

酵素の分離、精製および製剤化における 界面活性剤の利用

根 来 秀 夫

酵素は動植物あるいは微生物の細胞の中で、または細胞外液に、複雑な混合物として存在し、その中には多種多様の酵素や不純物質（蛋白質、核酸、多糖類、無機塩など）が含まれている。生体内で行なわれている複雑な化学反応、即ち生命現象を正確に把握するためには、この現象を組立てている個々の単位反応を切り離して解明することが必要である。この反応は、それぞれ独立の酵素の触媒作用により営まれているものであるから、個々の酵素を単一な状態にまで純離して、それら酵素の関与する反応を明らかにすることが重要であろう。目的とする酵素以外に他の酵素が夾雑していると、基質に反応して副反応を生じたり、生成物を他の物質に変化させたり、あるいは酵素や補酵素に作用して妨害を示す場合があるので、問題の酵素が純化されるまでは、それがどのような反応を触媒するかを正確に知ることができない場合がある。

酵素が精製されると、一見単純に見えた代謝反応が一連の過程を経て起るものであって、各過程は別々の酵素によって触媒されていることが明らかとなる場合がある。とくに酵素の特異性を研究する場合には、酵素をできるだけ純化しなければならない。もしも不純の酵素を試験に供した場合は、ある反応が検出されても、それは酵素標品中に混在する他の酵素によるものではないかという疑いが残る。

このように、酵素の精製純化の問題は、酵素の生理的機能、役割を解明する上に欠くことのできない要素であるばかりでなく、またその実用化に当っても極めて大きな意義をもっている。

酵素のもつ特性、即ち、温和な反応条件で最高の活性を発揮を発揮するこ

と、基質特異性の高いことは、食品のような多種多様の成分組成と組織構造をもつ複雑な系を加工処理する場合に、極めて有利なものと考えられる。温度、pH などの作用条件がおだやかなため、食品の品質は損なわれず、また厳密な特異性のために不要な化学変化を引おこすことなしに、目的の反応のみを達成させることが可能である。そのほか、酵素自体に毒性がなく、無味無臭で食品価値を損なわない、低濃度で急速に働らく、必要な時に加熱などで酵素を不活性化させて反応を止めることができるなどの、食品加工における操作上の利点があり、従来果たし得なかった食品の加工法も、酵素の活用によって解決し得る場合も多いと考えられる。

微生物学の進歩によって、多くの微生物は、従来動植物に見出されていたと同様な酵素を生産し得ること、またそれらには見出されなかった貴重な酵素を豊富に分泌生成し得ることが判明し、さらに近年の遺伝学の進歩による優良菌株獲得法の発達、酵素生成機作の解明、微生物培養法の進歩などによって、酵素生産量を飛躍的に増大する可能性が高まった。

他方、ここ20年ほど前から、酵素の精製技術が急速に進歩し、多くのものが結晶状に単離されるようになって、その物理化学的性質がかなり明らかになって来た。このような知識は、酵素を安定な商品として供給し得ることに貢献したのみならず、従来食品加工上の一つの難点であった随伴する色、臭気の問題を解決した。また、酵素的に単一な酵素標品も比較的容易に入手されるようになった。

このような実状を背景として、酵素の食品加工、医薬(治療、診断)、分析用試薬などとしての酵素の応用は急速な発展をとげつつある。

ひと昔前まで生化学者の研究目的の一つであった酵素の結晶化は、今では、酵素の構造と機能、反応機作、およびその実用化などのより高度の研究目的を遂行するための前提となっている。

酵素の給源は主として動植物の組織または微生物菌体の抽出液、あるいは培養液などで、その中にはかなり多量の不純蛋白質ならびに非蛋白体物質が含まれ、目的とする酵素は比較的含量が少なく且つ不安定な場合が多い。したがって目的酵素を不純物質から分離するに当っては、一般に慎重で且つ厳密な操

作が要求される。各種精製操作中同一種類の操作を反覆するだけでは、除去し得る不純物質の種類がおのずから限定されるので、多くの場合には多種の方法を併用する必要が生じる。一方操作の段階が多くなればなるほど、目的酵素の収量は加速度的に低下するから、むやみにその回数を増すわけにもゆかず、したがって酵素の精製に当っては、なるべく有効な操作を組合せて、その段階をできるだけ少なくする必要が生じる。

酵素精製手段には、1) 酵素の抽出、2) 分画法、a) pH の変化による分別沈殿、b) 加熱による分別変性、c) 有機溶媒による分別沈殿、d) 塩その他の蛋白沈殿剤による分別沈殿、e) 分別吸着、f) カラムクロマトグラフィー、g) 電気泳動や超遠心分離、3) 濃縮、4) 結晶化などがあげられる。

酵素の中には同一種類の操作を繰返すだけで結晶化されるものもあるが、多くの場合には、目的とする酵素ならびに共存不純物質の種類と性質に応じて、それぞれ有効な操作を組合せることが必要である。しかし、このような操作をいかに組合せても結晶化の困難な酵素もあり、例えば、saccharase については、古くから極めて多数の人々によって、上述のほとんどすべての精製法が試みられたが、その結晶化は至難とせられ、結晶状に単離することはできなかった。

著者はながらく、一細菌の saccharase について研究を行な^{1~3)}って来たが、先人の多数の研究結果ならびに著者の経験から、saccharase を結晶化するには従来行なわれているような酵素精製手段ではやや見込みうすく、何等かの特別の手段を講ずることが先決であろうと考えられた。そこで、その一つの手段として、saccharase をより安定でしかもより結晶しやすいかたちに modify して分離することを試みた。丁度その頃、蛋白質と界面活性剤との相互反応について研究が行なわれ始めた。それらの研究によると、ある特定の条件下において、両者は化学量論的に結合して安定な複合体を生成することが明らかとなりその中のあるものは容易に結晶として単離⁴⁾されている。

そこで著者は saccharase とイオン性界面活性剤との複合体を生成せしめる方法によって結晶化をはかり、alkyldimethylbenzylammonium chloride を用いて、活性を保持せしめた複合体として結晶状に分離⁵⁾し得た。また、この方

法が細菌液化型 amylase, 麦芽 α -amylase, 細菌アルカリ proteinase などにも有効なことを証明した。さらにこの研究から進展して, 界面活性剤による細胞内酵素の抽出, 酵素蛋白質の modification などについて研究を行ない, 若手の成果を収めた。

従来, 界面活性剤は強力な蛋白変性剤であるといわれているが, 著者の経験からすれば, 一般に酵素蛋白質は単純蛋白質に比して, 界面活性剤に対する抵抗性の強いものが多いと考えられる。したがって, 酵素蛋白質と界面活性剤とを反応せしめる条件を規制することによって, 酵素蛋白質を native な状態に保ったまま, 有効に不純物質を分別排除し得ることが可能であり, 酵素蛋白質の分離精製, あるいはその modification の手段として, 界面活性剤を利用する方法は, かなり有効な一手段と考えられる。これらの方法については, 既に個別的に 2, 3 の解説を試みたが, 最近の文献をとり入れて総括的にまとめた^{6) 7)} みたい。

1. 蛋白質とイオン性界面活性剤との結合

本論に入る前に, まずその基礎となる蛋白質と界面活性剤との結合について概説する。

蛋白質でも界面活性剤でも, それぞれ親水基および疎水基とが適当なバランスを保って含まれており, したがっていずれも界面活性の性質をもっている。蛋白質の場合には, 親水基および疎水基はそれぞれ, ペプチドの “back-bone” にそって分布しているアミノ酸の極性を有する残基および非極性基からなり, 一方イオン性の界面活性剤は, 親水基の “head” に疎水性の長鎖の炭化水素が結合している。したがってその両者が結合する場合には, お互いに反対荷電を有する解離基の間の静電結合と同時に, また非極性の間の association も考慮しなければならない。

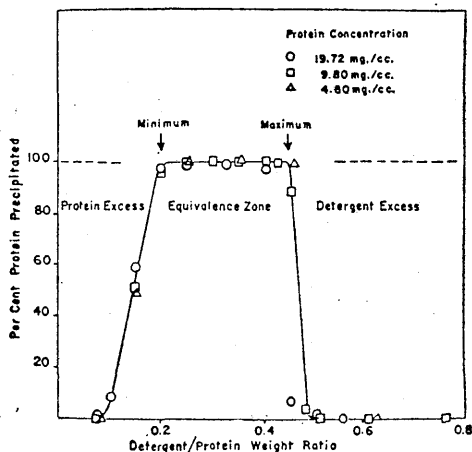
周知のようにイオン性界面活性剤は強力な蛋白変性剤で, ことに陰性のものについて詳細な研究が行なわれている。これが蛋白に比較的過剰に加えられると, 蛋白の陽荷電部 および 非極性部に結合して, 順次ペプチド鎖をほぐし変性, 失活を促す作用を示す。しかし, 界面活性剤の量が比較的少量の時には,

蛋白質と化学量論的に結合して、しかも蛋白と界面活性剤とが反対荷電をおびる pH では、この結合物はしばしば沈殿する。即ち sodium dodecyl sulfate (以下これを SDS と仮称する) のような陰イオンとして存在する界面活性剤が蛋白質を沈殿させる pH は蛋白質の等電点より酸性の pH、即ち蛋白質が陽イオンとして存在する pH であることが知られている。⁸⁾これと反対に dodecyltrimethylammonium chloride のような陽イオン性界面活性剤は、蛋白質の等電点よりアルカリ側で沈殿を生成する。⁹⁾

