

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2007～2008

課題番号：19560756

研究課題名（和文）イオン液体を媒体とするバイオ分子の新しい分離システムの開発

研究課題名（英文）Development of novel separation system by using ionic liquids as extraction media

研究代表者

久保田富生子（KUBOTA FUKIKO）

九州大学大学院工学研究院 助教

研究者番号：60294899

研究成果の概要：本研究の目的は、イオン液体を分離媒体として用いた、バイオ分子の新しい分離システムを開発することである。イオン液体は分離媒体として優れた性能を示すと期待されるが、利用できる抽出剤は限られている。本研究では、モデルに シトクロム c および DNA オリゴマーを選定し、これを抽出可能にするイオン液体抽出系の開発を行った。有機溶媒系よりも抽出性に優れた、反応抽出によるバイオ分子の抽出に成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：抽出・分離、イオン液体

## 1. 研究開始当初の背景

医療の高度化、人々の健康志向にともなって、生産あるいは分析分野で、アミノ酸、タンパク質、DNA など、バイオ分子の分離の必要性が高まってきた。物質の分離は、最も労力とコストを要する工程である。

溶媒抽出法は、目的物質を連続的に精度良く回収できることから、高度分離技術として、金属の分離精製に広く用いられてきた。バイオ分子の分離に関しては、金属の分離技術を応用することで最近本格的に研究が始まった。しかしながら、タンパク質や DNA 等の分子量の大きな分子を高度に認識する抽出

試薬がほとんど無いためその分離は難しく、より高度な分離システムの開発が求められている。

そこで我々は、イオン液体に着目した。イオン液体は、有機性陽イオンと陰イオンからなる液体の熔融塩で、蒸気圧がほとんど無く安全性の高い溶媒と言われている。合成が可能であることから、分子設計により高機能の溶媒となる液体を調製することができる。金属イオンの分離においてはいくつかの有用な系を見いだしており、この成果をもとに、より大きく複雑なバイオ分子の分離媒体としてイオン液体を用いることを着想した。

バイオ分子のために開発された数少ない抽出試薬は、クロロ系、芳香族系の有機溶媒にしか溶解しないため、イオン液体を代替に用いることができれば、より安全かつ高度な分離系の構築が期待できると考えられた。一方、イオン液体に溶解する抽出試薬は少なく、これを解決することが、大きな課題であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、イオン液体を分離媒体として用いることにより、タンパク質やDNAといったバイオ分子の新しい分離システムを開発することである。

イオン液体による有機物の分離例は、有機物の自己分配によるものがほとんどであるが、効率的な分離のためには、目的分子を高度に認識する抽出試薬を溶媒に組み込むことが必要である。しかしながら、イオン液体を溶解する抽出試薬は限られている。そこで、本研究では、タンパク質、DNA の分離をモデルとして、

(1) 目的分子を高度に認識する抽出試薬の開発

(2) 抽出試薬との親和性が高く、効率のよい抽出が可能なイオン液体の開発

により、バイオ分子の抽出に応用可能な抽出系を創出する。さらに、

(3) 抽出分離のメカニズムの解明と系の最適化を行い、新規プロセス設計のための指針を得ることを目標とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 抽出剤の開発

小分子の抽出および有機溶媒系における実験結果をもとに、タンパク質(シトクロム c、Cyt-c)、DNA の抽出試薬を選定、開発した。試薬の性能を抽出性能により評価した。

### (2) イオン液体の開発

抽出溶媒として、図1のようなイミダゾリウム型のイオン液体のカチオン側鎖に種々官能基 R を導入し、またアニオンと組み合わせることにより、種々イオン液体を合成した。イオン液体の物性を測定し、相互溶解性や抽出性能との関係を明らかにした。抽出試薬の溶解性の問題を解決するため、R にタンパク質を認識する官能基を導入し、自身に抽出能力を持たせたイオン液体系の開発を行った。

### (3) タンパク質および DNA の抽出平衡

開発した抽出試薬とイオン液体の組み合わせにより抽出相を調製し、定法にしたがって、Cyt-c および DNA の抽出平衡を測定した。Cyt-c の検出は、UV/VIS 分光光度計により行った。DNA は、

