



Title	BIOSEPARATION PROCESS OF PROTEINS AND ENZYMES USING AFFINITY AQUEOUS TWO-PHASE EXTRACTION SYSTEMS
Author(s)	王, 衛紅
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37932
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	おう	えい	こう
博士の専攻	王	衛	紅
分野の名称	博	士	(工 学)
学位記番号	第	1 0 2 8 9	号
学位授与年月日	平成	4 年 3 月 25 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
	基礎工学研究科	化学系専攻	
学位論文名	BIOSEPARATION PROCESS OF PROTEINS AND ENZYMES USING AFFINITY AQUEOUS TWO-PHASE EXTRACTION SYSTEMS (アフィニティ水性二相抽出系を利用したタンパク質および酵素の バイオ分離プロセス)		
	(主査)		
論文審査委員	教授	駒沢 勲	
	(副査)		
	教授	今中 利信	教授 樺田 栄一
	教授	笛野 高之	教授 東稔 節治
		助教授	久保井亮一

論文内容の要旨

遺伝子組換え、細胞融合、動植物細胞培養などのバイオテクノロジーの著しい発展に伴い、各種の高機能性生理活性物質を工業的な規模で経済的に生産することが必要とされている。本論文は、アフィニティ水性二相抽出法を利用し、細胞破碎や固液分離操作をも複合した酵素・タンパク質の高度バイオ分離プロセスの確立を目的とする。親水的なアルコール脱水素酵素 (ADH) と疎水的なパパインを分離対象とし、水性二相分配系において、タンパク質の分配特性を支配する各種相互作用を研究した。また、各精製段階を支配するパラメータを定量的に評価し、分離精製プロセス全体の合理的設計の確立を試みた。その成果を以下の 4 部にまとめた。

第 1 部では、パン酵母からの ADH の回収を例として、破碎による細胞内タンパク質の放出特性と二相分配によるセルデブリの除去について検討した。二相抽出系を構築する成分、ポリエチレングリコール (PEG 1540) の 6 w/w% 水溶液を破碎媒体とする時、ADH の放出速度および放出選択性が最大となり、最適な破碎条件が得られた。直接、PEG/リン酸塩水性二相系で細胞を破碎することによって、酵素の抽出およびセルデブリの除去が可能である。セルデブリの分配特性を定量的に評価し、タンパク質放出率と分配系の特性 (疎水性) の調整によってこれを制御できることを示した。

第 2 部では、二相分配系におけるタンパク質-タンパク質間、タンパク質-アフィニティリガンド修飾 PEG 間の各種相互作用を検討した。静電的な相互作用の強いリガンド GlyGlyTyrArg-PEG の場合は、塩による遮蔽効果によって、PEG/リン酸塩系ではパパインに対する親和力が消失する。一方、合成色素 Procion Blue MX-R ではパパインに対する親和力の中で疎水的相互作用の寄与が大きいため、PEG/リン酸塩系においても PEG/Dex 系と同程度の阻害効果を示す。続いて、水性二相系におけ

る分配特性の解析より、タンパク質間相互作用、表面特性およびコンフォメーション変化等を検討した。キモパインの共存効果の解析結果から、パパインとキモパインは表面構造が類似し、1対1の複合体を形成していると推測される。Procion Blueをアフィニティリガンドとして、その共存効果を検討した結果、アルカリpH条件でのアフィニティリガンドの相互作用によって、ADHの高次構造（4次、3次構造）が変化し、分配挙動も大きく変化することを示した。

