

### 9713 多孔性膜に多層吸着させた食品タンパク質をNaCl水溶液を使って高濃縮率かつ高速で溶出させる手法の開発

助成研究者：斎藤 恭一 (千葉大学 工学部)

タンパク質の精製法として、選択吸着基(リガンド)をもつ多孔性中空糸膜を用いた対流支援型のタンパク質回収法が提案されている。この方法では、多孔性中空糸膜にタンパク質溶液を透過させることによって、内部孔の表面に固定されたリガンドへのタンパク質の拡散移動抵抗を最小にすることができるので、ビーズ充てんカラムと比較して、タンパク質を高速で回収できる。また、中空糸膜を束ねた膜モジュールを作製することによってタンパク質回収のスケールアップも容易である。

鶏卵卵白は食品タンパク質溶液の代表例であり、リゾチームをはじめとして医療に役立つタンパク質を含んでいる。本研究では、卵白タンパク質として、ほぼ同一の重量割合で含まれているオボトランスフェリン(OTf; 分子量:76,600, 等電点:6.1, 卵白タンパク質中での組成:12 wt%) およびオボムコイド(OM; 分子量:28,000, 等電点:4.1, 卵白タンパク質中での組成:11 wt%) をモデルタンパク質として選択した。

アニオン交換基としてジエチルアミノ基および2-ヒドロキシエチルアミノ基を有するグラフト高分子鎖を多孔性中空糸膜の細孔表面に固定した。得られた多孔性イオン交換中空糸膜へのタンパク質の吸着特性およびNaCl水溶液によるタンパク質の膜からの溶出特性を、2種類の卵白タンパク質(OTf および OM) 溶液をこの中空糸膜に透過させて調べた。単一タンパク質および二成分タンパク質の破過曲線の測定から、つぎのことがわかった。

タンパク質がグラフト高分子鎖へ多層で吸着され、高容量でのタンパク質回収が可能になった。引き続きNaCl水溶液を膜に透過させることによって、タンパク質が多層で吸着していること、およびタンパク質の拡散移動抵抗が無視できることという2つの理由から、高濃縮率かつ高速での溶出を実現できた。

二成分タンパク質の透過実験から、膜に吸着していたOTfに換わって選択吸着性のより高いOMが吸着するという置換吸着が起きることがわかった。タンパク質溶液の透過流量を変えても無次元流出液量とタンパク質の吸着量との関係を示す曲線は一致した。これより、タンパク質がアニオン交換基まで拡散移動する過程の抵抗が無視でき、さらにOTfとOMとの間での置換吸着が十分速いことが示された。



### 9713 多孔性膜に多層吸着させた食品タンパク質をNaCl水溶液を使って高濃縮率かつ高速で溶出させる手法の開発

助成研究者：斎藤 恭一 (千葉大学 工学部)

#### 1. 研究目的

タンパク質の精製法として、選択吸着基(リガンド)をもつ多孔性中空糸膜を用いた対流支援型のタンパク質回収法が提案されている<sup>1-3)</sup>。この方法では、多孔性中空糸膜にタンパク質溶液を透過させることによって、内部孔の表面に固定されたリガンドへのタンパク質の拡散移動抵抗を最小にすることができるので、ビーズ充てんカラムに比較して、タンパク質を高速で回収できる<sup>4,5)</sup>。また、中空糸膜を束ねた膜モジュールを作製することによってタンパク質回収のスケールアップも容易である<sup>6)</sup>。

これまでに放射線グラフト重合法を適用して、多孔性中空糸膜にアニオン交換基<sup>3,4)</sup>またはカチオン交換基<sup>5)</sup>を有するグラフト高分子鎖が固定された。膜厚が約1mmの中空糸膜の細孔の内面から外面まで均一にイオン交換基を有する高分子鎖が配置された。その細孔に単一タンパク質溶液を透過させるとタンパク質がグラフト高分子鎖へ多層で吸着することが見いだされた。

イオン交換基をもつ多孔性中空糸膜を用いた食品タンパク質の回収を実用化するには、多成分タンパク質溶液を透過させたときの吸着挙動を明らかにする必要がある。Weinbrenner and Etzel<sup>7)</sup>は、スルホプロピル基をもつカチオン交換多孔性平膜に、 $\alpha$ -lactalbumin (ALA)と bovine serum albumin (BSA)の二成分タンパク質溶液を透過させた。透過量の増加に伴い競争吸着によってALAがBSAによって置換されることを報告している。また、Suen<sup>8)</sup>は、(1)BSAをリガンドとしてもつアフィニティ多孔性平膜に二種類のモノクローナル抗体、および(2)pepstatinをリガンドとしてもつアフィニティ多孔性平膜に二種類のタンパク質(chymosinとpepsin)という二つのアフィニティの組み合わせについて吸着回収の速度論的考察を行っている。

鶏卵卵白は食品タンパク質溶液の代表例であり、リゾチームをはじめとして医療に役立つタンパク質を含んでいる。本研究では、卵白タンパク質として、ほぼ同一の重量割合で含まれているオボトランスフェリン(OTf; 分子量:76,600, 等電点:6.1, 卵白タンパク質中での組成:12wt%)およびオボムコイド(OM; 分子量:28,000, 等電点:4.1, 卵白タンパク質中での組成:11wt%)を選択した。

本研究の目的は、(1)多孔性中空糸膜への単一タンパク質の吸着特性そしてNaCl水溶液によるタンパク質の膜からの溶出特性を調べること、および(2)二成分タンパク質の吸着特性を単一タンパク質のそれと比較することである。吸着材には、ジエチルアミノ基(-N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>)をアニオン交換基としてもつ多孔性中空糸膜を用いた。タンパク質をpH8の緩衝液に溶かして用いるので、OTfもOMもマイナスに荷電し、膜へイオン交換吸着する。

## 2. 研究方法

### 2.1 アニオン交換多孔性中空糸膜の作成

基材として、ポリエチレン製多孔性中空糸膜(旭化成工業株式会社製)を用いた。中空糸膜の内径、外径、空孔率および平均孔径はそれぞれ2.4 mm, 3.1 mm, 70%および0.35  $\mu\text{m}$ である。グリシジルメタクリレート(GMA,  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_2\text{CHOCH}_2$ )を東京化成工業(株)から購入しそのまま用いた。

アニオン交換多孔性中空糸膜の作成経路をFig. 1に示す。作成はつぎの4段階(Fig. 1中の(1)~(4))からなり、Tsuneda et al.<sup>4,9)</sup>の方法に従った。(1) まず、基材に、電子線を照射してラジカルを生成させた。(2) つぎに、そのラジカルを開始点としてGMAを接ぎ木(以後グラフトと呼ぶ)重合させた。このときの重量増加率をグラフト率としてつぎのように定義した。

$$\text{グラフト率} [\%] = 100 (\text{グラフト高分子鎖の重量}) / (\text{基材の重量}) \quad (1)$$

ここでは、グラフト率を140%に設定した。

(3) さらに、グラフト高分子鎖中のエポキシ基とジエチルアミンとの反応によってジエチルアミノ(DEA)基(- $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ )を導入した。ここでは、タンパク質を多層で吸着させる<sup>4)</sup>ために、GMA中のエポキシ基の65モル%をDEA基へ変換した。(4) 最後に、残りのエポキシ基をエタノールアミンとの反応によって2-ヒドロキシエチルアミノ(EA)基(- $\text{NHC}_2\text{H}_5\text{OH}$ )に変換した。

### 2.2 膜へのタンパク質の吸着

OTfまたはOMの単一タンパク質溶液を、長さ7 cmのイオン交換多孔性中空糸膜の内面から外面へ一定の圧力(0.02 MPa)下で透過させた(Fig. 2)。OTfおよびOMはそれぞれSigma製およびナカライテスク製を用いた。タンパク質をTris-HCl緩衝液(pH 8.0)に溶かした。単一タンパク質溶液では、濃度を0.4 g/Lとした。これらの溶液を多孔性膜への供給液とした。外面からの流出液のOTfとOMの濃度を流出液量の関数として追跡した。230および280 nmの吸光度を測定し、タンパク質を定量した。実験は常温で行った。

吸着操作に引き続き、細孔内の洗浄操作、吸着タンパク質の溶出操作を行った。洗浄液にはTris-HCl緩衝液を、溶出液には、0.5 M NaClを含むTris-HCl緩衝液を用いた。比較のため、二成分タンパク質(OTfおよびOM)溶液を用いて破過曲線を得た。二成分タンパク質溶液では、それぞれの濃度を0.1 g/Lとした。また、透過圧力を0.01および0.09 MPaとした。

得られる破過曲線から、供給液濃度に対するそれぞれのタンパク質の膜への平衡吸着量をつぎの式から算出した。

$$\text{平衡吸着量} [\text{g/g}] = \int_0^{V_s} (C_0 - C) dV/W \quad (2)$$

ここで、 $C_0$ および $C$ は、それぞれ供給液および流出液中のタンパク質濃度 [g/L] である。また、 $V$ 、 $V_s$ および $W$ は、それぞれ流出液量 [L]、 $C=C_0$ となる流出液量 [L] および膜重量 [g] である。

### 3. 研究結果と考察

#### 3.1 単一タンパク質の吸着および溶出特性

OTf または OM 溶液をイオン交換多孔性中空糸膜に透過させたときの破過曲線および溶出曲線をそれぞれ Figs. 3 (a), (b) に示す。ここで、横軸は、流出液量を中空部分を除く膜体積で割った値で定義される無次元流出液量 (DEV) である。一方、縦軸は、流出液タンパク質濃度を供給液タンパク質濃度で割った値で定義される無次元タンパク質濃度 ( $C/C_0$ ) である。Fig. 3 (a)で、DEV の値が 230 までは吸着操作、DEV の値が 230~360 および 360~400 の範囲がそれぞれ洗浄および溶出操作で得られるタンパク質の濃度変化である。

Fig. 3 (a), (b)から式(2)に従って算出される供給液濃度  $C_0$  に対する OTf および OM の膜への平衡吸着量はそれぞれ 0.037, 0.067 g/g であった。つぎの式で算出される単層吸着量を算出し、単層吸着量に対する平衡吸着量の比で定義される吸着積層数を求めた。

$$\text{単層吸着量 [g/g]} = (a_v M_r) / (a N_A) \quad (3)$$

ここで、 $a_v$ は窒素吸着法によって測定された膜の比表面積 [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]、 $a$  および  $M_r$  はタンパク質の占有面積 [ $\text{m}^2$ ] および分子量、 $N_A$  はアボガドロ数である。ここでタンパク質の占有面積は、タンパク質を球状とみなして分子量から得られるストークス半径  $r_s$  を算出し<sup>10)</sup>、さらに、それを表面に最密充填したと仮定してつぎの式から求めた。

$$r_s [\text{m}] = kT / (6 \pi D_w \mu_w) \quad (4)$$

$$a [\text{m}^2] = \pi r_s^2 / 1.15 \quad (5)$$

ここで、 $k$  および  $T$  はボルツマン定数 [ $(\text{kg m}^2)/(\text{s}^2 \text{K})$ ] および温度 [K]、 $D_w$  および  $\mu_w$  はタンパク質の純水中の拡散定数 [ $\text{m}^2/\text{s}$ ] および純水の粘度 [ $\text{kg/ms}$ ] で、293 K での値を用いた。OTf および OM の  $D_w$  は、それぞれ  $5.7 \times 10^{-11}$  および  $6.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  である<sup>11)</sup>。OTf および OM の  $r_s$  は、それぞれ  $3.8 \times 10^{-9}$  および  $2.6 \times 10^{-9} \text{ m}$  と算出された。OTf および OM の単層吸着量は、それぞれ 0.019, 0.014 g/g、このとき吸着積層数は、それぞれ 1.9 (層の高さ 14 nm)、4.7 (24 nm) となった。

Fig. 3 に示すように、膜に吸着したどちらのタンパク質も 0.5 M NaCl を含む Tris-HCl 緩衝液を用いてすべて溶出された。タンパク質が多層で吸着していることおよび

タンパク質の拡散移動抵抗が無視できるという2つの理由から、高濃縮率かつ高速での溶出が示された。

### 3.2 二成分タンパク質の吸着特性

二成分タンパク質溶液を、透過圧力0.01 MPaのもとで中空糸膜に透過させて得られる破過曲線を Fig. 4 に示す。破過点を  $C/C_0=0.1$  と定義すると、OTf および OM の破過点での DEV はそれぞれ 55 および 150 であった。また、流出液中の OTf 濃度は  $DEV=75$  で供給液中のそれを越え、 $DEV=120$  でピークとなり、 $DEV=180$  で  $C_0$  に戻った。このとき流出液中の OM 濃度も  $C_0$  に達した。

破過曲線から算出される吸着量を流出液量の関数として Fig. 5 に示す。OTf の吸着量は  $DEV=75$  から減少した。 $C_0$  (0.1 g/L) に対する OTf と OM の平衡吸着量は、それぞれ 0.0066, 0.051 g/g となった。これらのことから OM が OTf に比べて選択的に膜に吸着することがわかる。タンパク質のイオン交換基への選択吸着性は、その形、サイズ、表面電荷密度などによって決定される。この場合、pH 8.0 の緩衝液中では、OM (pI 4.1) の方が OTf (pI 6.1) に比べてマイナスの表面電荷密度が高くアニオン交換基により選択的に吸着されたと推察される。

OTf と OM の吸着積層数を Fig. 6 に示す。平衡吸着量に対応する吸着積層数は、それぞれ 0.3, 3.7 となった。このときグラフト高分子鎖中での二成分タンパク質の積層高さは 22 nm と算出された。単一タンパク質の実験で求められた OTf および OM のそれぞれの吸着積層の高さ 14 nm, 24 nm の範囲にあり、合理的な結果である。

アニオン交換多孔性中空糸膜の膜厚方向での二成分タンパク質の吸着挙動を考察した (Fig. 7)。まず、Figs. 4, 5 中の (○) の領域では、選択吸着性のより高い OM がより膜内面側に、OTf がそれを越えて膜外面側に多層で吸着する。つぎに、(□) の領域では、吸着していた OTf に換わって OM が吸着 (置換吸着) するため、OTf の流出液濃度は供給液濃度を越える。さらに、(△) の領域では、吸着平衡に達し、二成分ともに見かけ上吸着しない。Konishi et al.<sup>12)</sup> は、金属イオン捕集基としてイミノジ酢酸基を有するキレート多孔性中空糸膜にコバルトおよび銅イオンを含む二成分金属イオン溶液を透過させて、X線マイクロアナライザーを使って、膜内での金属イオンの吸着量の膜厚方向分布を直接に測定し、イミノジ酢酸基との錯体の安定度定数の大きい銅イオンが吸着していたコバルトイオンに換わって吸着するという置換吸着現象を実証した。二成分タンパク質でも二成分金属イオンと同様の膜への吸着挙動を示すことが推察される。

透過圧力、すなわち二成分タンパク質溶液の流量を変化させて (0.01 および 0.09 MPa)、吸着実験を行った。Fig. 8 に示すように、透過流量を変えても、無次元流出液量とタンパク質の吸着量との関係を示す曲線は一致した。このことは、タンパク質がグラフト高分子鎖中のアニオン交換基へ拡散移動する過程の抵抗が無視できること、および OTf と OM との間の置換が瞬時に起きることを示している。これは理想的な吸着特性である。

## 4. まとめ

アニオン交換基としてジエチルアミノ基および 2-ヒドロキシエチルアミノ基を有するグラフト高分子鎖を多孔性中空糸膜の細孔表面に固定した。得られた多孔性イオン交換中空糸膜へのタンパク質の吸着特性および NaCl 水溶液によるタンパク質の膜からの溶出特性を、オボトランスフェリン (OTf) およびオボムコイド (OM) という 2 種類の卵白タンパク質溶液をこの中空糸膜に透過させて調べた。単一タンパク質および二成分タンパク質の破過曲線の測定から、つぎのことがわかった。

タンパク質がグラフト高分子鎖へ多層で吸着され、高容量でのタンパク質回収が可能になった。引き続き NaCl 水溶液を膜に透過させることによって、タンパク質が多層で吸着していること、およびタンパク質の拡散移動抵抗が無視できることという 2 つの理由から、高濃縮率かつ高速での溶出を実現できた。

二成分タンパク質の透過実験から、膜に吸着していた OTf に換わって選択吸着性のより高い OM が吸着するという置換吸着が起きることがわかった。タンパク質溶液の透過流量を変えても無次元流出液量とタンパク質の吸着量との関係を示す曲線は一致した。これより、タンパク質がアニオン交換基まで拡散移動する過程の抵抗が無視でき、さらに OTf と OM との間での置換吸着が十分速いことが示された。

## 5. 文献

- 1) S. Brandt, R. A. Goffe, S. B. Kessler, J. L. O'Connor, S. E. Zale, *Bio/Technol.*, 6, 779(1988).
- 2) H. Iwata, K. Saito, S. Furusaki, T. Sugo, J. Okamoto, *Biotechnol. Prog.*, 7, 412(1991).
- 3) S. Matoba, K. Saito, S. Furusaki, T. Sugo, *Bio/Technol.*, 13, 795(1995).
- 4) S. Tsuneda, K. Saito, S. Furusaki, T. Sugo, *J. Chromatogr.*, 689, 211(1995).
- 5) S. Tsuneda, H. Shinano, K. Saito, S. Furusaki, T. Sugo, *Biotechnol. Prog.*, 10, 76(1994).
- 6) N. Kubota, Y. Konno, K. Saito, K. Sugita, K. Watanabe, T. Sugo, *J. Chromatogr. A*, 782, 159(1997).
- 7) W. F. Weinbrenner, M. R. Eitzel, *J. Chromatogr. A*, 662, 414(1994).
- 8) S. Suen, *Chem. Eng. Sci.*, 48, 1801(1993).
- 9) S. Tsuneda, K. Saito, S. Furusaki, T. Sugo, I. Ishigaki, *J. Membrane Sci.*, 71, 1(1992).
- 10) R. B. Bird, W. E. Stewart, E. N. Lightfoot, "Transport Phenomena", John Wiley & Sons, New York(1960), pp. 514.
- 11) 日本化学会編, 生化学データブック., 東京化学同人 (1979).
- 12) S. Konishi, K. Saito, S. Furusaki, T. Sugo, *J. Membrane Sci.*, 111, 1(1996).

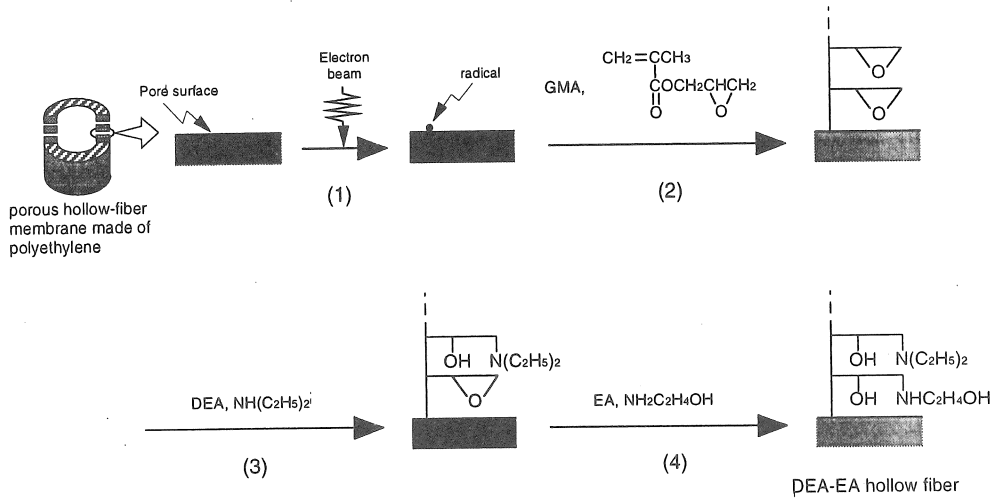


Fig. 1 Preparation scheme of a porous hollow-fiber membrane containing diethylamino and 2-hydroxyethylamino groups.

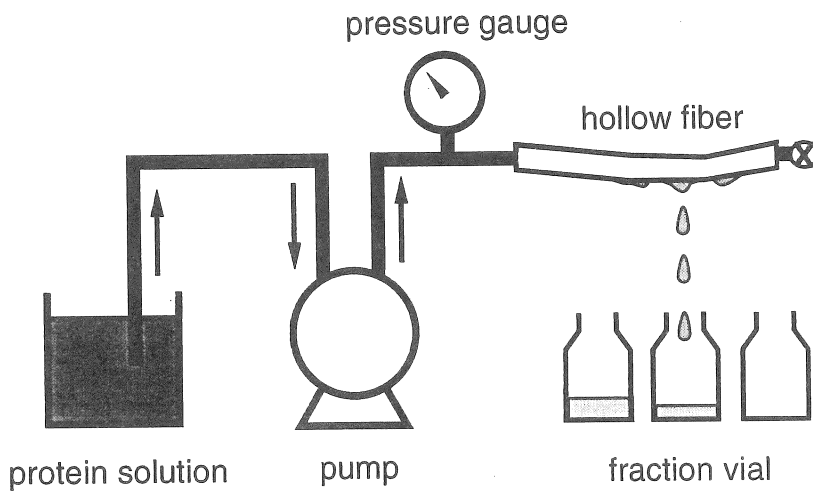
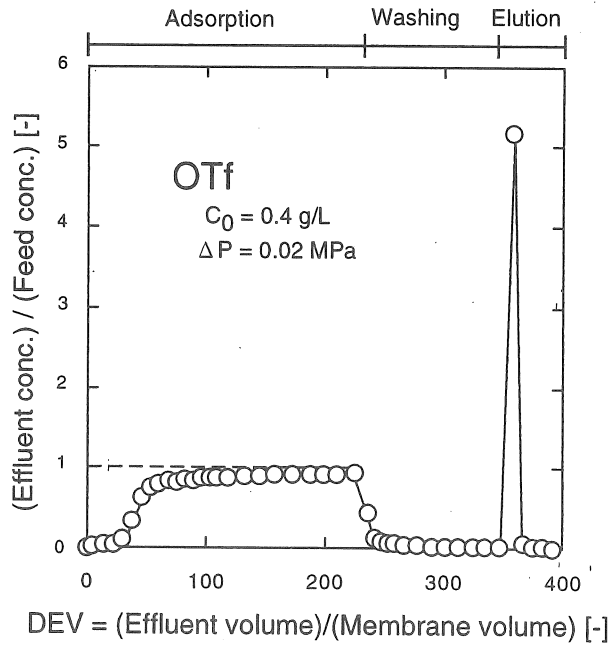
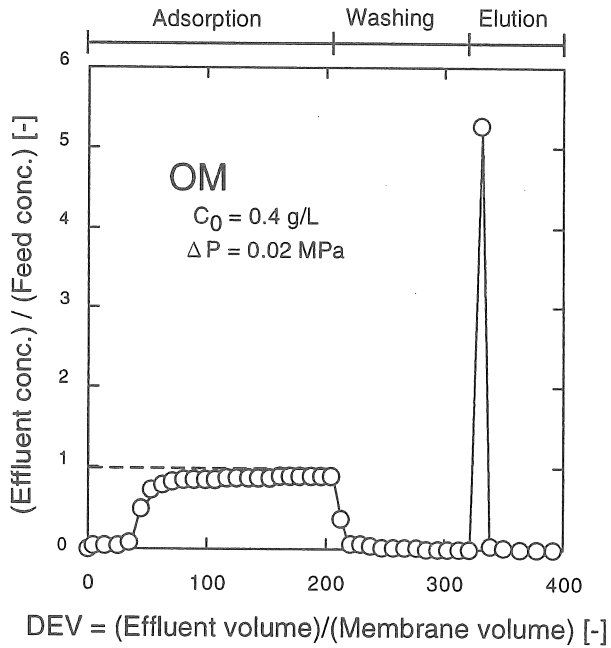


Fig. 2 Experimental apparatus for permeation of protein solution through the hollow-fiber membrane.





(a) ovotransferrin



(b) ovomucoid

Fig. 3 Breakthrough and elution curves for a single protein.

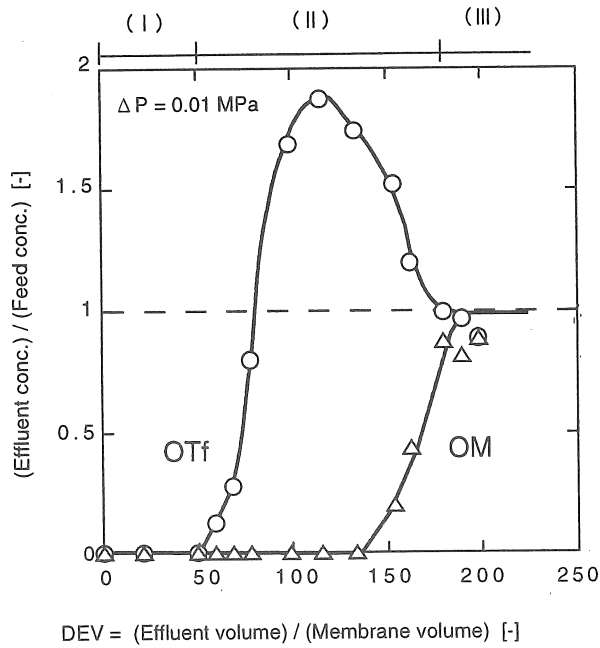


Fig. 4 Breakthrough curves for the binary protein system.

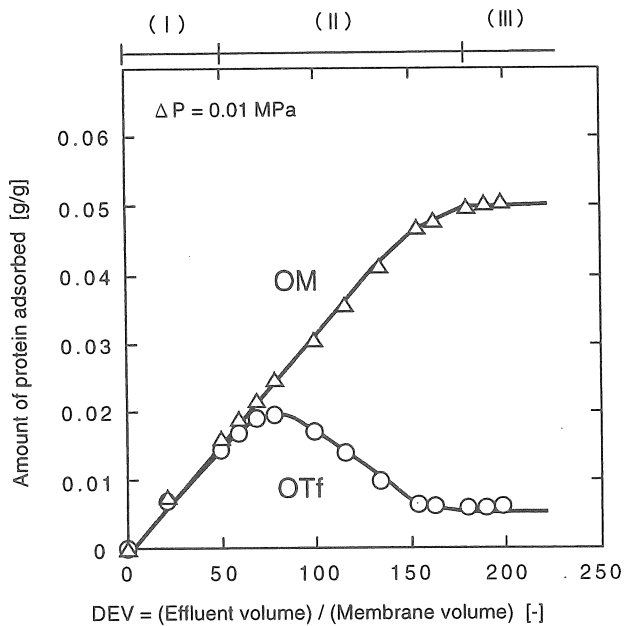


Fig. 5 Amount of protein adsorbed onto the membrane as a function of dimensionless effluent volume (DEV).

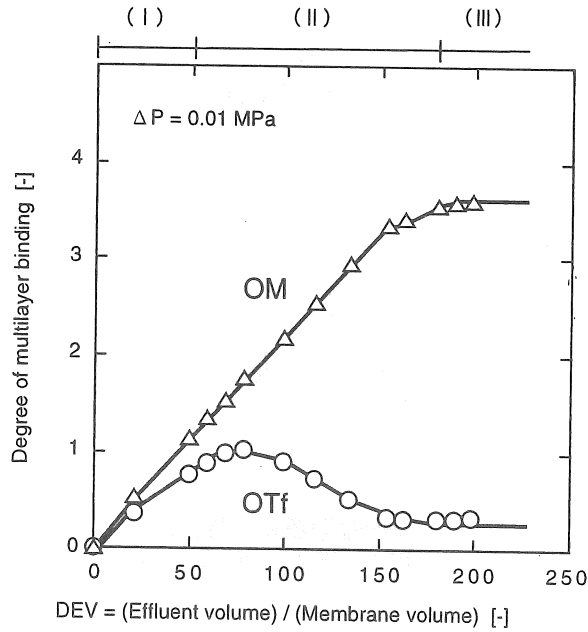


Fig. 6 Degree of multilayer binding of protein vs DEV.

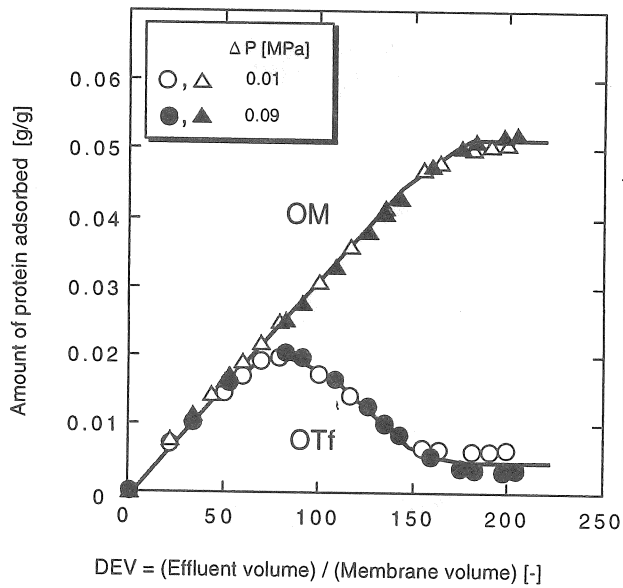


Fig. 8 Dependence of amount of protein adsorbed on permeation pressure across the membrane.

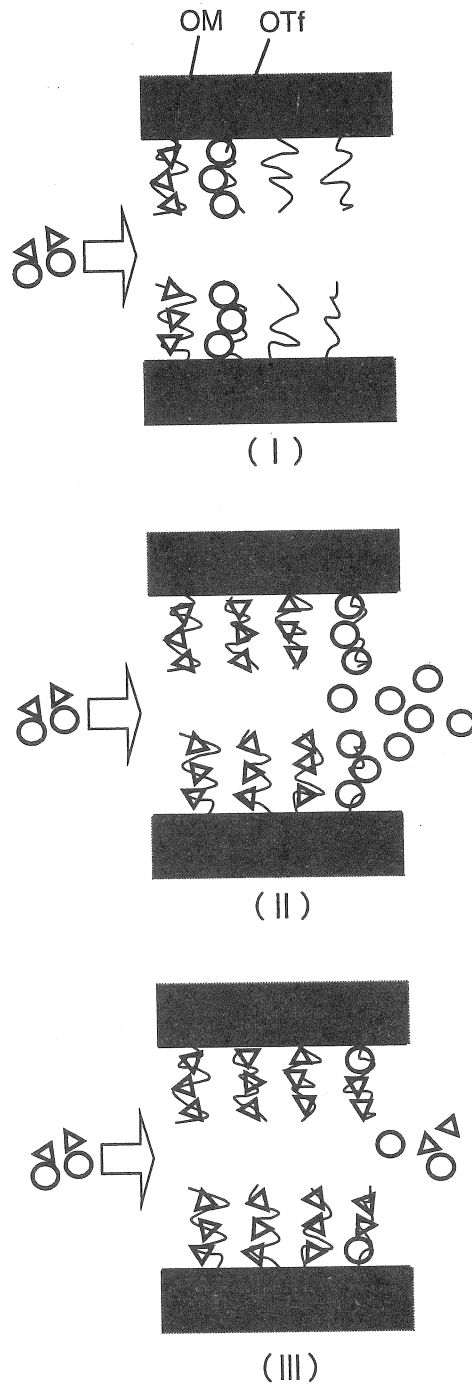


Fig. 7 Illustration of adsorption behavior of proteins by the anion-exchange-group-containing polymer chains grafted onto a porous hollow-fiber membrane.

## Development of High-Performance Elution of Proteins Adsorbed in Multilayers onto Porous Hollow-Fiber Membrane with NaCl Aqueous Solution

Kyoichi Saito

Department of Specialty Materials, Faculty of Engineering  
Chiba University

### *Summary*

Convection-aided recovery of proteins using the porous membranes immobilizing ligands has been suggested. This recovery method will enable a high-rate processing of the proteins because the diffusional path of the protein to the ligand immobilized by the polymer chain grafted on the pore surface of the porous membrane can be minimized due to the permeation, i.e., convective flow, of the protein solution through the pores. In addition, a linear scaleup of the protein recovery is demonstrated by bundling the single hollow-fiber membranes to form the membrane module.

Egg white contains various proteins applicable for pharmaceuticals. Here, ovotransferrin (OTf) (Mr; 76,600, pI; 6.1) and ovomucoid (OM) (Mr; 28,000, pI; 4.1) were selected as a model protein to clarify the adsorption and elution behavior during the permeation of the protein solution through the pores edged by the anion-exchange-group-containing polymer chains.

The polymer chains containing a diethylamino (DEA) and 2-hydroxyethylamino groups as an anion-exchange group were appended onto the pore surface of a porous hollow-fiber membrane. Breakthrough curves obtained for the permeation of a single protein solution showed that both proteins were bound in multilayers to the polymer chains expanding from the pore surface due to mutual electrostatic repulsion between the DEA groups. Subsequent elution with 0.5 M NaCl provided a high peak of the protein because of multilayer binding and negligible diffusional mass-transfer resistance.

A mixture of OTf and OM permeated through the pores of the membrane. An equilibrium overshooting, i.e., an OTf concentration in the effluent that is higher than that in the feed, indicates that OTf was displaced by OM. Overlapping of the adsorption curves for different flow rates of the OM protein solution demonstrates a negligible diffusional mass-transfer resistance of the proteins to the DEA group and instantaneous displacement of OTf by OM.