**FITC-5'-GAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGC-3'**

のように5'末端にFITCで蛍光ラベル化した30mer (分子量=9388) の1本鎖を用い、水溶

液中の蛍光(520nm)を測定することによりその濃度を決定した。抽出特性に及ぼす諸因子(化学種濃度、温度、イオン液体の物性)の影響を調べ、抽出のメカニズムを検討した。

従来溶媒との抽出挙動の比較を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 種々イオン液体の合成

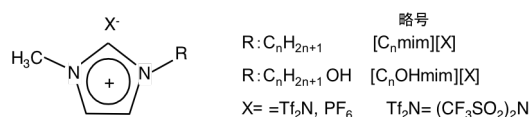


図1. イミダゾリウム型イオン液体

側鎖に、アルキル基、アルコール、エーテル、グリコール基等種々官能基を導入したいオン液体を合成した。図1に水相と二相を形成し、目的分子の抽出に寄与したイオン液体の構造と略号を示す。

### (2) 抽出試薬の溶解性

まず、典型的なイオン液体[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]および[C<sub>4</sub>mim][Tf<sub>2</sub>N]への市販抽出試薬の溶解性を調べた。CMPO, TBP, TOPO, DC18C6 など中性抽出剤は分子内に長鎖アルキル基を有していても、イオン液体へよく溶解した。一方D2EHPA やPC-88Aのように、長鎖アルキル基を有するアニオン性、あるいは四級アンモニウム塩のようなカチオン性抽出剤は難溶であり、また解離基の多い抽出剤は難溶であることが明らかとなった。後に示すように、イオン液体の構造を変えることにより、難溶性抽出剤が溶解可能であることが明らかとなった。

### (3) Cyt-c の分離をモデルとした新規抽出系の開発

Cyt-c は、複数個のε-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>を側鎖とするリジン残基を分子表面に有するタンパク質である。クラウンエーテルは-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>を認識する。

そこで、図2のようなクラウンエーテルを導入したクラウン化イオン液体[18C6mim][PF<sub>6</sub>] (和光純薬)によりCyt-cの抽出挙動を調べた。

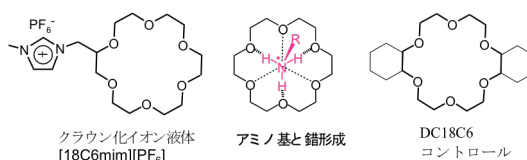


図2 クラウン化イオン液体とDC18C6

[18C6mim][PF<sub>6</sub>] を [C<sub>2</sub>mim][Tf<sub>2</sub>N], および [C<sub>2</sub>OHmim][Tf<sub>2</sub>N]に溶解して、水から(Cyt-cの等電点は10.6でアミノ基はプロトン化さ

れている)の抽出実験を行った。図3から明らかのように、[C<sub>2</sub>OHmim]を希釈剤として用いた場合に、Cyt-cは抽出された。希釈剤として用いたイオン液体には抽出能力が無く、また[18C6mim][PF<sub>6</sub>]濃度が増すとともに抽出率が增大することから、[18C6mim][PF<sub>6</sub>]が抽出試薬と同じように働くことが明らかとなった。一方、[C<sub>2</sub>mim][Tf<sub>2</sub>N]にはほとんど抽出しなかった。

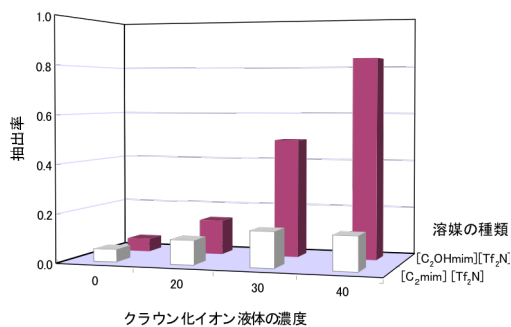


図3 Cyt-cの抽出挙動(35°C)

イオン液体の飽和含水量を調べた結果、イミダゾリウム側鎖が短いほど含水量が高く、また、アルコールなどの親水基を含むイオン液体は水との親和性が高かった。

- ・Cyt-cが親水性の化合物であること、
- ・金属イオンの抽出で検討した結果、中性抽出剤の場合は、溶質とイオン液体のカチオンが交換することが明らかとなり、Cyt-cでも、希釈剤のイオン液体カチオンとCyt-cのカチオン交換で抽出が進むと考えられること、