第3部では、タンパク質のアフィニティ分配を支配するパラメータを定量的に評価した。ADHなどの脱水素酵素に対する安価な合成色素の阻害定数はPEG/リン酸塩系においても、PEG/Dex系と同程度の値が得られた。経済性に優れたPEG/リン酸塩系はパパインのみならず、多数の脱水素酵素のアフィニティ抽出に適用できることを初めて明らかにした。Procion Blue MX-R 5mMの添加により、分配係数はADHで2倍、G6PDHで4倍、GDHで10倍、LDHで30倍まで増加した。PEG/Dex系と比較して、PEG/リン酸塩系は合成色素リガンドの分配係数と脱水素酵素に対する抽出選択性が高いなどの特徴を有する。PEG/リン酸塩系でパパイラテックスからのパパインのアフィニティ抽出を行った。Procion Blue MX-Rは、PEG/リン酸塩系の疎水性を増加させるために、疎水性の強いパパインを上相に分配させると共に、リソチームやキモパインのような親水性夾雑タンパク質を下相に分配させる複合効果を有する。この結果、従来の多段の分画沈澱法によるパパインの精製より、1段のアフィニティ抽出の方が有効であることを実験的に示した。

第4部では、以上の知見を総合して、細胞破碎と固液分離操作を複合する細胞内脱水素酵素の抽出プロセスの最適化を検討し、目的酵素の分配を最大にすると共に、夾雑物およびセルデブリの分配を最小にする、アフィニティ抽出・分離プロセスの最適設計スキームを提出した。

論文審査の結果の要旨

細胞融合法などによって、新規な酵素・タンパク質が大量に生産できるようになった。ところが問題はこれらを変性・失活させずに、すなわち特異な高次構造を維持させたまま、夾雑物質と分離し、精製・濃縮するというダウンストリームプロセスが困難なことである。本研究は水性二相分配系を用いて、分離・精製プロセスの高効率化を目指したものである。

本論文ではパパイラテックスからの消化酵素パパインの分離、およびパン酵母からのアルコール脱水素酵素の分離・精製をモデル系とし、緒論、本論4部および結論よりなる。主な成果は次のようになる。

- (1) 細胞内酵素を溶かし出すために破碎し、細胞破碎屑（セルデブリ）の分離がまず必要である。セルデブリの水性二相系における分配について研究し、酵素・タンパク質と同様にセルデブリの表面疎水性と分配系の疎水性との相関によって、支配されることを見出した。
- (2) 水相中に溶出した酵素・タンパク質の分配を支配するのは目的成分と分離場（上相液と下相液）との疎水的、静電的、アフィニティ（生物学的特異的親和性）相互作用である。目的酵素とアフィニティ

効果を持つリガンドで相構成ポリマーのポリエチレングリコールを修飾したアフィニティ抽出ではこのリガンドが目的酵素の構造と安定性に大きく影響する場合があることを指摘した。目的成分（パパイン）に親和性を持つプロシオンブルーをアフィニティリガンドとして用いると、パパインに対する親和性による従来から予測される効果とともに、分離場の疎水性も変化させるため、親水性の夾雑タンパク質を排除するという複合効果が出現することを見出している。

- (3) アフィニティ抽出におけるリガンドの解離定数、阻害定数、分配係数などアフィニティ分配を支配するパラメータを詳細に検討した。目的酵素として、アルコール脱水素酵素など8種類の脱水素酵素を、群特異性のリガンドとして4種類のトリアジン染料を用いた実験を行った。ここでリン酸基に親和性を持つ酵素を除けば、相構成物質としてリン酸カリを用いた二相系でもアフィニティ効果が出現することを見出している。これによって、二相系の工業的規模の操作に途を開いた。
- (4) 細胞内酵素の溶出のための破碎とアフィニティ抽出を同時に行うという新規な方式が可能な場合があることを見出した。さらに、アフィニティ抽出を中心として分離プロセスの合理的な設計法を研究している。

以上のように、本研究の成果は、アフィニティ水性二相分配系による生理活性物質の分離精製プロセスに新しい知見を提出するとともに、工業的な設計法の基盤を提出したものであり、化学工業およびその関連分野に貢献することが大きい。よって、本研究は、博士（工学）の学位論文として価値があるものと認める。