

## 抽出操作における分子集合試薬という新しい概念の誕生

九州大学大学院工学研究院 教授

後藤 雅宏

### 1. はじめに

液液抽出は、混ざり合わない2液相間の分配の差を利用して、目的物質を分離する手法です。その意味で、通常は水と有機相が、上記の2相形成に用いられます。抽出操作は、合成反応においても、最終の目的成分を取り出すためには欠かせない操作であり、化学プロセスの様々な分野で現在利用されています。この抽出操作が、最も大規模で利用されている例は、鉱山から特定の金属を分離する湿式精錬が有名です。また、原子力の分野では、核燃料廃棄物の処理に欠かせないプロセスとなっています。さらに最近では、レアメタルのリサイクルプロセスとしての抽出操作が注目を浴びています。

この液液抽出操作の鍵を握る物質が、抽出剤です。抽出剤は、目的の化合物のみを選択的に認識し、水相から有機相に移動させます。例えば、金属精錬の場合には、目的金属イオンと特異的に錯形成するキレート試薬が抽出剤として用いられます。また、原子力産業では、ウランと特異的に反応する有機リン酸系の抽出剤が用いられます。このように抽出剤の選択は、抽出操作において最も重要な因子であり、その選択が抽出操作の成否を決定するといっても過言ではありません。

さて、それでは水相に溶けている生体分子、タンパク質やDNAなどを有機相に抽出することができるのでしょうか？ このような生体分子は通常水に溶解していますので、目的となるタンパク質やDNAのみを有機相に移動させる必要があります。当然のことながら従来の液液抽出法では、このようなことを実現することは困難でした。ところが、1980年代の中頃に、抽出試薬として逆ミセルという分子集合体が登場

して、液液抽出操作の革命が起こりました。本稿では、この分子集合体を抽出試薬として用いるこの20年間の進歩について、その研究の進展にまつわるエピソードを交えて紹介したいと思います。

## 2. 逆ミセルと呼ばれる抽出試薬の出現

逆ミセルとは、有機媒体中に形成される両親媒性化合物の分子集合体のことを言います（図1）。逆ミセルの形成によって、有機溶媒中にナノスケール水滴を均一に分散させることができます。この逆ミセルは、有機溶媒を単なる疎水性化合物を溶解させるための溶媒から、親水性の生体分子をも可溶化できる特異な媒体へと変化させました。一般に水中で機能している酵素（タンパク質）や核酸のような生体分子は、油にはほとんど溶解せず、逆に疎水性環境によって変性状態を招くことが知られています。精密な高次構造によってその機能を発現している生体分子もまた、逆ミセルを利用することによって、いとも簡単に有機溶媒へ均一に溶解させることができるのです。さらに、取り込まれた生体分子が、有機媒体中で、新たな機能を発現することも報告されています。1980年代前半から、逆ミセルを利用した多くの酵素の可溶化が報告され、このような逆ミセルを酵素の新しい反応場として利用しようとする試みが盛んに行われました。

