

界面活性剤との複合化によるリパーゼ類の
有機溶媒可溶化に関する研究

平成12年3月

杉村 佳昭

山口大学大学院理工学研究科

目次

第1章 緒論

1. 1	研究の背景・目的	1
1. 2	参考文献	5

第2章 脂質被覆法による界面活性剤-リパーゼ複合体調製の定量化

2. 1	緒言	7
2. 2	実験	
2. 2. 1	酵素および非酵素タンパク質	9
2. 2. 2	疎水性界面活性剤	10
2. 2. 3	その他の試薬	13
2. 2. 4	リパーゼ類、BSA および γ -G の脂質被覆操作	14
2. 2. 5	タンパク質濃度の測定	15
2. 2. 6	タンパク質の脂質被覆率 (coverage) の測定	16
2. 2. 7	酵素活性の測定	17
2. 3	実験結果および考察	
2. 3. 1	熟成時間	18
2. 3. 2	被覆温度	19
2. 3. 3	種々のタンパク質の $2C_{18}$, Δ^9 GE による被覆挙動	20
2. 3. 4	複合化等温式	22
2. 3. 5	脂質被覆の繰り返し	26
2. 3. 6	界面活性剤-酵素複合体中の酵素含量と酵素活性	27
2. 3. 7	脂質被覆へのタンパク質水溶液の pH の影響	36
2. 4	結言	38
2. 5	参考文献	39

第3章	水性二相分配法によるリパーゼ類の表面疎水性の測定	
3.1	緒言	41
3.2	実験	
3.2.1	試料タンパク質	42
3.2.2	試薬類	43
3.2.2	水性二相分配法によるタンパク質の疎水性の測定	44
3.3	実験結果および考察	
3.3.1	タンパク質の表面疎水性	47
3.3.2	タンパク質の局所疎水性	50
3.3.3	タンパク質の局所疎水性の pH による変化	52
3.3.4	リパーゼの疎水性と界面活性剤による被覆	55
3.3.5	リパーゼ類の疎水性と有機溶媒中の酵素活性	57
3.4	結言	59
3.5	参考文献	60
第4章	水相脂質被覆法によるリパーゼ類の疎水化修飾	
4.1	緒言	62
4.2	実験	
4.2.1	酵素修飾用ジェミニ型界面活性剤の合成	63
4.2.2	酵素修飾用ジェミニ型含糖界面活性剤の合成	68
4.2.3	リパーゼ類および試薬	70
4.2.4	ジェミニ型界面活性剤リパーゼ複合体の調製	71
4.2.5	有機溶媒中での界面活性剤リパーゼ複合体の酵素比活性の測定	72
4.3	実験結果および考察	
4.3.1	水相脂質被覆法で調製したジェミニ型界面活性剤リパーゼ複合体の酵素活性	74
4.3.2	種々のリパーゼのジェミニ型界面活性剤による疎水化修飾	76
4.3.3	界面活性剤リパーゼモル比の酵素活性への影響	81

4. 3. 4	ジェミニ型界面活性剤-リパーゼ複合体触媒反応における有機溶媒の影響	83
4. 3. 5	界面活性剤の HLB 値とリパーゼ類の疎水化修飾効果	86
4. 4	結言	92
4. 5	参考文献	93
第 5 章 結論		95
研究発表論文		97
謝辞		

【第1章】 緒論

1. 1 研究の背景・目的

酵素は生体細胞内の種々の反応を触媒するタンパク質であり、本来、水溶液中で機能するため、長い間、酵素は有機溶媒の存在下では変性、失活してしまうものと考えられ、有機溶媒中では使用されなかった。しかし、1966年に有機溶媒中に懸濁させたキモトリプシンが酵素活性を有することが Dastoli ら¹⁾によって報告され、そのおよそ20年後に、Klibanov²⁾が多数の酵素について有機溶媒中での酵素活性発現を確認するにおよんで、一般的な現象として非水溶媒体中での酵素反応が盛んに行われるようになった。

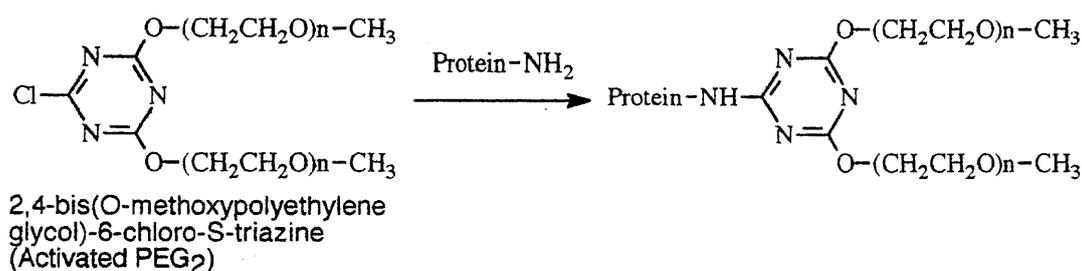
有機溶媒中で酵素反応が行えるようになると、疎水性の基質に対しても高濃度で反応できるようになり、加水分解酵素を逆反応の合成反応(エステル合成、ペプチド合成など)の触媒として利用でき、人工基質も含めた基質の選択の幅が大きく広がる、また、水の関与する副反応が起こりにくくなり、水中では不可能な反応が進行する可能性がある、さらに、水系に比べて有機溶媒からの生成物の回収は容易で、微生物汚染の可能性も少ない、といったような利点が、酵素反応本来の利点に更に加わり、リパーゼ、エステラーゼ、オキシダーゼ、プロテアーゼなどの酵素を使用した多数の有機溶媒中の酵素反応がこれまで開発されている³⁾。

その間、有機溶媒中で酵素反応を行う技術として、(1)粉末酵素を基質に溶解させた有機溶媒(微量の水分を含む)に直接懸濁させて用いる粉末酵素法^{4,5)}、(2)水系で酵素を固定化しておいて有機溶媒中で反応を行う固定化酵素法^{6,7)}、(3)基質を含む有機相と酵素を含む水相を界面で反応させる有機溶媒-水二相系反応法^{8,9)}、(4)逆ミセルの“水プール”中に酵素を溶解させ、有機相中の基質と反応させる逆ミセル法^{10,11)}、が開発されている。しかし、これらの方法では酵素は完全には有機溶媒に溶解せず、本質的には不均一反応であるので、反応速度は著しく小さい欠点がある。

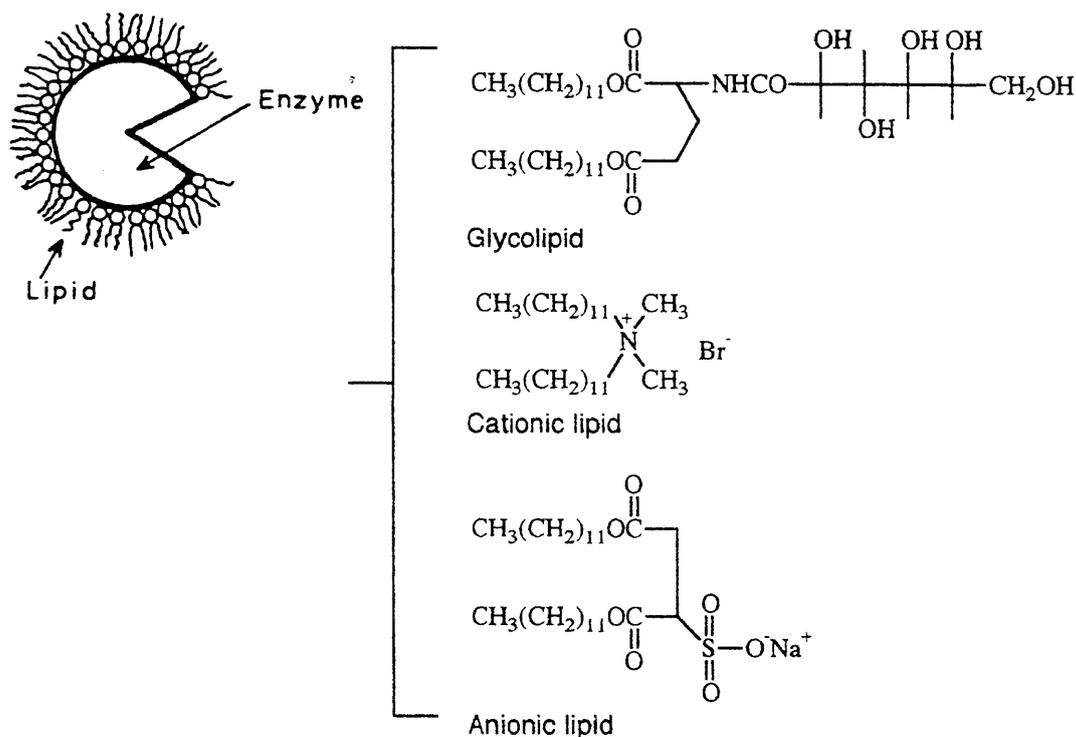
一方、1980年代後半に開発された、(5)酵素を疎水化修飾して有機溶媒に可溶性にする酵素修飾法(有機溶媒可溶化法)^{12,13)}は酵素と基質が共に均一に溶

解した有機溶媒中で酵素反応が進行するため、有機溶媒中でも非常に大きな反応速度が得られる優れた方法である。

酵素の有機溶媒可溶化法として、2,4-ビス(O-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-S-トリアジン水溶液中で酵素表面のアミノ基と共有結合させて疎水化する化学修飾法¹⁴⁾ (スキーム 1.1) と、水系で疎水性の界面活性剤 (脂質) で酵素表面を被覆して疎水化する物理的修飾法 (脂質被覆法)^{15,16)} (スキーム 1.2) がそれぞれ 1984 年と 1988 年に相次いで公表され、それぞれ次のような特徴を有している。



Scheme 1.1 Chemical modification of protein



Scheme 1.2 Lipid-coated method

前者は酵素ではカタラーゼ、ペルオキシダーゼ、キモトリプシノーゲン、リパーゼなどに応用され、ベンゼンや含塩素炭化水素溶媒中での酵素反応が行われている。タンパク質表面に存在するアミノ基（N末端アミノ基及びリジン残基の ϵ -アミノ基）に両親媒性のポリエチレングリコール鎖を共有結合するので、タンパク質分子中のすべてのアミノ基を修飾すれば、有機溶媒への溶解度は上がるが、酵素活性は消失するので、例えば、カタラーゼではアミノ基の修飾率を42%、リパーゼでは50%に制御する必要があり、酵素分子中の全アミノ基数を測定しておく必要性及び反応後の修飾剤の除去の必要性など、調製が複雑で時間がかかる欠点があり、バイオリクターとしての修飾酵素としてよりも、ポリエチレングリコール修飾タンパク質は抗原性を消失させる効果があり、医薬としての応用の方が現在では盛んになっている。

一方、後者は調製法は簡便であるが、ほとんどリパーゼに対して用いられ、アニオン性疎水性界面活性剤では静電的反撥のため、酵素が被覆できず、逆にカチオン性疎水性界面活性剤では静電的引力のため被覆率は良いが、結合が強すぎるので酵素活性がなく、中性疎水性界面活性剤を用いてのみ、有機溶媒中で高活性の脂質被覆酵素が得られることが明らかにされている。

先に、福永ら¹⁶⁾は従来水系で使用されてきた酵素が固定化されることで、さらにその利用価値が高められたことから、(5)の有機溶媒可溶化酵素（修飾酵素）も有機溶媒中で固定化して有機溶媒中で用いることができれば、さらに利用価値が高められるとの想定のもと、脂質被覆法で *Pseudomonas cepacia* 起源のリパーゼ（リパーゼ P）を疎水化修飾し、ベンゼン中で疎水性光硬化性プレポリマー ENT-P を用いて包括固定化し、有機溶媒中で活性な薄片状¹⁶⁾あるいはペレット状¹⁷⁾の固定化有機溶媒可溶化リパーゼの調製に成功した。

これらの成果は、有機溶媒可溶化酵素も従来水系での酵素のように、有機溶媒中で連続酵素反応の触媒として利用できることを示したもので、特に酵素は不斉選択性を有しており、かつてのサリドマイド事件の教訓と近年の生活の高度化に伴う純粋な光学活性化合物（キラル化合物）の需要増加により、キラル化合物の分離技術や大量生産技術に大きな期待がかけられている現在、不斉合成と光学分割の両方に応用可能な固定化有機溶媒可溶化酵素はこれらキラル化合物の大量生産技術として有望である。

固定化有機溶媒可溶化リパーゼの性能は固定化前の有機溶媒可溶化リパーゼの性能をよく反映していたので、より優れた固定化有機溶媒可溶化酵素の創製にはより優れた有機溶媒可溶化酵素の調製が不可欠であるとの観点から、本研究では実用性の高い脂質被覆法による酵素の有機溶媒可溶化、すなわち、疎水性界面活性剤と酵素の複合化についての基礎的、かつ定量的な検討を行うことにした。

酵素としては、非水溶媒中での適用反応数が最も多く、また、今まで疎水化修飾が最も多く行われているリパーゼ類を選んだ。

1. 2 参考文献

- 1) F.R. Dastoli, N.A. Musto and S. Drice, "Reactivity of active sites of chymotrypsin suspended in organic medium", Arch. Biochem. Biophys., **115**, 44-47 (1966).
- 2) 例えば総説として A.M. Klibanov, "Enzymes that work in organic solvents", Chemtech, **16**, 354-359 (1986).
- 3) 例えば総説として J.S. Dordick, "Enzymatic catalysis in nonphasic organic solvents", Enzyme Microb. Technol., **11**, 194-211 (1989).
- 4) I.L. Gatfield, "The enzymatic synthesis of esters in nonaqueous systems", Ann. New York Acad. Sci., **434**, 569-572 (1984).
- 5) R.Z. Kazandjian and A.M. Klibanov, "Regioselective oxidation of phenols catalyzed by polyphenol oxidase in chloroform", J. Am. Chem. Soc., **107**, 5448-5450 (1985).
- 6) C. Marlot, G. Langrand, C. Triantphylides and J. Baratti, "Ester synthesis in organic solvent catalyzed by lipases immobilized on hydrophilic supports", Biotechnol. Lett., **7**, 647-650 (1985).
- 7) A. Tanaka and K. Somonoto, "Immobilized biocatalysts in organic solvents", Chemtech., 112-117 (1990).
- 8) M.D. Lilly, "Two-liquid-phase biocatalytic reactions", J. Chem. Tech. Biotechnol., **32**, 162-169 (1982).
- 9) T. Ishii, T. Mori, J. Chen, Y. Itoh, S. Shimura, K. Kirimura and S. Usami, "Ester synthesis by a crude lipase of *Rhizopus oligosporus* in an aqueous system", J. Ferment. Bioeng., **70**, 188-189 (1990).
- 10) P.D.I. Fletcher, R.B. Freedman, B.H. Robinson, G.D. Rees and R. Schomacker, "Lipase-catalysed ester synthesis in oil-continuous microemulsions", Biochim. Biophys. Acta, **912**, 278-282 (1987).
- 11) H. Stamatis, A. Xenakis, M. Provelegiou and F.N. Kolisis, "Esterification reactions catalyzed by lipases in microemulsions: The role of enzyme localization in relation to its selectivity", Biotechnol. Bioeng., **42**, 103-110 (1993).

- 12) K. Takahashi, H. Nishimura, T. Yoshimoto, Y. Sato, and Y. Inada, "Chemical modification to make horseradish peroxidase soluble and active in benzene", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **121**, 261-265 (1984).
- 13) Y. Okahata and K. Ijio, "A lipid-coated lipase as a new catalyst for triglyceride synthesis in organic solvent", *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1392-1394 (1988).
- 14) 高橋勝宣, 稲田祐二, "合成高分子と蛋白質のハイブリッド-有機溶媒可溶化酵素-", *蛋白質 核酸 酵素*, **31**, 579-590 (1986); 上村武司, 齊藤哲也, 小寺洋, 西村裕之, 廣戸三佐雄, 二見-松島端子, 稲田祐二, "蛋白質のポリエチレングリコールによる化学修飾法", *蛋白質 核酸 酵素*, **41**, 1607-1613 (1996).
- 15) Y. Okahata, Y. Fujimoto and K. Ijio, "Lipase-lipid complex as a resolution catalyst of racemic alcohols in organic solvents", *Tetrahedron Lett.*, **29**, 5133-5134 (1988); 岡畑恵雄, 居城邦治, "酵素-脂質複合体", *化学と工業*, **43**, 1243-1245 (1990).
- 16) K. Fukunaga, N. Mimamijima, Y. Sugimura, Z. Zhang and K. Nakao, "Immobilization of organic solvent-soluble lipase in nonaqueous conditions and properties of the immobilized enzyme ", *J. Biotechnol.*, **52**, 81-88 (1996); 福永公寿, 張忠智, 杉村佳昭, 中尾勝實, "固定化有機溶媒可溶化リパーゼの調製とその特性", *Bioche. Newsletter*, **11**, 11-16 (1995).
- 17) K. Fukunaga, H. Nakamura, Y. Sugimura, K. Nakao, T. Iida and Y. Nanishi, "Preparation and properties of a cylindrical immobilized lipid-coated lipase", *化学工学シンポジウムシリーズ*, **70**, 39-42 (1999).

【第2章】 脂質被覆法による界面活性剤－リパーゼ複合体調製の定量化

2. 1 緒言

脂質被覆法 (lipid-coated method) は 1988 年に岡畑ら¹⁾によって開発された酵素の有機溶媒可溶化法の一つで、酵素の水溶液と疎水性界面活性剤の水分散液を 4℃で混合し、長時間の熟成後、析出した沈殿を遠心分離で集め、凍結乾燥して粉末状の界面活性剤－酵素複合体を得る簡便な方法である²⁾。

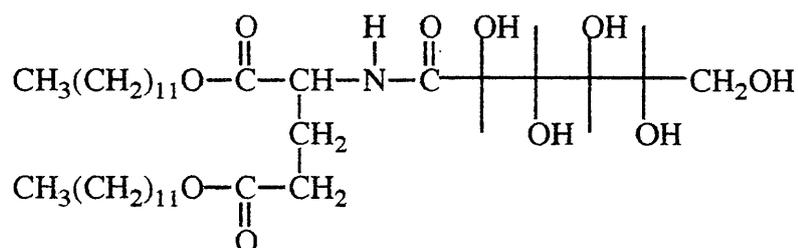
今まで、この脂質被覆法によって有機溶媒可溶化されている酵素と疎水性界面活性剤との組み合わせは、*Rizopus delemere* リパーゼ－ジドデシルグルコシル L-グルタメート (2C₁₂GE)^{1,2)}、グルコースオキシダーゼ－グリセロール α, α' -ジヘプタデシルエーテル³⁾、*Pseudomonas fragi*22 リパーゼ－2C₁₂GE¹⁾、*Pseudomonas cepacia* リパーゼ－ジオレイルグルコシル L-グルタメート (2C₁₈ Δ^9 GE)^{4,5)}、*Mucor javanicus* リパーゼ－2C₁₈ Δ^9 GE⁵⁾、*Candida rugosa* リパーゼ－2C₁₈ Δ^9 GE⁶⁾、および β -D-ガラクトシダーゼ－2C₁₂GE⁷⁾で、ほとんどがリパーゼである。

岡畑ら^{1,2)}は酵素表面の親水性アミノ酸残基と疎水性界面活性剤の親水部の水酸基とが水素結合によって結合して酵素表面を覆い、疎水鎖が外側へ向いた構造をとるため (スキーム 1.2)、酵素が有機溶媒に溶解するという機構を提出している。もしそうであれば、酵素は一般に水溶液では疎水部を内側に、親水部を外側にして溶解しているので、すべての酵素が容易に界面活性剤と結合して有機溶媒可溶化されることになる。しかし現実には、リパーゼのような疎水性基質の反応を触媒する酵素に対してのみ、この脂質被覆法が用いられているようで、また、リパーゼでも起源、したがって、種類によって被覆されたり、しなかったりすることから²⁾、酵素の脂質被覆機構についてのより詳細な知見が必要と考えられる。

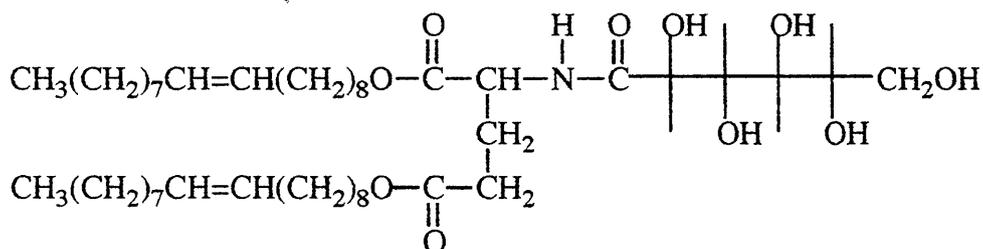
一方、界面活性剤－リパーゼ複合体の調製条件に関しては岡畑ら²⁾および後藤ら⁶⁾がそれぞれ *Rhizopus delemere* リパーゼ－2C₁₂GE と *Pseudomonas cepacia* リパーゼ－2C₁₈ Δ^9 GE の系について、界面活性剤/リパーゼ混合比の得られた界面活性剤－リパーゼ複合体の酵素活性に対する影響から、両者とも重量比 1

: 1 の混合比がよいとしていることと、両者とも界面活性剤-リパーゼ複合体にも粉末酵素法でみられる「pH 履歴現象」⁸⁾が認められ、酵素の水溶液での至適 pH で脂質被覆するのがよいことを明らかにしている以外、知見は少ない。

そこで、疎水性界面活性剤として $2C_{18} \Delta^9GE$ を用い、脂質被覆法による界面活性剤-リパーゼ複合体の調製の定量化を検討した。また比較のため、非酵素タンパク質の牛血清アルブミンおよび人血清 γ -グロブリンの脂質被覆も行った。



$2C_{12}GE$



$2C_{18} \Delta^9GE$

Scheme 2.1 Molecular structure of the synthetic detergents, didodecylglucosyl L-glutamate, diolelylglucosyl L-glutamate

2. 2 実験

2. 2. 1 酵素および非酵素タンパク質

実験に使用したリパーゼ類及び非酵素タンパク質の略称、起源及び分子量を表 2.1 にまとめた。

リパーゼ類は豚膵臓リパーゼ (PPL) に SIGMA 社の typeII の製品を使用した以外はすべて天野製薬 (株) から提供されたものを使用した。牛血清アルブミン (BSA) は伊藤ハム (株) 組織培養試薬を、 γ -グロブリン (γ -G) には和光純薬工業 (株) 生化学試薬を使用した。

Table 2.1 Abbreviations and molecular weights of proteins studied

Protein	Origin	Abbreviation	Molecular weight
Lipase	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Lipase P	31,000
Lipase	<i>Candida rugosa</i>	Lipase C	64,600
Lipase	<i>Aspergillus niger</i>	Lipase A	35,000
Lipase	<i>Rhizopus</i> sp.	Lipase R _b	39,000
Lipase	<i>Rhizopus</i> sp.	Lipase R _a	40,000
Lipase	Porcine pancreas	PPL	49,000 ^{a)}
Bovine serum albumin	Bovin plasma	BSA	67,000
γ -Globulin	Human serum	γ -G	150,000

a) The molecular weights of co-lipase is not taken into account.⁹⁾

2. 2. 2 疎水性界面活性剤

ジオレイルグルコシル L-グルタメート (2C₁₈ Δ °GE) は後藤の文献⁹⁾にしたがって、次のように合成した。

(1) L-グルタミン酸ジオレイルエステル塩酸塩の合成

L-グルタミン酸 15g (102mmol)、オレイルアルコール (和光純薬工業 (株) 化学用試薬) 71ml (223mmol)、乾燥 p-トルエンスルホン酸 30g (158mmol) を 500ml ナス型フラスコに入れ、脱水トルエン 300ml を加える Dean-Stark トラップを付したジムロート冷却管を取り付け、反応の進行とともに生成する水を共沸除去しながら、6 時間加熱還流した。さらに、トラップに滞留あるいは除去水に付着して減少した分のトルエン (約 50ml) を追加し、さらに 4 ~ 5 時間加熱還流した。反応液を室温まで放冷した後、トルエンを減圧留去し、残渣をジエチルエーテル 250ml に溶解して分液ロートに移し、炭酸ナトリウム 10g (94.3mmol) を水 200ml に溶解した液で振とうした。水相を除去した後、エーテル相を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、エーテルの大部分を常圧留去し、さらに減圧留去した。残渣をアセトン 250ml に溶解し、濃塩酸 10ml (120mmol) を少しずつ添加して、冷凍庫で一晩冷却した。上澄液を除去し、沈殿にアセトン 50ml を加えて湯浴に浸し、加熱溶解し、再び冷凍庫で冷却した。このデカンテーションを 3 回繰り返した後、L-グルタミン酸ジオレイルエステル塩酸塩の半固体を吸引ろ過して、得られた半固体の重量を測定した (この重量を Ag とする)。

(2) L-グルタミン酸ジオレイルエステルの合成

この半固体 (Ag) を分液ロート中でジエチルエーテル (Eml) に溶解させ、炭酸ナトリウム (Sg) を水 (Wml) に溶解した溶液と振とうした。ここで、E、S、W の値は A の値によってそれぞれ、式 2.1、式 2.2、式 2.3 から求めた。

$$E(\text{ml}) = S(\text{g}) \times 20 \quad (2.1)$$

$$S(g) = \frac{A(g)}{683.5} \times 106 \times 1.2 \quad (2.2)$$

$$W(ml) = S(g) \times 16 \quad (2.3)$$

エーテル相をとり、無水硫酸マグネシウムで脱水し、エーテルを常圧及び減圧留去して遊離アミンの残査を得た。脱水を完全にするため無水エタノール (60ml) を加えては、エタノールを減圧留去する操作を2回繰り返した。

(3) ジオレイルグルコシル L-グルタメートの合成

L-グルタミン酸ジオレイルエステルとグルコノ- δ -ラクトン (Gg) を脱水エタノール (Etml) 中で、3時間加熱還流した。G 及び Et はそれぞれ式 2.4、式 2.5 から求めた。

$$G(g) = \frac{0.15}{0.11} \times A \times \frac{178.14}{685.3} = 0.355A \quad (2.4)$$

$$Et(ml) = \frac{A}{685.3} \times \frac{700}{0.11} = 9.31A \quad (2.5)$$

大部分のエタノールを常圧蒸留した後、減圧留去した残査をアセトン (200ml) から再結晶した。母液を 200ml ナス型フラスコに入れ、常圧蒸留で 100ml に濃縮して熱ろ過した。母液を氷冷し、室温まで戻してから析出した結晶をろ取した。この結晶をアセトン (40ml) で再結晶した。母液を 20ml にまで濃縮した後、冷却により析出した結晶をろ取した。最後にアセトンから再結晶した。精製品は収量 2.0g (収率 2.4%)、m.p.76-78 °C (文献値¹⁰⁾76-78 °C) であった。生成物の同定は元素分析、IR 分析および NMR 分析により行った。

それらの結果を表 2.2 および表 2.3 にまとめた。

Table 2.2 Elementary Analysis of Dioleoyl glucosyl L-glutamate

Formula	Found(Calcd) [%]			
		C	H	N
C ₄₇ H ₈₇ NO ₁₀	Found	10.04	67.97	1.71
	Calcd	10.61	68.33	1.70

Table 2.3 Spectral Data of Dioleoyl glucosyl L-glutamate

IR(KBr)[cm⁻¹]: 3350(-OH), 1720(-C=O), 1650(-CONH-), 1080, 1040(-O-).