Putnam, Neurath⁸⁾によれば、種々の pH の 0.1N 酢酸緩衝液で馬血清アルブミンと SDS を混合すると、アルブミンの等電点 pH 4.75 より酸性側では、この界面活性剤が十分に存在する限り、蛋白質の全量が完全に沈殿する。アルカリ側では全く沈殿を生じない。しかしその際でも、界面活性剤が結合されていることが電気泳動によって確かめられている。

界面活性剤によって沈殿を生ずる pH でも、界面活性剤と蛋白質の濃度の比が適当でないと沈殿が不完全になったり、あるいは全く沈殿を生じない。図 1 は pH 4.5 における馬血清アルブミンの SDS による沈殿量 (百分率) と界面活性剤と蛋白質の重量比との関係で、界面活性剤が過剰でも、蛋白質が過剰でも沈殿を生じないことが明らかにされている。¹⁰⁾

図 1 馬血清アルブミンの SDS による沈殿形成と混合比との関係



(PH 4.50.1N 酢酸ナトリウムの緩衝液)

沈殿の形成域が両物質の絶対濃度によらず、相対比のみによって定まっていることから、この結合が化学量論的結合であることが知られる。

完全な沈殿が生ずる極大極小の点 (矢印) は、それぞれアルブミンの pH 4.5 における陽性基の数および半分に等しい数の界面活性剤が結合した状態に対応することが知ら

れている。また卵白アルブミンは、蛋白の $\frac{1}{3}$ 量（卵白アルブミン1分子に46分子）の界面活性剤が1個ずつ結合したものに相当する。しかも蛋白が過剰の場合には、電気泳動的に界面活性剤の全く結合していない蛋白が認められる。¹¹⁾即ち、卵白アルブミンと alkyl benzene sulfonate とが結合する時は、陽性基全部に結合するか或いは全く結合しないかの All or non の反応である。さらに蛋白に対して界面活性剤の割合が多くなれば連続的に次第に多くの界面活性剤が結合してゆく。この場合、結合物の沈殿は起りにくくなる。

β -ラクトグロブリンは2分子のSDSが結合すると熱およびアルカリ変性に対して安定化され、この結合物は結晶として分離された。⁴⁾

また酵素関係では lysozyme と benzylcetyldimethylammonium chloride とが化学量論的な結合物を生成することが知られている。¹²⁾

最近 biological membrane における lipid-protein の結合様式を知るためのモデルケースとして、SDSと蛋白質との相互反応に関する研究が行なわれている。^{13) 14)}これらの研究によると、蛋白質に対して多量のSDSを反応せしめた場合、両者の結合比を g/g で表わすと、蛋白の種類が変わってもその値は殆んど変わらないこと、多量のSDSが蛋白質に結合する時は主として疎水的な結合であり、その結合にはSDSのミセルは関係せず monomer だけが関与していることが知られる。Oligomer の蛋白質（例えば aldolase, alcohol dehydrogenase, catalase）はSDSを結合することによって、subunit に解離し失活する。aspartate transcarbamylase, β -galactosidase あるいは aldolase のように、SDSで失活せしめたものを、適当な条件で incubate すると回話が回復し、それに伴ない蛋白の高次構造も native の状態にもどるものもある。¹⁵⁾しかし、牛肝臓の glutamate dehydrogenase のように、SDSによって不可逆的に失活するものもある。後者の場合 Protein-fluorescence が消失し、また蛋白区分が NADH や NADPH と結合する能力が失なわれる。¹⁶⁾

以上のように、界面活性剤は蛋白質および生物系に対していろいろ異なった影響を与える。即ち、あるいは蛋白質の沈殿とその変性化、酵素、ウイルスなどの不活性化、また蛋白質の ペプチド結合、アミド結合の分解をうながし、その結果殺菌作用や溶血作用をおこすことが知られている。また oligomer

からなる酵素を subunit へ dissociate する作用もある。

これらの多様な現象は、蛋白質と界面活性剤とを反応せしめる条件、特にそれらの混合割合、反応時の pH、イオン強度、両者の化学構造にもとづく親和性などによって支配されるものであろう。

一般的にいて、蛋白質に対し界面活性剤が過剰に加えられた場合に変性、失活の傾向がみられるが、両者を反応せしめる条件を厳密に規制することによって、活性を保持した安定な複合体を生成せしめ得る場合も多いと考えられる。その条件の内とくに、pH および蛋白質と界面活性剤の相対比とが重要な因子である。複合体を生成せしめる時の条件は蛋白質の種類によってかなり相異し、また複合体の溶解度、等電点、熱およびアルカリに対する安定性なども、原蛋白質のそれとかなり異なってくる場合が多い。蛋白質と界面活性剤を結合せしめる時の条件の差異、および生成した複合体の特性をたくみに利用することによって、通帯の手段では分別精製の困難な蛋白質のそれも容易になるものと考えられる。

以下著者の実験結果を述べながら、この精製法を適用するに当って考慮すべき 2, 3 の問題点について著者の見解を述べてみたい。

2. 界面活性剤による酵素の精製法

2.1 細菌 saccharase 複合体の結晶化

以上のような蛋白質とイオン性界面活性剤との結合様式から、この菌の saccharase が比較的安定な状態で界面活性剤と結合するためには、陽イオン性の界面活性剤を用いねばならないことがわかる。と言うのは、この saccharase は等電点が pH 5 以下の酸性蛋白であるから、SDS のような陰イオン性界面活性剤との複合体を生成せしめるためには、かなりの酸性側で反応させる必要があり、このような条件下ではたとえ複合体を生成しても直ちに失活するからである。

そこで各種の陽イオン性界面活性剤について検討した結果 dodecyldimethyl-bezylammonium chloride (DN-Cl) を用いて次のような経過で結晶化を達成した。⁵⁾

タンニン酸で沈殿させる方法（表1）により精製した saccharase の水溶液に pH6 で、0°C あるいはそれ以下で DN-Cl 溶液を徐々に滴下すると、共存する不純蛋白質ならびに多糖類はほとんど大部分この界面活性剤と結合して沈殿するが、saccharase は液中に溶存している。

表1. タンニン酸沈殿法による精製

		全活性度	窒素 1 mg 当りの活性	糖 1 mg 当りの活性
培養液 2 l		12,000		
5% タンニン酸 270ml 添加 (pH 6) 1.5時間後遠心分離			1.04	0.11
上澄液	沈殿			
	アセトン、エーテルで洗浄 (0~3°C) 真空デシケーター中で乾燥			
	乾燥粉末 1.75g	9,980	21	1.8

ほとんど沈殿を生じなくなるまで DN-Cl を添加して濾過する。この処理により、酵素活性の損失を比較的少なくして、窒素 mg 当りの活性を約40倍に増大することができる。

濾液を pH 7 としてさらに DN-Cl を添加しても、ほとんど沈殿を生成しない。しかし、この酵素の等電点から考えて、この pH 範囲では、saccharase と DN-Cl はおそらく結合していることが推定されるので、この結合物の分離を試み、アセトンの終末濃度55~60%の間で沈殿せしめる方法によって、その分別が可能なることを確かめた。DN-Cl の添加量が比較的少量の場合には、DN-Cl はほとんど定量的にこの沈殿中に移行していることが認められる。沈殿の結合 DN-Cl と全窒素の比率は約 10~11 の値を保ち、また窒素 1 mg 当りの活性も約 6,000~7,000 のほぼ一定の値を保持する。

さらに DN-Cl を添加すると、saccharase と DN-Cl との結合物の生成量は漸次増大してゆくが、上の比率が 11 をこえると急に酵素が失活し始める。失活の度合は界面活性剤の量にほぼ比例し、最後にはほとんど酵素活性を失うに至る。この場合の結合 DN-Cl と全窒素の比率は約 12.8 となる。これらの関

係を示すと表2の如くなる。

表2. saccharase と界面活性剤 (DN-Cl) との結合

処理 pH	DN-Cl 添加量 mg	活性度/ml	活性度/ mg N	結合 DN-Cl/TN	55%アセトンで 沈殿する区分の 全活性度%
6	0	140	50	0	—
	220	120	2,100	4.18	4
	260	92	7,100	10.8	12
	280	90	7,000	10.8	24
7	293	68	6,800	10.4	32
	298	60	5,700	10.8	48
	303	60	4,900	10.7	44
	308	45	4,100	10.1	32
	318	1以下	—	12.8	4

供試酵素液：タンニン酸沈殿物の水溶液

活性度：(140/ml, 50mg N), 全活性度：70,000 全窒素：2.8mg/ml, TN：1.4g

以上のような諸事実から、DN-Cl の添加量を規制することによって、活性を保持した化学量論的な複合体を生成せしめ得ることが判明した。これは表3に示すような方法で結晶状に分離された。

表3. 細菌 saccharase 複合体の結晶化

		全 活 性	活性/mg N	活性/mg 糖
タンニン酸沈殿物 95g	水 2 l に溶解, 遠心分離	494,000	24	2.5
	上澄液 1850ml			
濾液 1680ml	1% DN-Cl 230ml 添加 (pH 6.0, 0~3°C), 濾過	428,000	520	140
	pH 7.0 に調整, 1%DN-Cl 45ml 添加, 濾過			
濾液 1920ml	アセトン 2700ml 添加 (0~3°C), 遠心分離			
沈殿	水 150ml に溶解, 遠心分離, 透析			

