

## 研究課題別研究評価

1 研究課題名： タンパク質多層集積構造によってバイオテクノロジーを飛躍させる研究

2 研究者名： 斎藤 恭一

3 研究のねらい：

多孔性中空糸膜（内径 2mm，外径 3mm，孔の直径 0.4  $\mu\text{m}$ ，孔の体積割合 70%）に，長さ 0.1  $\mu\text{m}$  程度の高分子鎖を，高密度にしかも膜全体に均一にグラフト（接ぎ木）する．以後，この高分子鎖をグラフト高分子鎖と呼ぶ．このグラフト高分子鎖へ荷電基を導入すると，高分子鎖がその電荷によって互いに反発し，孔の表面から孔に向かって高分子鎖がブラシのように伸びる．荷電基密度を変えることにより，この高分子鎖の伸び具合を制御できる．伸びた高分子鎖間に，タンパク質を多層にぎっしりと集積させた形を作り出すことを見出した．この多孔性中空糸膜という“マクロな形”の孔表面上に形成させた「タンパク質多層集積構造」という“マイクロな形”を利用して，(1)タンパク質の高速・高濃縮精製，(2)光学異性体の高速・完全分離，および(3)高活性な酵素反応という 3 つの高性能なはたらきを実現することを研究のねらいとした．

4 研究結果及び自己評価：

1) タンパク質の高速・高濃縮精製

タンパク質の精製は，現状ではおもに，ビーズ充填カラムクロマト法によっておこなわれている．しかしながら，時間と手間がかかるという欠点がある．そこで，イオン交換基をもつグラフト高分子鎖を固定した多孔性膜にタンパク質を多層集積させておいて，そこへ NaCl 水溶液を透過させることによって，高速・高濃縮率でタンパク質を溶出させるという手法を提案する．

ジエチルアミノ基をもつグラフト高分子鎖を固定した多孔性中空糸膜に，ウレアーゼ溶液を膜内面から外面へ向かって孔内を透過させた．ウレアーゼは膜を透過する間に，孔表面から伸びたグラフト高分子鎖中のジエチルアミノ基に吸着する．ウレアーゼの吸着量は，膜 1 グラムあたり 2 グラムに達した．この値は従来の吸着材に比べると 2 桁多い．多層集積のおかげであった．吸着操作を終えた後，溶出操作をおこなった．NaCl もタンパク質も透過流に乗って輸送されるので，タンパク質が瞬時に全量，高濃縮率で溶出された．

2) 光学異性体の高速・完全分離

光学異性体は，生体に対する薬効や毒性が異性体間で全く異なる．そこで，特に医薬や食品分野では，これらの異性体を完全に分離する必要性が高まっている．そこで，グラフト高分子鎖を固定した多孔性膜に光学異性体を識別するタンパク質の一つであるウシ血清アルブミン(BSA)を多層集積させておき，そこへ光学異性体を透過させることにより，光学異性体を高速，且つ完全に分離するという手法を提案する．

ジエチルアミノ基をもつグラフト高分子鎖を固定した多孔性中空糸膜に，アルブミン溶液を膜内面から外面へ向かって孔内を透過させた．膜を作成するときの転化率を変えてグラフト高分子鎖中のイオン交換基密度を振ることによって，アルブミンの多層集積度を 1 から 6 まで変化させた．膜の孔に移動相を透過させておいてそこへ光学異性体として DL-トリプトファンを一定量注入した．得られるクロマトグラフから保持時間を調べ，分離係数を算出した．多層集積度が高いほど分離係数も大きくなり，完全分離を達成した．多層集積を利用した甲斐があった．

3) 高活性な酵素反応

タンパク質として酵素を使うと多層集積構造は高活性な反応場となることを実証する．アミノアシラーゼ溶液をジエチルアミノ基をもつグラフト高分子鎖を固定した多孔性中空糸膜にこれまでと同様に透過させ，15 層分を多層集積させた．さらに，酵素の脱落を防ぐためにグルタルアルデヒドを使って

酵素間を架橋した。こうして作成した固定化酵素膜に、アセチル-DL-メチオニン溶液を透過させた。膜外面からの流出液中の不斉加水分解されて生成した L-メチオニン濃度を測定し、活性を算出した。これまでに報告されている活性の値に比べて、10 倍高流量にしても 9 倍活性が高くなった。

この酵素反応の他にも、アスコルビン酸オキシダーゼを多層集積した膜を使ったアスコルビン酸による脱酸素、そして環状イソマルトオリゴ糖合成酵素を多層集積した膜を使ったデキストランからの環状イソマルトオリゴ糖の製造でも多層集積構造が活性の向上に有効であった。

## 5 研究総括の見解：

多孔性中空糸膜全体に、高分子を高密度でつけて、タンパク質の濃縮精製、光学異性体の分離、能率の良い酵素反応などを行わせるという新技術開発である。ウレアーゼ吸着は膜 1 グラムあたり 2 グラムに達し、尿素除去に卓効を示した。パイロット実験は成功しているが、工業スケールにするには様々な工夫が必要と思われる。

## 6 主な論文：さきがけ研究の成果から掲載および受理された論文 14 のうち 4 つ選択

- (1) I. Koguma, K. Sugita, K. Saito, and T. Sugo, Multilayer binding of proteins to polymer chains grafted onto porous hollow-fiber membranes containing different anion-exchange groups, *Biotechnol. Prog.*, 16, 456-461(2000).
- (2) M. Nakamura, S. Kiyohara, K. Saito, K. Sugita, and T. Sugo, High resolution of DL-tryptophan at high flow rates using a bovine serum albumin-multilayered porous hollow-fiber membrane, *Anal. Chem.*, 71, 1323-1325(1999).
- (3) T. Kawai, K. Sugita, K. Saito, and T. Sugo, Extension and shrinkage of polymer brush grafted onto porous membrane induced by protein binding, *Macromolecules*, 33, 1306-1309(2000).
- (4) T. Kawai, M. Nakamura, K. Sugita, K. Saito, and T. Sugo, High conversion in asymmetric hydrolysis during permeation through enzyme-multilayered porous hollow-fiber membranes, *Biotechnol. Prog.*, 17, 872-875(2001).