¹H-NMR(CDCl₃, TMS)[ppm], J[Hz]: 0.86(6H, t, J=6.10, 2×CH₃-),

1.30(44H, d, 2×CH₃(CH₂)₅CH₂CH₂CH₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₂),

1.65(4H, m, 2×CH₃(CH₂)₅CH₂-), 2.02(4H, d, J=5.94, -CH₂CH=CHCH₂-),

2.15-2.46(4H, m, -NHCHCH₂CH₂-), 4.04(4H, sextet, J=6.85, 2×-CH₂OCO-),

4.56(1H, dd, J=5.28, -NHCH-), 5.33(4H, t, J=9.57, 2×-CH=CH-),

7.63(1H, t, -NH-).

¹³C-NMR(CDCl₃, TMS)[ppm]: 14.12(2×CH₃-), 22.70-32.63

(2×CH₃(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇-, -NHCHCH₂CH₂-), 51.73(-NHCH-), 65.12,

66.25(2×-CH₂OCO-), 129.76, 129.85, 129.92, 129.97(2×-CH=CH-),

172.18, 172.92(2×CH₂OCO-), 170.03(-NHCO-).

2. 2. 3 その他の試薬

Commassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250)、(±)6-メチル-5-ヘプテン-2-オール ((±)スルカトール) および酢酸イソプロペニルはそれぞれ Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland)、Sigma-Aldrich Japan K.K. (Tokyo)、東京化成工業 (株) の試薬を用いた。その他の有機試薬および無機試薬は高純度の市販試薬をそのまま使用した。

2. 2. 4 リパーゼ類、BSA および γ -G の脂質被覆操作

典型的な脂質被覆操作を以下に示す。

タンパク質濃度が 1.625g/l になるように、タンパク質をリン酸緩衝液 (0.1M, pH 7.0) に溶解した。その 10ml の溶液をとり、ミリポアフィルター (孔径 0.45 μ l) でろ過した (ミリポアフィルターの中には材質によって、タンパク質吸着性のものがあり (例えば、ポリ塩化ビニル製のミリポア (株) 製 BDWP など)、酢酸セルロース製の FM-45 (富士写真フィルム (株) 製) を用いた)。ろ液の 8ml を磁気攪拌子を入れた 10ml の栓付試験管に入れ、残りの 2ml のろ液はブラッドフォード法による原液のタンパク質濃度測定に供した。

試験管中のタンパク質リン酸緩衝液溶液に所定量の $2C_{18} \Delta^9GE$ を加え、室温 (20 $^{\circ}C$ 恒温室) で 1h 磁気攪拌し、そして、5min 超音波 (20kHz) 照射し、冷蔵庫 (4 $^{\circ}C$) で 3h 静置した。10,000 $\times g$ で 5min 遠心分離した後の上清のタンパク質濃度を再びブラッドフォード法で定量した。

なお、この操作で得られる $2C_{18} \Delta^9GE$ -タンパク質複合体の固体沈殿は上清を除去して、恒量になるまで減圧乾燥したのち定量し、反応に供した。

2. 2. 5 タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度はブラッドフォード法 (Bradford method)¹¹⁾により定量した。

(1) CBB 溶液の調製

CBB G-250 100mg を 95%エタノール 50ml に溶解し、85%(w/v)リン酸 100ml を加え、蒸留水で 1l にした。この溶液をミリポアフィルターでろ過して用いた。

(2) タンパク質濃度の測定

CBB 溶液 3ml に室温でタンパク質リン酸緩衝液水溶液を所定量 (20 ~ 800 μ l) 加え、2min 後に島津分光光度計 UV-1200 を用い、595nm で分光光度定量した。なお、濃度換算には実験に用いたタンパク質そのもので作成した検量線を用いた。

2. 2. 6 タンパク質の脂質被覆率 (coverage) の測定

タンパク質の脂質被覆率 (coverage) は界面活性剤 (脂質) と複合化し、疎水化され水不溶性になったタンパク質の全タンパク質量に対する比と定義し、solution depletion 法、すなわち、脂質と複合化させる前後のタンパク質溶液の濃度差から求めた。

$$\text{タンパク質の脂質被覆率} = \frac{(\text{タンパク質原液濃度}) - (\text{残存タンパク質濃度})}{(\text{タンパク質原液濃度})} \quad (2.6)$$

また、 $2C_{18} \Delta^9GE$ - リパーゼ P 複合体の一つの試料については元素分析法 ((株) 柳本製作所 MT-5 元素分析計) によりその組成を定量した。

2. 2. 7 酵素活性の測定

2C₁₈ Δ⁹GE-リパーゼ P 複合体の酵素比活性をジイソプロピルエーテル中、30 °Cでのラセミスルカトールと酢酸イソプロペニルのトランスエステル化反応の初速度を測定して求めた¹²⁾。

ラセミスルカトール 304 μl (2mmol) と酢酸イソプロペニル 217 μl (2mmol) をジイソプロピルエーテル 4ml に溶解させ、所定量の 2C₁₈ Δ⁹GE-リパーゼ P 複合体を添加して反応を開始し、磁気攪拌下に、30 °Cで均一反応を行った。反応の進行は所定時間毎に反応液を 0.1 ~ 0.2 μl サンプルングし、直接ガスクロマトグラフ分析することにより追跡した。ガスクロマトグラフ分析条件は表 2.4 にまとめた。

Table 2.4 Analytical conditions for GC

Chiral capillary column	SUPELCO β-DEX120, 60m
Detector	FID
Carrier gas	N ₂
Inj. temperature	150 °C
Col. temperature	100 °C

転化率は(R)-(-)体について求め、1h、1g の 2C₁₈ Δ⁹GE-リパーゼ P 複合体あたり生成した(R)-(-)-アセトキシスルカトールの mmol 数で酵素比活性を表した。

また、(R)-エステルに対するエナンチオマー過剰率 e.e._R はガスクロマトグラムから転化率 20%付近でのスルカトールおよびアセトキシスルカトールのエナンチオマー純度 (e.p.) を測定して算出した。

2. 3 実験結果および考察

2. 3. 1 熟成時間

本脂質被覆は脂質と酵素との間の水素結合を介した複合化で平衡に達するまでには、長時間を要するものと考えられていた。したがって、岡畑らは両者を混合後の熟成時間を 24h¹⁾ および 20h²⁾、そして、後藤らも 24h^{4,5)} としている。まず、リパーゼ P について熟成時間の被覆率におよぼす影響を調べた。

リパーゼ P 緩衝液溶液 (1.625g/l) 8ml に 2C₁₈ Δ⁹GE を 20mg 添加し、1h 攪拌後、熟成時間をそれぞれ 0、3、6、12、24h としたときの脂質被覆率を測定した。

実験結果を表 2.5 にまとめた。

Table 2.5 Effect of aging time on complexation between 2C₁₈ Δ⁹GE and lipase P^{a)}

Aging time [h]	0	3	6	12	24
Coverage [%]	53.9	52.3	53.3	52.4	52.4

a) Coating conditions: 2C₁₈ Δ⁹GE, 20 mg; lipase P, 13 mg; aqueous phosphate buffer solution (pH 7.0), 8 ml.

その結果、複合化は 1h の混合攪拌中にも終了するほど迅速なものであることが分かったが、本研究での今後の熟成時間は念のため、3h にすることにした。

2. 3. 2 被覆温度

従来の脂質被覆操作は、温度による酵素の失活を考慮して4℃で行われているが^{1,2,4)}、被覆率の温度依存性についての知見はないので、種々の温度のリパーゼP緩衝液溶液(1.625g/l)8mlに2C₁₈Δ⁹GE 20mgを添加し、3hの熟成後の被覆率を測定して被覆率への被覆温度の影響を調べた。

実験結果を表2.6にまとめた。

Table 2.6 Effect of temperature on complexation between 2C₁₈Δ⁹GE and lipase P^{a)}

Temperature [°C] ^{b)}	2	5	10	15	18	20	30
Coverage [%]	53.1	52.2	57.3	52.8	54.3	52.3	38.6

a) Coating conditions: 2C₁₈Δ⁹GE, 20 mg; lipase P, 13 mg; aqueous phosphate buffer solution (pH 7.0), 8 ml.

b) All operations of the mixing procedure prior to aging were performed at this temperature.

この表の結果から、10℃を超えると被覆率の低下が徐々にみられ、30℃では著しいが、20℃までは被覆率に大差はみられないので、実用性を考慮して被覆温度は20℃で以後の実験を行うことにした。

2. 3. 3 種々のタンパク質の $2C_{18} \Delta^9GE$ による被覆挙動

これまでの予備的実験で最適化した被覆条件下で、各種のタンパク質を種々の混合モル比で $2C_{18} \Delta^9GE$ で被覆し、それらの脂質被覆率を測定して、被覆挙動を比較した。

実験結果を図 2.1 に示した。

図 2.1 の結果から、タンパク質によって被覆率にかなり差異があり、また、タンパク質に対して脂質量を増加させていくと、それに比例して被覆率は増加するが、飽和値があることが分かった。

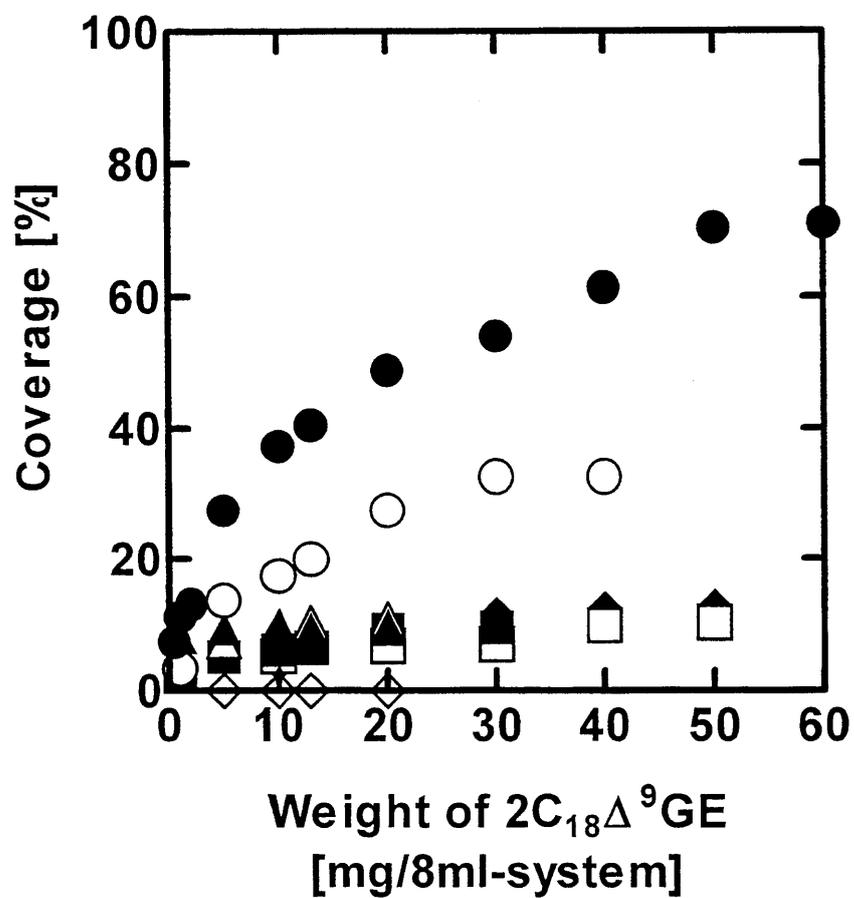


Figure 2.1 Profile of percentage of protein coated with lipid as a function of the amount of $2C_{18}\Delta^9GE$ applied to the system and of the total amount of protein added to the system (13 mg). Plots indicate experimental data for lipase P (●), lipase C (○), lipase A (▲), lipase R_a (△), lipase R_b (■), PPL (□), γ -G (◆) and BSA (◇).

2. 3. 4 複合化等温式

2C₁₈ Δ °GE は水不溶性で、脂質を吸着剤、タンパク質を吸着質とみなして、先の脂質被覆実験のデータを Langmuir 型の吸着等温式 2.7 で整理した。

$$q = \frac{[\text{Pro}]_b}{[\text{L}]_t} = \frac{nK[\text{Pro}]_f}{1 + K[\text{Pro}]_f} \quad (2.7)$$

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{nK[\text{Pro}]_f} + \frac{1}{n} \quad (2.8)$$

ここで、 q : 脂質一分子あたりの結合タンパク質のモル比[-]、 n : タンパク質一分子中の結合サイトの数[-]、 K : 複合化定数[M⁻¹; l/mol]、 $[\text{Pro}]_b$: 脂質と結合したタンパク質の濃度[M; mol/l]、 $[\text{Pro}]_f$: 脂質と結合していない遊離タンパク質の濃度[M; mol/l]、 $[\text{L}]_t$: 脂質濃度[M; mol/l]、である。

式 2.7 を式 2.8 の線形式に変形し、先の被覆実験のデータから、 q^{-1} vs. $[\text{Pro}]_f^{-1}$ をプロットして直線回帰したところ、相関係数 R で示すように直線性は良好であったので、各パラメータ値および飽和被覆率、脂質飽和結合モル数を求めることができた。

それらの値を表 2.7 にまとめた。

また、図 2.2 に各タンパク質に対する複合化等温式を示した。

Table 2.7 The constants of Langmuir equation, maximum coverage, saturating number of the lipid molecules, and multiple correlation coefficients (R) derived from a linear regression analysis

Protein	n	K	Maximim coverage	Saturaing number of 2C ₁₈ Δ ⁹ GE molecules	R
	[×10 ³]	[M ⁻¹ ×10 ³]	[%]		
Lipase P	38.4	8.95	71.1	240	0.965
Lipase C	22.9	4.26	32.6	730	0.998
Lipase A	8.58	5.31	10.4	940	0.993
Lipase R _a	4.26	34.1	10.6	1030	0.984
PPL	3.80	21.5	10.3	2220	0.982
Lipase R _b	2.28	37.3	9.6	1170	0.971
γ-G	0.784	8.34	12.9	5420	0.972
BSA	0	—	0	0	—

The constants were derived from linear regression fits of Eq.(2.8) to the lipid-coating data in Fig. 2.2.

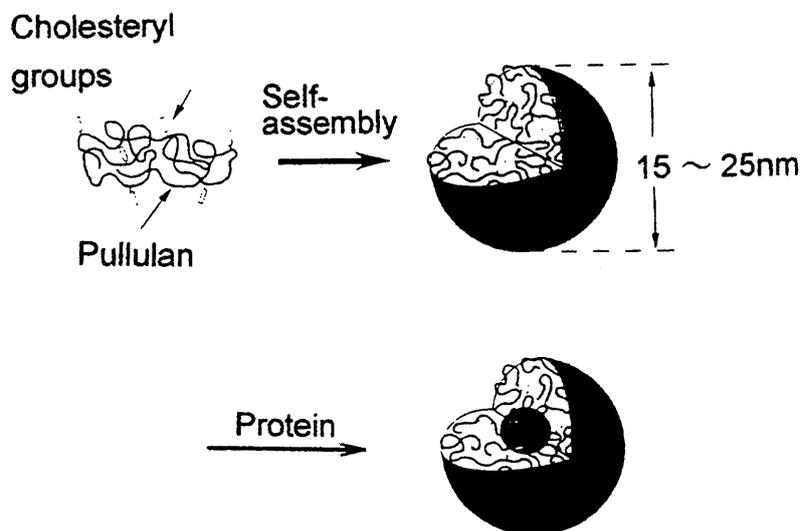
したがって、式 2.7 と表 2.7 の諸パラメーター値を用いて、被覆条件に対応して得られる 2C₁₈ Δ⁹GE-タンパク質複合体の収量および組成が予測できる。

n はタンパク質一分子中の 2C₁₈ Δ⁹GE に対する吸着サイト数で、大きな n 値を有するタンパク質ほど脂質に対する親和性が大きく、したがって、被覆が容易で、飽和被覆率も大きくなる。

リパーゼ類 (n=2.28 ~ 38.4) は総じて、BSA (n=0) や γ-G (n=0.784) のような親水性非酵素タンパク質よりも著しく大きな n 値を有し、疎水性物質を基質とする酵素の特性がうかがえる。

秋吉ら¹³⁾は疎水化多糖粒子 (コレステロール結合プルラン: CHP) のタンパク質との複合化について研究し、インシュリン、シトクロム C、α-キモトリプシン、カーボニックアンハイドラーゼ、西洋ワサビパーオキシダーゼおよび BSA の結合サイト数 (n) と錯化定数 K [M⁻¹] を定量している。本研究で得られた n と K の値は、いずれも秋吉らの値のほぼ 10³ 倍になっている。これらの

差異は CHP とタンパク質の複合体形成はスキーム 2.2 に示すように、CHP ヒドロゲル内部の現象で、タンパク質の全表面が関与しているのに対し、本研究でのタンパク質の $2C_{18} \Delta^{\circ}GE$ との複合体形成はタンパク質表面のごく一部しか関与していないことを考慮すると理解できる。



Scheme 2.2 Schematic representation of complex of protein with self-assembled hydrogel nanoparticle of cholestery-bearing pullulan (CHP).

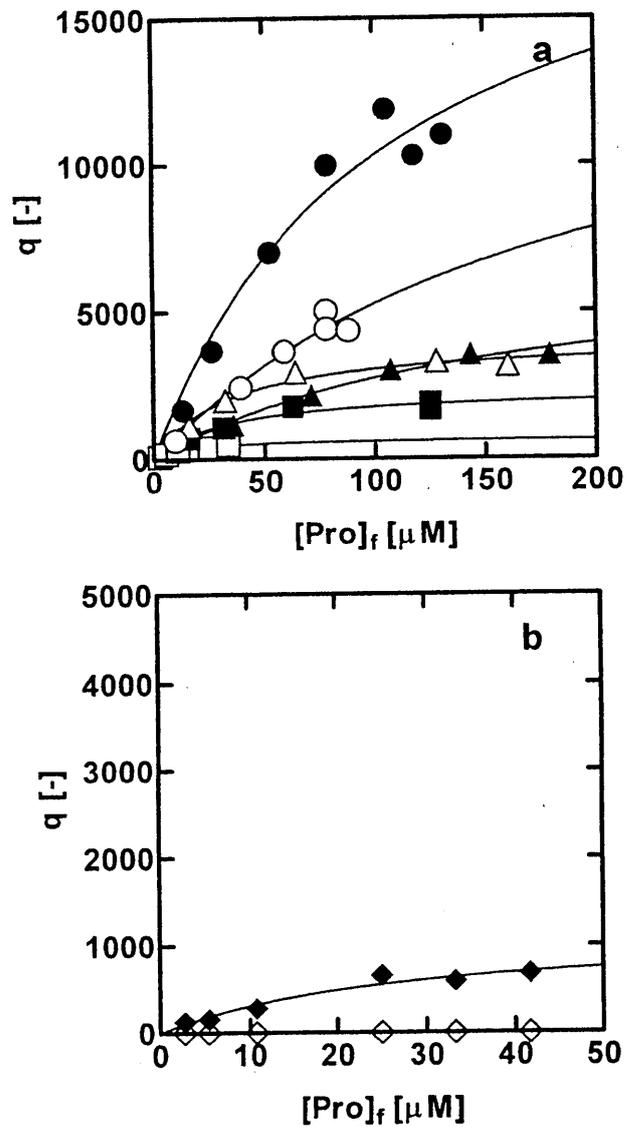


Figure 2.2 Complexation isotherms of protein to $2C_{18} \Delta^9GE$. Lipid-coating conditions: $2C_{18} \Delta^9GE$, 30 mg; protein, 3.3 - 50 mg; aqueous phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7.0), 8 ml. (a) lipase P (●) (3.3 - 30 mg); lipase C (○) (5.1 - 45 mg); lipase A (▲) (10 - 50 mg); lipase R_a (△) (5.0 - 50 mg); lipase R_b (■) (5.0 - 50 mg); PPL (□) (5.0 - 50 mg). (b) γ -G (◆) (3.3 - 50 mg); BSA (◇) (5.0 - 50 mg). The solid curves are calculated on the basis of Eq.(2.7) using the parameters in Table 2.4.

2. 3. 5 脂質被覆の繰り返し

本研究で得た複合化等温線と一般の吸着等温線の類似性を実験的に確認するため、リパーゼ P について $2C_{18} \Delta^9GE$ による被覆操作をさらに 3 回繰り返して行って、 $n=38.4 \times 10^3$ 、 $K=8.95 \times 10^3$ のパラメーター値を代入した式 2.7 に基づいて、各被覆操作毎の被覆率を算出し、実験値と比較した。

1.625g/l リパーゼ P 緩衝液溶液 8ml に $2C_{18} \Delta^9GE$ 30mg を加えて最初の被覆を行った後、 $2C_{18} \Delta^9GE$ - リパーゼ P 複合体を単離した。残存リパーゼ P 緩衝液溶液に、新たに $2C_{18} \Delta^9GE$ を 30mg を加え、再び被覆を行った。このような操作を繰り返した。

実験結果および被覆率の理論計算結果を表 2.8 にまとめた。

Table 2.8 Repetition of a lipid-coating of lipase P^{a)}

Number of complexations	1	2	3	4
Coverage [%]	59.1	24.7 (21.6) ^{b)}	8.62 (7.49) ^{b)}	0 (0) ^{b)}
Integrated coverage [%]	59.1	69.2 (67.9) ^{b)}	71.8 (70.4) ^{b)}	71.8 (70.4) ^{b)}

a) Coating conditions, 1st run: $2C_{18} \Delta^9GE$, 30 mg; lipase P, 13 mg; aqueous phosphate buffer solution (pH 7.0), 8 ml. After measurement of the remaining lipase P content, 30 mg of $2C_{18} \Delta^9GE$ was added to the supernatant from the 1st run and these operations were repeated.

b) The values in parentheses were calculated from Eq.(2.7) based on the constants for lipase P in Table 2.7.