透折内液 140ml	265,000	2,200	1,700
沈殿 アセトン 200ml 添加 (0~3℃), 遠心分離			
上澄液 水 50ml に溶解, 遠心分離	223,000	4,700	2,800
結晶 アセトン 52ml 添加, 0℃に1~2日放置	175,000	6,800	5,500
結晶 水に溶解, アセトン約55%から再結	162,000	6,800	5,600

この結晶標品は酵素的ならびに電気泳動的に単一であり、それについての蛋白化学的研究から、従来不明であった saccharase の化学的形態が明らかとなった。

2.2 その他の saccharase

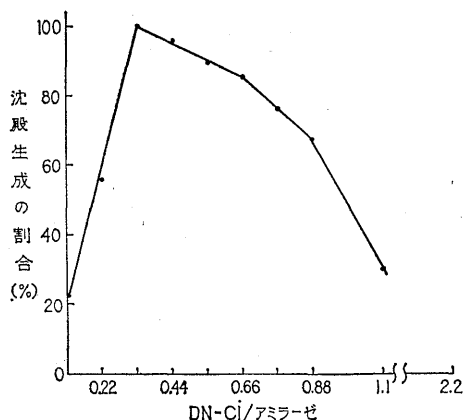
丸山らは¹⁷⁾ *Fusarium oxysporum* の菌子と孢子, microconidia の細胞膜フラクションからそれぞれ1種類ずつ, またその培養液から1種類の saccharase を, 著者の行なったとほぼ同様の操作即ちタンニン酸による沈殿, および陽イオン性界面活性剤処理によって結晶状に分離した。

2.3 細菌液化型 amylase 複合体の結晶化¹⁸⁾

この amylase は等電点が pH 5 付近にあり, アルカリ側では極めてとけやすく, かつ安定であるから, 陽イオン性界面活性剤と結合して安定な複合体を生成することが推察されるので, DN-Cl を用いて実験を試みた。

結晶細菌 amylase の溶液に pH 8.6 付近で DN-Cl を添加すると, ただちに複合体が沈殿する。沈殿の生成量は DN-Cl の添加量に比例して漸次増大しである点で最高に達し, さらに過剰の界面活性剤を添加すると溶解する。それらの関係を示せば図2の如くなる。

図2. amylase DN-Cl の混合比と沈殿生成の割合



アミラーゼを水酸化カルシウム液に溶解し (pH 8.6), その一定量に種々の量の DN-Cl を加えて生成した沈殿を定量した。

沈殿の生成量と沈殿に移行した活性度は全く比例し, また沈殿の窒素 1 mg 当りの活性は常に 8,200~8,300 の値を保持し (原結晶のそれは 12,000 である), さらに沈殿の窒素含量および DN-Cl 含量も ほぼ一定の値を示すことが認められる (表4)。

表4. DN-Cl による細菌 amylase の沈殿と沈殿の活性度

amylase (mg)	DN-Cl (mg)	沈殿生成率 (%)	沈殿の活性 (%)	沈殿の活性/ mg 窒素
9	1	21	20	8.370
	2	52.5	53.8	8.210
	3	100	100	8.330
	4	97	97.2	8.330
	5	91	91.6	8.460
	6	85	85	8.220
	8	78	78	8.380
	10	68	70	8.270
	20	29	30	8.180
	50	0	0	—

表5. 細菌 amylase と DN-CI との結合比

配 合		amylase 40 mg DN-CI 10 mg	amylase 40 mg DN-CI 20 mg
複 合 体	全 活 性 度	32,000	76,000
	窒素 1 mg 当りの活性	8,600	8,700
	窒 素 含 量	13.8%	13.6%
	DN-CI/複合体	18 "	19 "
原 結 晶	全 活 性 度	80,000	
	窒素 1 mg 当りの活性	12,000	

これらの事実から, amylase 蛋白は界面活性剤の量が著しく過剰にならない限り化学量論的に結合して, 一定の活性を保持した複合体として沈殿することが明らかとなった。そこで, この複合体を結晶状に分離することを試みた。前述の方法で amylase と DN-CI との複合体を沈殿せして, これを0.2% CaCl₂ 液に溶解する。この溶液にアセトンを終末20~30%になる如く添加して氷室中に放置すると, 美しい針状結晶を析出する。この結晶は窒素 1 mg 当り 8,200 単位である。結晶化の操作法を示せば表6の如くなる。

表6. 細菌 amylase DN-CI 複合体の結晶化 (I)

		活性度/ mg窒素	全活性度
結晶 amylase 液 50 ml 0.1% DN-CI 50 ml 添加(pH 8.6)		12,000	415,000
沈殿	上澄液		
0.2% 塩化カルシウム 100 ml に溶解			
活性度/mg窒素	0.1 DN-CI 50 ml 添加		
8,200	沈殿		
上澄液	0.2% 塩化カルシウム 50 ml に溶解		
(全活性度 120,000)	アセトン 50ml 添加, 冷所放置		
結晶	上澄液		
0.2% 塩化カルシウムに溶解			
8,200	アセトン 40 ml 添加, 冷所放置		
結晶溶液	結晶		
0.2% 塩化カルシウムに溶解			
	結晶溶液	8,300	75,0000

なお amylase の粗製標品からも、この方法に準じて、容易に複合体の結晶を分離し得ることを確めた。その操作法および本複合体の理化学的性質の詳細については原著¹⁸⁾を参照されたい。

なおそのほか、細菌アルカリ proteinase にも、この精製法が有効に適用されることが確かめられた。¹⁹⁾

これらの実験例から明らかなように、酵素蛋白質と界面活性剤との安定な複合体を生成せしめるためには、それらを反応せしめる条件、とくに(1)反応時の pH と(2)蛋白質の界面活性剤の相対比を厳密に規制することが肝要である。なおそのほかに供試界面活性剤の構造も蛋白質との結合性を支配する要因である。¹⁰⁾ Putnam によれば、蛋白質と界面活性剤とが化学量論的に結合する場合には、2つの因子があるといわれる。その1つは(a)イオン結合で、他は(b)蛋白質の configuration と界面活性剤の構造(大きさ)に関連した特異的な親和力にもとづく結合である。(a)の単なるイオン結合の場合には、陽イオンあるいは陰イオンのいずれを用いるかが問題になるが、これは目的とする酵素蛋白質の等電点、およびその安定な pH 範囲などによって、おのずから限定される。(b)の結合の場合には、界面活性剤の種類によって蛋白質との結合性が異なり、また生成した複合体の溶解度などの諸性質、ならびに酵素活性が支配される可能性もあると思われるので、いかなる界面活性剤をえらぶかが重要になる。イオン性界面活性剤の殺菌効果ならびに蛋白質との結合力が、炭化水素部分のアルキル基の長さによって支配されることから考えると、界面活性剤の構造の中でも、アルキル基の長さが重要な因子であろうと推察される。著者も細菌 saccharase の研究において、dodecyldimethylbenzylammonium chloride を用いた場合にはほとんど失活しないが、octadecyl 基の場合には、かなりの失活がみられることを経験した。

なお、上述の各複合体結晶の溶解度、熱およびアルカリに対する安定性、紫外外部吸収スペクトル、比旋光度および電気泳動的性質はもとの native な酵素^{5,18,19)}のそれとかなり相異していることが知られる。

これらの事実から、界面活性剤が結合することによって蛋白質構造が幾分 modify されていることが考えられるが、複合体結晶が原結晶の活性をほとんど

ど完全に保有していることから、酵素活性を発現する active site には大した変化はないように考えられる。

2.4 不純物質除去手段としての界面活性剤の利用

既述の酵素精製手段のうちで、蛋白沈殿剤による酵素または共存蛋白質の分別法がよく用いられる。

蛋白質は両性電解質であるため、酸性または塩基性の各種化合物と結合する性質を有する。結合した場合に溶解度が増加することもあるが、逆に減少する場合には蛋白の沈殿化に利用できるわけである。一般に蛋白沈殿剤といわれるものが後者で、その種類は極めて多い。

核酸、タンニン酸、酢酸ウラニル、ピクリン酸、燐タンゲステン酸、燐モリブデン酸、及び三塩化酢酸などで、そのうち酵素沈殿剤として比較的に用いられるものは最初の2者である。

その他、塩基性のリバノールはタカ amylase と結合して不溶性の塩を作る。この沈殿を高濃度の塩類に溶解してからリバノールを除くと、遊離の²⁰⁾ amylase が得られる。また、リバノールによる蛋白の沈殿性はその種類によって著しく異なるから、不純蛋白の除去にも用いられる。タカジアスターゼより α -amylase を除いて proteinase や糖化型 amylase を得るのはこの例である。その他トリパフラビン、サフラニン等の色素もある種の酵素の沈殿に利用されている。

これら多くの蛋白沈殿剤の中で何を選ぶかは、目的とする酵素ならびに共存不純物の種類と性質に応じて決定すべきであるが、その条件として沈殿化に特異性があり、蛋白質の種類によってその沈殿能の異なるものが要求される。