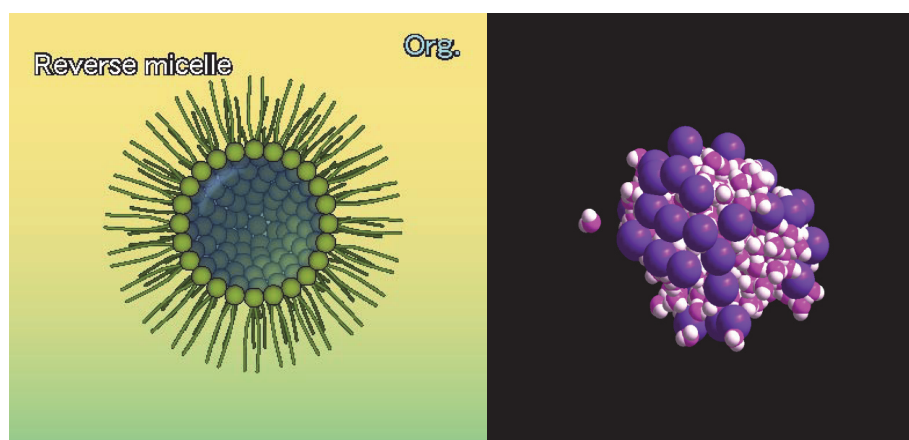


図1 逆ミセルの模式図と内水相のMD シミュレーション

これらの研究は、後に有機溶媒中の酵素反応として大きく展開していきます。一方、抽出の分野での革新は、1985年にMITのHatton教授らがアメリカ化学工学会(AIChE)の創刊号Biotech. Prog.誌に発表した「逆ミセルによるタンパク質抽出」という論文が契機となりました。この論文のポイントは、水相に存在するタンパク質が有機相へ移動することを、チトクロムcをモデルタンパク質としてはじめて実証した点にあります。これによって、タンパク質を水相から有機相に抽出する新原理が確立されたのです。ところが、革新的な原理を生み出した背景には、裏話がつきものです。この論文が発表される3ヶ月前に、欧州のLuisiグループは、まったく同じ考えで、タンパク質が水相から有機相に移動することを国際会議で発表していました。当然のことながら、彼らは「逆ミセルでタンパク質を抽出したのは我々がはじめてだ。」とその後アピールしています。この議論は世界を二分し、米国のHattonグループを支持する研究者は、逆ミセルを”Reversed Micelle”と標記し、欧州のLuisiその後弟子のWaldeグループを支持する研究グループは、”Reverse Micelle”と標記することで今日に至っています。それから20年が経過し、若手の研究者がこのようなことを知るよしもなく、Hatton研に留学した私のグループでさえ、最近では”Reverse Micelle”を用いるようになりました。

### 3. 分子集合体逆ミセルが備える分離機能とは？

water poolとも呼ばれる逆ミセルの有する親水的な微小ナノ空間には、様々な生体分子を取り込むことができます。この特性を活かして、逆ミセル相(有機相)-水相間の物質移動が可能となれば、タンパク質の抽出分離プロセスを構築することができます。逆ミセルの内水相が、タンパク質などの生体分子の高次構造を保持するために、大変好都合な環境を与えることができます。逆ミセルをタンパク質の認識試薬として用いる抽出プロセスは、ターゲットとなるタンパク質の選択的抽出と、それに続く逆抽出(回収)操作で構成されます(図2)。

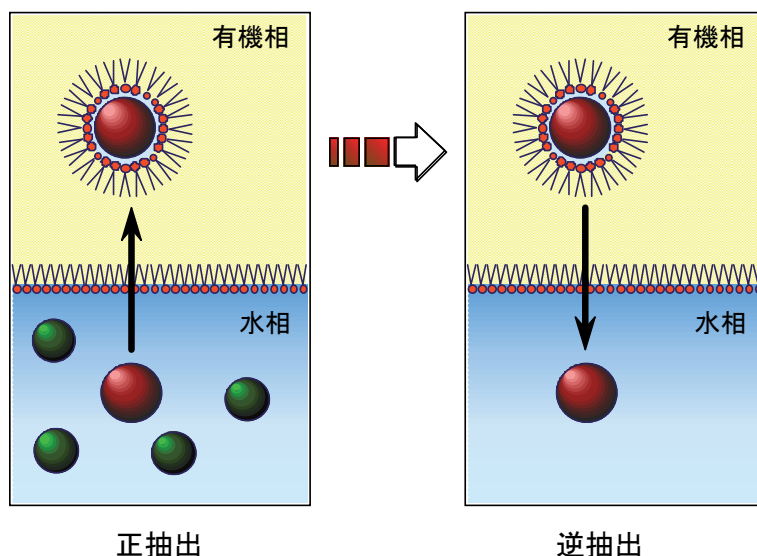


図2 分子集合体逆ミセルを用いるタンパク質の抽出操作

アミノ酸やペプチドなどの小分子は、分子構造の影響を強く受け、特に疎水性のアミノ酸は、逆ミセル界面への分配が容易になることが知られています。タンパク質と呼ばれるほどペプチド鎖が長くなると、アミノ酸側鎖の影響よりも、むしろタンパク質全体の電荷分布や大きさが抽出挙動に反映されます。これに対し、表面にリン酸基を有する核酸は均一な負電荷を帯びたアニオン性の生体高分子であり、その性質が核酸を抽出する際の重要なポイントとなります。我々が世界ではじめて成功した逆ミセルによる DNA の抽出に関しては、後で詳しく述べます。その他にも、逆ミセルを用いた糖や抗生物質の抽出も報告されています。

紙面の都合上、以降は、分離対象として最も盛んに研究されてきたタンパク質に焦点を絞り、逆ミセルを利用した抽出分離について述べることにします。まず、タンパク質の分離を行うには、逆ミセルへの抽出メカニズムを解明することが重要です。これまでの研究により、タンパク質が逆ミセルへ抽出されるためのドライビングフォースは、逆ミセルの作り出す親水的環境ではなく、逆ミセルを構成する界面活性剤とタンパク質の相互作用に起因すると考えられます。特に、タンパク質-界面活性剤間の