2 回目、3 回目の被覆率には理論値とやや差が大きいが、通算 3 回の積算被覆率は 71.8%で、その理論値は 70.4%でほぼ一致している。4 回目の被覆操作ではもはやリパーゼは $2C_{18} \Delta^9GE$ と複合化しなかった。

ここでの結果は、式 2.7 の複合化等温式の妥当性を示し、脂質とタンパク質の複合化、すなわちタンパク質の脂質被覆は単分子吸着様式で扱えることが分かった。

2. 3. 6 界面活性剤-酵素複合体中の酵素含量と酵素活性

今までの実験結果から、脂質被覆法では酵素に対して脂質量を増加させれば被覆率は増加し、得られる複合体の量も多くなることが分かったが、実用的には用いる脂質の量が最も少なく、酵素比活性を大きくする調製条件を決定する必要がある。

まず、 $2C_{18} \Delta^9GE$ - リパーゼ P 複合体について、種々の酵素含量の $2C_{18} \Delta^9GE$ - リパーゼ P 複合体を調製して、その有機溶媒中での比酵素活性を測定して被覆率の酵素活性へ及ぼす影響を調べた。用いた反応系はジイソプロピルエーテル中、 $30^{\circ}C$ でのラセミスルカトールと酢酸イソプロペニルとのトランスエステル化である。

実験結果を図 2.3 に示した。

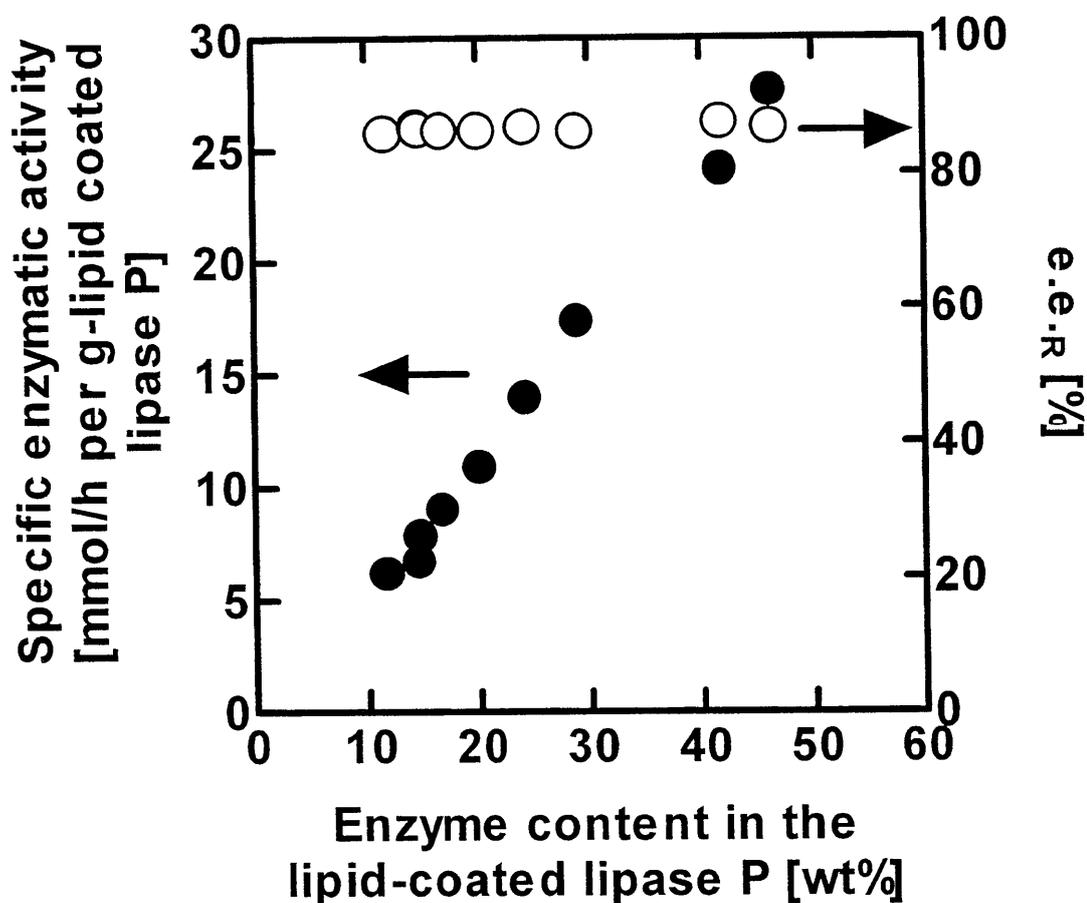


Figure 2.3 Comparison of activity and enantioselectivities of the $2C_{18} \Delta$ $^{\circ}GE$ -coated enzyme of different lipase contents. Reaction conditions: the lipid-coated lipase P, 20 mg; racemic sulcatol, 2 mmol; isopropenyl acetate, 2 mmol; diisopropyl ether, 4 ml; temperature, 30 °C; string speed, 300 rpm: The enantioselectivity was expressed as the enantiomeric excess of the (R)-(-)-product (e.e.R).

界面活性剤－リパーゼ P 複合体基準の酵素比活性は複合体中の酵素含量に比例し、エナンチオ選択性も、どの被覆率のリパーゼ P でも一定であったので、脂質被覆率の酵素活性および酵素の不斉選択性への影響は認められなかった。

したがって、脂質被覆における脂質と酵素の最適混合比は被覆率が小さくて、大きな酵素含量の複合体を生成する重量比であり、各リパーゼについて図 2.4～図 2.9 に示した。

被覆率 vs. $2C_{18} \Delta^9GE$ /リパーゼの重量比曲線とリパーゼ含量 vs. $2C_{18} \Delta^9GE$ /リパーゼの重量比曲線の交点の混合比であると決定できる。

この最適混合比については従来、岡畑らの $2C_{12}GE - Pseudomonas fragi$ リパーゼ系¹⁾および後藤らの $2C_{18} \Delta^9GE -$ リパーゼ P 系⁹⁾、両系において得られた界面活性剤－リパーゼ複合体の酵素活性に基づく重量比 1 が報告されているが、これらの図から、 $2C_{18} \Delta^9GE -$ リパーゼ P 系では本研究では重量比 0.8 付近、リパーゼ C では重量比 0.9、リパーゼ A では重量比 0.4、そして PPL では重量比 1.2 付近が最適であることが分かった。

なお、界面活性剤－酵素複合体中の酵素含量は従来は一般に元素分析から求められているので^{1,2,4)}、本研究で用いている solution depletion 法による組成分析の精度をみるため、一つの $2C_{18} \Delta^9GE -$ リパーゼ複合体の組成を元素分析から求め、比較してみた。

10mg/8ml のリパーゼ P 溶液に 13mg の $2C_{18} \Delta^9GE$ を添加して得た 14.9mg の $2C_{18} \Delta^9GE -$ リパーゼ P 複合体の被覆率は 37.3%で、重量%は 32.7wt%であった。一方、その複合体中の元素分析値 (C: 57.39%, H: 8.80%, N: 2.45%) と $2C_{18} \Delta^9GE$ の元素分析値 (C: 68.36%, H: 10.50%, N: 1.70%) および、リパーゼ P の元素分析値 (C: 35.12%, H: 5.36%, N: 3.96%) からは、リパーゼ P 含量は 33.0wt% と計算され、両者はほぼ一致した。しかし一般に、元素分析の誤差は大きく (0.30%)、特に低酵素含量の界面活性剤－リパーゼ複合体の組成分析に大きな誤差を生じるものと考えられ、本研究で用いた solution depletion 法では広範囲の界面活性剤/リパーゼ混合比で得られる界面活性剤－リパーゼ複合体の組成を精度良く、しかも迅速に測定できる利点があることが分かった。

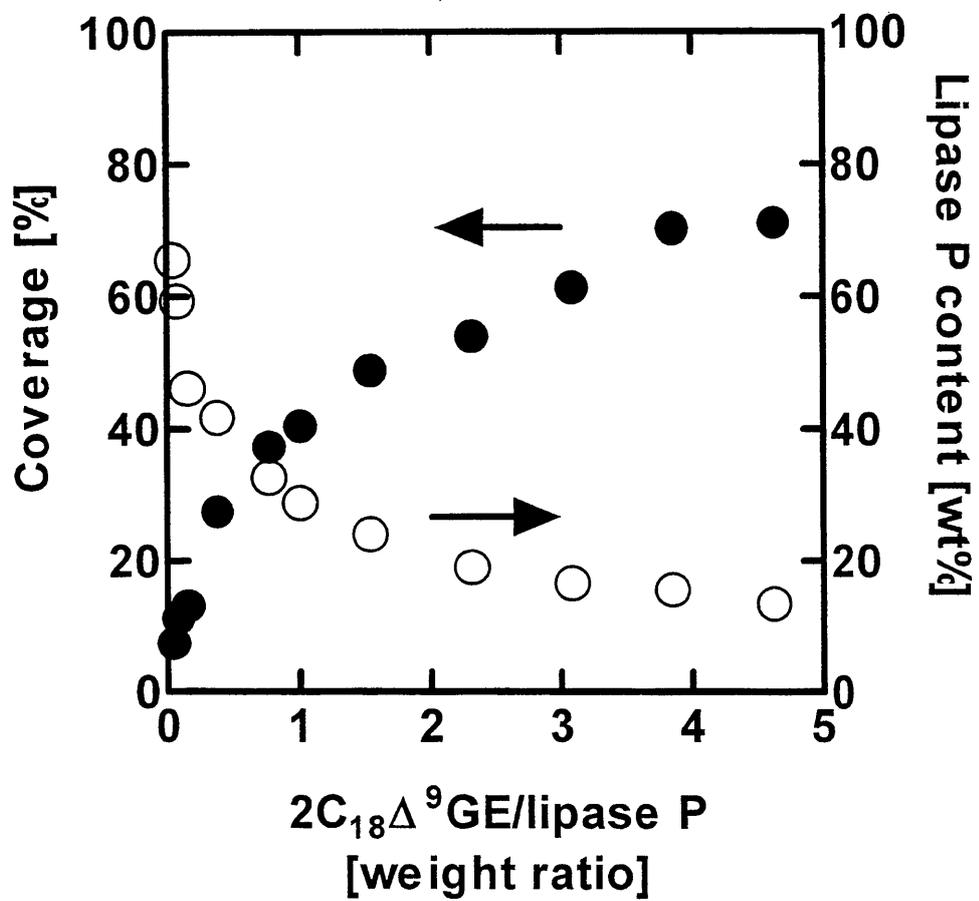


Figure 2.4 Effect of the gravimetric mixing ratio of 2C₁₈ Δ⁹GE to lipase P on the coverage of lipase P (●) and lipase P content (○) in the isolated lipid-coated lipase P. The experimental details are in the text.

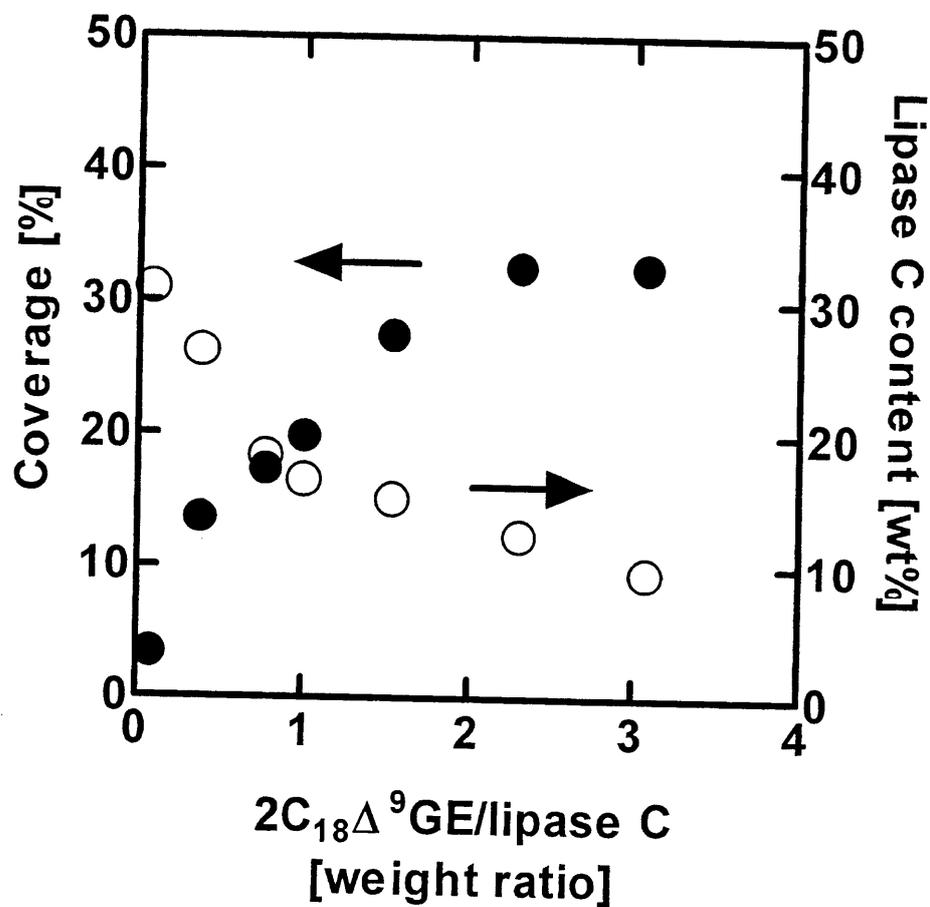


Figure 2.5 Effect of the gravimetric mixing ratio of $2C_{18}\Delta^9GE$ to lipase C on the coverage of lipase C (●) and lipase C content (○) in the isolated lipid-coated lipase C. The experimental details are in the text.

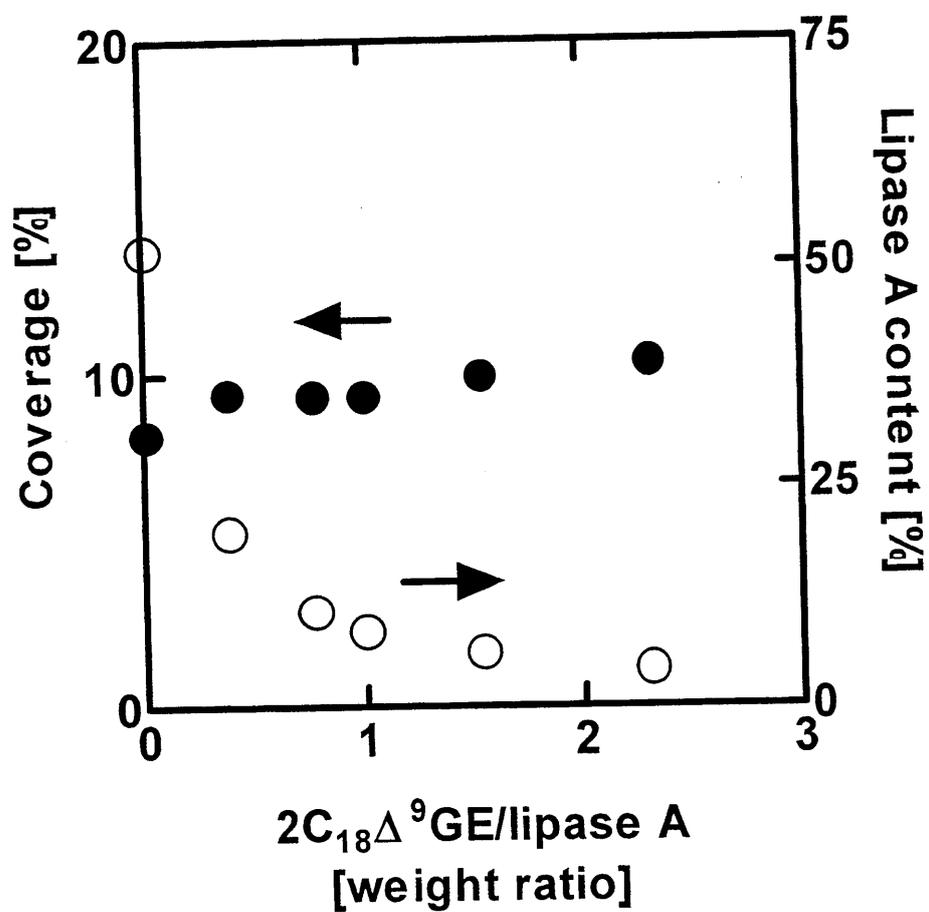


Figure 2.6 Effect of the gravimetric mixing ratio of $2C_{18}\Delta^9GE$ to lipase A on the coverage of lipase A (●) and lipase A content (○) in the isolated lipid-coated lipase A. The experimental details are in the text.

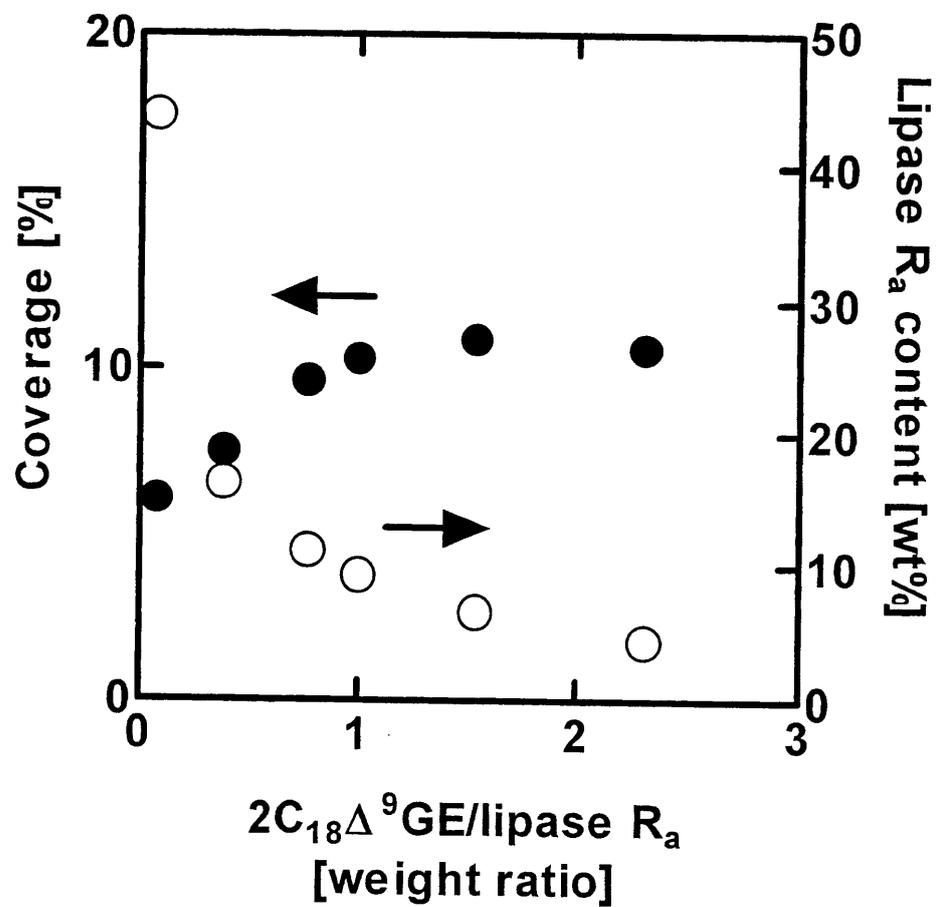


Figure 2.7 Effect of the gravimetric mixing ratio of $2C_{18}\Delta^9GE$ to lipase R_a on the coverage of lipase R_a (●) and lipase R_a content (○) in the isolated lipid-coated lipase R_a . The experimental details are in the text.

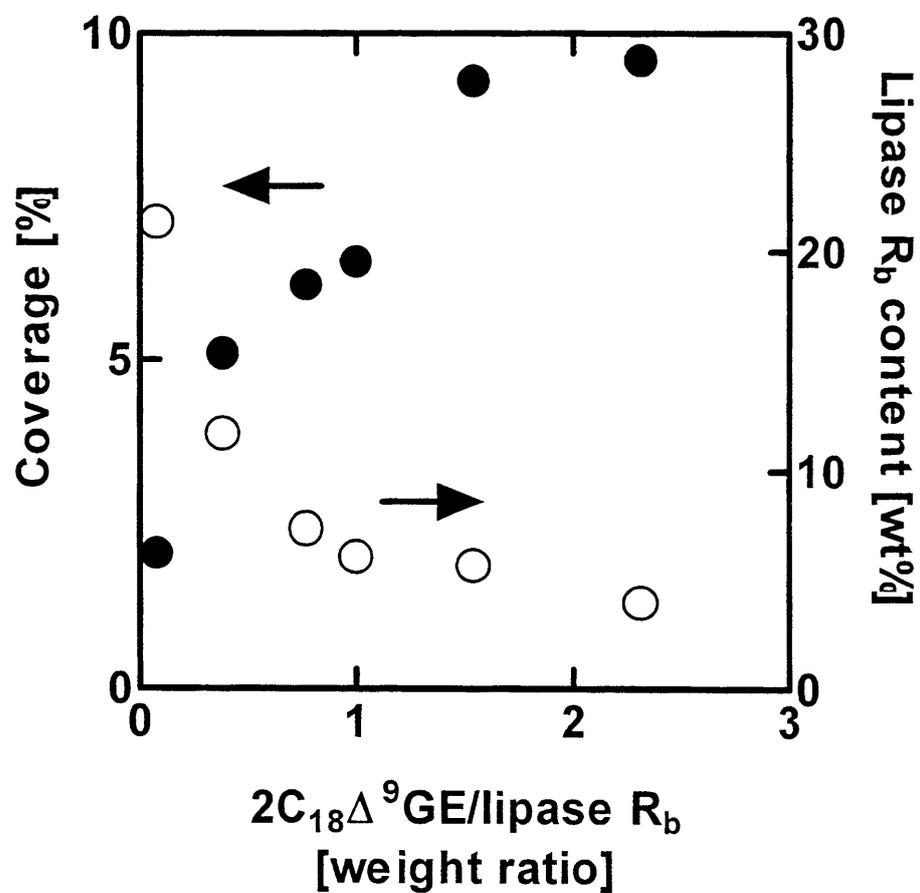


Figure 2.8 Effect of the gravimetric mixing ratio of $2C_{18}\Delta^9GE$ to lipase R_b on the coverage of lipase R_b (●) and lipase R_b content (○) in the isolated lipid-coated lipase R_b . The experimental details are in the text.

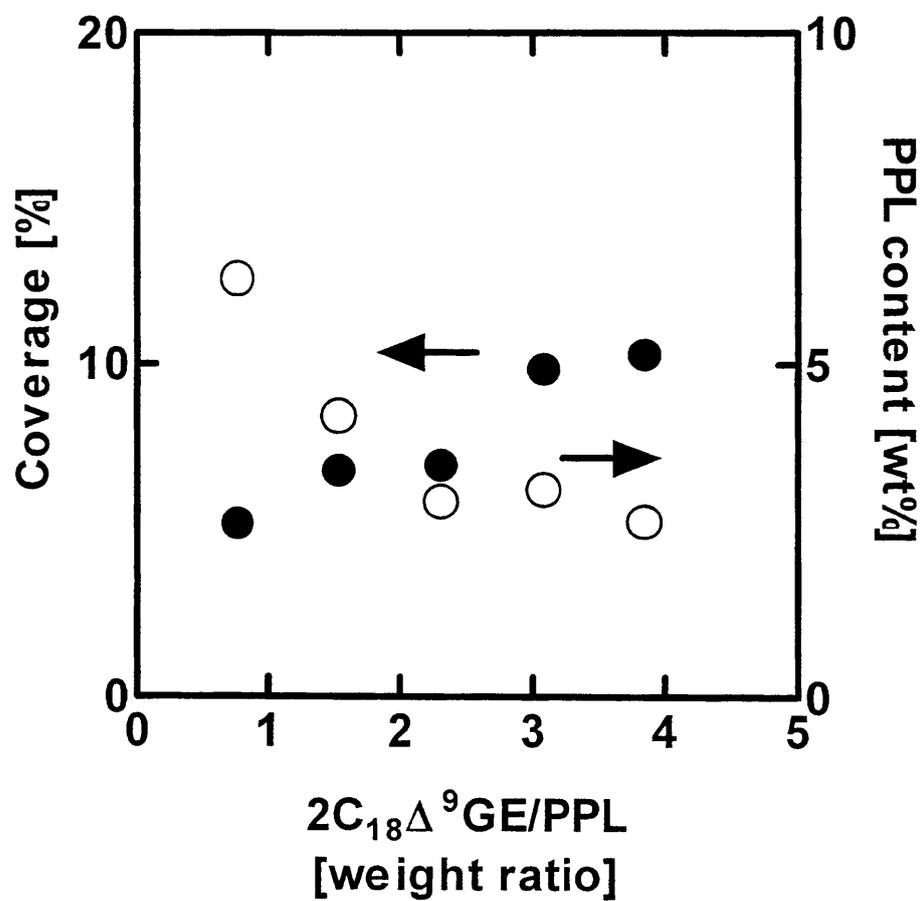


Figure 2.9 Effect of the gravimetric mixing ratio of 2C₁₈ Δ⁹GE to PPL on the coverage of PPL (●) and PPL content (○) in the isolated lipid-coated PPL. The experimental details are in the text.

2. 3. 7 脂質被覆へのタンパク質水溶液の pH の影響

脂質被覆時の酵素水溶液の pH を変化させて、リパーゼ P についての被覆を行い、それぞれの被覆率を比較した。ここで pH3.0 ~ 8.0 (7.0 は除く) は McIlvaine (0.2M リン酸水素二ナトリウム - 0.1M クエン酸)、pH7.0 は 0.1M リン酸緩衝液、pH9.0、10.0 は Menzel の緩衝液 (0.05M 炭酸ナトリウム - 0.1M 炭酸水素ナトリウム) を用いた。

また、各 pH の水溶液から得られた 2C₁₈ Δ⁹GE - リパーゼ P 複合体の有機溶媒中での酵素比活性を測定し、リパーゼ P の大豆油の加水分解反応の酵素活性の pH 依存性ととも、図 2.10 にまとめた。

これらの結果から、被覆率への pH 値の影響は全くないが、有機溶媒中でのリパーゼ P 活性には水溶液中での酵素活性の pH 依存性があることが分かり、脂質被覆においても、酵素が最後に接触した水溶液の状態を記憶している「pH 履歴」現象⁹⁾が存在する。

したがって、高活性の界面活性剤 - 酵素複合体を得るには、その酵素の至適 pH の水溶液で被覆操作を行う必要がある。

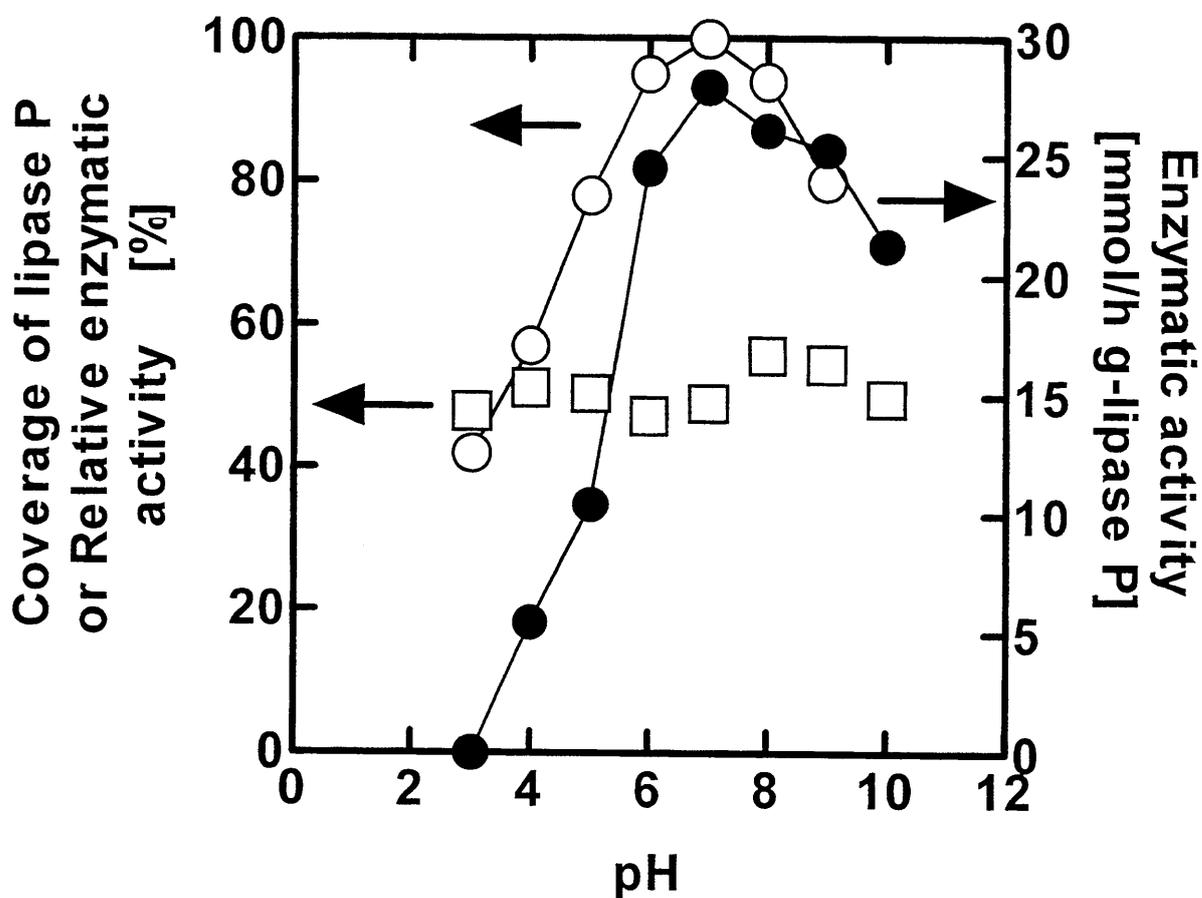


Figure 2.10 Effect of aqueous pH on the coverage (□) and enzymatic activity (●) in the lipid-coating of lipase P with $2C_{18} \Delta^9GE$. Coating conditions: lipase P (13 mg) and $2C_{18} \Delta^9GE$ (20 mg) in aqueous bufer solution at a given pH (8 ml). Enzymatic activities of native lipase P in aqueous phopphate buffer solution were measured for the hydrolysis of soybean oil at 37 °C and expressed as relative activities (○). The isoelectric point of lipase P used was pH 4.46.

2. 4 結言

以上の実験結果から、酵素（リパーゼ類）の $2C_{18} \Delta^9GE$ による脂質被覆についての次のような知見を得ることができた。

- (1) 疎水性の大きい脂質では solution depletion 法で酵素の脂質被覆過程を簡便に解析できる。
- (2) 脂質と酵素の複合化（酵素の脂質被覆）は迅速で、長時間熟成しなくても 1h 内に完結する。被覆温度はなるべく $10^{\circ}C$ 以下の低温が望ましいが、 $20^{\circ}C$ でもよい。
- (3) タンパク質の種類によって、したがって、リパーゼではその起源によって、脂質被覆率に差異があり、BSA は全く脂質被覆できないことが分かった。
- (4) Langmuir 型の吸着等温式に類似した複合化等温式 2.7 で脂質被覆を定量化することができた。結合サイト数 n の大きいタンパク質ほど、脂質に対して親和性が大きく、リパーゼ類では、リパーゼ P > リパーゼ C > リパーゼ A, リパーゼ R_a, PPL, リパーゼ R_b の順に脂質被覆されやすいことが分かった。各タンパク質に対するパラメーター、タンパク質一分子中の結合サイト数 n および複合化定数 K を式 2.7 に代入することにより、各タンパク質の $2C_{18} \Delta^9GE$ による脂質被覆における飽和被覆率、脂質の飽和結合モル数を決定することができた。式 2.7 を用いると、脂質とタンパク質の混合比に対応して得られる脂質被覆タンパク質の組成が推測できる。
- (5) 脂質被覆法においても、界面活性剤-リパーゼ複合体は pH メモリーを有しており、脂質被覆は至適 pH の水溶液で行うと、同じ被覆率でも高活性の界面活性剤-酵素複合体が得られることが分かった。

2. 5 参考文献

- 1) Y. Okahata and K. Ijio, "A lipid-coated lipase as a new catalyst for triglycerides synthesis in organic solvents", *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1392-1394 (1988); Y. Okahata, Y. Fujimoto and K. Ijio, "Lipase-lipid complex as a resolution catalyst of racemic alcohols in organic solvents", *Tetrahedron Lett.*, **29**, 5133-5134 (1988).
- 2) Y. Okahata and K. Ijio, "Preparation of a lipid-coated lipase and catalysis of glyceride ester syntheses in homogeneous organic solvents", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**, 2411-2420 (1992).
- 3) Y. Okahata, T. Tomoya, K. Ijio, and K. Ariga, "Langmuir-Blodgett films of an enzyme-lipid complex for sensor membranes", *Langmuir*, **4**, 1373-1375 (1988).
- 4) M. Goto, H. Kameyama, M. Goto, M. Miyata, and F. Nakashio, "Design of surfactants suitable for surfactant-coated enzymes as catalysts in organic media", *J. Chem. Eng. Japan*, **26**, 109-111 (1993).
- 5) M. Goto, N. Kamiya, M. Miyata and F. Nakashio, "Enzymatic esterification by surfactant-coated lipase in organic media", *Biotechnol. Prog.*, **10**, 263-268 (1994).
- 6) N. Kamiya, M. Goto and F. Nakashio, "Surfactant-coated lipase suitable for the enzymatic resolution of menthol as a biocatalyst in organic media", *Biotechnol. Prog.*, **11**, 270-275 (1995).
- 7) Y. Okahata and T. Mori, "Effective transgalactosylation catalyzed by a lipid-coated β -D-galactosidase in organic solvent", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2861-2866 (1966).
- 8) A. Zaks and A.M. Klibanov, "Enzyme catalyzed processes in organic solvents", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3192-3194 (1985).
- 9) H. Brokerhoff, "A model of pancreatic lipase and the orientation of enzymes at interfaces", *Chem. Phys. Lipids*, **10**, 215-222 (1973).
- 10) 後藤雅宏, "乳化型液膜法のための新規界面活性剤の開発に関する基礎的研究", p. 18, 九州大学大学院工学研究科博士論文(1989).

- 11) 福井哲也, 伊藤正樹共著, "馴化学と生物実験ライン 12 タンパク質定量法", p. 63-77, 廣川書店 (1991); M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 12) K. Fukunaga, N. Mimamijima, Y. Sugimura, Z. Zhang and K. Nakao, "Immobilization of organic solvent-soluble lipase in nonaqueous conditions and properties of the immobilized enzymes", *J. Biotechnol.*, **52**, 81-88 (1996).
- 13) K. Akiyoshi, T. Nishikawa, S. Kobayashi and J. Sunamoto, "Self-assembled hydrogel nanoparticle of hydrophobized polysaccharide: complexation and stabilization of soluble proteins", in M. Yalpani ed., *Biomedical Functions and Biotechnology of Natural and Artificial Polymers*, ATL Press, p. 115-125 (1996).

【第3章】 水性二相分配法によるリパーゼ類の表面疎水性の測定

3. 1 緒言

前章でタンパク質を脂質被覆する場合、タンパク質によって被覆されやすさが異なり、どの酵素に対しても脂質被覆法は適用できるものではないことが示唆された。そこで本章では、表面疎水性の大きい酵素タンパク質ほど脂質によって被覆されやすいのではないかとの類推をもとに、久保井ら^{1~4)}の考案した水性二相分配によるタンパク質の表面および局所疎水性の測定法を用いて、前章で使用したリパーゼ類と、比較のための非酵素タンパク質のBSAおよびγ-Gの表面疎水性（HFS: Hydrophobic factor of solutes; Surface net hydrophobicity）および局所疎水性（LH: Local hydrophobicity）を測定して、タンパク質の表面疎水性を評価して、前章の脂質被覆実験結果との関連性を検討する。

3. 2 実験

3. 2. 1 試料タンパク質

前章で用いたものと同じリパーゼ類および非酵素タンパク質の BSA、 γ -G を用いた。各タンパク質の略称と等電点を表 3.1 にまとめた。

Table 3.1 Abbreviations and isoelectric points of proteins studied

Protein	Abbreviation	Isoelectric point
Lipase	Lipase P	4.46
Lipase	Lipase C	4.30
Lipase	Lipase A	4.10
Lipase	Lipase R _a	7.10
Lipase	Lipase R _b	7.20
Lipase	PPL	5.00
Bovine serum albumin	BSA	4.90
γ -Globulin	γ -G	6.00

3. 2. 2 試薬類

水性二相系を構成する水溶性ポリマーとして用いたポリエチレングリコール (PEG) はそれぞれ PEG1540、4000、6000 であり、平均分子量 (Da) はそれぞれ 1500、3000、7500 で和光純薬工業 (株) 製一級試薬である。もう一つの水溶性ポリマーはデキストラン (Dex) で分子量分布 100k-200kDa で和光純薬工業 (株) 製である。局所疎水性の測定に用いる非イオン性界面活性剤 Triton X-405 (約 40 のエチレンオキシド繰り返し単位を有する polyoxyethylene isoctylphenyl ether) は Sigma-Aldrich Japan K.K. 製、タンパク質濃度測定に用いる Commassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250) およびマイクロ TP テストワコー (ピロガロールレッド法に基づくタンパク質濃度定量キット) はそれぞれ Fluka Chemie AG および和光純薬工業 (株) 製を用いた。その他の有機試薬および無機試薬は高純度の市販品をそのまま使用した。

3. 2. 3 水性二相分配法によるタンパク質の疎水性の測定

(1) 測定原理

水性二相系でのタンパク質の等電点における分配係数 (K_{pr}) は静電効果を無視することができ、二相分配系の疎水性とタンパク質の表面疎水性の積として次式で相関される¹⁾。

$$\ln K_{pr} = HFS \times HF \quad (3.1)$$

ここで、 K_{pr} : 分配係数、HFS: タンパク質の表面疎水性 (Hydrophobic factor of solutes)、HF: 二相分配系の疎水性 (Hydrophobic factor)、である。したがって、分配系の HF が既知の二相系 (ここでは PEG/Dex 系) にタンパク質を分配させ、その K_{pr} の変化を調べることによってタンパク質の表面疎水性 (HFS) を評価することができる。

また、タンパク質の局所疎水性 (LH) は PEG/Dex 系に Triton X-405 を添加すると、Triton X-405 は PEG 相に偏って分配されるので、Triton と疎水結合するタンパク質は PEG 相に偏って分配されるようになる⁴⁾。したがって、Triton 濃度に対するタンパク質の K_{pr} の変化の大きさから、次式にしたがって LH を評価することができる (Triton 添加法)³⁾。

$$\Delta \ln K_{pr, \text{Triton}} = \ln (K_{pr, \text{Triton}} / K_{pr, 0}) \quad (3.2)$$

ここで、 $K_{pr, \text{Triton}}$: Triton X-405 の存在下でのタンパク質の分配係数、 $K_{pr, 0}$: Triton X-405 の不在下でのタンパク質の分配係数、である。

(2) タンパク質の表面疎水性 (HFS) の測定

30 % PEG 溶液と 30 % Dex 溶液を調製し、それらの pH を水酸化ナトリウム水溶液あるいは塩酸の添加によって等電点に調整した。試験管にそれぞれ 1.5g ずつ加えた後、全体で 5g になるようにタンパク質濃厚水溶液と水を加えた。ボルテックスミキサーで 5min 混合後、5000rpm で 20min 遠心分離 (久保田製作所 (株) インバーターマイクロ遠心機 1130 型) し、二相に分離した。上 (PEG)

相と下 (Dex) 相の体積を測定後、下相のタンパク質濃度を 50 ~ 60 μ l のサンプリング溶液で、リパーゼ P についてはブラッドフォード法、その他のリパーゼ類およびタンパク質についてはピロガロールレッド法により測定し、上相のリパーゼ濃度は物質収支から求めた。K_{pr} は次式から算出した。

$$K_{pr} = \frac{\text{(上相リパーゼ濃度)}}{\text{(下相リパーゼ濃度)}} \quad (3.3)$$

PEG/Dex 二相系の HF 値は水溶性ポリマーの組み合わせで変化させ、次の 3 つの疎水性の異なる二相系を用いた。各水性二相系の HF 値は相対疎水性が既知のアミノ酸、ここではグリシン、L-トレオニン、L-メチオニン、L-バリン、L-チロシン、L-フェニルアラニンおよび L-トリプトファン、の分配係数を測定することにより決定した¹⁾。

PEG1540 (10.8%) /Dex100k-200k (9%): 0.0070mol/kJ; PEG4000 (9%) /Dex100k-200k (9%): 0.0126mol/kJ; PEG6000 (9%) /Dex100k-200k (9%); 0.0201mol/kJ.

各タンパク質の HFS 値は式 3.1 に基づいて、HF vs. K_{pr} の点綴の直線の傾きから求めた。

(3) タンパク質の局所疎水性 (LH) の測定 (Triton 添加法)

PEG4000/Dex 二相系に Triton X-405 を 0 ~ 10mmol/kg の濃度で添加し、それぞれの二相系にタンパク質を分配させて、K_{pr} を先の HFS の測定の場合と同様に測定し、式 3.2 から LH の値を求めた。

(4) タンパク質濃度の分析

上述のタンパク質の分配実験 (2)、(3) では下相のタンパク質濃度をピロガロールレッド法²⁾により定量したが、リパーゼ P の場合については、K_{pr} が大きいため下相のタンパク質濃度が小さくて、少量の PEO にも影響されるようになったためか、異常呈色で分析できなかつたため、Kula らの文献⁶⁾に基づいて、次のように PEO の除去を行ってから、ブラッドフォード法⁷⁾によりタンパク質濃度を定量した。

下相 1ml を別の試験管に移し、それに 1,2-ジクロロエタン（和光純薬工業（株）特級試薬）を 3ml 加え、ボルテックス混合を 5min 行った。5000rpm で 5min 遠心分離し、Dex 相と 1,2-ジクロロエタン相を分離した後、Dex 相を取り出して分析に供した。

3. 3 実験結果および考察

3. 3. 1 タンパク質の表面疎水性

種々のリパーゼ、BSA および γ -G の K_{pr} を 3 つの二相系 (1: PEG1540 (10.8wt%)/Dex100k-200k (9wt%); 2: PEG4000 (9wt%)/Dex100k-200k (9wt%); 3: PEG6000 (9wt%)/Dex100k-200k (9wt%)) において測定した。

実験結果を図 3.1 にまとめた。

式 3.1 に基づいて、各直線の傾きから各タンパク質の HFS 値を求め、表 3.2 にまとめた。

Table 3.2 Surface net hydrophobicities (HFS values) of lipases, BSA, γ -G

Protein	HFS [kJ/mol]	pH [-]	HFS as determined by Kuboi et al. (pI) [kJ/mol]
Lipase P	+31.6	4.46	—
Lipase R _a	-21.1	7.10	—
Lipase A	-24.7	4.10	—
Lipase R _b	-28.1	7.20	—
PPL	-82.4	5.00	-67.3(5.0) ^{b)}
Lipase C	-124	4.30	—
γ -G	-184	6.00	—
BSA	-205	4.90	-231(4.9) ^{c)}

a) HFS values were derived from linear regression fits of Eq.(3.1) to the K_{pr} data in Figure 3.1.

b) Taken from Reference 3.

c) Taken from Reference 1.

表 3.2 に示されているように、リパーゼ類と非酵素水溶性タンパク質はかなり異なる表面疎水性を有している。一般に、タンパク質は水溶液中では親水性のアミノ酸残査を表面に、そして疎水性のそれらを内部に位置させることによって安定に存在しており、したがって、大きな分子量の可溶性球状タンパク質

のほとんどは親水性の表面を有していて、HF 値も例えば、 γ -G、 β -ガラクトシダーゼ³⁾、B-ヘモグロビン¹⁾のように、それぞれ、-184、-453、-208kJ/mol のような負の大きな値を有する。しかし、リパーゼ類は油-水界面で疎水性の基質に作用する特殊な酵素で⁸⁾、通常タンパク質と異なり、大きな疎水性を有している。疎水性はその起源によって大きく異なり、ここで調べた6種類のリパーゼでは、リパーゼ P > リパーゼ R_a, リパーゼ A, リパーゼ R_b > PPL > リパーゼ C の順に疎水性の強い表面を有することが分かった。

Pseudomonas cepacia 起源のリパーゼ P は疎水性が最も大きな表面を有するが、Kula ら⁹⁾もリパーゼ P、*Chromobacterium viscosum* 起源のリパーゼ、リゾチーム、*Bacillus licheniformis* 起源のアルカリプロテアーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼの5つのタンパク質の中で最も有効タンパク質疎水性 (log a: effective protein hydrophobicity) が大きいことを報告している。

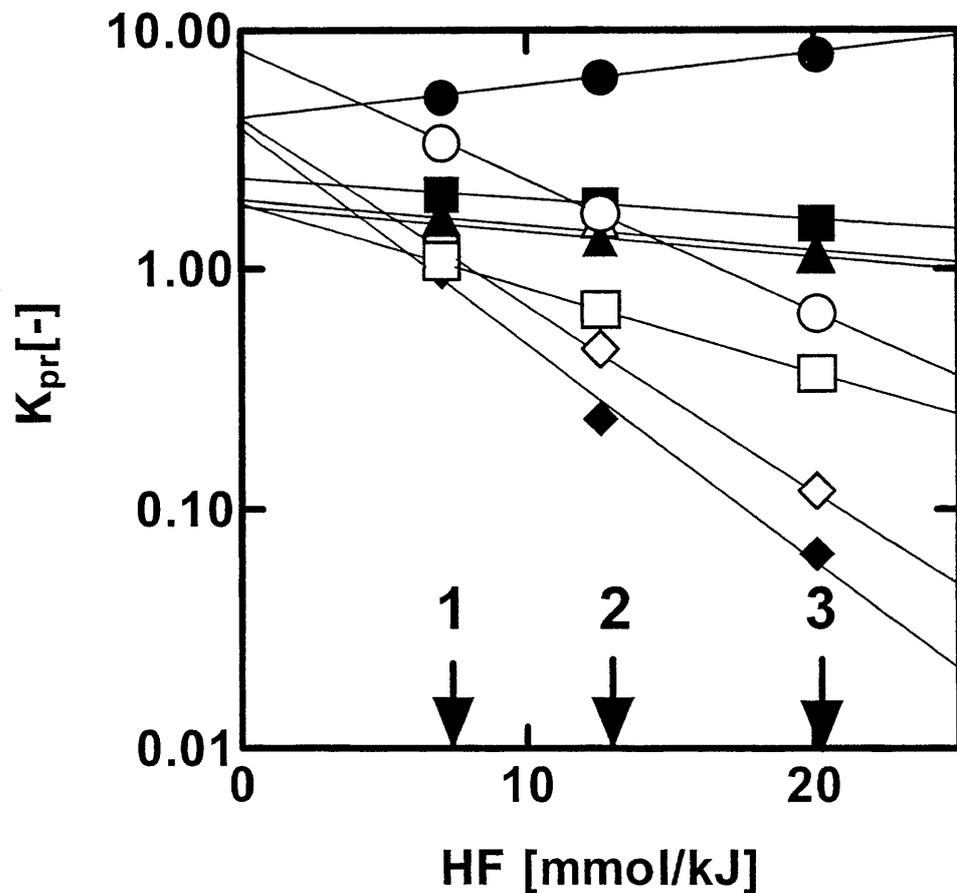


Figure 3.1 Dependence of the partitioning coefficient of proteins (K_{pr}) on the hydrophobic factor (HF) at their pI.

Composition of aqueous two-phase systems: 1, PEG1540 (10.8 wt%) / Dex 100k - 200k (9 wt%); 2, PEG4000 (9 wt%) / Dex 100k - 200k (9 wt%); 3, PEG6000 (9 wt%) / Dex 100k - 200k (9 wt%).

Plots indicate experimental data for lipase P (●, pH = 4.46), lipase C (○, pH = 4.30), lipase A (▲, pH = 4.10), lipase R_a (△, pH = 7.10), lipase R_b (■, pH = 7.20), PPL (□, pH = 5.00), γ -G (◆, pH = 6.00) and BSA (◇, pH = 4.90).

3. 3. 2 タンパク質の局所疎水性 (LH)

種々のリパーゼ、BSA そして γ -G の Triton 添加法³⁾における K_{pr} の変化の測定結果を図 3.2 にまとめた。

これらの結果から、式 3.2 で定義される LH 値 [kJ/mol] はリパーゼ C で 0.50、 γ -G で 0.40、そして BSA で 1.76 で、それ以外のタンパク質では 0 であった。

この結果は本研究で用いた親水性の大きいタンパク質には疎水部が局所的に分布していることを示している。

なお、BSA の LH は久保井らの測定値 1.75¹⁰⁾ ($\Delta \ln K_{BSA} = \ln K_{BSA, \text{with, 1mM, Triton X-405}} - \ln K_{BSA, \text{without Triton X-405}}$)、PEG4000 (9wt%)/Dex100k-200k (9wt%) 二相系 (pH8.0, 10mM TM-緩衝液) とよく一致している。LH 値は BSA が最大であるが、このことは BSA が Triton に対して強い親和性を有する結合サイトを有することを意味し、事実、Makino ら¹¹⁾は BSA が Triton X-100 に対する強い結合サイトを 4 個有していることを報告している。

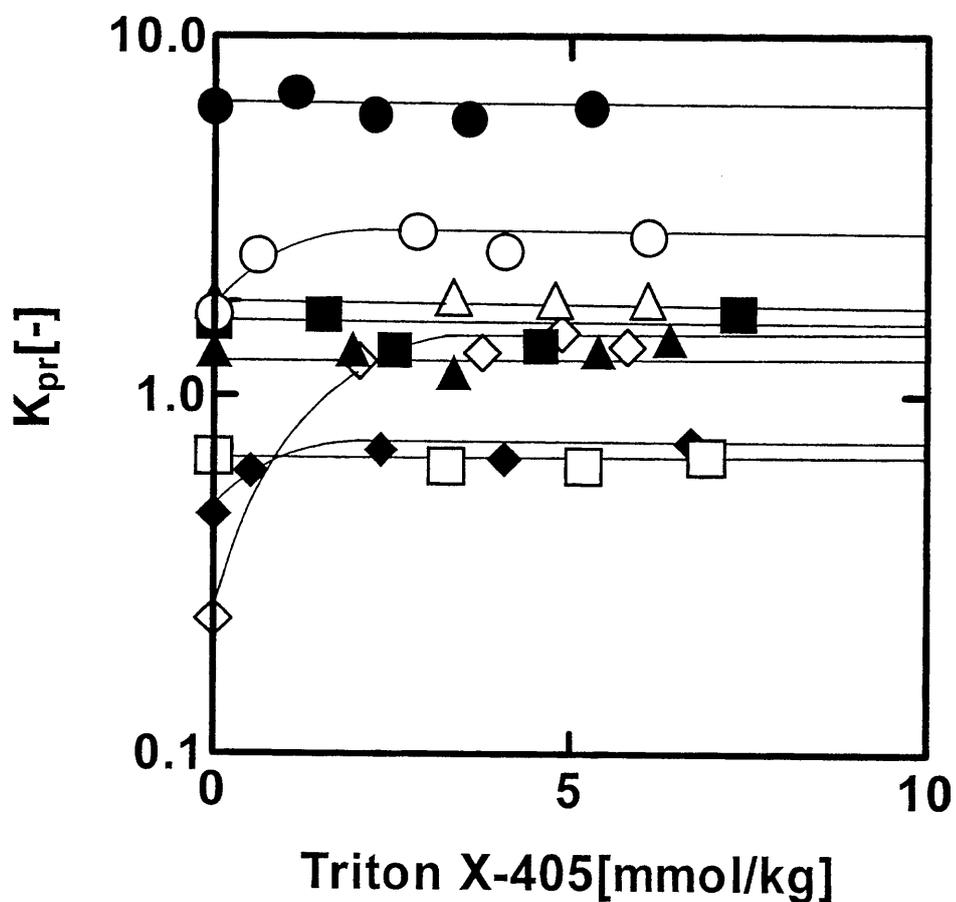


Figure 3.2 Effect of addition of Triton X-405 on the partition coefficient of proteins at their pI in PEG4000 (9 wt%) / Dex 100k - 200k (9 wt%) two-phase systems. Symbols: lipase P (●, pH = 4.46), lipase C (○, pH = 4.30), lipase A (▲, pH = 4.10), lipase R_a (△, pH = 7.10), lipase R_b (■, pH = 7.20), PPL (□, pH = 5.00), γ -G (◆, pH = 6.00) and BSA (◇, pH = 4.90).

3. 3. 3 タンパク質の局所疎水性の pH による変化

リパーゼ類ではリパーゼ C にのみ、LH が存在した。脂質被覆法では等電点の pH ではなく、至適 pH の水溶液で行うので、局所疎水性の pH 変化について明らかにしておく必要があり、各種リパーゼ、BSA、そして γ -G について等電点をはさむ種々の pH の PEG4000/Dex100k-200k 二相系で Triton 添加法により、LH を測定した。

分配実験の結果を図 3.3 にまとめた。

これらの結果から、式 3.2 に基づいて、LH ($\Delta \ln K_m$) を求め、図 3.4 にその pH 依存性をまとめた。

この結果、リパーゼ C に低 pH 側でわずかに LH の pH 依存性がみられるが、至適 pH 付近では無視できるほどであり、リパーゼ類については脂質被覆へおよぼす pH の影響はないと考えてよい。これは前章でのリパーゼ P の被覆率が水溶液の pH に依存しなかったことと一致している。リパーゼ C はわずかに局所疎水性を有しているが、この局所疎水性は Triton のような線状の疎水部とは相互作用できるが、 $2C_{18} \Delta^9GE$ の平面状の大きな疎水部とは相互作用できない細いくぼみ状のものと予測される。 γ -G の LH はその等電点 ($pI=6.00$) で最大値をとり、一方、BSA の LH は等電点 ($pI=4.90$) を越えると大きく減少しているが、この両者の pH 依存性は Kitano ら¹²⁾が報告しているホルムアルデヒド-ヒドロキノン樹脂 (FA-HQ 樹脂) への吸着におけるものとよく一致していて、疎水相互作用による結合が示唆される。

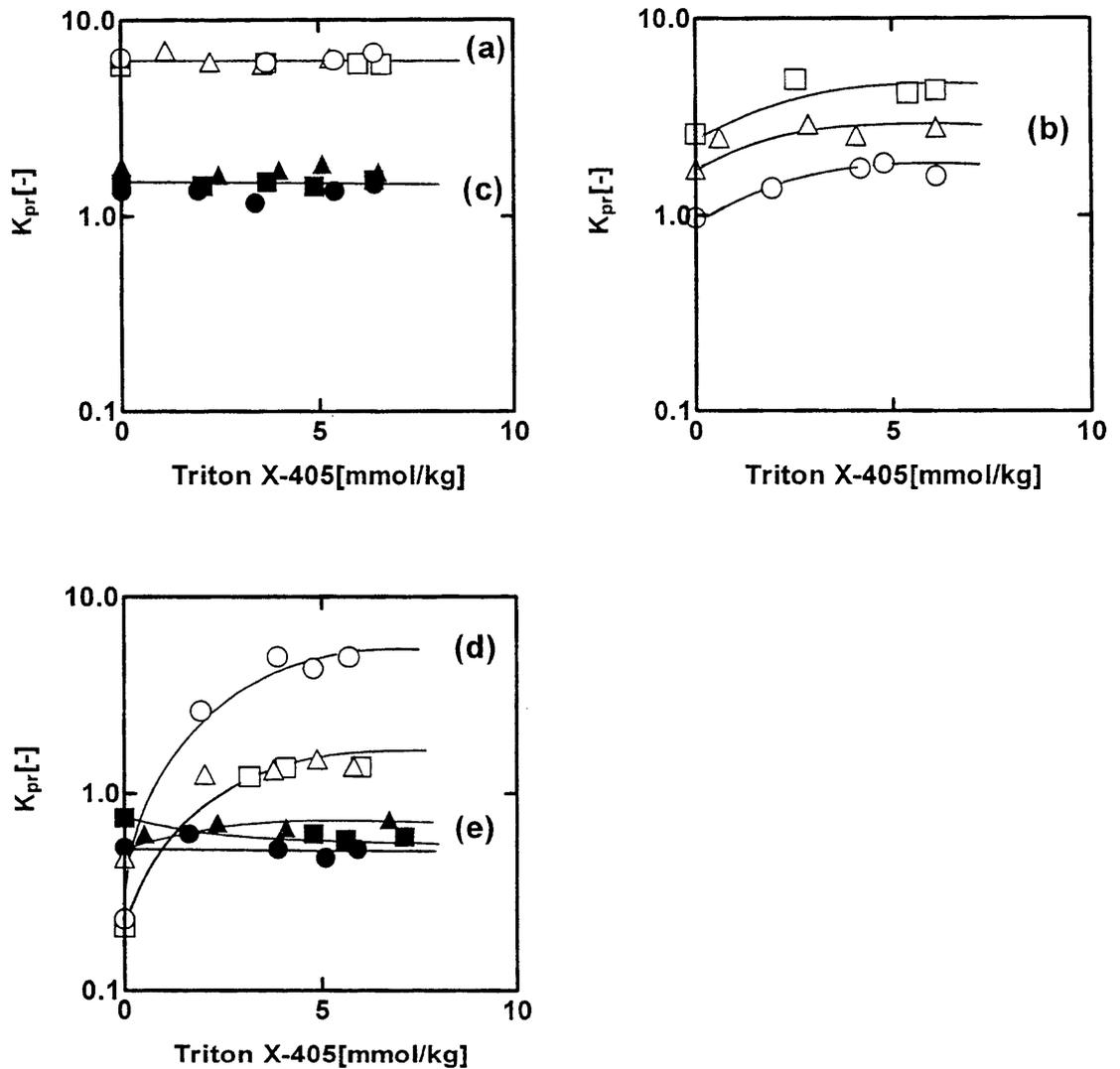


Figure 3.3 Effect of addition of Triton X-405 on the partition coefficient of proteins at various pH values in PEG4000 (9 wt%) / Dex 100k - 200k (9 wt%) two-phase systems. (a) lipase P (pH 4.10 (○), pI 4.46 (△), pH 7.60(□)), (b) lipase C (pH 4.00 (○), pI 4.30 (△), pH 8.00 (□)), (c) lipase A (pI 4.10 (●), pH 6.30 (▲), pH 7.80 (■)), (d) BSA (pH 4.30 (○), pI 4.90 (△), pH 7.60 (□)), (e) γ -G (pH 5.30 (●), pI 6.00 (▲), pH 7.60 (■)).

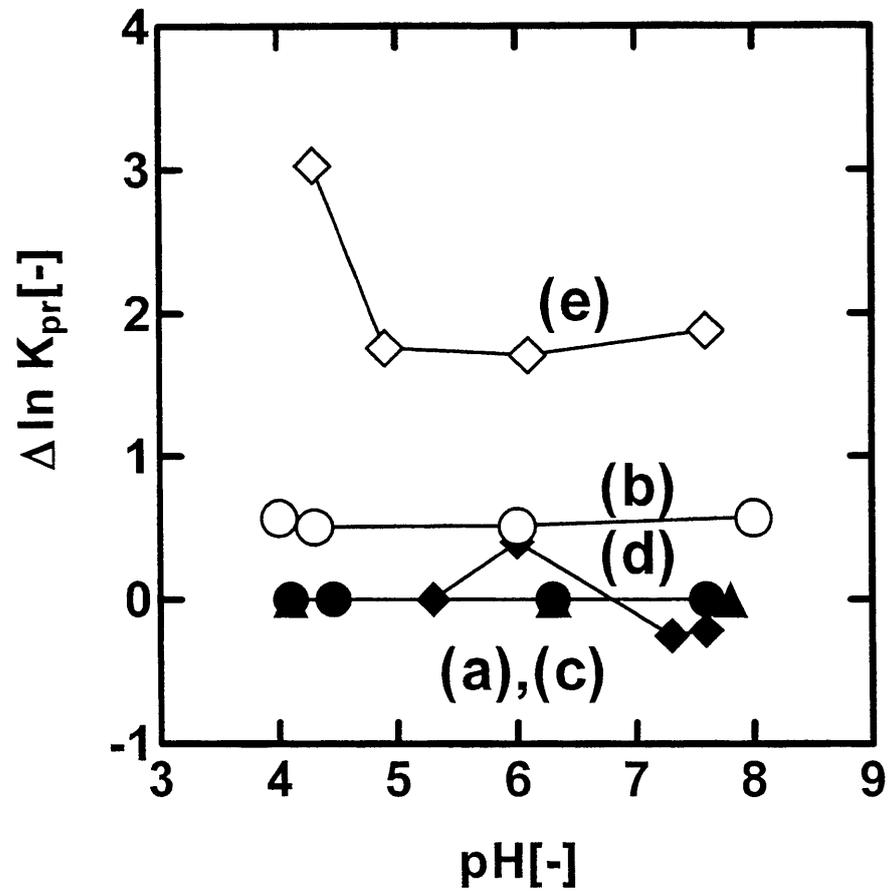


Figure 3.4 Effect of pH on the local hydrophobicity ($\Delta \ln K_{pr}$) of proteins. (a) lipase P (●), (b) lipase C (○), (c) lipase A (▲), (d) γ -G(◆) and (e) BSA (◇).

3. 3. 4 リパーゼの疎水性と界面活性剤による被覆

本研究で得られたリパーゼの表面疎水性 (HFS) と界面活性剤 ($2C_{18} \Delta^9GE$) による被覆との関連性をみるため、第2章の実験で得られた最大脂質被覆率 vs. リパーゼ類、BSA および γ -G の HFS のプロットを行った (図 3.5)。

図 3.5 に示されるように、リパーゼ A、リパーゼ R_a、リパーゼ R_b、PPL を除いて良好な比例関係がみられ、表面疎水性の大きいタンパク質ほど脂質被覆されやすいことが定量的に明らかにできた。なお、この比例関係はタンパク質の $2C_{18} \Delta^9GE$ に対する活性サイト数 (n) vs. タンパク質の HFS 値のプロットでもみられた。この結果は、タンパク質の脂質被覆の主因子がタンパク質と脂質との間の疎水性相互作用であることを裏付けている。HFS 値が大きい割には最大被覆率が小さいリパーゼ類は、例えば、*Rhizopus arrhizus* 起源のリパーゼは一分子あたり 13 ~ 14 モルのマンノースと 2 モルのヘキソースアミンを含む糖タンパク質であり¹³⁾、したがって、リパーゼ R_a、リパーゼ R_b は糖含量の非常に多いタンパク質で、また Kula ら⁹⁾も *Aspergillus niger* 起源のリパーゼ (リパーゼ A) および PPL とも高度に糖化されている酵素タンパク質であることを指摘しており、糖鎖の存在が脂質とタンパク質との結合を妨げているものと考えられる。また、BSA より大きい疎水性を有するタンパク質はすべて $2C_{18} \Delta^9GE$ と結合しているため、脂質被覆されるにはタンパク質の疎水性は HFS 値 $-205kJ/mol$ 以上は必要であると推定される。

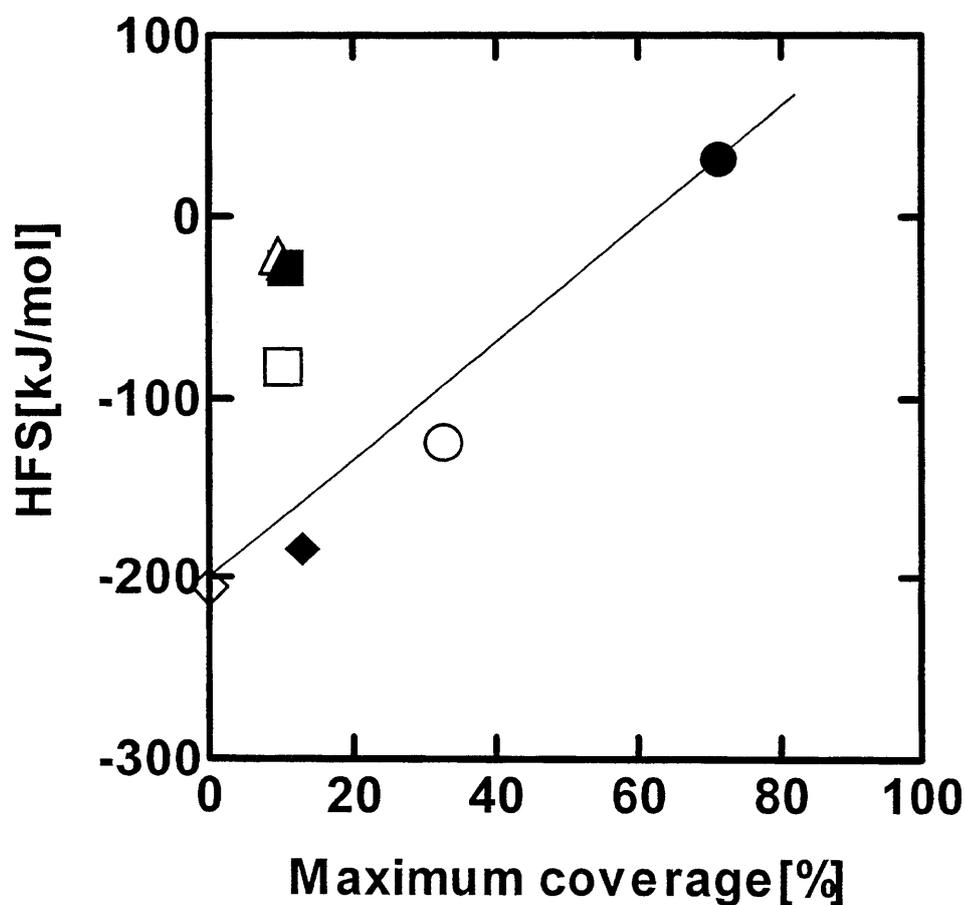


Figure 3.5 Correlation between maximum coverage for the lipid-coating of protein with $2C_{18} \Delta^9GE$, cited from the previous work,¹⁴⁾ and HFS. The experimental conditions of HFS are the same as those of Figure 3.1 or Table 3.1, and the complexation between protein and $2C_{18} \Delta^9GE$ was carried out at the pH 7.0 (150 mM aqueous phosphate buffer solution). Plots indicate experimental data for lipase P (●), lipase C (○), lipase A (▲), lipase R_a (△), lipase R_b (■), PPL (□), γ -G (◆) and BSA (◇).

3. 3. 5 リパーゼ類の疎水性と有機溶媒中の酵素活性

Klibanov はほとんどの酵素が修飾することなくそのまま、有機溶媒中で活性を有すると述べている (酵素粉末法)¹³⁾、しかし一般に、粉末酵素の反応は粒子内拡散抵抗や外部拡散抵抗の存在のため著しく遅い。表面疎水性の酵素ほど有機溶媒や疎水性の基質に対して、高い親和性を有し、したがって、有機溶媒中で高活性であると考えられ、酵素の HFS 値と有機溶媒中での粉末酵素活性との関連を本研究で最大の疎水性のリパーゼ P (HFS 値: +31.6kJ/mol) と最小の疎水性のリパーゼ C (HFS 値: -124kJ/mol) について検討した。

ヘキサン中の 3-メチル-2-シクロヘキセン-1-オールと酢酸イソプロペニルのトランスエステル化反応¹⁵⁾、トルエン中の (R,S)-(±)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-メタノールと酢酸イソプロペニルとのトランスエステル化反応¹⁶⁾、およびヘキサン中の (R,S)-(±)-シトロネラルの酪酸によるエステル化反応¹⁷⁾、において粉末リパーゼ P の方が粉末リパーゼ C よりも高活性であることが報告されている。

また、脂質被覆した後の酵素の表面疎水性は脂質と結合して疎水化した酵素が沈殿してくるので、どの酵素でも大差はないと考えられる。したがって、 $2C_{18} \Delta^{\circ}GE$ -リパーゼ C 複合体 (リパーゼ含量 28.0wt%) のイソオクタン中、35 °Cでの (1R,2S,5R)-(-)-メントールとラウリン酸とのエステル化反応¹⁸⁾および $2C_{18} \Delta^{\circ}GE$ -リパーゼ P 複合体 (リパーゼ含量 28.8wt%) のジイソプロピルエーテル中、30 °Cでの (R)-(-)-6-メチル-5-ヘプテン-2-オールと酢酸イソプロペニルとのトランスエステル化反応¹⁹⁾での比活性はそれぞれ $6.3 \mu \text{ mol h}^{-1} (\text{g-lipase C})^{-1}$ および $27.2 \mu \text{ mol h}^{-1} (\text{g-lipase P})^{-1}$ で、それぞれ、粉末リパーゼの比活性の 79 倍および 9.8 倍増大しているが ($0.08 \mu \text{ mol h}^{-1} (\text{g-lipase C})^{-1}$ および $2.79 \mu \text{ mol h}^{-1} (\text{g-lipase P})^{-1}$)、脂質被覆前の、すなわち、粉末リパーゼの活性はリパーゼ P の方が大きいので、脂質被覆後の活性の増加率は疎水性度の増加率に反映し、リパーゼ C の方が大きくなったものと考えられる。

図 3.5 における切片は脂質被覆法を適用できる酵素は-205kJ/mol より大きい疎水性を有する必要があることを示唆しており、この限界値はその酵素が疎水化修飾することなく、有機溶媒中で活性であるかどうかの指標にもなるものと考えられる。例えば、リパーゼ以外のかなり疎水性のパパイン (HFS 値:

+43.7kJ/mol)¹⁾、リゾチーム (HFS 値: -39.3kJ/mol)¹⁾、そして α -キモトリプシン (HFS 値: -85kJ/mol)¹⁾などは脂質被覆法により、疎水化修飾しやすい酵素であり、また、そのまま粉末状態で有機溶媒中でもある程度、活性を発現できる酵素であると予想できる。

3. 4 結言

本章で得られた知見は次のように要約される。

- (1) リパーゼ類、 γ -G および BSA の表面疎水性を水性二相分配法によって測定し、表面疎水性 (HFS 値: kJ/mol) は次のような値となった。

リパーゼ P: +31.6, リパーゼ R_a: -21.1, リパーゼ A: -24.7, リパーゼ R_b: -28.1, PPL: -82.4, リパーゼ C: -124, γ -G: -184, BSA: -205

- (2) Triton 添加法により、リパーゼ類、 γ -G および BSA の局所疎水性 (LH: kJ/mol) を測定し、次のような値を得た。

リパーゼ P: 0, リパーゼ R_a: 0, リパーゼ A: 0, リパーゼ R_b: 0, PPL: 0, リパーゼ C: 0.50, γ -G: -0.40, BSA: 1.76

- (3) 局所疎水性の pH 依存性については、等電点で LH 値を有するタンパク質にのみ存在し、 γ -G の LH は等電点で最大値を有する。また、BSA の LH は等電点を超えると減少する様式をとり、一方、リパーゼ C は BSA の様式に近いがほとんど pH 依存性はなかった。

- (4) 第 2 章のタンパク質の最大脂質被覆率とタンパク質の HFS 値には良好な相関性がみられ、タンパク質と脂質の結合は疎水性相互作用によるもので、表面疎水性の酵素ほど脂質被覆法により、疎水化修飾されやすいことが示唆された。リパーゼ R_a、リパーゼ R_b、リパーゼ A および PPL については HFS 値が大きい割には被覆率が小さいが、これらのリパーゼでは糖鎖の存在が脂質との結合を妨げているものと考えられる。

- (5) 酵素の HFS 値と粉末酵素の有機溶媒中での酵素活性にも関連性がみられ、表面疎水性の大きい酵素ほど、有機溶媒中でも高活性であることが示唆された。

3. 5 参考文献

- 1) 久保井亮一, 田中寿計, 駒沢勲, "水性二相分配系における疎水性とタンパク質の分配特性", 化学工学論文集, **16**, 755-761 (1990).
- 2) 久保井亮一, 田中寿計, 駒沢勲, "水性二相分配系およびタンパク質疎水性と塩効果", 化学工学論文集, **17**, 67-73 (1991).
- 3) 久保井亮一, 矢野浩二, 田中寿計, 駒沢勲, "水性二相分配系における非イオン性界面活性剤との疎水的相互作用を利用するタンパク質の表面疎水性の評価", 化学工学論文集, **19**, 446-454 (1993).
- 4) R. Kuboi, K. Yano and I. Komazawa, "Evaluation of surface properties and partitioning of proteins in aqueous two-phase extraction systems", *Solv. Extr. Res. Dev. Japan*, **1**, 42-52 (1994).
- 5) Y. Fujita, I. Mori and S. Kitano, "Color reaction between pyrogallol red-molybdenum (VI) complex and protein", *BUNKEKI KAGAKU*, **32**, E379-E386 (1983).
- 6) G.C. Terstappen, M.-R. Kula, "Selective extraction and quantitation of polyoxyethylene detergents and its application in protein determination", *Anal. Lett.*, **23**, 2175-2193 (1990).
- 7) M.M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 8) A.G. Ghatorae, M.J. Guerra, G. Bell and P.J. Halling, "Immiscible organic solvent inactivation of urease, chymotrypsin, lipase, and ribonuclease: Separation of dissolved solvent and interfacial effects", *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 1355-1361 (1994).
- 9) G.C. Teratappen, R.A. Ramelmeier and M.-R. Kula, "Protein partitioning in detergent-based aqueous two-phase systems", *J. Biotechnol.*, **28**, 263-275 (1993).
- 10) R. Kuboi, T. Hasegawa, K. Yamahara, I. Komazawa, G. Johansson, "Selective recovery of proteins by control of their surface properties utilizing PEG-bound affinity ligands", *J. Chem. Eng. Japan*, **31**, 618-625 (1998).

- 11) S. Makino, J.A. Reynolds and C. Tanford, "The binding of Deoxycholate and Triton X-100 to proteins", *J. Biol. Chem.*, **248**, 4926-4932 (1973).
- 12) 北野博巳, 中村勝則, 伊勢典夫, "検体からの蛋白質の分離・除去", *蛋白質核酸 酵素*, **31**, 210-219 (1986).
- 13) A.M. Klivanov, "Enzymes that work in organic solvents", *Chemtech*, **16**, 354-359 (1986).
- 14) Y. Sugimura, K. Fukunaga, T. Matsuno, K. Nakao, M. Goto, F. Nakashio, "A study on the lipid-coating of lipases", *Biochem. Eng. J.*, **2**, 137-143 (1988).
- 15) Y.-F. Wang, J.J. Lalonde, M. Momongan, D.E. Bergbreiter and C.-H. Wong, "Lipase-catalyzed irreversible transesterifications using enol esters as acylating reagents: preparative enantio- and regioselective syntheses of alcohols, glycerol derivatives, sugars, and organometallics", *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7200-7205 (1988).
- 16) E. Vanttinen and L.T. Kanerva, "Lipase-catalysed transesterification in the preparation of optically active solketal", *J. Chem. Soc. Parkin Trans.*, **1**, 3459-3463 (1994).
- 17) Y. Wang and Y.-Y. Linko, "Lipase-catalysed enantiomeric synthesis of citronellyl butyrate", *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 473-477 (1995).
- 18) N. Kamiya, M. Goto and F. Nakashio, "Surfactant-coated lipase suitable for the enzymatic resolution of menthol as a biocatalyst in organic media", *Biotechnol. Prog.*, **11**, 270-275 (1995).
- 19) K. Fukunaga, N. Mimamijima, Y. Sugimura, Z. Zhang and K. Nakao, "Immobilization of organic solvent-soluble lipase in nonaqueous conditions and properties of the immobilized enzymes", *J. Biotechnol.*, **52**, 81-88 (1996).

【第4章】 水相脂質被覆法によるリパーゼ類の疎水化修飾

4. 1 緒言

前章まで脂質被覆法による酵素の疎水化修飾法について詳細に検討してきたが、この調製法の欠点は水不溶性の疎水性界面活性剤分子と水相中に溶解している酵素分子との自発的な会合によっているため一部の酵素を除いて、酵素の回収率が一般的に低いことである。

そのため、都築ら¹²⁾は助溶媒としてテトラヒドロフラン (THF) を用いる界面活性剤被覆法 (均一系脂質被覆法) を考案した。すなわち、水相に酵素を溶解させておき、THF にジドデシルグルコシル L-グルタメート (2C₁₂GE) を溶解させ、両液を 4 °C で混合後、24h 放置して溶媒を蒸発させ、得られた界面活性剤-酵素複合体を水で洗浄して、未修飾の酵素を除去する方法である。この方法では、均相で界面活性剤と酵素分子とが接触するため、酵素の回収率の大幅な向上が認められた。

一方、Blinkovsky ら³⁾は疎水化高分子糖の palmitoyl poly(sucrose acrylate) をジメチルホルムアミド (DMF) に溶解し、ズブチリシンを緩衝液水溶液に溶解して混合後、凍結乾燥により修飾酵素を取り出し、酵素複合体が有機溶媒中で高活性であることを見出している。この調製法では酵素が全量回収できるので、工業的調製法として有望と考えられる。

また後藤ら⁴⁾はイソオクタンにジオレイルグルコシル L-グルタメート (2C₁₈Δ⁹GE) を溶解させ、水相中の酵素と混合させて得た W/O マイクロエマルジョンからイソオクタンを除去、凍結乾燥して、同様に全量の酵素が回収できる方法で界面活性剤-酵素複合体を得ている。

これらの改良脂質被覆法では界面活性剤-酵素複合体の収率が定量的である利点があるが、いずれも調製に大量の有機溶媒の使用が不可欠である。そこで、有機溶媒を用いない酵素の疎水化修飾を行う方法を探索し、既往の酵素修飾用界面活性剤のジアルキル型両親媒性化合物の親水基をもう一本増やした型のジェミニ型界面活性剤が水溶性になることに着目して、水相だけでリパーゼ類を疎水化修飾する方法を開発した。

4. 2 実験

4. 2. 1 酵素修飾用ジェミニ型界面活性剤の合成

膜タンパク質可溶化剤として知られている BIGCHAP (N,N-bis (3-D-gluconamidopropyl) cholamide) の合成法⁶⁾を参考にして、スキーム 4.1 のようにジアルキル N-(3-カルボキシプロパノイル)-L-グルタメート (2C_nCA) とイミノビスグルコノアミドを混合酸無水物法で縮合させて、N,N-bis (3-D-gluconamidopropyl) -3-(dialkyl-L-glutamyl) propamides (BIG2C_nCA: n=10, 12, 14, 16, 18) を合成した。

BIG2C₁₂CA の合成法を代表例として記載する。

Didodecyl N-(3-carboxypropanoyl)-L-glutamate⁷⁾ 10mmol を脱水 DMF80ml に溶かし、トリエチルアミン 1.40ml (10mmol) を加え、さらにクロロギ酸イソブチル (東京化成工業 (株) 試薬) 0.96ml (10mmol) を加え、30 分間攪拌した。溶液を冷蔵庫中に 2 時間放置して冷却した後、析出したトリエチルアミン塩酸塩をろ別した。一方で、先に合成した N,N-[Iminobis(trimethylene)]-bis (D-gluconamide)⁶⁾ 4.87g (10mmol) を脱水 DMF80ml に溶かし、混合酸無水物の母液を加え、50 °C で 2 日間攪拌し反応させた。反応後、溶媒を真空ポンプを用いて減圧留去し、残渣を 2-プロパノール 100ml から 2 回再結晶して、白色粉末結晶を得た。

表 4.1 および表 4.2 に合成したジェミニ型界面活性剤の融点、元素分析およびスペクトル分析の結果をまとめた。

Table 4.1 Analytical data of BIG2C_nCA

Detergent	Formula	m.p. [°C]	Found (Calcd) [%]		
			C	H	N
BIG2C ₁₀ CA	C ₄₇ H ₈₈ N ₄ O ₁₈	170-172	56.48 (56.61)	8.92 (8.89)	5.58 (5.62)
BIG2C ₁₂ CA	C ₅₁ H ₉₆ N ₄ O ₁₈	170-172	57.80 (58.15)	9.37 (9.19)	5.32 (5.32)
BIG2C ₁₄ CA	C ₅₅ H ₁₀₄ N ₄ O ₁₈	174-176	59.49 (59.54)	9.89 (9.45)	5.03 (5.05)
BIG2C ₁₆ CA	C ₅₉ H ₁₁₂ N ₄ O ₁₈	174-176	61.08 (60.80)	10.19 (9.69)	4.60 (4.81)
BIG2C ₁₈ CA	C ₆₃ H ₁₂₀ N ₄ O ₁₈	176-178	62.60 (61.94)	10.40 (9.90)	4.19 (4.59)

Table 4.2 Spectral data of N,N-bis(3-D-gluconamidopropyl)-3-(dialkyl-L-glutamatecarbonyl)propamide (BIG2C_nCA)

BIG2C₁₀CA: IR(KBr)[cm⁻¹]: 3350(-OH), 1720(-C=O), 1640(-CONH-).

¹H-NMR(DMSO, TMS)[ppm], J[Hz]:

¹³C-NMR(DMSO, TMS)[ppm]: 13.32(CH₃×2), 21.56-30.82(CH₃(CH₂)₈×2, NCH₂CH₂CH₂N×2, COCH₂CH₂CO, CHCH₂CH₂CO), 46.37-51.06 (NCH₂CH₂CH₂N×2, NHCH), 63.10, 70.12, 71.39, 72.22, 73.19 (carbon of glucose), 63.54, 64.02(RCH₂O×2), 170.71-172.02(ROCO×2, NHCO-glucose×2, COCH₂CH₂CO).

BIG2C₁₂CA: IR(KBr)[cm⁻¹]: 3350(-OH), 1720(-C=O), 1640(-CONH-).

¹H-NMR(DMSO, TMS)[ppm], J[Hz]: 0.84(6H, t, J=6.7, CH₃×2), 1.24-1.28 (36H, m, CH₃(CH₂)₉×2), 1.52-1.60(8H, m, R-CH₂CH₂×2, NCH₂CH₂CH₂N×2), 2.32-2.59(8H, m, COCH₂CH₂CO, CHCH₂CH₂CO), 3.03-4.22(34H, m, hydrogen of glucose, NCH₂CH₂CH₂N×2, RCH₂O×2), 5.42(1H, m, NHCHCH₂CH₂CO), 7.77-8.23(3, m, NHCO×3).

¹³C-NMR(DMSO, TMS)[ppm]: 13.81(CH₃×2), 22.14-31.41(CH₃(CH₂)₁₀×2, NCH₂CH₂CH₂N×2, COCH₂CH₂CO, CHCH₂CH₂CO), 46.37-51.67 (NCH₂CH₂CH₂N×2, NHCH), 63.54, 70.75, 71.97, 72.75, 73.73 (carbon of glucose), 64.32, 64.81(RCH₂O×2), 171.92-172.70(ROCO×2, NHCO-glucose×2, COCH₂CH₂CO).

BIG2C₁₄CA: IR(KBr)[cm⁻¹]: 3350(-OH), 1720(-C=O), 1640(-CONH-).

¹H-NMR(DMSO, TMS)[ppm], J[Hz]: 0.84(6H, t, J=6.7, CH₃×2), 1.23-1.26 (44H, m, CH₃(CH₂)₁₁×2), 1.53-1.58(8H, m, R-CH₂CH₂×2, NCH₂CH₂CH₂N×2), 2.31-2.55(8H, m, COCH₂CH₂CO, CHCH₂CH₂CO), 3.01-4.56 (34H, m, hydrogen of glucose, NCH₂CH₂CH₂N×2, RCH₂O×2), 5.42(1H, m, NHCHCH₂CH₂CO), 7.78-8.25(3, m, NHCO×3).

¹³C-NMR(DMSO, TMS)[ppm]: 13.66(CH₃×2), 22.19-31.55(CH₃(CH₂)₁₂×2, NCH₂CH₂CH₂N×2, COCH₂CH₂CO, CHCH₂CH₂CO), 46.37-51.79 (NCH₂CH₂CH₂N×2, NHCH), 63.59, 70.80, 72.02, 72.80, 73.73 (carbon of glucose), 64.02, 64.61(RCH₂O×2), 171.97-173.19

(ROCO×2, NHCO-glucose×2, COCH₂CH₂CO).

BIG2C₁₆CA: IR(KBr)[cm⁻¹]: 3350(-OH), 1720(-C=O), 1640(-CONH-).

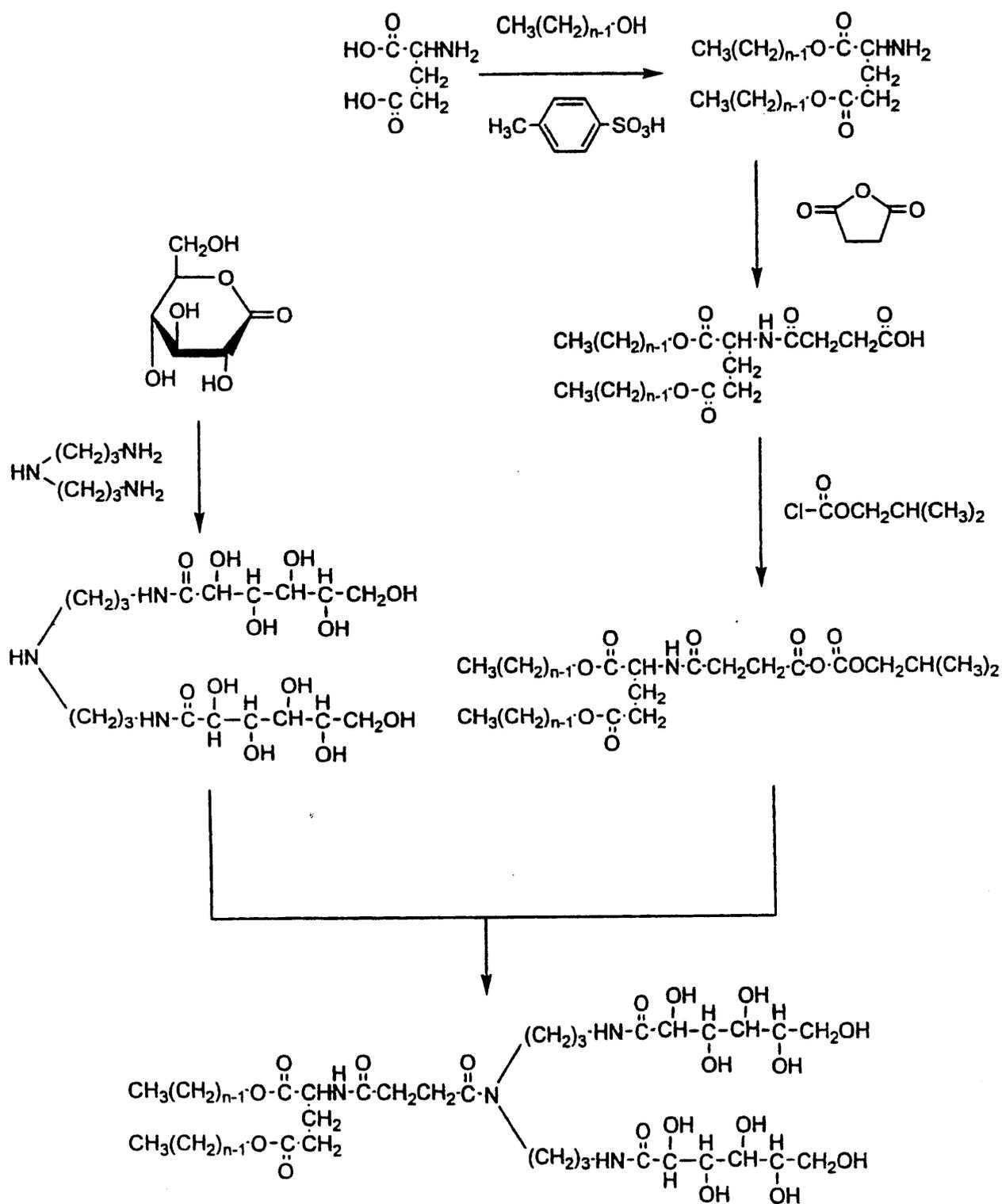
¹H-NMR(DMSO, TMS)[ppm], J[Hz]: 0.82(6H, t, J=6.7, CH₃×2), 1.03-1.23
(52H, m, CH₃(CH₂)₁₃×2), 1.54-1.93(8H, m, R-CH₂CH₂×2, NCH₂CH₂CH₂N×2),
2.35-2.56(8H, m, COCH₂CH₂CO, CHCH₂CH₂CO), 3.01-4.56
(34H, m, hydrogen of glucose, NCH₂CH₂CH₂N×2, RCH₂O×2), 5.42
(1H, m, NHCHCH₂CH₂CO), 7.78-8.25(3, m, NHCO×3).

¹³C-NMR(DMSO, TMS)[ppm]: 13.32(CH₃×2), 22.56-30.82(CH₃(CH₂)₁₄×2,
NCH₂CH₂CH₂N×2, COCH₂CH₂CO, CHCH₂CH₂CO), 46.37-51.01
(NCH₂CH₂CH₂N×2, NHCH), 63.15, 70.12, 71.44, 72.22, 73.19
(carbon of glucose), 63.54, 64.04(RCH₂O×2), 172.07
(ROCO×2, NHCO-glucose×2, COCH₂CH₂CO).

BIG2C₁₈CA: IR(KBr)[cm⁻¹]: 3350(-OH), 1720(-C=O), 1640(-CONH-).

¹H-NMR(DMSO, TMS)[ppm], J[Hz]: 0.84(6H, t, J=6.7, CH₃×2), 1.03-1.23
(60H, m, CH₃(CH₂)₁₅×2), 1.54-1.92(8H, m, R-CH₂CH₂×2, NCH₂CH₂CH₂N×2),
2.29-2.58(8H, m, COCH₂CH₂CO, CHCH₂CH₂CO), 3.02-4.55
(34H, m, hydrogen of glucose, NCH₂CH₂CH₂N×2, RCH₂O×2), 5.41
(1H, m, NHCHCH₂CH₂CO), 7.78-8.24(3, m, NHCO×3).

¹³C-NMR(DMSO, TMS)[ppm]: 13.32(CH₃×2), 21.56-30.82(CH₃(CH₂)₁₆×2,
NCH₂CH₂CH₂N×2, COCH₂CH₂CO, CHCH₂CH₂CO), 46.37-51.01
(NCH₂CH₂CH₂N×2, NHCH), 63.15, 70.12, 71.44, 72.22, 73.19
(carbon of glucose), 63.54, 64.04(RCH₂O×2), 171.14-171.97
(ROCO×2, NHCO-glucose×2, COCH₂CH₂CO).



BIG2C₁₀CA(n=10), BIG2C₁₂CA(n=12), BIG2C₁₄CA(n=14),
 BIG2C₁₆CA(n=16), BIG2C₁₈CA(n=18).

Scheme 4.1 Synthesis of BIG2C_nCA

4. 2. 2 酵素修飾用ジェミニ型含糖界面活性剤の合成

疎水部の構造が BIG2C_nCA と同じでそれよりも親水基の多いジェミニ型界面活性剤として N,N-bis(3-D-lactonamidopropyl)-[3-(dialkyl-L-glutamatecarbonyl)] propamides (BIL2C_nCA: n=16, 18) を合成した。この合成はスキーム 4.2 に示したように、BIG2C_nCA の合成におけるグルコノラクトンの代わりにラクトノラクトンを用いることで容易に行うことができた。

BIL2C₁₆CA の合成法を代表例として記載する。

Dihexadecyl N-(3-carboxypropanoyl)-L-glutamate⁷⁾ 3.77g (5.42mmol) を脱水 DMF 約 80ml に溶かし、トリエチルアミン 0.76ml (5.42mmol)、さらにクロロギ酸イソブチル 0.52ml (5.42mmol) を加え、30 分間攪拌した。析出したトリエチルアミン塩酸塩をろ別し、そのろ液にあらかじめ合成した N,N'-Iminobis(trimethylene)-bis(lactonamido) 4.39g (5.42mmol) を脱水 DMF に溶解した溶液を加え、65 °C で 2 日間攪拌下に反応させた。溶媒を減圧留去し、残渣をメタノール 200ml から 2 回再結晶して、白色粉末結晶を得た。

BIL2C₁₆CA: m.p. 136-138 °C(MeOH), IR(KBr; cm⁻¹) 3300(OH), 1720(C=O), 1520, 1420(CONH);

¹³C-NMR(90MHz, DMSO-d₆, TMS, ppm) δ 171.4, 104.3, 82.3, 75.5, 71.1, 68.2, 63.6, 62.2, 60.5, 51.2, 30.9, 29.8, 28.6, 28.3, 27.8, 25.0, 21.7, 13.4.

BIL2C₁₈CA: m.p. 135-139 °C(MeOH), IR(KBr; cm⁻¹) 3300(OH), 1720(C=O), 1520, 1420(CONH);

¹³C-NMR(90MHz, DMSO-d₆, TMS, ppm) δ 172.0, 104.1, 82.3, 78.8, 75.4, 73.2, 71.8, 71.3, 70.9, 70.4, 63.5, 62.2, 60.4, 51.1, 30.8, 29.7, 29.5, 28.5, 28.2, 27.6, 26.1, 24.9, 21.6, 13.3.

4. 2. 3 リパーゼ類および試薬類

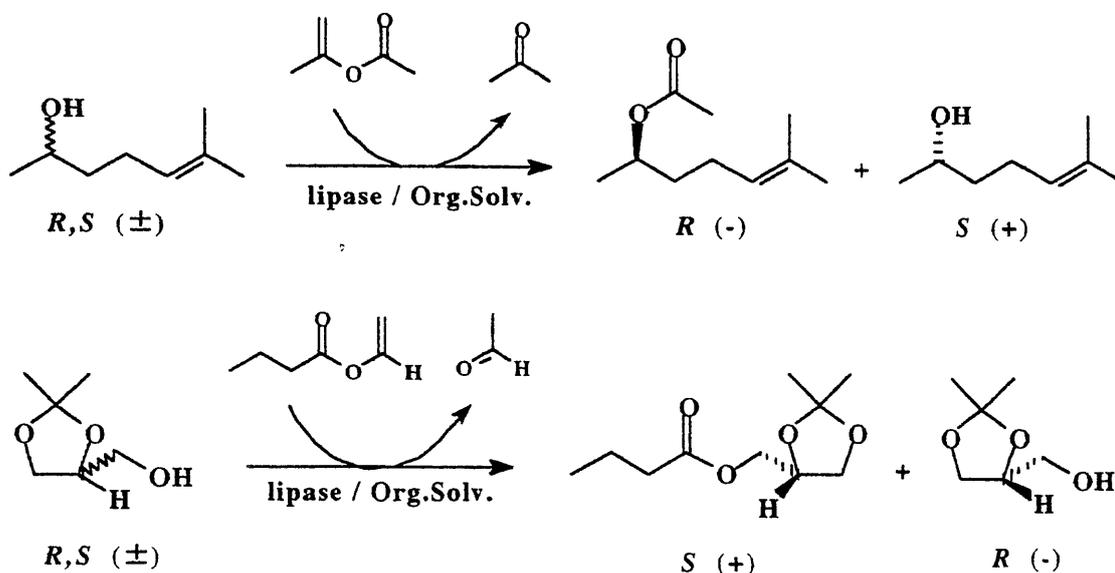
リパーゼ類は第2章および第3章で用いたものと同じのリパーゼ A、リパーゼ C、リパーゼ P、PPL、およびリパーゼ R_n を用いた。(±)6-メチル-5-ヘプテン-2-オール ((±)スルカトール)、(R,S)-(±)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-メタノール ((±)ソルケタール)、酢酸イソプロペニル、および酪酸ビニルはそれぞれ Sigma-Aldrich Japan K.K. (Tokyo)、東京化成工業 (株)、東京化成工業 (株)、および信越化学工業 (株) の製品を用いた。その他の有機試薬および無機試薬は高純度の市販試薬をそのまま使用した。

4. 2. 4 ジェミニ型界面活性剤-リパーゼ複合体の調製

リパーゼ濃度が 1.0g/l になるようにリパーゼ類を 10ml のリン酸緩衝液に溶解した。緩衝液は無機塩をあまり残さないよう 10mM 濃度とし、リパーゼ A およびリパーゼ R₂ では pH5.6、リパーゼ C、リパーゼ P、そして PPL では pH7.0 の至適 pH に調整した。所定量 (100 ~ 300 モル倍) の界面活性剤を添加した後、ホモジナイザー (三田村理研 (株) 製 LD-X10 型) で 2min、ホモジナイズした (12,000rpm)。懸濁液を液体窒素で凍結し、凍結乾燥機 (タイテック (株) 製 VD-16 型) により 20h 凍結乾燥して界面活性剤-リパーゼ複合体を得た。本法ではリパーゼの回収率は定量的で、得られた界面活性剤-リパーゼ複合体には実験に使用したリパーゼの全量が含まれている。

4. 2. 5 有機溶媒中での界面活性剤-リパーゼ複合体の酵素比活性の測定
 リパーゼは種類によって触媒できる反応系が異なるため、スキーム 4.3 に示す2つの反応を行って有機溶媒中での酵素比活性を測定した。

リパーゼ P に対してはラセミスルカトールと酢酸イソプロペニルのトランスアセチル化反応、一方、リパーゼ A、リパーゼ C、リパーゼ R₁ および PPL に対してはラセミスルケタールと酪酸ビニルのトランスブチリル化反応⁹⁾、これらの反応ではアシル化剤がエノールエステルなので、反応で遊離するアルコールが直ちにアルデヒドまたはケトンに異性化し、反応が不可逆的に進行するので⁹⁾、再現性がよく、ガスクロマトグラフ分析が可能で、また、エナンチオ選択的反応でもあるので、不斉選択性からの酵素の立体構造に関する知見も得ることができる。



Scheme 4.3 Lipase-catalyzed reaction systems

(1) ラセミスルカトールの酢酸イソプロペニルによるトランスアセチル化反応

容積 10ml の反応セルにラセミスルカトール 304 μ l (2mmol) と酢酸イソプロペニル 217 μ l (2mmol) を反応有機溶媒 4ml に溶解させた。30 $^{\circ}$ C で磁気攪拌下に界面活性剤-リパーゼ複合体を添加して反応を開始した。

反応の進行は所定時間毎に反応液を約 0.2 μ l サンプルングして、キラルキャピラリーカラム (Supelco β -DEX120, 60m) を用いたガスクロマトグラフ分析 (検出器: FID, キャリヤーガス: N_2 , カラム温度: 100 $^{\circ}C$) を行って、反応の転化率およびエナンチオマー純度 (e.p.) を測定した。なお、転化率はスルカトールの R 体と S 体の両方についての値で算出し、酵素活性は転化率 20%までの初速度から求め、 $mmol\ h^{-1}\ (g\text{-lipase})^{-1}$ で比活性で表した。また、エナンチオマー過剰率 (ここでは R 体について) e.e.R は転化率 20%付近での e.p. から求めた。

(2) ラセミソルケタールの酪酸ビニルによるトランスブチリル化反応

容積 10ml の反応セルにラセミソルケタール 247 μ l (2mmol) と酪酸ビニル 253 μ l (2mmol) を反応有機溶媒 4ml に溶解させた。30 $^{\circ}C$ で磁気攪拌下に界面活性剤-リパーゼ複合体を添加して反応を開始した。

反応の進行は (1) と同様にガスクロマトグラフ分析により追跡した (ただし、カラム温度は 120 $^{\circ}C$)。また、エナンチオマー過剰率はリパーゼ C、リパーゼ R₂ および PPL では S 体について、リパーゼ A では R 体について求めた。

4. 3 実験結果および考察

4. 3. 1 水相脂質被覆法で調製したジェミニ型界面活性剤-リパーゼ複合体の酵素活性

希薄緩衝液中で界面活性剤とリパーゼを混合溶解し、凍結乾燥によって取り出されただけの界面活性剤-リパーゼ複合体が有機溶媒中で酵素活性を発現するかどうか、まず、BIG2C₁₂CA のリパーゼ P およびリパーゼ C 複合体について、それぞれ有機溶媒中での酵素反応を行って調べた。

図 4.1 に BIG2C₁₂CA -リパーゼ P (モル比 100) 複合体についての実験結果のみを示すが、両複合体は同じ反応挙動を示した。

図は同じ量のリパーゼ P を用いた BIG2C₁₂CA との複合体、粉末リパーゼ P および反応時に両者を混合したときの反応の進行状況を示しており、調製リパーゼ複合体が非常に高活性で、また、水溶液中で界面活性剤と酵素との相互作用を経過することが高酵素活性発現に必須であることが分かる。

一方、粉末リパーゼ P に反応液中で BIG2C₁₂CA を添加しても反応促進効果が認められるが、これは有機溶媒中でもリパーゼと脂質との相互作用がわずかながら起こっていることを示唆し、既往の 2C₁₈ Δ⁹GE などではこのような添加効果は認められず、ジェミニ型界面活性剤の修飾作用力の大きさがうかがえる。なお、この BIG2C₁₂CA の添加による反応促進効果はリパーゼ C に対する方が大きかった。

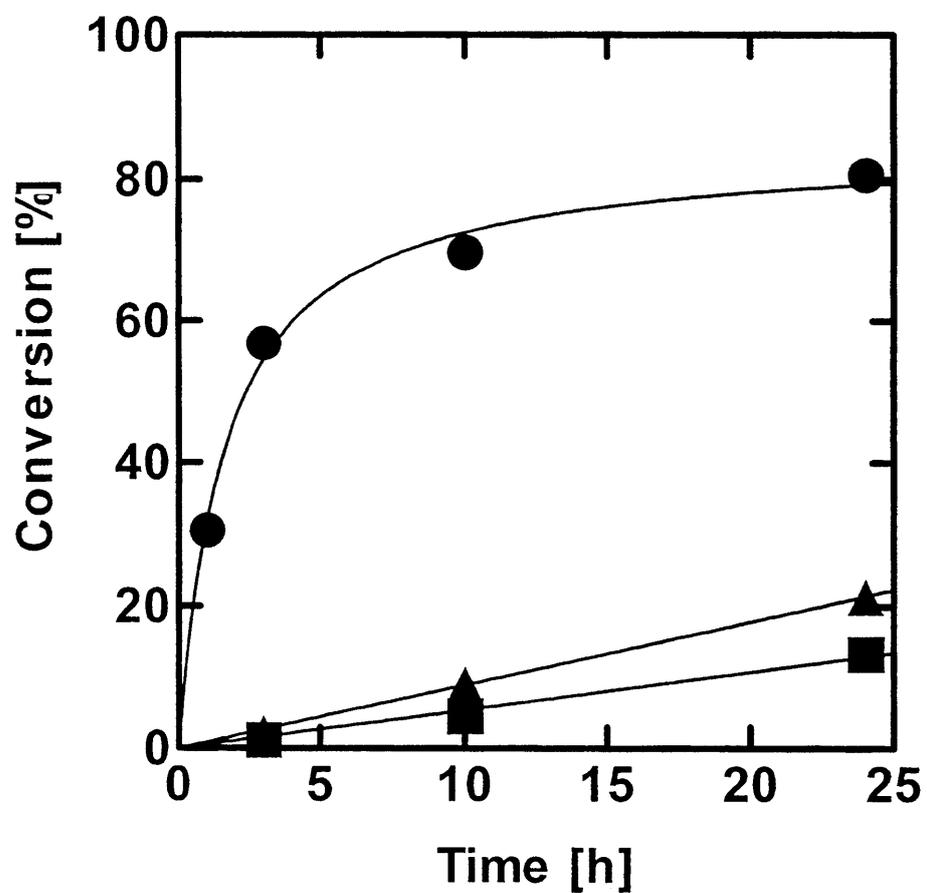


Figure 4.1 Time courses of transesterification between racemic sulcatol (0.5 M) and isopropenyl acetate (0.5 M) in diisopropyl ether (4 ml) using (●) BIG2C₁₂CA (30 mg)- lipase P (10 mg) complex, (▲) BIG2C₁₂CA (30 mg) and native lipase P (10mg) independently, (■) native lipase P (10 mg).

4. 3. 2 種々のリパーゼのジェミニ型界面活性剤による疎水化修飾

BIG2C₁₂CA を用いた水相脂質被覆法により調製した界面活性剤-リパーゼ複合体が有機溶媒中で高酵素活性を発現したので、新規に合成したジェミニ型界面活性剤 BIG2C_nCA および BIL2C_nCA を用いて、種々のリパーゼを水相脂質被覆して得た界面活性剤-リパーゼ複合体の有機溶媒中での比酵素活性を測定した。

これらの結果を各リパーゼについて、表 4.3 ~ 表 4.7 にまとめた。

Table 4.3 Effect of different detergents on enzymatic activity and enantioselectivity of the detergent-lipase P complexes

Detergent	Enzymatic activity ^{a)} [mmol/h g-lipase]	e.e. _R [%]
BIG2C ₁₀ CA	53	87
BIG2C ₁₂ CA	62	88
BIG2C ₁₄ CA	58	88
BIG2C ₁₆ CA	38	86
BIG2C ₁₈ CA	19	89
BIL2C ₁₆ CA	25	93
BIL2C ₁₈ CA	32	94
None ^{b)}	1.0	86

a) Transesterification between racemic sulcatol (0.5 M) and isopropenyl acetate (0.5 M) in diisopropyl ether (4 ml) using detergent-enzyme complex at 30 °C and (Detergent/lipase P) molar ratio was 100.

b) Native lipase P.

Table 4.4 Effect of different detergents on enzymatic activity and enantioselectivity of the detergent-lipase C complexes

Detergent	Enzymatic activity ^{a)} [mmol/h g-lipase]	e.e. _s [%]
BIG2C ₁₀ CA	84	38
BIG2C ₁₂ CA	80	40
BIG2C ₁₄ CA	80	40
BIG2C ₁₆ CA	80	40
BIG2C ₁₈ CA	64	39
BIL2C ₁₆ CA	59	65
BIL2C ₁₈ CA	32	66
None ^{b)}	1.0	31

a) Transesterification between racemic solketal (0.5 M) and vinyl butyrate (0.5 M) in cyclohexane (4 ml) using detergent-enzyme complex at 30 °C and (Detergant/lipase C) molar ratio was 200.

b) Native lipase C.

Table 4.5 Effect of different detergents on enzymatic activity and enantioselectivity of the detergent-PPL complexes

Detergent	Enzymatic activity ^{a)} [mmol/h g-lipase]	e.e. _s [%]
BIG2C ₁₀ CA	19	47
BIG2C ₁₂ CA	18	49
BIG2C ₁₄ CA	18	47
BIG2C ₁₆ CA	6.8	49
BIG2C ₁₈ CA	3.8	49
BIL2C ₁₆ CA	18	44
BIL2C ₁₈ CA	15	47
None ^{b)}	0.2	36

a) Transesterification between racemic solketal (0.5 M) and vinyl butyrate (0.5 M) in diisopropyl ether (4 ml) using detergent-enzyme complex at 30 °C and (Detergent/PPL) molar ratio was 150.

b) Native PPL.

Table 4.6 Effect of different detergents on enzymatic activity and enantioselectivity of the detergent-lipase A complexes

Detergent	Enzymatic activity ^{a)} [mmol/h g-lipase]	e.e. _R [%]
BIG2C ₁₀ CA	30	6
BIG2C ₁₂ CA	32	6
BIG2C ₁₄ CA	26	7
BIG2C ₁₆ CA	11	7
BIG2C ₁₈ CA	7.0	3
BIL2C ₁₆ CA	20	66
BIL2C ₁₈ CA	31	67
None ^{b)}	0.1	12

a) Transesterification between racemic solketal (0.5 M) and vinyl butyrate (0.5 M) in diisopropyl ether (4 ml) using detergent-enzyme complex at 30 °C and (Detergant/lipase A) molar ratio was 100.

b) Native lipase A.

Table 4.7 Effect of different detergents on enzymatic activity and enantioselectivity of the detergent-lipase R_a complexes

Detergent	Enzymatic activity ^{a)} [mmol/h g-lipase]	e.e. _s [%]
BIG2C ₁₂ CA ^{b)}	41	71
BIG2C ₁₄ CA ^{c)}	46	70
None ^{d)}	0.2	60

a) Transesterification between racemic solketal (0.5 M) and vinyl butyrate (0.5 M) in diisopropyl ether (4 ml) using detergent-enzyme complex at 30 °C and (Detergant/lipase R_a) molar ratio was 114^{b)} or 108^{c)}.

d) Native lipase R_a.

また、既往の汎用酵素被覆用界面活性剤 2C₁₂GE および 2C₁₈ Δ °GE もリパーゼの水相脂質被覆に用いて新規に合成した界面活性剤の性能と比較してみた。この比較は表 4.8 にまとめた。

どのリパーゼ系においても、水相脂質被覆法では 2C₁₂GE や 2C₁₈ Δ °GE よりも、ジェミニ型界面活性剤の短鎖のもの (n=10 ~ 12) が優れた修飾効果を示すことが分かった。

Table 4.8 Enzymatic activities of the detergent-lipase complexes

Detergent/Lipase (Molar ratio)	Activity ^{a)} [mmol h ⁻¹ (g-lipase) ⁻¹]	%e.e. (Config.)
BIG2C ₁₂ CA/Lipase P(100)	62	88(R)
BIG2C ₁₄ CA/Lipase P(100)	58	88(R)
2C ₁₂ GE/Lipase P(100)	20	89(R)
2C ₁₈ Δ °GE/Lipase P(100)	24	89(R)
BIG2C ₁₀ CA/Lipase C(200)	88	38(S)
BIG2C ₁₂ CA/Lipase C(200)	84	40(S)
2C ₁₂ GE/Lipase C(200)	8.8	36(S)
2C ₁₈ Δ °GE/Lipase C(200)	18	37(S)
BIG2C ₁₀ CA/PPL(150)	19	47(S)
BIG2C ₁₂ CA/PPL(150)	18	49(S)
2C ₁₂ GE/PPL(150)	4.6	47(S)
2C ₁₈ Δ °GE/PPL(150)	4.6	48(S)
BIG2C ₁₀ CA/Lipase A(100)	30	6(R)
BIG2C ₁₂ CA/Lipase A(100)	32	6(R)
2C ₁₂ GE/Lipase A(100)	2.0	3(R)
2C ₁₈ Δ °GE/Lipase A(100)	3.6	4(R)

a) Lipase P: transesterification between racemic sulcatol and isopropenyl acetate in diisopropyl ether at 30 °C; Lipase C, PPL, and Lipase A: transesterification between racemic solketal and vinyl butyrate in cyclohexane, diisopropyl ether, or diisopropyl ether, respectively.

4. 3. 3 界面活性剤－リパーゼモル比の酵素活性への影響

界面活性剤として BIG2C₁₂CA を用いて 4 種類のリパーゼに対する調製時における（界面活性剤/リパーゼ）モル比の得られる界面活性剤－リパーゼ複合体の酵素活性への影響を調べた。

実験結果を図 4.2 にまとめた。

図に示されているように、すべてのリパーゼで低モル比側では、BIG2C₁₂CA の添加量に比例して酵素活性は増加するが、一定のモル比を越えるとあまり活性は上昇しなくなる。そのモル比が最適混合比と考えられ、それぞれ、リパーゼ P で 96、リパーゼ A で 106、リパーゼ C で 213、PPL で 240 以上、であった。PPL はまだ上昇しているが、この時点で反応液はすでに濃厚なスラリー状で、これ以上のモル比での反応の進行は無理と考え、実験は行わなかった。

本実験における最適モル比を第 2 章での従来の懸濁系での脂質被覆法における飽和モル数（リパーゼ P で 240、リパーゼ A で 940、リパーゼ C で 730、PPL で 2220）と比較すると、リパーゼ A とリパーゼ C に順序の逆転がみられるが、よく対応しており、本水相脂質被覆法においても界面活性剤と酵素の結合による酵素の疎水化が有機溶媒中での酵素活性増大の要因であると考えられる。

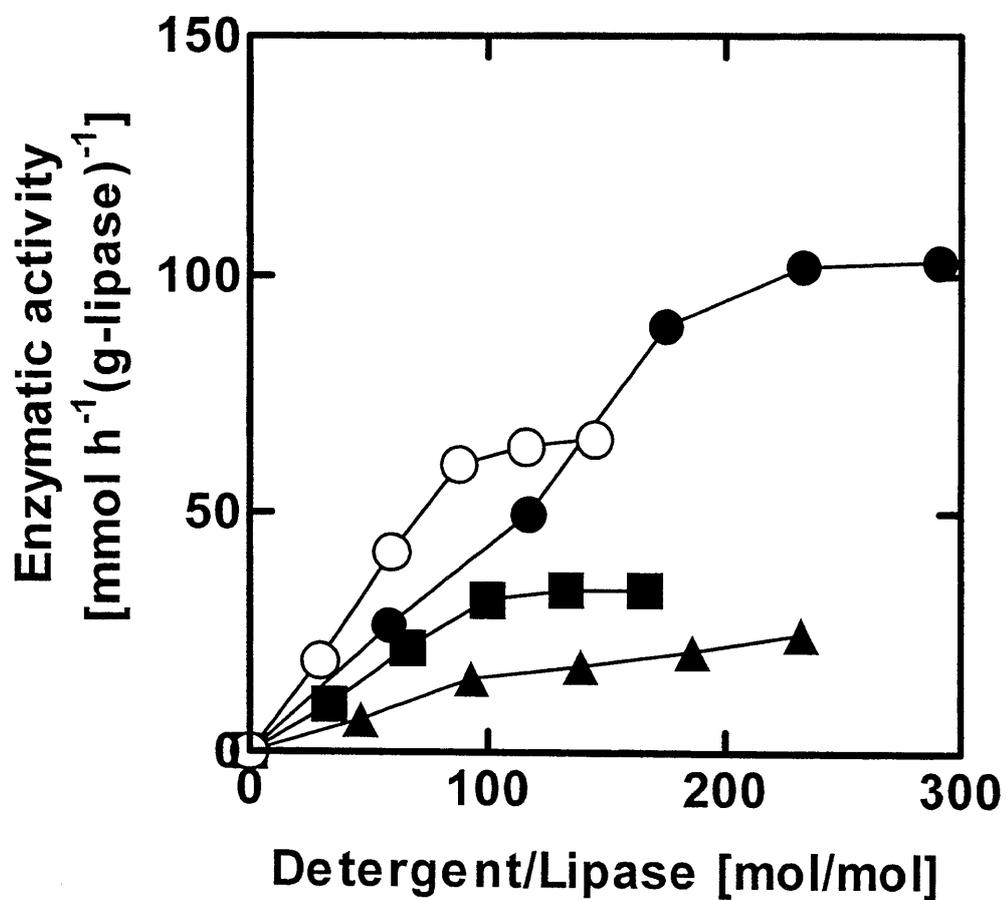


Figure 4.2 Enzymatic activities of the BIG2C₁₂CA-lipase complexes obtained with different molar ratios (detergent/lipase): (○) lipase P; (●) lipase C; (▲) PPL; (■) lipase A.

4. 3. 4 ジェミニ型界面活性剤ーリパーゼ複合体触媒反応における有機溶媒の影響

ジェミニ型界面活性剤は親水部が既往の $2C_{12}GE$ や $2C_{18} \Delta^9GE$ よりも 2 倍多い。したがって、それらの酵素複合体の有機溶媒に対する溶解度も変わることが予想され、 $BIG2C_{12}CA$ ーリパーゼ P 複合体および $BIG2C_{12}CA$ ーリパーゼ C 複合体についての溶媒効果を調べた。

実験結果を表 4.9 および表 4.10 にまとめた。

Table 4.9 Enzymatic activity and enantioselectivity for the transesterification between racemic sulcatol and isopropenyl acetate using $BIG2C_{12}CA$ -lipase P complex (molar ratio 100) in different organic solvents

Solvent	$\log P^a)$	Enzymatic activity [mmol/h g-lipase]	e.e. _R [%]	Solubility ^{b)}
Isooctane	4.5	53	87	×
Hexane	3.5	50	93	×
Cyclohexane	3.2	59	81	×
Toluene	2.5	38	92	○
Benzene	2.0	23	93	○
Diisopropyl ether	1.9	62	87	×
Diethyl ether	0.85	56	84	×
Tetrahydrofuran	0.49	16	90	×
Acetone	-0.23	16	94	×
Dimethyl sulfoxide	-1.3	3.1	90	○

a) The values were taken from Ref. 10.

b) Solubility of lipase complex to pure organic solvent: ○; soluble, ×; insoluble.

Table 4.10 Enzymatic activity and enantioselectivity for the transesterification between racemic solketal and vinyl butylate using BIG2C₁₂CA-lipase C complex (molar ratio 200) in different organic solvents

Solvent	logP ^{a)}	Enzymatic activity [mmol/h g-lipase]	e.e. _s [%]	Solubility ^{b)}
Isooctane	4.5	58	35	×
Hexane	3.5	48	36	×
Cyclohexane	3.2	80	40	×
Toluene	2.5	74	49	○
Benzene	2.0	63	49	○
Diisopropyl ether	1.9	42	36	×
Diethyl ether	0.85	28	38	×
Tetrahydrofuran	0.49	10	41	×
Acetone	-0.23	0	—	×
Dimethyl sulfoxide	-1.3	0	—	○

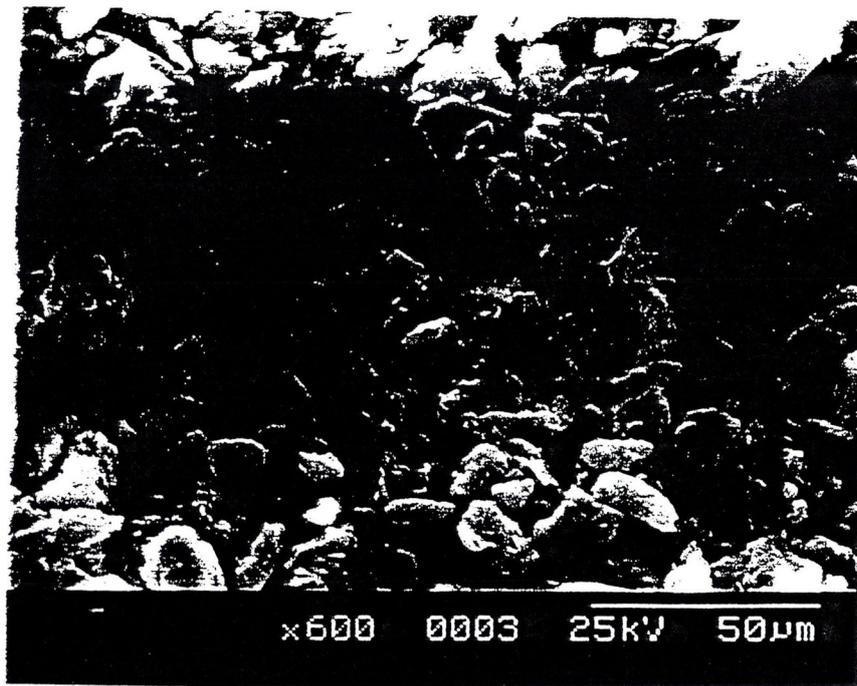
a) The values were taken from Ref. 10.

b) Solubility of lipase complex to pure organic solvent: ○; soluble, ×; insoluble.

ジェミニ型界面活性剤-リパーゼ複合体は既往の 2C₁₂GE や 2C₁₈ Δ⁹GE -リパーゼ複合体よりも有機溶媒に溶解しにくく、トルエン、ベンゼン、ジメチルスルホキシド (DMSO) 以外の有機溶媒には不溶であったが、不溶性の有機溶媒中でも反応性はかなり大きい。これらの溶媒効果の実験結果は疎水性以外にも酵素とジェミニ型修飾酵素との複合体の多孔構造化を示唆しており、事実、図 4.3 の BIG2C₁₂CA -リパーゼ C 複合体の SEM 写真で示されるように酵素分子に界面活性剤が分散している固体複合体の状態¹¹⁾が示唆される。



(a)



(b)

Figure 4.3 Typical SEM micrograph of lipase: (a) Native lipase C,
(b) BIG2C₁₂CA-lipase C complex

4. 3. 5 界面活性剤の HLB 値とリパーゼ類の疎水化修飾効果

どのような界面活性剤がリパーゼの修飾剤として良いのか特性化するため、Griffin¹²⁾によって導入された HLB (Hydrophile lipophile balance: 親水疎水比) 値を指標に用いて考察してみた。本実験で用いる合成界面活性剤の HLB 値は通常の界面活性剤と異なり、実測が困難であるので、原子団の基数の加減則から成り立つ次式 4.1 に基づいて計算した¹³⁾。

$$\text{HLB} = \sum J_w + \sum J_o + 7 \quad (4.1)$$

ここで、 J_w : 親水基の基数、 J_o : 疎水基の基数、である。代表的な親水基、疎水基を表 4.11 に示した。

Table 4.11 Group number

atomic group	group number	atomic group	group number
-OSO ₃ Na	38.7	-OH	1.9
-COOK	21.1	-O-	1.3
-COONa	19.1	-OH(sorbitan ring)	0.5
-SO ₃ M	11	-(CH ₂ CH ₂ O)-	0.33
sorbitan	6.8	-CH ₂ -, -CH ₃ , =CH-	-0.475
ester	2.4	-(CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -O)-	-0.15
-COOH	2.1		

本実験で用いた界面活性剤の計算値を表 4.12 にまとめた。参考のため、既往の 2C₁₂GE および 2C₁₈ Δ °GE についても計算値を示した。

また、室温での界面活性剤 30mg の水 10ml に対する溶解性も実測し、表中に記載した。

Table 4.12 The calculated values of HLB and water solubilities of the detergents used

Detergent	M.W.	HLB	Solubility in water ^{a)}
BIG2C ₁₀ CA	997	11.3	○ ^{b)}
BIG2C ₁₂ CA	1053	9.4	○
BIG2C ₁₄ CA	1109	7.5	△
BIG2C ₁₆ CA	1166	5.6	×
BIG2C ₁₈ CA	1222	3.7	×
BIL2C ₁₆ CA	1517	19.4	○
BIL2C ₁₈ CA	1545	17.5	○
2C ₁₂ GE	661	6.1	×
2C ₁₈ △ ⁹ GE	825	0.4	×

a) Detergent (30 mg) in water (10ml) at 25 °C.

b) ○: Easily soluble, △: Slightly soluble, ×: Insoluble.

界面活性剤の HLB 値が 9 よりも大きいと水溶性で、7 よりも小さいと水不溶性であることが分かった。

修飾に用いたジェミニ型界面活性剤の HLB 値に対する有機溶媒中での界面活性剤-リパーゼ複合体の有機溶媒中での酵素比活性の依存性を表 4.1 ~ 表 4.4 の実験結果に基づいてリパーゼ P (モル比 100)、リパーゼ A (モル比 100)、PPL (モル比 150)、そしてリパーゼ C (モル比 200) について調べた。

その結果を図 4.4 および図 4.5 にまとめた。

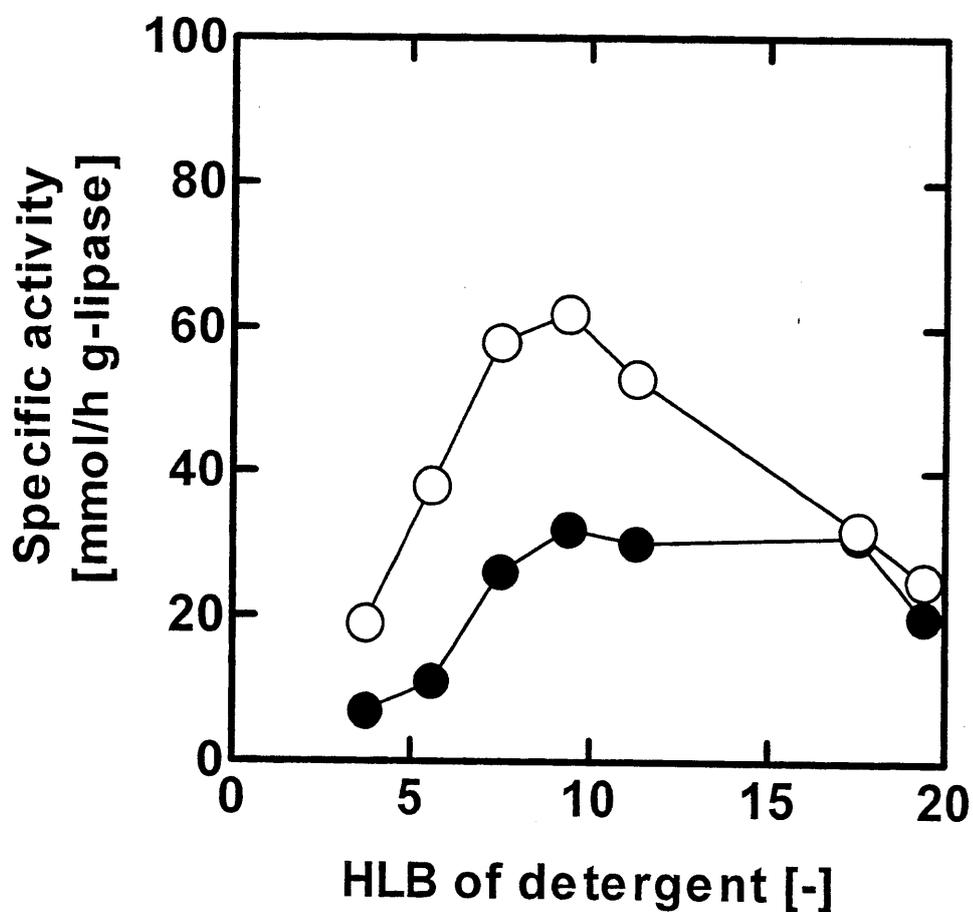


Figure 4.4 The dependencies of the enzymatic activity of the detergent-lipase P (molar ratio 100) (○) and -lipase A (molar ratio 100) (●) complexes on the HLB value of detergent in the transacetylation between racemic sulcatol and isopropenyl acetate and in the transbutyrylation between racemic solketal and vinyl butyrate in diisopropyl ether, respectively.

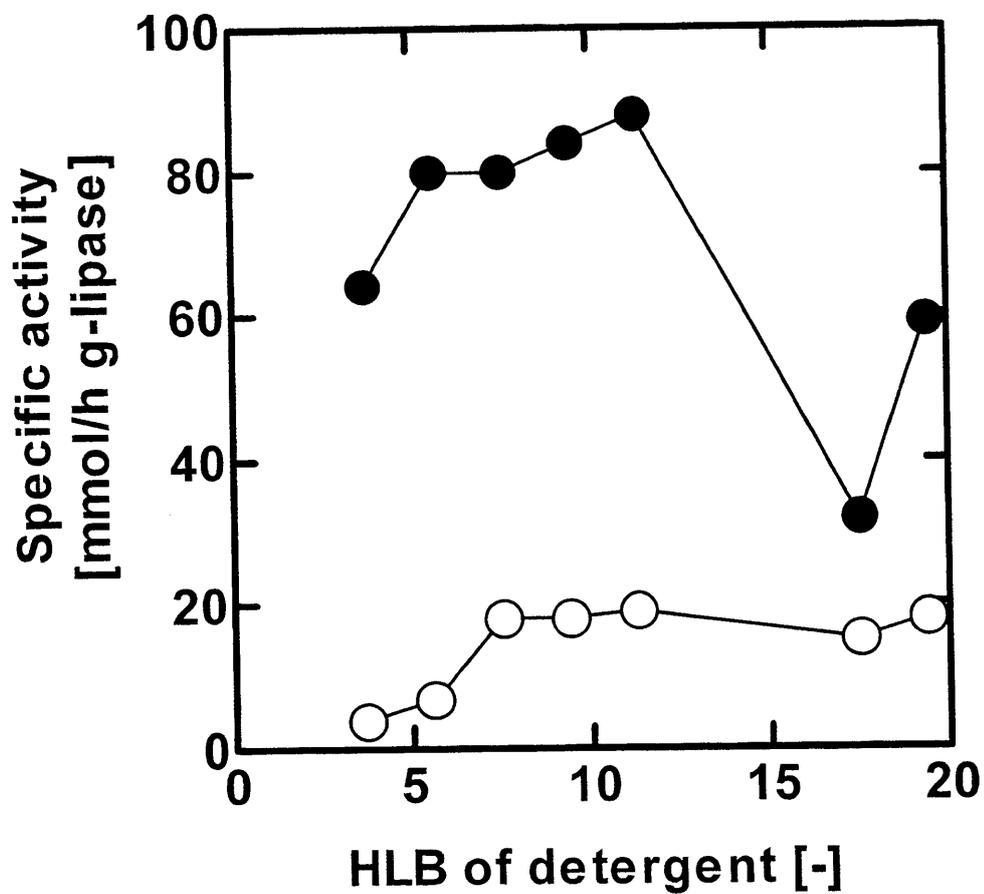


Figure 4.5 The dependencies of the enzymatic activity of the detergent-PPL (molar ratio 150) (○) and -lipase C (molar ratio 200) (●) complexes on the HLB value of detergent in the transbutyrylation between racemic solketal and vinyl butyrate, in diisopropyl ether and in cyclohexane, respectively.

図 4.4 のリパーゼ P およびリパーゼ A では HLB が 9.4 の BIG2C₁₂CA で、また、図 4.5 の PPL およびリパーゼ C では HLB が 11.3 の BIG2C₁₀CA で酵素活性が最大になった。第 3 章で、リパーゼ P およびリパーゼ A の表面疎水性は大きく、PPL およびリパーゼ C の表面疎水性は小さいことが明らかになった。リパーゼ分子の表面は疎水性部分と親水性部分とから構成されていて、一種の両親媒性化合物とみなすことができ、HLB 値でいうと、リパーゼ P およびリパーゼ A は小さな HLB 値を、一方、PPL およびリパーゼ C は大きな HLB を有している。したがって、リパーゼの疎水性に近い HLB 値を有するジェミニ型界面活性剤ほどリパーゼに親和性があり、高活性の複合体を与えるものと考えられる。なお、親水性のリパーゼでは糖脂質の BIL2C₁₆CA や BIL2C₁₈CA もかなり優れた修飾剤である⁸⁾。

また、修飾に用いたジェミニ型界面活性剤の HLB 値に対する界面活性剤-リパーゼ複合体の不斉選択性の依存性も同様に調べた。

その結果を図 4.6 にまとめた。

PPL では高 HLB のジェミニ型界面活性剤で複合化すると不斉選択性はわずかに低下するが、他のリパーゼでは向上し、特にリパーゼ C とリパーゼ A では高 HLB の BIL2C₁₆CA と BIL2C₁₈CA で大幅な不斉選択性の増加がみられた。これは糖環の存在がリパーゼによっては大きな酵素分子の柔軟性の変化を引き起こしているためと推測される¹⁴⁾。

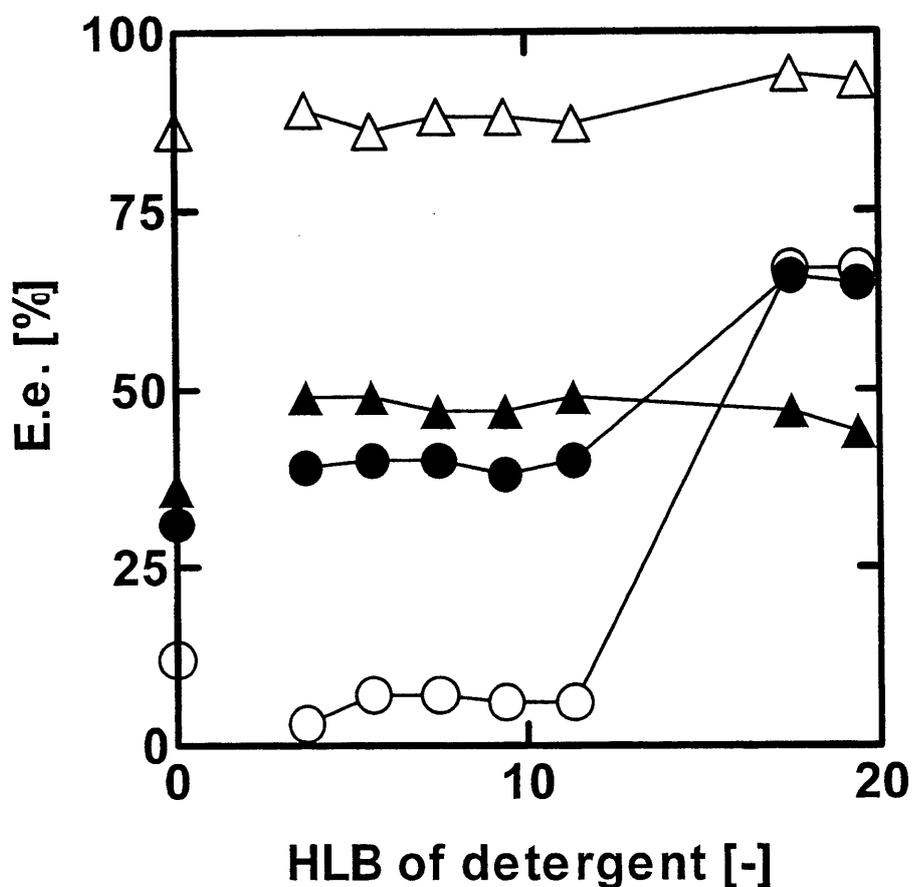


Figure 4.6 The dependencies of the enantioselectivity of the detergent-lipase complexes on the HLB value of detergent in the transacetylation between rac-sulcatol or racemic solketal with vinyl or isopropenyl carboxylate in organic solvent: (○) Lipase A, racemic solketal; vinyl butyrate, diisopropyl ether; (●) Lipase C, racemic solketal, vinyl butyrate, cyclohexane; (△) Lipase P, racemicsulcatol, isopropenyl acetate, diisopropenyl ether; (▲) PPL, racemic solketal, vinyl butyrate, diisopropyl ether. The data for the results of a control experiment, which was conducted with same enzyme content of the native powder lipase, were plotted on the ordinate.

4. 4 結言

本章で得られた知見は次のように要約される。

- (1) 既往の酵素修飾用疎水性界面活性剤の親水基を倍加させた形のジェミニ型界面活性剤 BIG2C_nCA および BIL2C_nCA を新規に合成し、それら高 HLB 界面活性剤の水溶性を利用した簡便なリパーゼ類の水相疎水化修飾法（水相脂質被覆法）を開発した。この調製法では酵素は定量的に回収できる。
- (2) 水相脂質被覆法で調製したジェミニ型界面活性剤-リパーゼ複合体は概して、既往の疎水性界面活性剤の 2C₁₂GE あるいは 2C₁₈ Δ⁹GE で水相脂質被覆して調製したリパーゼ複合体よりも有機溶媒中で高活性であった。
- (3) この水相脂質被覆法でも脂質 vs. リパーゼの混合モル比が、得られる界面活性剤-リパーゼ複合体の酵素活性に大きく影響し、リパーゼ P およびリパーゼ A ではモル比 100、リパーゼ C および PPL でモル比 200 が適当であることが分かった。これらの値は水相中でのリパーゼとジェミニ型界面活性剤との疎水相互作用が最大に達する複合体組成を示しており、懸濁系脂質被覆法との機構的相同性が示唆された。
- (4) 界面活性剤の HLB 値 9.4 の BIG2C₁₂CA がリパーゼ P およびリパーゼ A に、また、HLB 値 11.3 の BIG2C₁₀CA が PPL およびリパーゼ C に対して最適であることが分かり、酵素の表面疎水性に近い疎水性を有する界面活性剤が適合性が良いことが示唆された。

4. 5 参考文献

- 1) W. Tsuzuki, Y. Okahata, O. Katayama and T. Suzuki, "Preparation of organic-solvent-soluble enzyme (lipase B) and characterization by gel permeation chromatography", *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1245-1247 (1991).
- 2) W. Tsuzuki, H. Kasumimoto and S. Kobayashi, "Use of a synthetic detergent to partition protein mixtures", *Analyst*, **118**, 131-135 (1993).
- 3) A.M. Blinkovsky, Y.L. Khmel'nitsky and J.S. Dordick, "Organosoluble enzyme-polymer complexes: A novel type of biocatalyst for nonaqueous media", *Biotechnol. Tech.*, **8**, 33-38 (1994).
- 4) S. Okazaki, N. Kamiya, K. Abe, M. Goto and F. Nakashio, "Novel preparation method for surfactant-lipase complexes utilizing water in oil emulsions", *Biotech. Bioeng.*, **55**, 455-460 (1997).
- 5) K. Abe, M. Goto and F. Nakashio, "Surfactant-chymotrypsin complex as a novel biocatalyst in organic media", *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 555-560 (1997).
- 6) L.M. Hjelmeland, W.A. Klee and J.C. Osborne, "A new class of nonionic detergents with a gluconamide polar group", *Anal. Biochem.*, **130**, 485-490 (1983).
- 7) Z. Zhang, K. Fukunaga, Y. Sugimura, K. Nakao and T. Shimizu, "Synthesis of glycolipids: dialkyl N-[N-(4-lactonamidobutyl) succinamoyl]-L-glutamates", *Carbohydr. Res.*, **290**, 225-232 (1996).
- 8) K. Fukunaga, Y. Sugimura, R. Taniyama and K. Nakao, "Studies on lipid-coating of lipases with galactolipids", *Book of Abstracts of 8th European Congress on Biotechnology*, p.386 (1997).
- 9) T.-F. Wang, J.J. Lalonde, M. Momongan, D.E. Bergbreiter and C.-H. Wang, "Lipase-catalyzed irreversible transesterifications using enol ester as acylating reagents: Preparative enantio- and regioselective synthesis of alcohols, glycerol derivatives, sugar, and organometallics", *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7200-7205 (1988).
- 10) C. Laane, S. Boeren, K. Vos and C. Veager, "Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents", *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 81-87 (1987).

- 11) H. Michel, "Crystallization of membrane proteins", *Trend. Biochem. Sci.*, **8**, 56-59 (1983).
- 12) W.G. Griffin, "Classification of surface-active agents by "HLB"", *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **1**, 311-326 (1949).
- 13) J.T. Davies, in: *Interfacial Phenomena*, Academic Press., p.374 (1961).
- 14) D.B. Volkin and A.M. Klibanov, "Mechanism of thermoactivation of immobilized glucose isomerase", *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 1104-1111 (1989).

【第5章】 結論

酵素の有機溶媒可溶化法のうち、実用性の高い脂質被覆法 (lipid-coating method)、すなわち疎水性界面活性剤と酵素の複合化による酵素の疎水性修飾法について5種類のリパーゼを対象酵素として用いて研究を行った。

まず、懸濁系脂質被覆法では Langmuir 型の吸着等温式に類似した複合化等温式で $2C_{18} \Delta^{\circ}GE$ を用いたリパーゼ類の脂質被覆を定量化することができ、各リパーゼに対する結合サイト数 (n)、複合化定数 (K) のパラメーター値を求めた。そして、得られた複合化等温式から各リパーゼに対する飽和脂質被覆率、 $2C_{18} \Delta^{\circ}GE$ の飽和結合モル数を求めることができ、リパーゼでもその起源によって脂質被覆の程度に大きな差異があることを明らかにした。また、複合化等温式から脂質被覆条件に対応して得られる界面活性剤-リパーゼ複合体の量と被覆率、したがって、組成が予測でき、希望する酵素含量の界面活性剤-リパーゼ複合体の調製条件を設定することが可能になった。

次に、この懸濁系脂質被覆法は水不溶性の疎水性界面活性剤分子と、水相中に溶解している酵素タンパク質分子との疎水性相互作用による自発的な会合によっているため、リパーゼの表面特性によりその脂質被覆挙動が左右されるのではないかとの想定のもとに、水性二相分配法によるリパーゼ類の表面疎水性 (HFS) および局所疎水性の測定を行った。測定したリパーゼ類ではリパーゼ P (HFS: +31.6kJ/mol) が最も疎水性で、リパーゼ R_a (HFS: -21.1kJ/mol)、リパーゼ A (HFS: -24.7kJ/mol) およびリパーゼ R_b (HFS: -28.1kJ/mol) は弱い疎水性、PPL (HFS: -82.4kJ/mol) およびリパーゼ C (HFS: -124kJ/mol) は親水性であることが分かった。また、局所疎水性 (LH) はリパーゼ類の中では、リパーゼ C (LH: 0.50kJ/mol) のみに存在し、他のリパーゼは0であった。リパーゼ類の表面疎水性 (HFS) と懸濁系脂質被覆法における脂質被覆率を相関して表面疎水性の大きい酵素ほど脂質被覆されやすいこと、酵素が脂質被覆されるには BSA の HFS の -205kJ/mol より大きい表面疎水性を有する必要性があること、また、一般に酵素の表面疎水性と native 酵素の有機溶媒中での酵素活性にも相関することを明らかにした。

そして、酵素の回収率が低い懸濁系脂質被覆法の代わりに、水溶性のジェミ

ニ型界面活性剤、BIG2C_nCA (n=10, 12, 14, 16, 18) および BIL2C_nCA (n=16, 18)、を用いる酵素の水相脂質被覆法を開発した。この方法では水相で界面活性剤と酵素を混合溶解後、凍結乾燥で界面活性剤-酵素複合体を取り出すだけなので、酵素と脂質の回収率は定量的で、しかも、既往の懸濁系脂質被覆法の改良法と異なり、有機溶媒が不用である。この水相脂質被覆法で調製した界面活性剤-リパーゼ複合体は有機溶媒中で高活性で、各リパーゼに対して最適界面活性剤/リパーゼ混合モル比が存在した。ジェミニ型界面活性剤の HLB 値 9.4 の BIG2C₁₂CA がリパーゼ P およびリパーゼ A に、また、HLB 値 11.3 の BIG2C₁₀CA が PPL およびリパーゼ C に対して最適で、酵素の表面疎水性に対応した疎水性の界面活性剤が親和性が大きく、この水相脂質被覆法では界面活性剤の水溶性は HLB の大きい方がよく、また、得られる複合体の有機溶媒中での酵素活性は界面活性剤の HLB が小さい方がよいと考えられるので、両者の折半した 9 ~ 12 の HLB 値を有するジェミニ型界面活性剤が適しているものと考えられる。

以上、本研究における成果は脂質被覆法によって各種の酵素から最も高性能の有機溶媒可溶化酵素を調製する際の指針と、少なくとも一部の手段を与えたものと思われ、今後の更なる進展が期待される。

研究発表論文

以上の内容は以下に示す論文として発表した。

(a) 査読のある雑誌等

- (1) **Y. Sugimura**, K. Fukunaga, T. Matsuno, K. Nakao, M. Goto, F. Nakashio,
"A study on the lipid-coating of lipases",
Biochemical Engineering Journal, **2**, 137-143 (1998)
(第2章に関連)
- (2) **Y. Sugimura**, K. Fukunaga, T. Matsuno, K. Nakao, M. Goto, F. Nakashio,
"A study on the surface hydrophobicity of lipases",
Biochemical Engineering Journal, **3**, (1999) in press.
(第3章に関連)
- (3) K. Fukunaga, N. Maruoka, **Y. Sugimura**, K. Nakao, T. Shimizu,
"Preparation of the gemini detergent-lipase complexes and their high enzymatic
activities in the transesterifications in homogeneous organic solvents",
Biotechnology Letters, **20**, 1161-1165 (1998)
(第4章に関連)

(b) 国内、国際会議の会議録

- (1) K. Fukunaga, N. Maruoka, K. Samezima, K. Nakao, **Y. Sugimura**,
"Preparation of the gemini detergent-lipase complexes and their enzymatic
activities in organic solvent",
化学工学シンポジウムシリーズ, **70**, 110-114 (1999)
(第4章に関連)

また、以下に示す参考論文として発表した。

(a) 査読のある雑誌等

- (1) Z. Zhang, K. Fukunaga, **Y. Sugimura**, K. Nakao, T. Shimizu,
"Synthesis of glycolipids: dialkyl N-[N-(4-lactonamidobutyl)succinamoyl]-L-
glutamate", Carbohydrate Research, **290**, 225-235 (1996)

- (2) Z. Zhang, K. Fukunaga, **Y. Sugimura**, K. Nakao, T. Shimizu,
"Synthesis of glycolipids containing disaccharides and two longer alkyl chains and
their applications as enzyme modifiers",
Carbohydrate Research, **292**, 47-59 (1996)
- (3) K. Fukunaga, N. Minamijima, **Y. Sugimura**, Z. Zhang, K. Nakao,
"Immobilization of organic solvent-soluble lipase in nonaqueous conditions and
properties of the immobilized enzymes",
Journal of Biotechnology, **52**, 81-88 (1996)
- (b) 国内、国際会議の会議録
- (1) 福永公寿, 張忠智, 杉村佳昭, 中尾勝實,
"固定化有機溶媒可溶化リパーゼの調製とその特性",
Bioche Newsletter, **11**, 11-16 (1995)
- (2) K. Fukunaga, N. Minamijima, **Y. Sugimura**, Z. Zhang, K. Nakao,
"Immobilization of lipid-coated enzymes: Some studies with lipases as model
system",
Abstract Book of 7th European Congress on Biotechnology, Volume **2**,
p.63 (1995)
- (3) K. Fukunaga, **Y. Sugimura**, R. Taniyama, K. Nakao,
"Studies on lipid-coating of lipases with galactolipids",
Book of Abstract 8th European Congress on Biotechnology, p.386 (1997)
- (4) K. Fukunaga, **Y. Sugimura**, S. Azukizawa, M. Nishie, K. Nakao,
"Micellaneous reduction of fluoroketones by baker's yeast",
化学工学シンポジウムシリーズ, **61**, 55-59 (1998)

謝辞

本論文をまとめるに際し、終始変わらぬ御指導、御鞭撻を賜りました山口大学工学部教授中尾勝實先生、同助教授福永公寿先生に心より感謝の意を表します。

また、本論文に対し御指導、御討論を戴きました山口大学工学部教授岡本健一先生、同教授西澤義矩先生、同教授大石勉先生に深く感謝致します。

次に本研究の実験に多大なる御指導を戴きました通産省工業技術院物質工学研究所有機機能解析研究室長清水敏美先生、九州大学工学部助教授後藤雅宏先生、熊本工業大学工学部教授中塩文行先生、そして、大阪大学大学院教授久保井亮一先生に深く感謝致します。

共同研究者として実験に御協力戴きました張忠智氏、南島昇氏、石井憲一氏、松野貴弘氏、賀儀山善隆氏、上戸章吾氏、清水修一氏、谷山隆一氏、日隈和也氏、伊東恭子氏、岡田貴司氏、中村博臣氏、山手修氏、小豆澤修一氏、丸岡伸明氏、鮫島健一氏、岑友里恵氏に深く感謝致します。

最後に沢山のリパーゼ類とそのデータを頂きました天野製薬（株）田中英郎氏に厚く御礼申し上げます。