前述のように、酵素蛋白質とイオン性界面活性剤との複合体を生成せしめる方法は、酵素の純化（結晶化）の手段として、かなり有効なものと考えられるが、この精製法が適用されるためには、目的とする酵素蛋白質と界面活性剤とが活性を保持した安定な複合体を作ることが必要である。しかし、酵素の中には界面活性剤によって顕著にその活性が阻害されるものもある。例えば、結晶 urease は、pH 5 で極めて微量の陰イオン性界面活性剤によって阻害され、そ

の阻害作用は、阻害剤が酵素の活性基に直接結合するためであろうと説明されている。²¹⁾ また後述の如く、細菌中性 proteinase は陽イオン性、陰イオン性界面活性剤とそれぞれ結合するが、いずれの場合にも著しい失活が認められる。^{22, 24)} また、牛肝臓の glutamate dehydrogenase も微量の界面活性剤によって非拮抗的に阻害されることが知られている。¹⁶⁾

このような場合には適当に反応条件を規制して、界面活性剤を共存する不純物質と結合（沈殿）せしめることによって、純化の目的を果すことができる。また、複合体を形成せしめて結晶化する際にも、その前段階として、界面活性剤を不純物質を除去する手段に用いて効果を収める場合もある。

例えば、前述の細菌 saccharase 複合体の結晶化法（表 3）⁵⁾ をみると、その前段階において、界面活性剤処理により、能率よく不純蛋白質および多糖類の除去されていることがわかる。ここで注目すべきことは、陽イオン性の界面活性剤が粗酵素標品中に含まれている多糖類と結合して、これを沈殿せしめることである。多糖類は蛋白質の結晶化をさまたげる要因となるが、従来の方法ではそれらを排除することは比較的困難で、またかなり煩雑な操作を必要とするので、このような目的に界面活性剤を利用することは有効であろう。

以下、このような見地から行なった著者の実験例を紹介する。

2.4.1 細菌中性 proteinase の精製²²⁾

一細菌の分泌する中性 proteinase は、適当な条件で DN-Cl あるいは SDS と結合するが、いずれの場合にも顕著な失活が認められる（表 7・表 8）

しかしながら、この proteinase が比較的安定な pH 5.5~6.5 の間で DN-Cl を加えると、proteinase の活性をほとんど損失することなく、混在する不純蛋白質を能率よく沈殿せしめ得る。また pH 8 付近で反応せしめると、proteinase はあまり沈殿せず、amylase はほとんど大部分 DN-Cl と結合して沈殿するため、proteinase の損失を比較的少なくして、混在する amylase を分別除去し得る。以上のような条件下で DN-Cl と反応せしめて、不純蛋白質およびアミラーゼを除去した後、アセトンで分画沈殿することによって、容易に単一蛋白の proteinase 結晶が得られる。²³⁾

表7. 細菌中性 proteinase と DN-Cl との結合に対する pH の影響

反応 pH	活 性 度	
	沈 殿	上 澄 液
5.5	200(3.3%)	5,500(92 %)
6	200(3.3%)	5,500(92 %)
6.5	250(4.2%)	5,000(83 %)
7	200(3.3%)	5,200(87 %)
7.5	300(5 %)	4,200(70 %)
8	500(8.3%)	4,000(67 %)
8.5	1,000(16.7%)	1,800(30 %)
9	1,200(20 %)	1,000(16.7%)
供試 proteinase	6,000(100%)	

表8. 細菌中性 proteinase と SDS との結合に対する pH の影響

pH	全 活 性 度	
	沈 殿	上 澄 液
4	825(3.9%)	2,640(12.5%)
4.5	1,100(5.2%)	7,920(37.8%)
5	—	18,500(88 %)
5.5	—	18,500(88 %)
供試 proteinase	21,000(100%)	

2.4.2 麦芽 α -amylase の精製²⁴⁾

麦芽 α - 及び β -amylaseの混合液に対して、種々の割合に DN-Cl を添加して両 amylase の活性をみると表9の如くなり、DN-Cl の割合が増大するに伴って、糖化力が顕著に減退することが知られる。(表9)

表9. DN-Cl と酵素液の相対比と両 amylase の分別効果

DN-Cl/N	糊精化力 (DA)	糖化力 (SA)	SA/DA
0	58.5	165	2.82
0.022	"	"	"
0.045	"	162	2.76
0.09	55	"	2.94
0.18	"	"	"
0.37	55.5	158	2.84
0.75	51.5	160	3.11
1.5	31	160	1.93
3.0	25	17.5	0.70

しかし、このように単に DN-Cl の添加量を増大するだけでは、 β -amylase を分別することは困難で、界面活性剤の存在下で加熱処理することにより始め

て完全に除去することができる。いま DN-Cl と酵素液の全窒素の比率 (DN-Cl/N) を約 1 として、50, 55, 60, 65 及び 70°C の各温度にそれぞれ 10 分間処理した場合の糖化力と糊精化力の比率 (SA/DA) を求めると表 10 の如くなる。

表10. ND-Cl による B-amylase の分別

	糊 精 化 力	糖 化 力	SA/DA
amylase + 水	66 (100%)	177 (100%)	2.98
amylase + DN-Cl			
" (室温)	65 (98.5)	170 (95.4)	2.61
" (50°C)	58.5(88.6)	" (")	2.90
" (55°C)	52.5(78)	120 (67.8)	2.28
" (60°C)	45.5(68.9)	70 (39.5)	1.53
" (65°C)	35.5(53.7)	20 (11.3)	0.56
" (70°C)	26.5(40.1)	8 (4.52)	0.301

麦芽 amylase に p-Chloromercuribenzoate を加えて、 β -amylase の作用を完全に阻止した場合の SA/DA は通常 0.5~0.6 であることから、本実験の場合には、65°C、10分間の加熱でほぼ完全に β -amylase を失活せしめ得たことが知られる。

また熱処理により、大量の不純蛋白が沈殿凝固して著しく純度を高めることができる。

このように界面活性剤で処理した酵素液をアセトンで分画沈殿することによって、高純度の α -amylase 標品²⁴⁾が得られる。

3. 界面活性剤による菌体内酵素の抽出

酵素は細胞で作られ、そのあるものは細胞外に分泌、排出される。工業的に広く利用されている微生物の加水分解酵素の多くのものや、動物の消化酵素はその代表的な例である。しかしながら、大多数の酵素は細胞内で、他の蛋白質、多糖類、磷脂体、その他細胞の特殊の微細構造と複雑に結びついて、環境

に応じてその機能を変化し、生体内で行なわれている複雑な化学反応を触媒している。

このような酵素の生理的機能を解明する立場からあるいはまた、酵母 saccharase のような菌体内酵素を工業的に利用する場合にも、まず、細胞から目的の酵素を溶離することが前提であり、酵素抽出手段の巧拙は重要な意味をもつものと考ええる。

細胞内に含まれている種々の酵素が、どのようなかたちで存在しているかは明らかでないが、その多くは細胞内に溶存しているものではなく、原形質を構成している骨格（構造）蛋白質と、時には種々の物質を介して、結合しているものであろう。酵素の種類によっては、この結合が容易に切れて、酵素蛋白質が溶出されるものもあるが、コハク酸脱水素酵素のように、その結合が強固で、容易に溶出されないものもある。

例えば、細胞の呼吸に重要な役割を果しているジアホラーゼは、それ自身可溶性の黄色の酵素であるが、それが細胞内では、不溶性の構造蛋白と強固に結合しているために溶出されない。細胞を摩砕してその破砕懸濁液を作り、硫酸 2%、アルコール 3% の混合液 (pH 4.5) で 10~15 分間 43°C に加温すると、構造蛋白との構造が切れて溶出されるようになる。

また、酵素は細胞内において、しばしば、他の酵素、不活性な蛋白質、核酸、多糖類、リピドなどと complex を形成しているが、このような multi-molecular aggregate は水あるいは希薄な塩類溶液に不溶性の場合が多い。したがって、これらの bound enzyme をとり出すためには、通常、細胞の原形質膜の性状を変化せしめたり、または、酵素と他の物質との結合を dissociate することが必要である。

その有効な手段として、古くからいろいろな方法がとられている。その主なものをあげると次のようである。

1) 磨砕による抽出法

細胞組織にアルミナ・ガラス粉末、石英砂などを加えて、乳鉢中で磨砕するか、あるいは homogenizer, Warling blender などを用いる。

2) 自己消化

- 3) 凍結, 融解
- 4) アセトン処理
- 5) 乾燥
- 6) 超音波
- 7) 滲透圧の差
- 8) lysozyme その他細胞壁溶解酵素処理
- 9) Dithiothreitol, Mercaptoethanol などの処理
- 10) 界面活性剤処理

酵素抽出源として用いられる細胞の種類, 細胞破壊の難易性, あるいは目的とする酵素の安定性や, 細胞内における localizationなどを十分勘案した上でそれぞれ最も有効適切な手段を採用すべきである。

酵素蛋白質は一般に変性, 失活しやすいものであるから, 抽出操作においては, 目的とする酵素の失活を起さないように注意しなければならないことは申すまでもない。

なお抽出に当っては, 目的酵素の他に不純蛋白質, 多糖類などの高分子化合物が夾雑することは避けられない。しかもそれらの不純物の排除には, かなり煩雑な操作を要する場合もあるので, 目的酵素を能率よく抽出して, しかも不純物の混入をでき得る限り排除するような抽出条件が望ましい。

