bioeng.*, **56**, 311 (1997).

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

12) Y. Imai: *J. Biochem.*, **80**, 267 (1976).
13) T. Kamataki, K. Maeda, Y. Yamazoe, T. Nagai, R. Kato: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 1 (1981).
14) A. I. Tauber, J. Wright, F. K. Higson, S. A. Edelman, D. J. Waxman: *Blood*, **66**, 673 (1985).
15) M. S. Shet, K. Sathasivan, M. A. Arlotto, M. C. Mehdy, R. W. Estabrook: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2890 (1993).
16) T. Omura, R. Sato: *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370 (1964).
17) K. Mihara, R. Sato: *J. Biochem.*, **71**, 725 (1972).
18) Y. Yasukochi, R. T. Okita, B. S. Masters: *Arch. Biochem. Biophys.*, **202**, 491 (1980).
19) P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk: *Anal. Biochem.*, **150**, 76 (1985).
20) M. Yamazaki, M. Ohshika, T. Ito: *Biochim. Biophys. Acta*, **1063**, 175 (1991).
21) N. K. Pandit, J. Kanjia: *Int. J. Pharm.*, **141**, 197 (1996).
22) R. A. Ramelmeier, G. C. Terstappen, M. R. Kula: *Bioseparation*, **2**, 315 (1991).
23) Y. J. Nikas, C.-L. Liu, T. Srivastava, N. L. Abbott, D. Blankschtein: *Macromolecules*, **25**, 4797 (1992).
24) A. Sillero, J. M. Ribeiro: *Anal. Biochem.*, **179**, 319 (1989).
25) M. Haniu, T. Iyanagi, P. Miller, T. D. Lee, J. E. Shively: *Biochemistry*, **25**, 7906 (1986).
26) J. Ozols: *Biochim. Biophys. Acta*, **997**, 121 (1989).
27) J. Ozols, G. Korza, F. S. Heinemann, M. A. Hediger, P. Strittmatter: *J. Biol. Chem.*, **260**, 11953 (1985).

要　旨

Triton X-114 を用いたミセル水性二相分配系に荷電水溶性ポリマーを添加し，膜タンパク質の界面活性剤相への抽出に及ぼす影響を検討した．膜タンパク質にはミクロゾーム中で電子伝達系を構成するチトクロム b_5，NADH-チトクロム b_5 還元酵素，NADPH-チトクロム P450 還元酵素を用いた．電荷を持たないデキストランを添加した場合，添加しなかったときと同様，いずれの膜タンパク質も界面活性剤相に抽出された．一方，正電荷を持つジエチルアミノエチルデキストランを添加すると，チトクロム b_5 及び NADPH-チトクロム P450 還元酵素の抽出が，負電荷を持つ硫酸デキストランを用いると NADH-チトクロム b_5 還元酵素の抽出がそれぞれ抑制された．膜タンパク質の電荷並びに塩を添加したときの抽出結果から，荷電ポリマーによる抽出抑制効果は膜タンパク質と水相中のポリマーとの静電的相互作用によることが明らかになった．

NII-Electronic Library Service