



Title	Design and Development for Protein Production and Purification Processes Using Aqueous Two-Phase Systems
Author(s)	田中, 寿計
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38240">https://hdl.handle.net/11094/38240</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>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	たなか ひさかず 田 中 寿 計
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 7 8 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 5 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	Design and Development for Protein Production and Purification Processes Using Aqueous Two-Phase Systems (水性二相分配系を用いるタンパク質生産分離プロセスの設計と開発)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 駒 沢 勲 (副査) 教 授 東 稔 節 治 教 授 葛 西 道 生 教 授 菅 健 一 教 授 高 木 俊 夫 助 教 授 久 保 井 亮 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

遺伝子組換え・細胞培養・高度分離精製法の急速な発展に伴い、新規な機能価値を付与した生体高分子の開発・設計・生産が可能となってきた。これらのバイオプロセスの開発に際して、upstreamにおける簡便・敏速・体系的な表面特性・機能の解析と、downstreamでの温和な条件下での高選択的分離が求められている。本論文は、タンパク質・微生物・環境にやさしく、生体高分子の分離・精製の優れた手法として用いられてきた水性二相分配法の、バイオプロセス全体を対象とする化学工学の立場からの体系化を目的とし、(1)タンパク質の表面特性の解析法の確立、(2)表面特性の差を用いた目的タンパク質の分離精製の体系化、(3)微生物・菌体の連続培養、放出、分離プロセス (upstream+downstream) の複合化による、省資源・省エネルギー型、高選択的なタンパク質の生産分離のプロセスの合理的開発、について検討を行った。論文は、3章から構成される。

第1章では、水性二相分配系 (ATPS) におけるタンパク質の分配係数に寄与する各種効果、疎水、静電、塩析、Triton 効果を定量的に評価し、それらの知見をもとに、未知タンパク質の表面特性 (表面疎水性 HFS, 等電点 pI, 分子量 M, 疎水結合部位) を定量するためのスキームを構築した。疎水効果による分配係数は分配系の疎水性 (上下相間の疎水性差, HF) と、タンパク質の表面疎水性 (HFS) を用いて表せる。分配系の疎水性 (HF) を疎水性が既知のアミノ酸の分配を用いて定量し、その制御法を確立した。HF は分配系の種類、ポリマー分子量・濃度、pH、塩添加により変化した。タンパク質の表面疎水性 HFS は HF が既知の分配系において、タンパク質を分配することにより定量できた。HFS 値は表面全体の疎水性に対応し、タンパク質によって大きく異なり、また構造変化と定量的に相関できた。ATPS に塩を添加すると、タンパク質に対し静電効果と疎水 (塩析) 効果が働く。静電効果を用いることによりタンパク質の等電点を評価できた。塩を高濃度で添加すると、塩による疎水効果によりタンパク質の疎水性が変化する。疎水性の変化の大きさ ( $\Delta$ HFS) は、アミノ酸・ペプチド・タンパク質の分子量と相関できた。非イオン性界面活性剤 Triton は相互作用が温和でかつ特異的であり、部分的変性・構造化したタンパク質、BSA、オリゴマーなど疎水結合部位をもつタンパク質と相互作用し分配係数を増加させた。Triton を用いることにより、タンパク質の疎水結合部位の解析が可能になった。以上の知見とスキームに基づき、表面特性や生物機能の解明が待たれている枯草菌の細胞壁溶解酵素 antolysin の解析を行い、未知タンパク質の表面特性・機能を簡便・敏速・体系的に解析できることを実証した。

第2章では、タンパク質の表面特性差を用いるタンパク質の分離・精製の体系化を行った。最適系を構築するため

の分離スキームを合成した。表面特性の差異に基づき、疎水、静電、塩、Tritonの各効果により、系の特性を制御することによって目的タンパク質の最適分離が可能になることを、いくつかのモデル分離により実証した。また複合効果により最小のステップで最大の分離効率を得られることを示した。分離スキームを用い大腸菌破碎液からの $\beta$ -galactosidaseの分離を行った。PEG/KPi系を用いる、 $\beta$ -galactosidaseの最適分離プロセスを構築した。