静電的相互作用は、抽出挙動を支配する重要な因子であることが明らかにされています。それゆえ、タンパク質抽出には主にイオン性界面活性剤、特にアニオン性界面活性剤であるスルホン酸型のジオクチルスルホコハク酸ナトリウム（商品名：AOT）がよく用いられています。

90年代に入ると、AOTに代わる強力な抽出能力を有するリン酸エステル型界面活性剤や、抽出したタンパク質へのダメージを抑える非イオン性界面活性剤あるいは生体適合性の高いレシチン系活性剤、さらにはカチオン性界面活性剤など、それぞれの目的に応じた新しい逆ミセル系の開発が盛んに行われてきました。近年では、数種類の界面活性剤を混合したハイブリッド型の逆ミセル系が提案され、逆ミセル設計の幅は大きく広がっています。また、このハイブリッド系逆ミセルの場合、単一の界面活性剤には見られない新しい抽出特性が得られることが報告されています。

それでは実際に逆ミセルによるタンパク質の抽出効率は、どのような因子によって支配されるのでしょうか？ 図3には、アニオン性界面活性剤であるジオレイルリン酸（DOLPA）で構成した逆ミセルを用いたときの、各pHにおけるヘモグロビン（分子量：64,500、等電点：6.8）の抽出率を示しています。

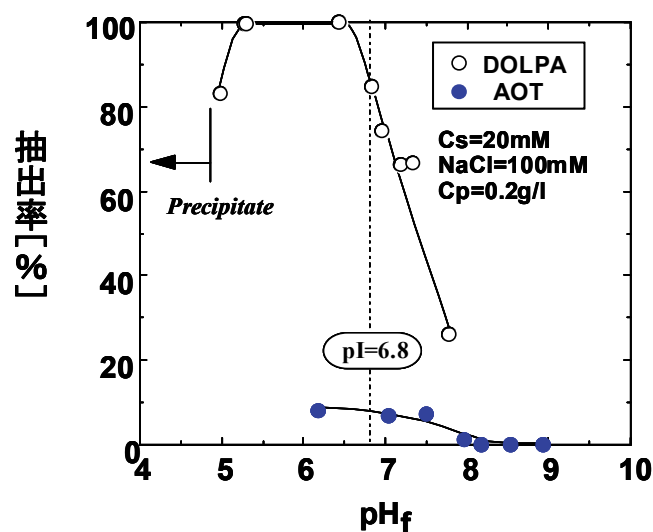


図3 ジオレイルリン酸(DOLPA)によるヘモグロビンの抽出

ヘモグロビンのような大きなタンパク質は、抽出能力の大きい疎水性の発達した DOLPA を用いることによって始めて可能となりました。また、等電点付近で抽出挙動が大きく変化することが明らかとなりました。等電点以下の pH 条件下において、ヘモグロビン表面は正電荷を帯びているため、アニオン性界面活性剤で構成された逆ミセルには効率良く抽出されますが、等電点以上では逆に、タンパク質表面が負電荷を帯び、静電的反発力のため逆ミセルへの可溶化が妨げられます。

等電点はタンパク質に固有の値であり、タンパク質表面の電荷状態を反映しています。従って、水溶液の pH 調製によって、タンパク質の表面電荷を制御すれば、選択的分離が可能となります。実際に、原料水溶液中の pH 制御によって、タンパク質混合液からの選択的抽出が報告されています。

また、タンパク質工学的手法を駆使して静電的相互作用を強化した変異タンパク質によって、静電的相互作用が抽出挙動の本質であることが確認されています。さらに、水溶液の塩濃度が、タンパク質の抽出挙動へ大きく影響することが知られています。塩濃度の増加は一般に、対イオンによる静電遮蔽効果や逆ミセル径の減少に伴うサイズ排除効果によって、顕著な抽出阻害を引き起こします。特にサイズ排除効果は、分子サイズによる分離を可能とします。また、逆抽出行程においては、回収水相の塩濃度を高くし、等電点以上の pH に設定することによって抽出されたタンパク質の回収を促進することができます。

逆ミセルが活性なタンパク質のみを選択的に抽出できるという興味深い結果も得られています。 $\alpha$ -キモトリプシンは分子量約 25,000 の加水分解酵素であり、80°C 以上の水溶液中では不可逆的な変性（失活）を起こします。この熱変性  $\alpha$ -キモトリプシンと活性な  $\alpha$ -キモトリプシンをジオレイルリン酸 (DOLPA) と AOT による混合逆ミセル系で抽出すると、活性を保持した  $\alpha$ -キモトリプシンを選択的に抽出できることがわかりました (図 4)。この結果は、逆ミセルという分子集合体によって  $\alpha$ -キモトリプシンの高次構造の違いを認識しているものと考えられています。

