

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：54601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22750135

研究課題名（和文） 光応答逆ミセルをキャリアとしたバイオマテリアル分離技術の開発

研究課題名（英文） Separation of bio materials using photo-responsive reverse micelles

研究代表者

宇田 亮子（UDA RYOKO）

奈良工業高等専門学校 物質化学工学科・准教授

研究者番号：90321463

研究成果の概要（和文）：逆ミセルを用いた生体由来物質の分離精製の光制御を目指し、光応答性分子を用いた逆ミセルによる抽出システムの構築を行った。光応答性分子としては、光照射未照射時では脂溶性分子であるが、光によりカチオン性界面活性剤となる分子を用いた。この分子をアニオン性界面活性剤が溶解したクロロホルム溶液に加えると、光照射後はアニオン性とカチオン性界面活性剤の錯体を作り、逆ミセルが破壊することが核磁気共鳴スペクトルにより明らかとなった。また、この逆ミセルにあらかじめ酵素を内臓させておくと、光照射に伴う逆ミセル内酵素の放出に成功した。

研究成果の概要（英文）：A photoresponsive compound which turns to be a cationic surfactant by irradiation was used as a functional compound. Anionic reverse micelle is disrupted by irradiation of the photoresponsive compound solubilized in anionic surfactant-water-chloroform mixture. The disruption was investigated by using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Furthermore, the photoinduced disruption of reverse micelle is shown to release enzyme incorporated in the interior of the photoresponsive reverse micelle.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：有機化学

科研費の分科・細目：複合科学・機能物質化学

キーワード：膜・集合体、光応答、逆ミセル、マラカイトグリーン

1. 研究開始当初の背景

逆ミセルは両親媒性分子によって有機溶媒中で形成される分子集合体であり、中心部に水を含む親水的環境を提供できる。両親媒性分子を含む有機溶媒に、酵素や核酸などの生体高分子を含む原料水溶液を加えて混合することで、中心部に目的生体高分子を内臓した逆ミセルが形成できる。逆ミセル内の生体高分子は変性を受けないため、

これを使った液-液抽出による生体高分子の精製が達成できれば、大量の原料を一括で処理し従来法に比べ大幅なコストダウンが期待できる。本研究では光による逆ミセル破壊という新しい手法より、逆ミセルを使った新規生体分子精製技術の開発を目的とした。研究者はこれまでに、長鎖アルキル基を有するマラカイトグリーン誘導体を分子設計し、光照射によってカチオン性界

面活性剤としての機能を得ることに成功している (*Chem. Lett.*, **2004**, 33, 586 など)。一方、アニオン性界面活性剤の逆ミセルにカチオン性界面活性剤を添加すると逆ミセルが破壊する現象が報告されている (*Biotechnol. Bioeng.*, **1999**, 62, 593 など)。そこで、光応答性マラカイトグリーン分子をアニオン性界面活性剤から成る逆ミセル相に溶解させておけば、光照射により生じたカチオン性界面活性剤と、有機相に存在するアニオン性界面活性剤との静電的な相互作用が生じ、逆ミセルが破壊して生体高分子の精製が可能となることを着想した。

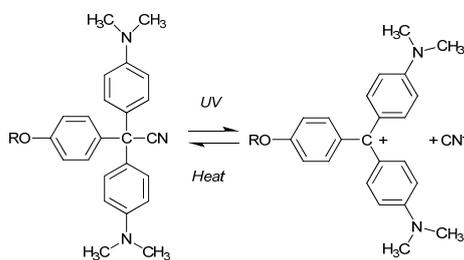
2. 研究の目的

本研究は、暗時では脂溶性分子である一方、光照射によりカチオン性となる光応答性分子を含む逆ミセル (W/O マイクロエマルジョン) を用い、生体由来物質の水相と有機相との移動を光で制御するものである。光照射による逆ミセルからのバイオマテリアルの放出 (水相への移動)、または逆ミセル相への抽出 (有機相への移動) を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 光照射による逆ミセルの破壊とそれに伴う RNase の水相への移動

1.0 mM のビス(2-エチルヘキシル)スルホコハク酸ナトリウム (AOT) とマラカイトグリーン誘導体 (図 1) を混合させた重クロロホルムと pH 5.0 のリン酸緩衝液と攪拌することにより逆ミセルを作製した。別途、この逆ミセルサンプルをクロロホルムと RNase を含むリン酸緩衝液 (pH 5.0) にて調整することにより、RNase 内臓逆ミセルを作製した。その後有機相を水相から分離して、新たに pH 8.0 のリン酸緩衝液と攪拌することにより、内臓 RNase の水相への放出を促進させた。光照射はキセノンランプからの光を光源とし、ガラスフィルターにて 300 nm 以下の光を 5 分間