第3章では、水性二相分配系において培養、放出、分離プロセスを統合することによる、タンパク質生産・分離プロセスの開発を行った。このとき、水性二相系における培養と目的タンパク質の選択的放出・分配が課題となる。PEG/KPi系においても、菌体増殖速度は低下するものの枯草菌の培養が可能であることがわかった。PEG/KPi系における枯草菌変異株 ATCC 6633の培養によって、疎水性の強い界面活性作用を持つ抗生物質 subtilin の連続培養分泌生産が可能になった。内在性タンパク質については、枯草菌 autolysin に注目し、細胞自身が持つ自己溶解機能 (autolysis) をコントロールすることにより、選択的に内在性タンパク質 G 6 PDH の放出を行うことができた。断続的溶菌により細胞をリサイクルしながら、G 6 PDH を上相から回収する省資源・省エネルギー・環境調和型の新規なバイオプロセスが可能になった。

水性二相分配法を体系的に用いることにより、バイオプロセスを構成する upstream (機能性タンパク質の培養生産・特性解析) から downstream (細胞からの放出・分離精製) までを定量的に評価した。またこれらの統合による、プロセス全体の合理的な開発・設計法を提出した。

## 論文審査の結果の要旨

遺伝子組換え・細胞培養法の急速な発展によって、新規な機能を付与した酸素などの生体高分子の生産が可能となってきた。これらのバイオプロセスの開発に際し、生体高分子の迅速かつ体系的な特性の解析法と夾雑成分との分離・精製法が必要である。水性二相分配法はポリエチレングリコール (PEG) とデキストラン (Dex) などの2種類の水溶性ポリマー、または、PEG とリン酸カリウム (KPi) などのポリマーと塩の水溶液が2液相を形成することを利用するものであり、タンパク質・微生物さらに環境に優しい分配法である。生理学や生化学の分野で用いられてきたこの分配法を、化学工学の立場から、すなわちバイオプロセス全体を対象にし、工業的応用を目的とし研究している。本論文は緒論、本論3章、結論よりなり、主な成果は次のようである。

- (1) まず、各種タンパク質の分配係数に寄与する因子として疎水、静電、塩析および界面活性剤 (Triton) の各効果を定量的に評価した。疎水効果は分配系の疎水性 (上下2相間の疎水性差) と抽質としてのタンパク質の表面疎水性を用いて表現している。分配系の疎水性は、疎水性が既知の各種アミノ酸の分配特性の解析から表現できた。各種タンパク質の native な状態における表面疎水性を定量するとともに、構造変化と表面疎水性変化とを相関させた。静電効果については、電氣的ポテンシャル差とタンパク質の表面電荷との相互作用とした。塩析効果については、タンパク質周囲の水の塩による構造変化と対応させて解析している。さらに Triton 添加によるタンパク質の分配挙動の解析から、タンパク質の疎水結合部位 (局所的疎水性) の定量的評価が可能となることを示した。
- (2) (1)の知見をもとにして未知タンパク質の表面疎水性、等電点 pI, 分子量、および疎水結合部位の定量が可能となる。そこで枯草菌の細胞壁溶解酵素 autolysin の特性を測定した。各種タンパク質の表面特性の微妙な差異を利用して、すなわち、疎水・静電・塩析および Triton 添加の各効果または複合効果を利用して、目的タンパク質の最適分離の体系化を行っている。これをいくつかのモデル分離実験によって実証するとともに、大腸菌破碎液から  $\beta$ -galactosidase の分離を、PEG/KPi の二相系で実施している。
- (3) 二相系を用いて、培養から分離までを一段で実行する新規なプロセスを研究している。このとき、培養に加えて、目的タンパク質の選択的放出・分配が問題となる。放出性生産物と内在性タンパク質の両者を対象とした。前者については、枯草菌変異株を用いた subtilin の連続培養・分泌・生産が PEG/KPi 系において可能なことを示した。後者については、枯草菌 autolysis を対象とし、断続的溶菌によって、細胞をリサイクルしつつ、脱水素酵素 G 6 PDH を上相から回収するプロセスを開発している。

以上のようにバイオプロセスを構成するタンパク質の特性解析 (分析場)、培養 (生産場)、および分離・精製 (分

離場)の各段階を系統的に研究した。さらにこれらの複合化による新規なバイオプロセスの開発・設計法の基盤を提出したものである。これらの成果は生物化学工学および関連工業分野に貢献するところが大である。よって、本研究は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。