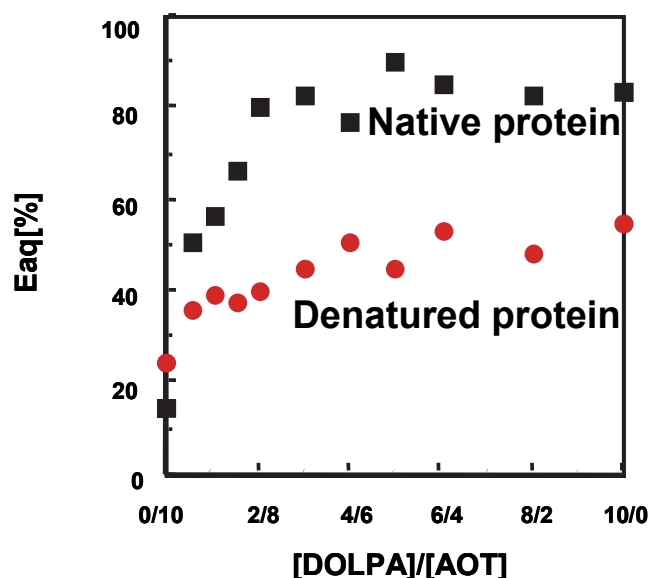


図4 ハイブリッド逆ミセルによる活性タンパク質の認識

#### 4. なぜ水相のタンパク質は有機相へ移動するのか？

逆ミセルの形成する微小液滴 (water pool) が、有機溶媒中においてもタンパク質の高次構造の保持に有効な親水的環境を提供できることから、タンパク質の抽出操作が可能となりました。それでは、実際どのようにしてタンパク質は水相から有機相へ抽出されているのでしょうか？また逆ミセルの形成は、タンパク質抽出の本質にどのような役割を及ぼしているのでしょうか？ タンパク質移動のメカニズムを解明する目的で、多くの研究が行われてきました。

Paradkar らは、逆ミセルを形成しない非常に低い AOT 濃度 (2mM) においても、1mg/ml もの  $\alpha$ -キモトリプシンを 90%以上抽出できるとの結果を報告しました。これによって、 $\alpha$ -キモトリプシンの抽出は、逆ミセルの存在によるものではなく、界面活性剤とタンパク質の静電的相互作用により形成される疎水性イオン対 (HIP : hydrophobic ion pairing) によって進行すると結論づけています。この疎水性イオン対 (HIP) は、酵素を有機溶媒に溶解させようとの試みから Powers らが提案したものです。彼らは、酵素溶液にドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を加えると、それらが静電的相互作用に

よる複合体として有機溶媒中に可溶化することを見いだしました。本実験におけるタンパク質（インスリン）の可溶化は、分子集合体を作るには不十分な SDS 濃度（いわゆる臨界ミセル濃度（CMC）以下の濃度領域）で達成されています。

これらの結果はタンパク質抽出の本質は、逆ミセル形成にはないことを示しています。確かに逆ミセルを形成するほど高濃度の界面活性剤が存在すればタンパク質を有機相中に移動させることは可能です。しかしながら、（逆ミセル形成には不十分な）少量の界面活性剤でも、有機相中にタンパク質を可溶化することはできるのです。つまり、タンパク質抽出の本質は、タンパク質-界面活性剤間の油水界面における相互作用（主に静電的相互作用）によるタンパク質表面の疎水化であると考えられます。