周知のように, 酵母 saccharase は細胞内で他の蛋白質あるいは多糖類と結合して, 不溶性のかたちで存在しているが, 細胞を自己消化せしめると, その結合が切れて細胞外に遊離してくる。

後述するように, イオン性の界面活性剤はごく微量で細胞構造に顕著な変化を生ぜしめ, その結果, 細胞内で結合状態にある酵素を dissociate する作用をもっているようである。このような界面活性剤の機能と, 酵母 saccharase が界面活性剤に対して安定であるという事実とを考えあわせると, 界面活性剤による酵母 saccharase の抽出はかなり有効な手段であると考えられた。

このような見地から, 酵母細胞を種々の界面活性剤で処理することを試みた。その結果, 陽イオン性の界面活性剤を用いると, 従来の自己消化法に比して, はるかに能率よく, 高収量でしかも夾雑不純物の少ない saccharase を抽

25, 26)
出し得ることを知った。

3.1 界面活性剤による酵素抽出の理論

界面活性剤を用いて、細胞からある特定の酵素蛋白質を抽出しようとする場合、その過程にはどのような反応が関与しているだろうか。多くの酵素蛋白質は細胞内において、特殊の微細構造に結びついているが、その存在様式 (localization) は各酵素の生理的機能に応じて多種多様である。一方、細胞の構成成分はいろいろであるが、細胞の生理的機能に関与している高分子物質として、蛋白質、核酸、リピド、多糖類があげられる。

細胞内酵素系およびこれらの細胞内成分は相互に反応しながら、細胞の成長の過程で、絶間のない物質代謝を営んでいる。

このように、構造的にも機能的にも複雑な性格をもっている細胞と界面活性剤との反応過程には、極めて多くの因子がからみあっていることが推測される。

例えば、1) 細胞内成分および酵素系に対する界面活性剤の作用、2) 細胞構造の変化、3) これらと関連して細胞成分の膜透過性の問題などが、この抽出を支配する要因であろう。以上のように考えてみると、この過程は極めて複雑な反応系である。

しかしながら、生物系と界面活性剤との反応機作に関する最近の知見をとり入れて、これを化学的に解析してみると、主として細胞のリピド区分 (lipoprotein) および蛋白区分に対する界面活性剤の作用という問題にしばられてくる。以下このような観点から解説を加えてみたい。

cholic acid や phospholipid のような自然界に存在する界面活性物質や、あるいはまた合成品の陽イオン性、陰イオン性および非イオン性の界面活性剤は、いずれも lipoprotein と結合しやすい。この際、低いイオン強度および適当な pH 範囲では、界面活性剤は安定なミセルを形成し、したがって、水に不溶性の物質の物理的な dispersion をひきおこす。

Wainio²⁷⁾らは sodium deoxycholate を用いて、羊の心筋から cytochrome oxidase を抽出することを研究した。即ち、心筋の suspension から、pH 4.6 で沈殿する区分を集めて、これを等重量の 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) に懸濁

せしめ、この suspension に sodium deoxycholate を加えて、4°C で 10 分間 homogenizer で磨砕する。この suspension を 20,000 g で 1 時間遠心分離すると、dispersed particle を含んだ透明な赤褐色の上清が得られる。この中には、cytochrome oxidase が含まれていることが知られた。

また Ord & Thompson²⁸⁾ は天然および合成の界面活性剤を用いて、brain cholinesterase を抽出した。この酵素は明らかに lipoprotein complex に associate しているが、brain homogenate を sodium cholate か deoxycholate あるいは非イオン性の Lubrol W (cetyl-alcohol-polyoxyethylene condensate) で処理すると、cholinesterase 活性を示す lipoprotein の dispersion を得ることができる。

William²⁹⁾ らはラットの肝臓 homogenate から、ミトコンドリアを分離し、この acetone powder を少量の sodium cholate と共に 0.1 M 磷酸乳衝液 (pH 6.8) に懸濁して homogenizer にかけた後、25,000 g で 30 分間遠心分離して透明な上澄を得た。この上澄は acetone powder のもっていた choline dehydrogenase 活性のほとんどすべてを含んでいることがわかった。

また、陰イオン性の Teepol XL (0.05%) か、あるいは非イオン性の Triton X-100 (0.12%) をマウス肝臓 homogenate に加えると、cytoplasmic particle から、 β -glucuronidase を遊離せしめ得ることが知られている³⁰⁾。しかしこの場合には、particle の機械的破壊、例えば凍結、融解、あるいはアセトン処理などによっても酵素が溶出されるので、lipid-enzyme complex の dissociation というよりもむしろ、particle をとりまく particulate membrane の破壊によるものであらうと考えられる。

以上の例から明かなように、天然に存在する、あるいは合成によって得た界面活性剤は、ある適当な条件下では安定なミセルを形成し、そのために、元来は水に不溶性の物質を disperse せしめて、酵素の抽出に極めて有効な働きをしていることが推察できる。既述のように、合成品の陽イオン性、陰イオン性の界面活性剤は、遊離した蛋白質とさらに反応して、蛋白質の沈殿、蛋白質-界面活性剤複合体の形成、あるいは蛋白質の変性をひきおこす場合がある。したがって、イオン性の界面活性剤を用いて酵素を抽出するに当っては、蛋白質

と界面活性剤との反応様式について十分留意して操作しなければならない。目的とする酵素蛋白質の安定性、物理化学的な性状、細胞内における localizationなどを十分考慮した上で、それぞれ適当な抽出条件を選べば、この方法はかなり有効な酵素抽出の手段になるであろうと考える。

3.2 酵母 saccharase の抽出^{25,26)}

酵母 saccharase は amylase, protenase などと共に、微生物を利用した酵素工業の代表的な例である。

細胞から saccharase を取り出す際に、自己消化の方法およびその程度如何によって、夾雑物の量に大きな差があるので、抽出操作は酵母 saccharase の製造上重要なポイントになっている。

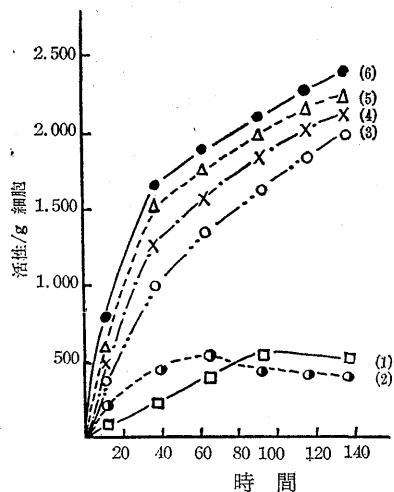
従来は、主として酵母細胞をトルオールあるいはクロロフォルムの存在下で自己消化せしめる方法がとられていたが、この抽出法では、大量の試料を取り扱う場合にかなり操作が困難で、また比較的多量の不純蛋白質および多糖類が夾雑して来る欠点があった。

著者はさきに述べたような見地から、酵母細胞(圧搾酵母)を各種の界面活性剤で抽出することを試みた。その結果、非イオン性および陰イオン性の界面活性剤ではほとんど saccharase を抽出し得ないが、陽イオン性の alkyl dimethylbenzylammonium chloride (BC と仮称) か benzyldimethyl {2-[2'-(p-1.1.3.3 tetramethyl butyl phenoxy) ethoxy]-ethyl} ammonium chloride または dodecyltrimethylammonium chloride を用いると、極めて能率よく抽出し得ることを知った。(図3)

いま、BC を用いて saccharase を抽出した場合を、従来の自己消化法と比較した一例を示すと図4の通りになる。

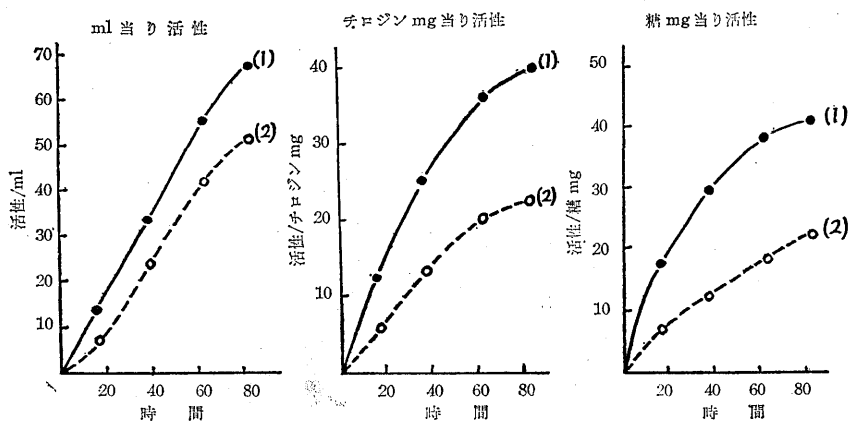
以上の結果から明らかなように、陽イオン性の界面活性剤を用いると、トルオール自己消化の場合に比較して、saccharase の抽出が早くなり、またその溶出量も大となる。さらにこのようにして得られた saccharase の糖およびチロジン mg 当りの活性は、トルオール自己消化液のそれらに比して大となり、夾雑物の少ない比較的高い純度の高いものが得られる。