により、水との親和性の高い[C<sub>2</sub>OHmim](含水率=10%, 35°C)に抽出されやすいことがわかった。

抽出試薬 DC18C6 をイオン液体に溶解した場合との比較を行った。図4に示すように、

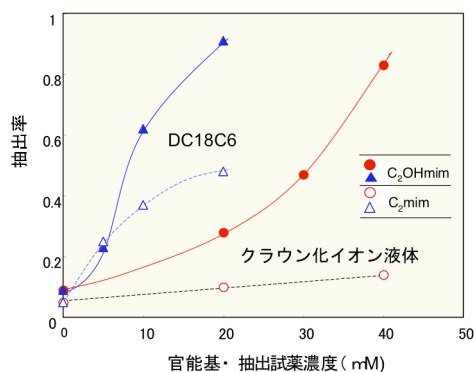


図4 DC18C6との比較

希釈剤の影響、抽出試薬の濃度の影響ともに、両者は同様の傾向を示した。また、分配比と濃度の関係を解析した結果、Cyt-cのアミノ基すべてにクラウンエーテルが配位しているわけではなく、その個数は、DC18C6と

[18C6mim]は同程度であることが推測された。

フリーの抽出剤に比べ、クラウン化イオン液体の抽出率が低いのは、図5に示すようにイミダゾリウムカチオンとアミノ基との静電反発や立体障害によるものと考えられ、イミダゾリウムと官能基間のスペーサーの長さ等の分子設計が重要であることが明らかとなった。

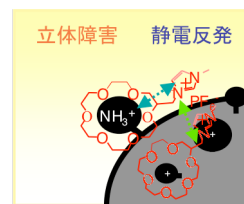


図5 抽出の模式図

本実験では高温ほど抽出率は高くなるが、自己分配率も高くなった。この場合は選択性が悪くなる。イオン液体抽出は温度に影響されやすく、温度のコントロールが重要であることが明らかとなった。

なお、通常の溶媒では、本実験条件下でCyt-cは抽出しない。

水酸化カリウムにより、逆抽出が可能であることが明らかとなった。逆抽出性能は、DC18C6に比べ、クラウン化イオン液体が格段に優れていることが明らかとなった(図6)。

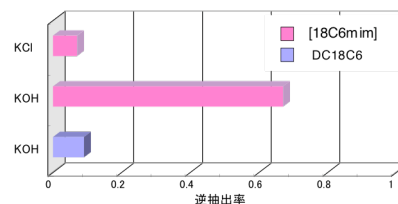


図6 逆抽出 (KCl, KOH=40mM)

KCl(pH=5.6)によっては、逆抽出されないことから、クラウンエーテルと親和性の高いK<sup>+</sup>とアミノカチオンとのイオン交換ではなく、高いpHにおけるアミノ基のプロトン解離によって、アミノ基がクラウンエーテルからの解離することによるものと考えられる。

#### (4) DNAの抽出

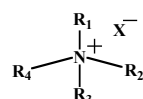


図7 nC<sub>m</sub>QAC

図7のような4級アンモニウム塩型界面活性剤 nC<sub>m</sub>QAX を抽出剤として用いた。(n=長鎖アルキル基数, m=長鎖アルキル基炭素数, C: X=C1, B: X=B)

UVの濁度測定により臨界温度(液が均一になる温度)を調べた結果、アルキル鎖長の短い界面活性剤(m<16, n=2)はいずれのイオン液体にも室温で溶解するが、これより長い

ものは30℃以上の加温が必要であった。一方イオン液体のアルキル鎖長を長くすることで、溶解性を高めることができた。さらに、溶液に10%の1-プロパノールを添加することにより、臨界温度を室温まで下げることができた。