筆者らもまた、ジオレイルリン酸（DOLPA）を利用したヘモグロビンの抽出において、同様の結論を導いています。

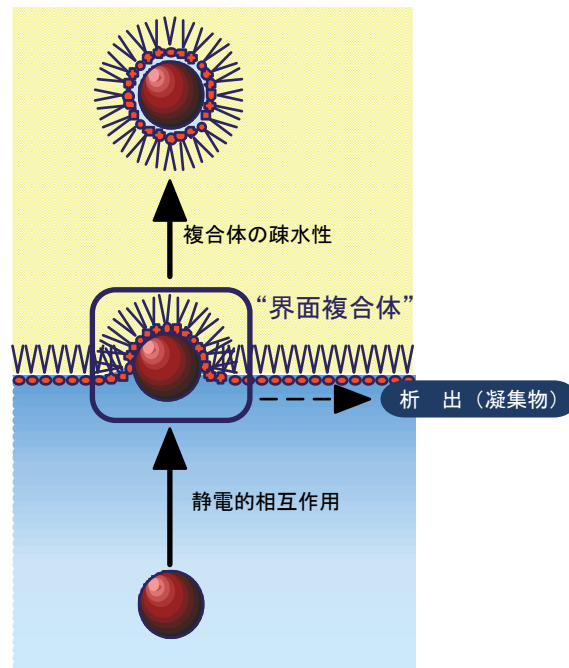


図5 逆ミセルによるタンパク質抽出のメカニズム

油水界面における界面活性剤とヘモグロビンによる複合体（界面複合体）の形成が、ヘモグロビン表面の疎水化を促し、十分な疎水性が得られた場合にのみ有機相へ抽出



されます。DOLPA は AOT と比較すると、発達した疎水鎖のため界面複合体に大きな疎水性を与えますが、AOT では（同じ会合数でも）界面複合体に十分な疎水性を与えることができないため、凝集物を油水界面に形成してしまいます。つまり、タンパク質の抽出には、タンパク質-界面活性剤間の相互作用に支配される複合化の段階と、界面で形成されたタンパク質-界面活性剤の複合体（界面複合体）が有機溶媒中へ可溶化する段階が存在することを提案しました（図 5）。タンパク質粉末から逆ミセル相へ直接抽出を行う固液抽出の際にも、同様の 2 段階を経ることが Hayes らの報告によって示されています。

また筆者らは化学修飾タンパク質を用いることによって、タンパク質-界面活性剤間相互作用の強さが抽出に与える影響を明らかにしました。タンパク質が異なれば、その電荷分布や高次構造の違いから両者を直接比較することが困難なため、タンパク質の表面修飾という手法を採用しました。すなわち、化学修飾によって、タンパク質の表面電荷を変化させました。具体的には、シトクロム c の表面に露出するカチオン性残基であるリジン残基をアセチル化することによって荷電残基数を変化させ、タンパク質-界面活性剤間の相互作用を制御し、抽出率の変化を観察しました。その結果、タンパク質の抽出メカニズムを決定するうえで重要な知見を得ました。

図 6 には、アセチル化したシトクロム c（リジン残基 19 個）とネイティブなシトクロム c を用いたときの抽出率の変化を示しています。

この結果は、タンパク質の移動において静電的な相互作用が決定的な因子として働いていることを示しています。さらに、表面の相互作用を高める目的で、タンパク質シトクロム c の表面をグアニジル化しました。この場合、リジン残基を表面にもつネイティブシトクロム c に比べて DOLPA との強い相互作用が期待されます。その結果、相互作用の強化は抽出率の向上へは直接結びつかないことが明らかとなりました。このことは、図 5 に示すように、抽出において 2 段階の過程が存在することを示唆しています。