図3. 各種界面活性剤による酵母サッカラーゼの抽出



- 1) polyoxy ethylene sorbitan monooleate
- 2) sodium dodecyl benzene sulfonate
- 3) dodecyl pyridinium bromide
- 4) dodecyltrimethylammonium chloride
- 5) alkyltrimethylbenzylammonium chloride
- 6) benzyldimethyl {2-[2'-(p-1.1.3.3 tetramethyl butylphenoxy) ethoxy] ethyl} ammonium chloride

図4 トルオールおよび界面活性剤抽出の比較

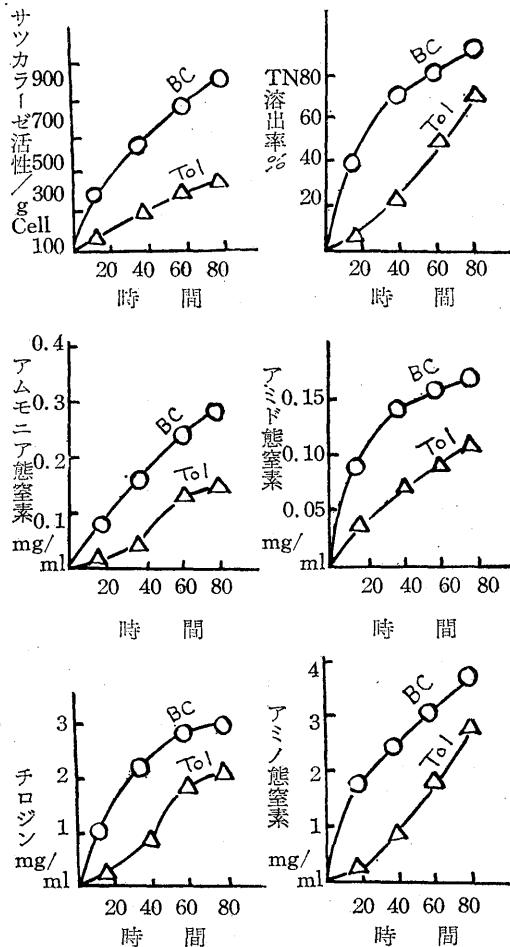


(1) BC処理 (2) トルオール処理

圧搾酵母に、少量の陽イオン性の界面活性剤液を加えると、パンの dough に近い固さのものが、ほとんど瞬間的に液状となり、少なくとも原形質膜の破壊状態がみられ、またメチレンブルーで染色されるようになる。しかしながら、saccharase は20~30時間 incubate して、ある程度細胞蛋白質の分解が進んだ後に、次第に細胞外に溶出されてくる。

この proteolysis はBCの添加によって、著しく促進される。その一例を示せば図5の如くなる。

図5. BC による細胞蛋白質分解の促進



このことはまた別に、トルオール自己消化液およびB Cで抽出した汙液について、遊離アミノ酸の paperchromatography を行なった結果からも確められた。

このように、B Cが酵母細胞蛋白質の分解を促進する機構には、かなり複雑な因子がからみあっていることが推測されるが、それらを解析した結果、酵母細胞蛋白質がB Cによって attack されて、proteolysis をうけやすいかたちに modify されていると思われる種々の現象が観察された。さらにB C処理した細胞のエーテル可溶性区分は対照（トルオール前処理細胞）に比較してはるかに大きく、最初、エーテルに難溶性のかたちで存在していたリピド区分が、B Cによって modify されて易溶性のかたちになったものと推察される。しかし、これが saccharase の抽出と直接的な関連をもつか否かについては、未だ何等の結論を出す段階ではない。

以上のように陽イオン性の界面活性剤を用いると、従来の自己消化法に比較して、はるかに能率よく、高収量でしかも夾雑不純物の少ない酵母 saccharase を抽出し得る。

従来の自己消化法では、多量の酵母多糖類が夾雑し、しかもその分別が困難なために、saccharase の精製にはかなり煩雑な操作を必要とするが、この方法で抽出すると、多糖類の混入が僅少となるので、その後の精製操作が容易になる。また、酵母の細胞塊が容易に液状となるので、大量の物量を比較的楽に取り扱うことができる。

3.3 その他の抽出例

大林は³⁰⁾ *Candida krusei* およびパン酵母の懸濁液に陽イオン性の cetyltrimethylammonium bromide を添加することによって、cytochrome C および alcohol dehydrogenase を能率よく抽出した。

この両酵素は、saccharase の抽出には数日間を必要とするのに対して、極めて短時間（3～5時間）で抽出されるといわれる。おそらく細胞内における存在様式や localization の差異によるものであろう。

また、界面活性剤は肝臓のミクロゾームから cytochrome b₅ を調製するの

に用いられている。この酵素は、従来、ミクロゾームを protease か部分的に精製した pancreatic lipase を用いて可溶化する方法によって精製され、その標品は分子量 11,700~16,000~19,000 と報告されている。³¹⁾ Ito はラットの肝臓ミクロゾームを界面活性剤で可溶化し covalent bond の切断を防止するような手段で精製することによって、分子量 25,000 の cytochrome b₅ を採取した。彼らは、それまで純化された分子量 11,700~19,000 の cytochrome b₅ は native な cytochrome の分解産物であろうと推察している。

細胞構造と結合状態にある酵素を可溶化する手段として、protease などを利用した場合には proteolysis がおきて、酵素蛋白質が modify される恐れがあるが、このように界面活性剤を用いる操作では、native な状態のままの酵素蛋白質を分離し得るので、酵素の生体細胞内における存在形態、結合様式などを明らかにする上から、好都合な手段となるであろう。

従来 cytochrome A の可溶化に cholic acid や deoxycholic acid が利用されていたが、Jacob³²⁾ らは非イオン性の Triton でこの酵素が能率よく抽出されることを見出した。この際 cytochrome の可溶化のためには、使用する界面活性剤にある特定の構造が要求され、かつ作用時に限定された条件が満たされる必要があるといわれる。

上述のように、界面活性剤は細胞の透過性に著しい影響を与えるが、この性質は細胞内酵素の抽出以外に、各種の発酵生産の分野で利用されている。

例えば、乳酸菌の生菌体を cetyltrimethylammonium bromide などの陽イオン性界面活性剤で処理すると、その菌体内の lactate dehydrogenase の活性が、生細胞のそれよりはるかに強くなることが観察された。³³⁾ この場合、D, L-一両乳酸の脱水素酵素を比較すると、両酵素が一律に増強されるのではなくて、その菌が作る型と反対の乳酸を基質とする脱水素酵素力が顕著に増大するといわれる。

また、*Brevibacterium ammoniagenes* を培養する途中で polyoxyethylene stearylamine などの陽イオン性界面活性剤を加えると、培地中に 5'-inosinic acid³⁴⁾ の蓄積されることが知られている。

Micrococcus glutamicus によるグルタミン酸発酵において、合成培地中

ビオチン濃度が 2.5 $\mu\text{g/l}$ の場合に、陽イオン、陰イオン、非イオンおよび両性の各種界面活性剤を添加すると、グルタミン酸生産が促進増加されること、またビオチン濃度 5～50 $\mu\text{g/l}$ の培地では、グルタミン酸はほとんど生産されないが、陽イオン性の cetyltrimethylammonium chloride の添加により、グルタミン酸の生産が可能になることが知られた。³⁵⁾

このように界面活性剤による細胞の透過性の損傷は、発酵生産物の合成と分泌と関連して興味ある問題と思われる。これについては大林の^{36,37)}詳細なる総説があるのでそれらを参照されたい。

4. 界面活性剤による酵素蛋白質の modification

4.1 界面活性剤による細菌 amylase の安定化

細菌液化型 amylase は、一般に他種 amylase に比して、その耐熱性の大きくなることが特徴であるが、ブドウ糖製造における澱粉液化段階の操作では、実用上 90°C に達する高温で澱粉を制限的に液化することが行なわれており、このような場合には、できるだけ耐熱性の大きな液化酵素が要求されている。また、のり抜剤として利用する場合でも、酵素反応をより高温で行なうことができれば、その反応速度が大となり、極めて有利なことはおのずから明らかである。

このような実用的見地から、amylase の耐熱性を増大せしめる問題に関しては、従来から多大の関心が払われて来た。それらを解決する対策として、耐熱性の強い amylase を生産する菌株の分離や、人工的に変異株を作ったり、あるいは交配などによって、有用菌株を得ようとする試みが行なわれているが、未だ実用化の段階には達していない。市販の酵素剤については、それに適当量の Ca 塩と Na 塩を配合し、かつその緩衝能力をできるだけ高めて、澱粉液化の際に、反応液が酸性側に傾くのを防止することによって、この問題は一応解決されたが、より以上の耐熱性を有する amylase の出現は依然として要望される問題点である。

前述のように、蛋白質に界面活性剤を結合せしめると、その複合体の溶解度や酸、アルカリおよび熱に対する抵抗性などは原蛋白質のそれと異なり、場合

によっては安定性を増大することもある。

このような事実から、著者は細菌液化型 amylase を界面活性剤で modify することによって、その耐熱性を増大せしめ得るものと考えて実験を進め、alkyldimethylbenzylammonium chloride (BC) を用いて、³⁸⁾ ほぼその目的を達した。