R = (CH₂)₁₅CH₃

図 1 マラカイトグリーン誘導体の光イオン化反応

照射して行った。RNase 酵素活性の評価は、逆ミセルから放出された RNase を RNA と 25°C でインキュベートしたのち、インビトロジェ

ン製 Quant-iT RNA アッセイキットを用いて定量した。

(2) 光照射による選択的抽出

破壊のみならず光によって選択的にバイオマテリアルを分離抽出する必要がある。そこで、図 1 のマラカイトグリーン誘導体の正電荷を利用した選択的タンパク質抽出を検討した。20 % (v/v) のヘキサノールを含むクロロホルム溶液にマラカイトグリーン誘導体を溶解させ、それとシトクロム *c* を含む pH 7.0 のリン酸緩衝液を攪拌させた。得られた有機相を水相から分離して、新たに pH 11.0 の水溶液と攪拌することにより水相へ逆抽出することにより、タンパク質水溶液を得た。その溶液中のタンパク質濃度は、ローリーフォリン法にて定量した。DNA の抽出には、シトクロム *c* の代わりに *Cal*f thymus DNA を用いた。逆抽出は行わず、抽出後の水相の CD スペクトルにて DNA 濃度を評価した。

4. 研究成果

(1) 光照射による逆ミセルの破壊とそれに伴う RNase の水相への移動

① 光照射による逆ミセル破壊

AOT 逆ミセルサンプルの核磁気共鳴スペクトルを図 2 に示す。2.0 ppm 付近のピークは水に由来し、クロロホルム溶液に元々溶解している水と逆ミセル内水相の水との平均的な状態を反映したものと考えられる。逆ミセル内水相の割合が高くなるとピークが低磁場シフトすることから、ピークのケミカルシフトより逆ミセル形成の状態を知ることが可能となる。図 3 にマラカイトグリーン誘導体と 1.0 mM の AOT を含む重クロロホルム中の水のケミカルシフトを示す。光未照射時では、マラカイトグリーン誘導体の濃度にかかわらずケミカルシフトの値はほぼ一定となっている。しかし光照射後は、マラカイトグリーン誘導体濃度に伴い高磁場シフトしており、50 mM で値が最少となっている。この系でのグリーン誘導体の光イオン化効率は、0.4% 程度であることを別途吸収スペクトルより明らかとしている。つまり、50 mM のマ

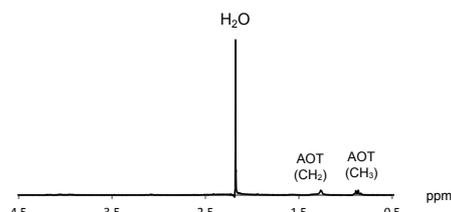


図 2 リン酸緩衝液で飽和した AOT (5.0 mM) 逆ミセルの ¹H NMR スペクトル

ラカイトグリーン誘導体は 0.2 mM のカチオン性界面活性剤を与えたことになる。この条件における AOT の臨界ミセル濃度を別途求め

たところ、0.8 mM となった。AOT とカチオン性マラカイトグリーン誘導体が 1:1 錯体を形成し逆ミセルが破壊したと考え、50 mM のマラカイトグリーン誘導体濃度は、ちょうど逆ミセルが破壊された濃度に対応することが分かった。

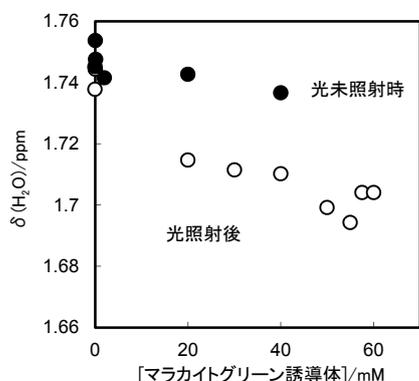


図3 マラカイトグリーン誘導体と AOT (1.0 mM)逆ミセルを含む重クロロホルム中の水プロトンのケミカルシフト変化

②逆ミセル破壊による RNase の光放出

逆ミセルの破壊に伴い内蔵されていた酵素は水相へと移動すると考えられる。そこで、pH 8.0 のリン酸緩衝液にて逆抽出した後の水溶液を調べ、RNase の光による放出を評価した。評価には次の式にて定義される放出率を用いた。