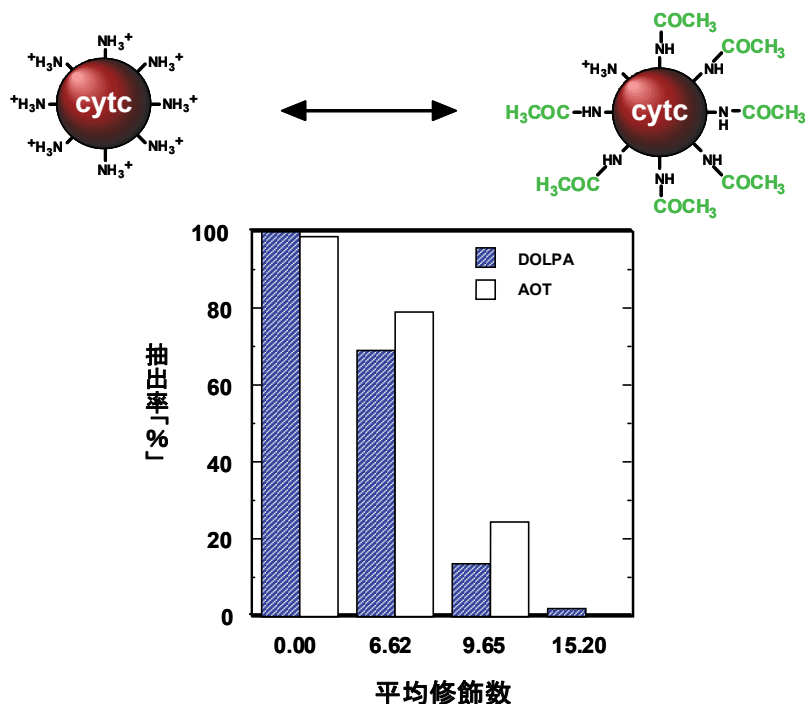


図 6 表面修飾数と抽出率の関係

化学修飾によって増大したリン酸-グアニジル基間の強い相互作用は、水溶液中からのタンパク質の減少を効果的にしたものの、タンパク質表面の相互作用部位の数は変化しないため、有機相への抽出効率までは改善できませんでした。この結果は、シトクロム c 分子に対する DOLPA 分子の比が 20 辺りで初めて完全な移動が達成されることから裏付けられます。

## 5. 逆ミセルを利用した世界初の DNA 抽出

DNA は生物の遺伝情報を担う重要な生体高分子であるため、近年、遺伝子工学や遺伝子治療など様々な分野で研究が盛んに行われています。また、界面活性剤分子で形成されるリポソームは、遺伝子導入におけるキャリアーとして注目されており、界面活性剤と DNA の相互作用の解明は、遺伝子工学の分野においても重要な知見を与えるものと期待されています。

これまで、タンパク質の逆ミセルへの抽出は数多く報告されてきましたが、水相中

の DNA を逆ミセル内に抽出した例は、全く報告されていませんでした。我々の研究によって始めて、DNA もタンパク質同様に逆ミセルによって抽出-逆抽出の操作が可能であることを明らかにしました。

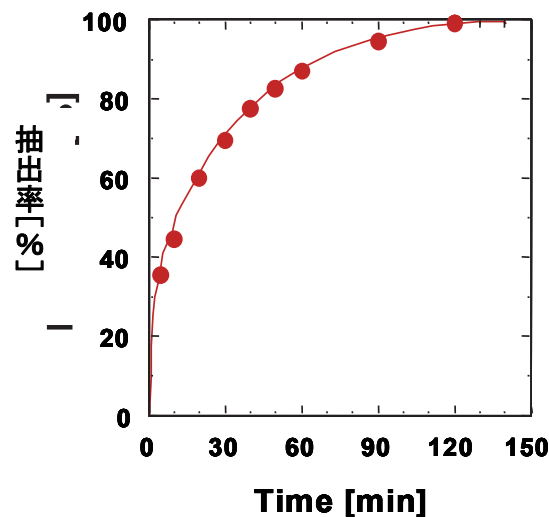


図7 逆ミセルにより DNA の抽出の経時変化 (界面活性剤:  $2C_{18}QA$ )

これはまさに偶然の発見でした。誰も成功したことのない DNA の抽出を試みたものの半年間まったく DNA の移動は起こりませんでした。DNA の表面はアニオンに帯電していますので、戦略的には、カチオン性の界面活性剤を用いれば抽出は起こると考えたのです。このため、カチオン性界面活性剤の代表でもある CTAB (セチルトリメチル四級アンモニウムブロミド) を用いていました。種々の条件を変化させても、CTAB では DNA がまったく有機相に移動しません。ところが、抽出実験を行うと水相から DNA が消えるという奇妙な現象が起こることがわかりました。しかし何度測定しても、残念ながら有機相に DNA は検出できません。ところがある日、突然、有機相に DNA のピークが現れました。当初は何が起こったのかさっぱりわかりませんでしたが、担当の 4 年生が間違っ隣にあった 2 本足の四級アンモニウム塩ジステアリルジメチルアンモニウムブロミド ( $2C_{18}QA$ ) を入れたことが判明しました。

さて、ここで一体何が起こったのでしょうか。また、先の水にも有機相にも検出されなかった DNA は、どこに行ったのでしょうか？ さらに、2 本足のカチオン性界面活

性剤でDNAが抽出されたのはなぜなのでしょう？ いろいろな疑問が残されていましたので、ひとつひとつ説明していきます。まず、一本足のCTABを用いるとDNAは、水相からも有機相からも検出されません。つまり、この現象は油水の界面にDNAとCTABの複合体が濃縮されたことを意味します。確かに注意深く観察すると界面に白いもやのような物体が存在することが確認されました。この場合、静電的な相互作用は十分ですが、界面から有機相へ移動するだけの十分な疎水性が得られなかったことを示唆しています。一方、疎水基が発達した2本鎖型のカチオン性界面活性剤を用いれば、界面で十分な疎水性が得られ、DNAが有機相に移動できることがわかりました。この結果は、逆ミセルによるDNAの抽出が先に提案した2段階のプロセスを経て有機相に抽出されることを示しています。