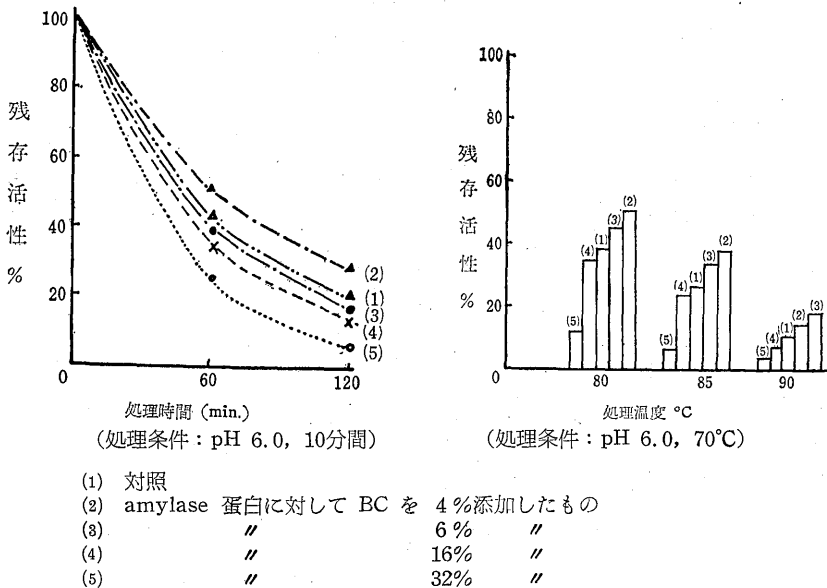
4.1.1 細菌液化型 amylase と界面活性剤の結合

供試細菌の培養液は amylase と同時にまた、著量の protease を含有するので、amylase を modify すると同時に、protease を能率よく分別、回収することができれば、酵素生産の立場から極めて有利である。

このような見地から、amylase が陽イオン性の界面活性剤と反応する pH 範囲で、しかも protease が安定な pH 6～7 の間の反応条件を選んだ。

常法に従って結晶化せしめた amylase に対して、種々の割合で BC を添加し (pH 6.0)、それぞれの場合について耐熱性を比較検討すると図 6 の如くなる。

図 6. amylase と界面活性剤の相対比と耐熱性



この結果、純化された amylase 蛋白に対して、4%程度の BC を添加した場合に耐熱性を増大せしめ得ること、過剰の添加はかえって熱失活を促進することが明らかとなった。

なおその他の陽イオン性界面活性剤を用いて同様の実験を行なった。この場合耐熱性を測定する一つの基準として、酵素濃度を等しくした各試料について、90°C における澱粉液化力を求めた。その一例を示せば表11の如くなり、amylase 蛋白に対し BC (1~4%), Hy (1%), DT-Cl (1~4%) をそれぞれ添加した場合には、かかる高温においても対照に比し、かなり高い活性を発揮することが明らかとなった。

表11. amylase と界面活性剤の相対比と耐熱性

界 面 活 性 剤		澱 粉 液 化 力 (90°C)
種 類	アミラーゼ蛋白に 対する添加量 %	
BC	0	3.16 (100)
	1	4.19 (132)
	2	5.00 (158)
	4	3.92 (124)
	8	3.26 (103)
※ Hy	0.5	3.45 (110)
	1	3.78 (120)
	2	3.16 (100)
DT-Cl	1	4.00 (126)
	4	4.19 (132)
	8	4.00 (126)

※ Hy : benzyltrimethyl {2-[2'-(p-1.1.3.3 tetramethyl butyl phenoxy)ethoxy]-ethyl} ammonium chloride

／ DT-Cl : dodecyltrimethylammonium chloride

一方、一定量の結晶 amylase に対して種々の割合で BC を添加し、pH 6 で incubate した後、未反応の遊離 BC 量を定量すると表12の如くなり、amylase 蛋白に対して約 4~5% の BC が結合されていることが知られた。

表12 amylase と界面活性剤の結合比
inacbation の条件 (pH 6.0, 25°C)

供試 amylase 量 (mg)	供試 BC 量 (mg)	遊離 BC 量 (mg)	結合 BC 量 (mg)
5 (100)	0.1 (2)	—	—
	0.2 (4)	±	—
	0.4 (8)	0.14	0.26 (5.2)
	0.8 (16)	0.66	0.24 (4.8)
	1.6 (32)	1.36	0.24 (4.8)

この事実は別に、平衡透析法によっても確かめられた。このようなことより、前述の耐熱性増大効果は、amylase 蛋白の modification によるものと推定される。原 amylase 結晶と複合体の紫外吸収スペクトルに顕著な差異はみられないが、複合体の極大吸収が短波長側にわずかに移行していることが観察された。

4.1.2 耐熱性 amylase 剤の製造法

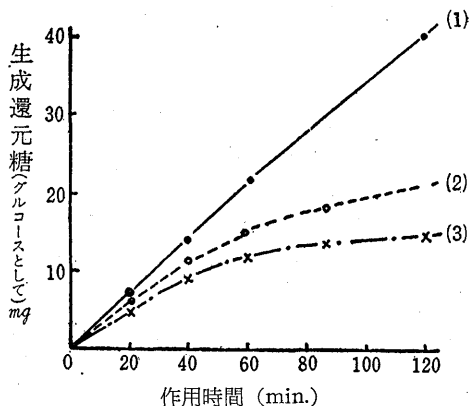
以上のように、本菌の amylase に適当な条件で陽イオン性の界面活性剤を結合せしめることによって、その耐熱性を増大せしめ得ることが明らかになったので、この方法による耐熱性 amylase の工業的製造法について検討した。

本菌の培養液に pH 6~6.5 で BC を終末 0.1~0.2 % になる如く添加すると、amylase は界面活性剤と結合する。この複合体および protease は液中に溶存しているが、混在する不純蛋白質および多糖類は大部分沈殿、凝固するので、amylase および protease の活性をあまり損失することなく、有効に不純物質を分別排除することができる。かくして得られた amylase 一界面活性剤複合体および protease を含有する液に、isopropanol を終末 30~40 % になるように加えて、低温で amylase を澱粉に吸着せしめる。

この方法で得られた amylase は約 4 % の BC を含有しており、従来工業的に利用されている amylase 製剤に比し、かなり耐熱性の大きなることが認められる。

この amylase 製剤を用いて、90°C の高温における澱粉糖化の伸びを対照の amylase 剤と比較した一例を示せば 図 7 の如くなり、本法によって調製し

図7. 各種 amylase の澱粉糖化曲線



- (1) 0.1% BC 処理後澱粉吸着によって得られたアミラーゼ
 (2) 無処理澱粉吸着アミラーゼ
 (3) 麴式培養物 (市販品)
 作用条件: 馬鈴薯澱粉30%
 pH 6.0, 90°C
 amylase 25U (糖化力単位)

た amylase 剤はかかる高温においても、極めて能率よくその作用を営み得ることが明らかである。

なお上述の実験において、40分後の反応液について、残存 amylase 活性を求めると表13の如くなり、BC処理後澱粉吸着せしめた amylase 剤は他のものに比し、極めて安定なことが確かめられた。

表13. 反応液中の残存 amylase 活性

アミラーゼの種類	残 存 活 性 率
BC 処理後 澱粉吸着	96.6
無 処 理 澱 粉 吸 着	58.3
麴 式 培 養 物	24.5

以上のように細菌液化型 amylase に pH 6 付近で約 4% の陽イオン性界面活性剤を結合せしめる方法によって、工業的に大きい価値を有する耐熱性 amylase 剤の製造法を確立し、また amylase を分別した汙液から高純度の protease を回収することができた。

この際、界面活性剤の添加量が重要であり、amylase 蛋白に対して約 4 % 程度の添加配合の場合に、耐熱性付与の効果がみられるが、より過剰の添加はかえって熱失活を促進する。

なお両者の相対比のほかに、その反応系における amylase の絶対濃度が重要な因子である。例えば、amylase と B C との配合比を 100 : 4 に規制した場合、1 mg amylase/ml の濃度においては耐熱性が増大されるが、その $\frac{1}{10}$ の濃度では、その効果はみられず、10 mg/ml の高濃度では、界面活性剤はかえって熱変性を促進するようである。

一方、反応時の pH に重要な条件である。pH 6 付近で生成した amylase の複合体は、耐熱性が増大するが、pH 9 以上で amylase と B C とを反応させると、前述のように約 18% の B C を含有する複合体が得られる。これは結晶状に分離されたが、その耐熱性は native amylase よりもかえって低く、アルカリ側においてはるかに安定なことがみられた。¹⁸⁾ 反応時の pH が相違すれば、酵素蛋白の表面におけるイオン化の状態が異なり、これらに応じて、amylase 蛋白に対する界面活性剤の結合比ならびにそれらの結合様式が支配されるものであろう。

4.2 カビ糖化型 amylase の modification

最近、水に不溶性の酵素剤を調製する技術が格段に進歩し、これを用いて酵素反応の連続化に関する研究が進展している。著者も不溶性 saccharase による蔗糖の連続転化について研究中である。^{39,40)} 不溶性酵素剤の具備すべき最大の条件は、高い活性をもち、しかもその活性が長期間安定に保持されることである。とくに不溶性酵素のカラム中に基質溶液を流すことによって、酵素の溶出することは実用上大きな欠陥である。

酵素法によるブドウ糖製造の場合に、吸着剤に固着させたカビの糖化型 amylase を用いて、澱粉液を連続的に糖化する方法が試みられているが、従来の吸着酵素剤はブドウ糖液を流すことによって幾分溶出される欠点があった。