$$\text{放出率 (\%)} = \frac{\text{水相に放出された RNase 量}}{\text{逆ミセル内蔵 RNase 量}}$$

RNase の定量には、CD スペクトルを用い 210 nm における楕円率から算出した。図 4 に放出率のマラカイトグリーン誘導体濃度依存性

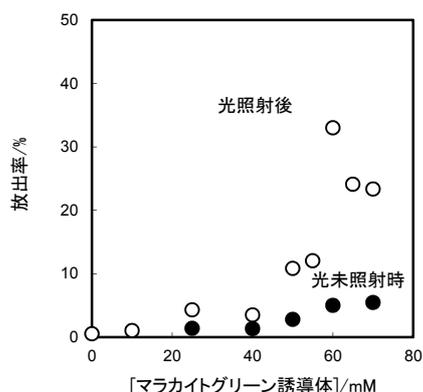


図4 マラカイトグリーン誘導体による AOT (1.0 mM)逆ミセルからの RNase の放出を示す。照射後は放出率がマラカイトグリーン誘導体濃度とともに増加する一方で、光未照射時ではほとんど放出されていないこ

とが分かる。さらに、光による放出率が著しいのはマラカイトグリーン誘導体濃度が 50 mM 以上の時である。これは図 3 の結果と良い対応を示しており、逆ミセルの破壊に伴い内蔵 RNase が放出されたことが示された。

③放出 RNase の活性評価

逆ミセルによる抽出や光放出の過程を経て得られた RNase の酵素活性を調べることは、光応答分離精製システムの構築に必要な項目である。そこで、図 4 の放出を経て得られた RNase について、その酵素活性を調べた。光未照射時においても、60 mM 以上のマラカイトグリーン誘導体濃度であればわずかであるが放出されているため、照射時・未照射の両方のサンプルにおいて評価することにした。Native な RNase の比活性と比べることにより、次式で算出される相対比活性として評価した。相対比活性の値を表 1 に示す。

$$\text{相対比活性 (\%)} = \frac{\text{放出 RNase の比活性}}{\text{Native RNase の比活性}}$$

表 1 放出 RNase の相対比活性 (%)

マラカイトグリーン誘導体濃度 (mM)	25	50	60
照射後	86.2	85.5	81.4
光未照射時	—	—	86.6

マラカイトグリーン誘導体濃度が増加するとともに、僅かながら相対比活性が小さくなっている。一方光未照射時の 60 mM では、マラカイトグリーン濃度が 25 mM の照射時と対応していることから、イオン化したマラカイトグリーン誘導体が RNase 活性に若干の影響を与えていると考えられる。しかし、その相対比活性は 8 割を超えており、本操作によっても酵素活性はほとんど失われないことが示された。

(2) 照射による選択的抽出

選択的な分離抽出のために、光イオン化したマラカイトグリーン誘導体の効果を調べた。水相からマラカイトグリーン誘導体を含む有機相に抽出されたのち再度水相へと逆抽出されたタンパク質量を、回収率として次式で評価した。

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{逆抽出溶液中のタンパク質量}}{\text{初期水溶液中のタンパク質量}}$$

なお、この系でマラカイトグリーン誘導体への照射による逆ミセル形成は、研究者によってすでに明らかにしており、その臨界ミセル濃度は 1.9 mM である。(Colloids. Surf.

A, 2009, 337, 180) 図5にシトクロム *c* の回収率を示す。臨界ミセル濃度を超えると、光照射後は光未照射より回収率が大きくなっており、シトクロム *c* がマラカイトグリーン誘導体によって形成される逆ミセルに抽出されたことが分かる。しかし、その回収率は非常に少ない。例えば、同じマラカイトグリーン逆ミセルによる抽出を牛血清アルブミンで行った場合は、マラカイトグリーン誘導体濃度が 10 mM の時に 15%、15 mM では 20% に達することを、研究者はこれまでの研究から明らかとしている。(Colloids. Surf. A, 2009, 337, 180) つまり、マラカイトグリーン逆ミセルには抽出しやすいタンパク質とそうでないものがあるといえる。この理由として、逆ミセル内の表面電荷の効果が考えられる。マラカイトグリーン誘導体は光照射後カチオン性界面活性剤となるため、逆ミセル内水相の表面は正に帯電している。牛血清アルブミンの等電点は 4.7 であり、本系の抽出条件から負に帯電していると考えられる。一方、シトクロム *c* の等電点は 10.7 であり正に帯電していることになる。シトクロム *c* のほうが牛血清アルブミンより分子量が小さいため、サイズの効果からするとより抽出されやすいはずであるが、牛血清アルブミンのほうが抽出されやすい結果となった。これは、マラカイトグリーンの正電荷との静電的相互作用により、逆ミセル内水相に安定に存在できるためと考えられる。