さらに、カチオン性以外の界面活性剤では抽出はまったく起こらないことから、DNA抽出における主なドライビングフォースは静電的相互作用であると考えられます。そこで、pHによる抽出依存性が検討されました。酸性領域におけるDNAの抽出率はほぼ50%程度であることがわかりました。このことは、pHが酸性側では、DNAのリン酸基のプロトン化が進むためにDNAと界面活性剤間の静電的相互作用が弱くなり、抽出率が低下したと推察されます。

また、タンパク質を逆ミセルを用いて抽出する際に、塩はひとつの代表的なパラメータとなっています。そこで、DNA抽出においても塩濃度に対する抽出率の変化が検討された結果、塩濃度の増加は著しい抽出効率の低下を招くことが明らかとなりました。これは、塩の添加により逆ミセルが不安定になっていることが原因だと思われます。また、1価より2価の陽イオンの塩が抽出率に大きな影響を与えることもわかりました。

逆ミセルをDNAの分離技術として用いるためには回収操作も重要となります。当初、塩のみ、アルコールのみを用いて試みましたが逆抽出されませんでした。そこで、アルコールと塩の共存系で最適化したところ、回収水相として0.5M NaClを用い、有機

相に 1-ブタノールを約 20%添加することによって、回収率が 100%に達することが明らかとなりました。さらに、回収された DNA の CD スペクトルを測定した結果、初期のものと回収後の CD スペクトルが同一であることがわかりました。つまり、正抽出・逆抽出操作を行った後も 2 重らせん構造を保っていることが明らかとなりました。このようにカチオン性の逆ミセルを利用することによって、DNA の正抽出・逆抽出が容易にコントロールできることが示されました。

## 6. 逆ミセルが DNA の配列を認識できる？

近年、RNA やアプタマーが創薬のターゲットとして注目されています。薬として特定配列の DNA や RNA を用いる場合、これらを大量に合成する必要があり、また合成されたものを大量精製する技術が必要になります。そこで、我々はそれら DNA の大量分離の場として逆ミセルの利用を考えました。逆ミセル抽出は容易にスケールアップが可能で大量精製に適しているのです。この抽出系において配列選択的な DNA・RNA 抽出が可能ならば、RNA 創薬・アプタマー創薬における精製技術として利用できると考えられます。本研究では DNA 鎖にオレイル基を結合させた DNA 界面活性剤を抽出剤として使い、DNA の相補鎖認識能を抽出の駆動力とすることで配列選択的な DNA 抽出を達成できるのではと考えたのです (図 8)。

ここで、もう少し詳しく、なぜ DNA のシーケンスを選択的に抽出できるかを説明しましょう。まず、DNA 界面活性剤における DNA 部分は Target とする DNA と相補的な配列を有し、Target の DNA とハイブリダイゼーションを起こします。DNA 界面活性剤と Target DNA の複合体は油水界面における逆ミセル形成に伴い、界面活性剤の一つとして逆ミセルに取り込まれます。このとき、シーケンスがマッチしない非相補鎖は DNA 界面活性剤と結合しないため逆ミセルには取り込まれません。このようにして、DNA 界面活性剤に結合できる相補的な DNA だけが有機相へ移動できると考えられます。実際実験を行うと、Target DNA に相補的な DNA 界面活性剤が存在する系でのみ、有機

相に強い蛍光が観測されました。蛍光強度から抽出率を計算したところ、6割程度のDNAが水相から有機相中へ移動していることが確認されました。

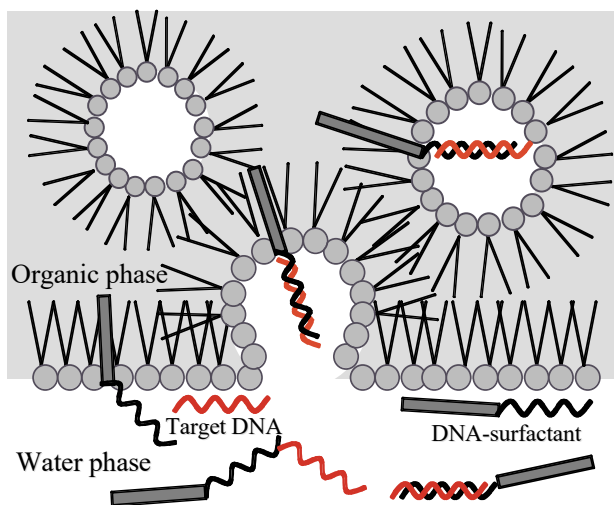
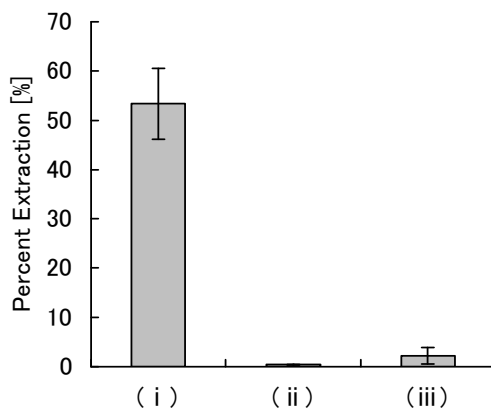


図 8 逆ミセルによる DNA 配列選択的抽出の模式図



DNA-surfactant	20 mer	(Oleyl)-5' - <u>CCAATACCACATCATCCATA</u> -3'
		(i) 3' - <u>GGTTATGGTGTAGTAGGTA</u> TAT-5' -FITC
Target DNA	22 mer	(ii) 3' -GGTATTGTATGCCATTAGAATT-5' -TAMRA
		(iii) 3' -AGAGTACAACCTTAGACACATTT-5' -Cy5

図 9 逆ミセルによる DNA の配列特異的抽出実験

また、有機相に抽出された Target DNA を再び水相へ回収する逆抽出を行ったところ、逆抽出操作後、水相において強い蛍光が観察され、蛍光強度からおよそ 80 %の DNA 鎖が有機相から水相へ回収されることを確認できました。

配列選択性を確認するため、塩基配列の異なる 3 種類の Target DNA の混合溶液から 1 種類の DNA 界面活性剤を用い、相補的な Target DNA のみの抽出を試みました。その結果、相補鎖の抽出は観察されましたが非相補鎖はほとんど抽出されないことが確認できました (図 9)。この例は、DNA の配列をはじめて認識した抽出例として、英国王立科学会の Chemical Science 誌にトピックスとして紹介されました。さらに、2007 年の 11 月に発行された Chem. Comm 誌の表紙に図 8 の模式図が採用されました。

我々はさらに高い選択性を得るため、DNA 界面活性剤の DNA 部位にヘアピン型 DNA を用いることにしました。また、Target DNA として完全相補鎖、1 塩基ミスマッチ、3 塩基ミスマッチをそれぞれ用いて抽出を行い、配列選択性を評価しました。その結果、3 塩基ミスマッチはほとんど抽出されず、また、ほんの一角所の配列の違う 1 塩基ミスマッチであっても完全相補鎖に対して 10 分の 1 程度しか抽出されないことを発見しました。その時の感動を今でも良く覚えています。

## 7. おわりに

逆ミセルという有機相の分子集合体が、タンパク質の抽出試薬になるという発見は、この分野の研究者の大きな興味を引きました。この現象に端を発したタンパク質の抽出技術は、ここ 20 年で盛んに研究され、多くの情報が蓄積されてきました。しかしながら、実用化へ向けては、まだ克服すべき問題が残っています。特に逆抽出効率の改善や回収後の活性保持は重要な課題であるといえます。今後は、これまで得られた抽出挙動に関する知見を活かして、ケーススタディを積み重ねて行くことが重要であると考えます。目的のタンパク質のみを選択的に抽出分離できる逆ミセル系の構築、さらに活性を損なわない定量的な回収技術の開発が進めば、逆ミセルによる抽出法は、

実用的な新分離技術として幅広い応用が可能となるでしょう。また、逆ミセル系は非常に高い DNA 配列選択性を有しており、遺伝子変異検出への応用も可能であると考えられます。本稿が抽出分野の新たな展開への発想のきっかけとなれば幸いです。

## 参考文献

- 1) Goklen K. E., and T. A. Hatton, *Biotechnol. Prog.* **1**, 69-76 (1985)
- 2) Goto M., A. Momota, and T. Ono, *J. Chem. Eng. Jpn.* **37**, 662-668 (2004)
- 3) Goto M., T. Ono, F. Nakashio, and T. A. Hatton, *Biotechnol. Bioeng.*, **54**, 26-32, (1997)
- 4) Ono, T., and M. Goto, "Interfacial Nanochemistry", Chapt. 14, *Bioseparation through liquid-liquid interface*, Kluwer Academic (2005)
- 5) Maruyama T., T. Hosogi, and M. Goto, *Chem. Comm.* 4450-4453 (2007)