⁴¹⁾ 富永などは、著者の行なった細菌液化型 amylase とほぼ同じような操作でカビの糖化型 amylase に各種の陽イオン性界面活性剤を結合せしめた後、こ

の複合体を吸着剤に固着せしめる方法によって、安定な溶出され難い不溶性酵素剤を製造する方式を開発した。

さらに、もとの糖化型 *amylase* の吸着物は、糖化の進行に伴って pH が低下すると、酵素活性が急速に低下し、長期の連続使用が不可能であるのに対し、複合体を吸着せしめたものは、同様の糖化操作で、糖液の pH 低下や腐敗現象も比較的少なく、また長期の連続使用によって pH が低下しても酵素の失活は少なく、酸に対する抵抗性の増大していることが明らかとなった。

このようにカビ糖化型 *amylase* に予め陽イオン性の界面活性剤を結合せしめた後、吸着不溶化することによって、吸着剤に対する *affinity* の大きい、しかも安定化された酵素剤が得られ、経済的に極めて有利となった。

5. その他の分野における利用

「生物の特異性を決定する、即ち「遺伝情報を伝達する」ものが、核酸それ自体であるということが実験的に証明されて以来、核酸の生物学的機能についての研究は日進月歩の勢いで進み、それと相まって、核酸の構成成分である *nucleotide* や *nucleoside* および塩基類の化学的、物理的研究、あるいは核酸の合成、分解に関与する酵素群の研究が発展したのは当然のことである。

このような核酸、核蛋白に関する研究を行なうに当り、一つの重要な問題は、それをなるべく天然の状態に近い状態で分離し精製することである。

しかし、この問題はかなり解決の困難な種々の課題を含むことになる。

いうまでもなく、生体材料には蛋白質やリピド、多糖類などが含まれ、これらの物質から核酸を分離しなければならないが、核酸は、酸やアルカリや高温では分解したり変性しやすいので、できるだけ温和な条件で他の物質を排除することを考えねばならない。

また、生細胞には種々の核酸分解酵素が含まれているので、これらの作用をさけるような工夫が望ましい。

研究目的によって抽出材料が異なり、従って材料ごとに抽出手段を検討しなければならないが、原理的には低温で操作を行ない、酵素の失活をかねて、できるだけ完全に蛋白質を変性させる操作が中心となる。

既述のように、SDSなどの陰イオン性の界面活性剤の機能は十分に条件にかなうものであり、またこの種界面活性剤は、生理的条件下で抽出する場合におこりがちな、核酸の depolymerization に関与する酵素の作用を block するので、native な状態で核酸を採取する手段として極めて好都合である。

動物組織、魚精子、小麦胚などのDNAは塩基性蛋白質と結びついた nucleohistone あるいは nucleoprotamine の形で存在している。これらの histone や protamine などは、その高い等電点のために、中性付近では強い positive charge をもっている。従って SDS のような陰イオン性の界面活性剤で処理することによって、容易にデオキシリボ核蛋白からDNAを遊離せしめ、且蛋白質を排除することが可能となる。

また、核酸と界面活性剤とは、ある特定の条件下において complex を形成するが、この complex はもとの核酸とは、溶解性などによりかなり顕著な差異がある。この差異を巧みに利用することによって、通常の操作では分別精製し難いような場合でも、容易にその目的を果すことができる。例えば細菌の核酸は cetyltrimethylammonium bromide と complex を作るが、DNA と RNA のそれぞれの complex の食塩溶液に対する溶解度には、かなりの差異が認められる。この差を利用して有効に両者を分離することが知られている。

このように考えてみると、この蛋白変性法は核酸分離の手段としてかなり有効であり、今後の適用が大いに期待されると考えられるが、それらについては既に解説を加えたので、今回は割愛した。⁴²⁾

引用文献

- 1) 福本寿一郎、根来秀夫：科学と工業 28, 103 (1954)
- 2) 根来秀夫、福本寿一郎：科学と工業 28, 292 (1954) : 29, 132 (1955)
- 3) 根来秀夫：科学と工業 29, 283, 286 (1955) ; 30, 142 (1956) 農化 31, 153, 158, 250, 253, 256, 312, 316, 319 (1957)
- 4) T. L. Mc. Meekin et al : J. Am. Chem. Chem. Soc., 71, 3606 (1949)
- 5) 根来秀夫：生化学 32, 306 (1960)
- 6) 根来秀夫：コロイドと界面活性剤 1, 535 (1960)
- 7) 根来秀夫：科学と工業 37, 244 (1963)
- 8) F. W. Putnam, H. Neurath : J. Am. Chem. Soc., 66, 692 (1944)

- 9) W. G. Jaffé : J. Biol. Chem., **148**, 185 (1943)
- 10) F. W. Putnam : Ad. Prot. Chem., **4**, 79 (1948)
- 11) H. P. Landgrn et al : J. Biol. Chem., **149**, 189 (1943)
- 12) H. N. Glassman, D. M. Molnar : Arch. Biochem. Biophys **32**, 170 (1951)
- 13) C. A. Nelson : J. Biol. Chem., **246**, 3895 (1971)
- 14) J. A. Reynolds, C. Tanford : Proc. Natl. Acad. Sci., **66**, 1002 (1970)
- 15) K. Weber, D. J. Kuter : J. Biol. Chem., **246**, 4504 (1971)
- 16) K. S. Roglers, S. C. Yusko : J. Biol. Chem., **244**, 6690 (1969)
- 17) 丸山芳治, 小野寺一清, 舟橋三郎 : 酵素化学シンポジウム第16回予備集 191 (1964)
- 18) 根来秀夫 : 生化学 **32**, 310 (1960)
- 19) 根来秀夫 : 生化学 **32**, 319 (1960)
- 20) 赤堀四郎, 萩原文二, 池中徳治 : Proc. Japan Acad., **27**, 350 (1951)
- 21) E. D. Wills : Biochem. J., **47**, 158 (1950)
- 22) 根来秀夫 : 生化学 **32**, 324 (1960)
- 23) 根来秀夫 : 酵素化学シンポジウム **14**, 334 (1960)
- 24) 根来秀夫 : 生化学 **32**, 316 (1960)
- 25) 根来秀夫, 平野幸夫, 福本寿一郎 : 科学と工業 **35**, 423 (1961)
- 26) 根来秀夫, 平野幸夫 : 科学と工業 **36**, 475 (1962)
- 27) W. W. Wainio et al : J. Biol. Chem., **173**, 145 (1948)
- 28) M. G. Ord, R. H. S. Thompson : Biochem. J., **49**, 191 (1951)
- 29) J. N. Williams, F., S. Sreenivasan : J. Biol. Chem., **203**, 899 (1953)
- 30) 大林晃 : 農化 **37**, 268 (1963)
- 31) A. Ito, R. Sato : J. Biol. Chem., **243**, 4922 (1968)
- 32) E. E. Jacobs, E. C. Andrews : Biochem. Biochys, Res, Comm., **25**, 87 (1966)
- 33) 大林晃, 岩野貞雄, 日下巖, 北原覚雄 : 農化 **34**, 16 (1960)
- 34) T. Nara, M. Misawa, T. Komuro, S. Kinoshita : Agr. Biol. Chem., **33**, 1198 (1969)
- 35) 宇田川清, 阿部重雄, 木下祝郎 : 醸工 **40**, 614 (1962)
- 36) 大林晃 : Amino acid and Nucleie Acid. **11**, 31 (1966)
- 37) 大林晃 : 醸協 **23**, 145 (1965)
- 38) 根来秀夫 : アミラーゼシンポジウム (1969)
- 39) 根来秀夫 : 醸工 **48**, 689 (1970)
- 40) 根来秀夫 : 醸工 **50**, 136 (1972)
- 41) 富永正, 新見匡弘, 相原久之 : 特許昭44—1360
- 42) 根来秀夫 : 科学と工業 **38**, 342 (1964)

Negoro, Hideo

The Use of Detergents in the Purification of Enzymes

Résumé

The study of the binding of detergents to proteins should furnish important insights into the more complicated and less easily understood problems of lipid-protein interactions.

The present review deals with the mode of the interactions of the proteins with the detergents, particularly the effects of the detergents on the enzyme activities. In general, the enzyme proteins are fairly resistant to the damaging effect of the detergent in contrast to the lability of the impure proteins, and the detergents are found to be favorable agents to remove the impurities contained in the enzyme solution. Under strictly controlled conditions, some of the enzymes form stable stoichiometric enzyme-detergent complexes which retain the activities. The resulting complexes are more easily obtained in crystallin states than the native enzymes, hence the detergents can be used to advantage in purifying the enzymes, such as bacterial saccharase, which proved difficult to crystallize in the usual way.

Detergents may alter the permeability of cells with consequent derangement of existing cellular enzyme-substrate relationships. Some intracellular enzymes become permeable in the presence of the detergents resulting in liberation of enzymes to surrounding medium.

The cationic detergent such as alkyltrimethylbenzylammonium chloride is useful to release the yeast saccharase from the cells. The extract obtained by the detergent method shows a higher specific activity than the extract prepared by the method using toluene, hence the extraction method seems to be of great advantage than the usual autolysis method.

The heat stability of bacterial liquefying amylase is increased when a definite amount of cationic detergent bound to the enzyme. By this method, the heat stable amylase, which is of considerable importance for practical use, is prepared.