図8に各種イオン液体および界面活性剤によるDNAの抽出結果の一例を示す。2C<sub>18</sub>QAXと[C<sub>12</sub>mim][Tf<sub>2</sub>N]の組み合わせで、ほぼ定量的な抽出を達成することができた。[C<sub>8</sub>mim]以下の側鎖の短いイオン液体は、Cyt-cとの複合体を溶解することは難しく、Cyt-cをイオン液体中に取り込むことはできなかった。2C<sub>18</sub>QAXの溶解性が低い[C<sub>4</sub>mim]では、界面に複合体が凝集し、その結果バルク水相からCyt-cが減少したが、抽出は起こっていないと推察された。

通常の有機溶媒では高い抽出率が得られなかった2C<sub>16</sub>QAXを用いても、イオン液体系ではほぼ定量的な抽出を達成することができた。

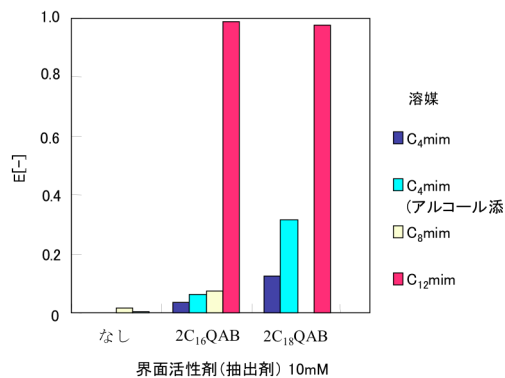


図8. DNAの抽出挙動

#### (5) まとめ

タンパク質やDNAのように金属イオンに比べて大きな分子の抽出は一般に難しいが、イオン液体と抽出剤の選択により、抽出が容易になることが明らかとなった。

イオン液体に溶解する抽出剤は限られているが、これを解決するには、イオン液体自身に抽出能を持たせること、および用いる抽出剤に合わせてイオン液体の分子設計を行うことである。

タンパク質と親和性の高い官能基を導入することにより、イオン液体は、通常のイオン液体に比べ高い抽出能力を示し、またフリーの抽出剤と同様の抽出機構を示すことがわかった。一方長鎖アルキル基を有する抽出剤は、イオン液体に長鎖アルキル基を導入することで溶解性が高まった。

抽出剤およびイオン液体の適切な組み合わせが、バイオ分子の抽出に重要であることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- 1 F. Kubota, Y. Shimobori, Y. Koyanagi, K. Nakashima, K. Shimojo, N. Kamiya, M. Goto, Extraction behavior of indium with TOPO into ionic liquids, *Solv. Extr. Res. & Devel. Japan*, **16** (2009) 印刷中 査読有り
- 2 F. Kubota, Y. Koyanagi, K. Nakashima, K. Shimojo, N. Kamiya, M. Goto, Extraction of lanthanide ions with an organophosphorous extractant into ionic liquids, *Solv. Extr. Res. & Devel. Japan*, **15**, 81-87 (2008) 査読有り

〔学会発表〕(計6件)

- 1 久保田富生子ら, 希土類金属回収のためのイオン液体抽出系の開発, 第27回溶媒抽出討論会, 2008年11月, 東京
- 2 久保田富生子ら, イオン液体を媒体とした希土類金属の抽出挙動の検討, 化学工学会第73年会, 2008年3月, 浜松
- 3 久保田富生子ら, イオン液体を用いた生体分子の抽出システムの開発, 化学工学会第39回秋季大会, 2007年9月, 札幌
- 4 M. Goto, F. Kubota et al., Protein Transfer From Aqueous Phase to Ionic Liquids and Its Change of Biological Function, The 2<sup>nd</sup> Int. Congress on Liquid Ions, 2007 Aug, Yokohama
- 5 久保田富生子ら, イオン液体を用いた新規抽出分離システムの開発, 第18回九州地区若手ケミカルエンジニアリング討論会, 2007年7月宮崎
- 6 久保田富生子ら, イオン液体を用いた生体分子の抽出, 第44回化学関連支部合同九州大会, 2007年7月北九州

〔図書〕(計1件)

久保田富生子, 後藤雅宏ら, 朝倉書店, 分離プロセス工学の基礎 化学工学会分離プロセス部会編, 2009年 p69-98

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久保田 富生子 (KUBOTA FUKIKO)  
九州大学・大学院工学研究院・助教  
研究者番号: 60294899

### (2) 研究分担者

後藤 雅宏 (GOTO MASAHIRO)  
九州大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号: 10211921