マラカイトグリーンカチオンをより有効的に用いた選択的抽出を実現するために、次に DNA 抽出の検討を行った。マラカイトグ

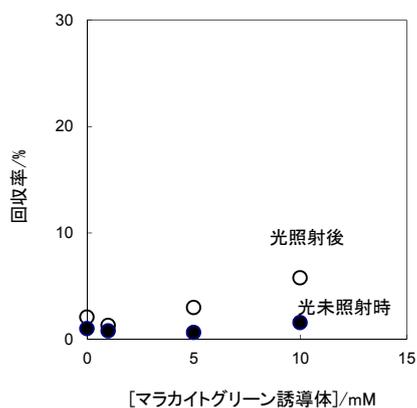


図5 マラカイトグリーン誘導体によるシトクロム *c* の有機相への移動

ーンを含むトリフェニルメチルカチオンは DNA と特異的に相互作用することが報告されており (*J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94, 7650 など)、その結合定数も 10^5 M^{-1} と、静電的相互作用によるものより大きい値を持つことが明らかとなっている。つまり、マラカイトグリーンカチオンを用いれば、より選択的な

DNA 分離精製が狙えることになる。図6にマラカイトグリーン逆ミセル溶液と攪拌した後の DNA 水溶液の濃度を示す。水溶液には DNA 濃度が 1g/L のものを用いた。マラカイトグリーン誘導体の濃度が増加すると水相中の DNA 濃度が減少し、0.5 mM 以上ではほぼ一定となり、8 割の DNA が水相から有機相へと移動したことが分かる。牛血清アルブミンやシトクロム *c* の抽出では、数 mM 以上のマラカイトグリーン誘導体濃度が必要であった (図5)。このことから DNA では、マラカイトグリーンカチオンとの特異的相互作用により、効果的な抽出に成功したといえる。しかしこの系での臨界ミセル濃度が 1.9 mM であることを考えると、この DNA 抽出は逆ミセル形成によるものではなく、別のメカニズムを経ていることが示唆される。

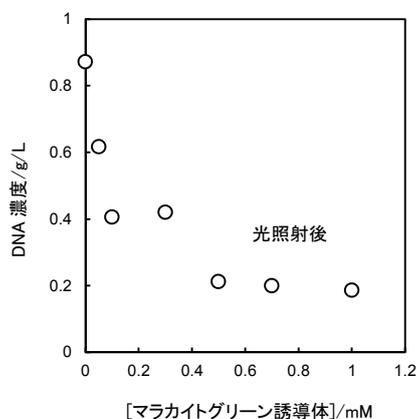


図6 有機相と攪拌後の水相中の Calf thymus DNA 濃度

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Ryoko M. Uda, Tsuyoshi Nishikawa, Yoshitsugu Morita, Disruption of reverse micelles and release of trapped ribonuclease A photochemically induced by Malachite Green leuconitrile derivative, *Journal of Colloid and Interface Science*, 査読有, 355 巻, 2011, 448-452

[学会発表] (計2件)

- ① Ryoko M. Uda, Eri Hiraiishi, Tsuyoshi Nishikawa, Yoshitsugu Morita, Photoresponsive Molecular Containers Based on Self-Assembly of Amphiphiles and Ionizable Malachite Green Derivative, 6th International

Symposium on Organic Photochromism、
2010年10月19日、Yokohama, Japan

- ② Ryoko M. Uda、Photosensitive Separation of Proteins by Reverse Micelles Containing Malachite Green Derivative、IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011、2011年5月25日、Kyoto, Japan

[その他]

- ① 宇田亮子、光応答性トリフェニルメタン誘導体の分離分析化学への応用、平成24年1月13日、第7回近畿分析技術研究奨励賞受賞講演会
- ② 宇田亮子、光応答性トリフェニルメタン誘導体による金属イオンの分離と検出、平成24年8月30日、兵庫県立大学環境エネルギー研究センター講演会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇田 亮子 (UDA RYOKO)
奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・
准教授
研究者番号：90321463

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし