

氏 名	Zheng Shuang Ning 鄭 双 寧
授 与 学 位	工 学 博 士
学位授与年月日	平成 2 年 3 月 28 日
学位授与の根拠法規	学位規則第 5 条第 1 項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 化学工学専攻
学 位 論 文 題 目	連続式電気泳動法による各種両性電解質の 分離・濃縮に関する研究
指 導 教 官	東北大学教授 只木 楨力
論 文 審 査 委 員	東北大学教授 只木 楨力 東北大学教授 鈴木 睦 東北大学教授 宝澤 光紀 東北大学教授 松本 繁

論 文 内 容 要 旨

第 1 章 緒 言

近年, バイオテクノロジー技術の発展に伴い, 生物反応器を用いて, 各種生化学物質を生産する試みが多数行われるようになってきたが, この場合, 一般に, 目的物質の濃度が極めて低く, かつ類縁物質が共存している場合が多く, 高度の濃縮と不純物の除去が要求されることがしばしばである。従って, 生産コスト全体に占める分離精製コストの割合が極めて大きく, 分離操作の効率化が重要な課題となっている。

ところで, 生化学物質の多くは両性電解質である。すなわち, 解離平衡を保ちつつ, 酸性溶液中では主に陽イオン, 塩基性溶液中では主に陰イオン, また, また, ある pH 条件では, 見かけ上の電荷がゼロとなり, 中性分子として存在する。その実効電荷がゼロとなる pH は両性電解質の等電点と呼ばれ, 物質ごとに固有の値を有している。

この等電点あるいは実効移動度の差を利用して物質を分離する電気泳動法が, 従来より, 生化学物質の定性および定量分析手段として広く利用されているが, 近年, この電気泳動法を生化学物質の精製分離に応用しようとする気運が高まっている。

しかし, 従来の電気泳動装置の多くは分析用として開発されているため, その処理量は小さく, 且つ, 多くは回分式であり, 工業規模の分離装置としては, 自ずと限界があるのが実状である。操作効率を向上させるためには, 是非とも連続式の高効率大規模電気泳動装置を開発する必要がある。

工業装置へ拡大するに際しては、装置内における物質の移動現象を定量的に把握することが重要となる。Reisらは均一電位勾配，均一pH分布など極めて簡単な条件下で，解析解を誘導し，泳動装置内における物質の移動特性の予測を行っている。しかし，電気泳動の場合，理想的な条件を満たす場合は極めて少なく，その解析解の使用範囲はかなり制限されることとなる。

一方，大型電子計算機の普及に伴い，種々の移動現象を，近似を極力排した移動論方程式で記述し，数値解析することが一般化しつつある。Bierらのグループの研究はこれに属すが，回分式に限られ，連続式装置についての数値シミュレーションはあまり行われていない。

本研究は，以上の点に留意し，工業規模の連続式電気泳動装置設計のための基礎資料収集を目的として行った。すなわち，数値シミュレーション手法を用い，連続式電気泳動装置における物質移動現象を移動論の立場から解析することを試みると共に，その数学モデルおよび数値解析の妥当性を実験により検証した。そして，さらに各種両性電解質の濃縮および分離におよぼす各操作因子の影響を考察し，装置の最適設計および運転指針を得ようとした。

第2章 アミノ酸の濃縮

－ p-アミノ安息香酸およびグリシンを例として －

第2章では，低分子両性電解質であるp-アミノ安息香酸およびグリシンの連続濃縮過程を取り上げ，その現象を移動論方程式の差分数値解析ならびに実験の両面から考察した。

荷電粒子が電場の下で泳動する現象は物質収支式，電荷収支式，および電気的中性条件で表せるが，そこから得られる基礎方程式は強い非線形性を示し，解析解は得られない。更に，アミノ酸のような両性電解質は解離反応によっても各成分が複雑に相互作用するため，基礎式は一層複雑となる。

回分式電気泳動過程に対して，Svenssonは，擬定常状態を仮定し，電場を駆動力とする物質の泳動流束と，濃度勾配による分子拡散流束が等しくなることを利用して，解析解を誘導し，着目物質の濃度分布を得ている。しかし，彼の手法では擬定常状態に達するまでの情報，いわゆる過渡状態に関する情報は何も得られない。それに対し，Bierらは数値解析により，非定常泳動過程を計算しているが，回分式に留まっている。

本章では，移動論方程式モデルを構築し，その数値解析を行うとともに，モデルと解析法の妥当性を実験的に検証した。そして，理論および実験結果に基づき，アミノ酸の濃縮度におよぼす諸因子の影響について考察した。

その結果，連続泳動濃縮過程は濃縮領域と動的平衡領域とに分けられること，また，この動的平衡の存在により，アミノ酸の濃縮度には上限が存在することが明らかになった。

また，印加電圧および滞在時間を操作変数として種々の数値計算を行い，上述の予測を裏付ける結果を得た。さらに，アミノ酸の濃縮度におよぼす支持電解質濃度とアミノ酸自身の物理化学性質の影響を明らかにした。

第3章 二成分アミノ酸の分離

— p-アミノ安息香酸とヒスチジンの分離 —

第3章では連続式電気泳動法によるアミノ酸の分離過程を考察した。本章では、前章で確立した移動論方程式モデルを二成分アミノ酸（p-アミノ安息香酸とヒスチジン）の分離に拡張し、再びその適用性を実験的に検証した。そして、さらに二成分アミノ酸の分離におよぼす印加電圧、滞在時間、特に緩衝剤の影響を考察した。

両性電解質の分離を考える場合、その荷電量は雰囲気 pH に左右されるので、泳動室内の pH 分布を如何に形成させるかが重要な点となる。従来より分析領域では、合成両性担体混合物を用いて線形の pH 勾配を形成させる方法がしばしば用いられており、また近年、固定化担体法も注目されている。しかし、そのような手法によれば運転コストが大となること、また両性担体の物理化学的性質に未知な点が多く、理論解析が容易ではないことなど欠点もある。それに対して、低分子両性電解質、あるいは弱酸、弱塩基性物質は安価であるため、それを緩衝剤として利用し、pH 勾配を形成する方法が注目されている。

本章では、それらの点にも留意しつつ、理論モデルを基に、p-アミノ安息香酸とヒスチジンの分離過程を理論と実験の両面から考察した。そして、両性担体の代用として、市販の安価な弱酸、弱塩基の緩衝剤を用いることの妥当性についても検討した。

その結果、13種の成分種を考慮した移動論モデルにより二成分アミノ酸の連続式電気泳動分離を表現でき、実験結果を概ね説明できることから、本数学モデル及び数値解析法は有効であることがわかった。

また、アミノ酸の分離濃縮特性に及ぼす緩衝剤の影響を考察したところ、①アミノ酸自身の緩衝能力により良好な分離性を得ることは期待できないため、緩衝剤を利用することが必要である。②しかも、緩衝剤の選択が本法の有効性に対して重要な因子となる、等の知見を得た。

第4章 タンパク質の濃縮

— 牛血清アルブミンを例として —

第4章は高分子両性電解質であるタンパク質の濃縮を考察したものである。タンパク質の場合 pH 変性にも注意を払う必要があるので、電気泳動室内の移動現象に加えて、電極室の状況を総括的に考慮し、牛血清アルブミンの濃縮度におよぼす電極液の組成、pH および他の諸因子の影響を検討した。

タンパク質もアミノ酸と同様、環境の pH によって、荷電状態が変わる。しかし、アミノ酸の場合、解離基はせいぜい 2、3 個しかなく、溶液中における、解離および未解離の各化学種の割合が容易に定量化ができるのに対し、タンパク質は、解離基の種類ならびに総数が多数となり解離状態の pH 依存性は一層複雑となる。そのために、各解離基の解離定数から、それぞれの解離化学種の割合を算出することは通常不可能であり、固有解離定数の概念を利用して（ときとして、各解離基の静電気相互作用を考慮して）、実効電荷を pH の関数として算出することが必要となる。

また、アミノ酸と異なりタンパク質は温度のみならず、pH によっても変性するので高い濃縮度

のみを目的関数にすることはできず、温和な pH 分布を作り出すために、泳動室だけでなく、電極液組成の影響も考慮することが必要となる。

本章ではタンパク質の pH 変性防止に留意しつつ、泳動室のみならず、電極室、及び膜の透過現象を含むシステム全体を移動論方程式で記述し、その数値解析を行った。そして数値解を実験結果と比較しつつ、数値計算法の妥当性を検証するとともに、タンパク質濃縮度におよぼす電極液組成など諸因子の影響を考察した。

その結果、タンパク質の連続電気泳動過程を表す移動論モデルの差分数値計算値は実験結果と概ね一致しており、構築したモデルおよび数値解析法の有効性が実証された。

タンパク質の濃縮度は pH 分布に大きく依存し、pH 勾配が鋭いほど濃縮度は高くなった。一方、電極液の組成は泳動室内の pH 分布に大きな影響を与えたが、これは電極液に添加した支持電解質と水素あるいは水酸あるいは水酸イオンが膜を競争的に透過するためであると考えられた。また、泳動室内の pH 分布は試料に添加した緩衝剤の種類によっても変化し、それによって、タンパク質の濃縮度も変化することもわかった。

第 5 章 二成分タンパク質の分離

—牛血清アルブミンと牛血液ヘモグロビンの分離—

第 5 章は二成分タンパク質、すなわち牛血清アルブミンと牛血液ヘモグロビンの分離過程を考察したものである。本章では第 4 章で確立した理論解析手法を二成分タンパク質の分離に拡張し、数値計算法の妥当性を実証した。

その結果、本解析法で実測値を定性的に説明できることが確かめられた。また、分離に及ぼす滞在時間および印加電圧の影響を考察したところ、それらに最適値が存在することがわかった。

第 6 章 総 括

第 6 章は以上の研究を総括的に論じ、今後の研究課題を含めた展望を論じたものである。

審 査 結 果 の 要 旨

ニューバイオテクノロジーの発展に伴い、その成果を利用するための各種技術の開発が急務となっているが、このことはダウンストリームにおいて、生化学物質を温和な条件で取扱う新分離法の確立に対する期待となって現れている。

本研究は、生化学物質の多くが両性電解質であることに着目し、従来生化学研究の分野において、分析手段として利用されている電気泳動法を、工業規模の分離濃縮装置に拡張しようとしたときに必要となる、基礎資料収集を目的として行ったものである。すなわち、実験室規模の装置試作ならびに運転を行うとともに、装置内における物質移動現象を移動論方程式で記述し、数値解析することにより、分離濃縮過程を詳細に解明したもので、全編6章から構成されている。

第1章は緒論であり、電気泳動に関する従来の研究を概説するとともに、本研究の背景と目的を述べている。

第2章では、低分子両性電解質であるアミノ酸の連続濃縮過程を取り上げ、実験と理論の両面から考察している。すなわち、現象に対して、移動論方程式モデルを構築し、その数値解析を行うとともに、モデルと解析法の妥当性を実験的に検証した。そして理論および実験結果に基づき、アミノ酸の濃縮度におよぼす諸因子の影響を明らかにしている。

第3章は前章で確立した移動論方程式モデルを二成分アミノ酸の分離に拡張したものである。そして、その適用性を再び実験的に検証するとともに、二成分アミノ酸の分離におよぼす印加電圧、滞在時間、特に緩衝剤の影響を考察している。

第4章は高分子両性電解質であるタンパク質の濃縮を考察したものである。ここではタンパク質のpH変性を防ぐことも考慮して、温和なpH勾配を形成させるべく、泳動室のみならず、電極室を含めたシステム全体を解析の対象とした。そしてそこから得られた数値解を実験結果と比較しつつ、タンパク質濃縮度におよぼす緩衝剤ならびに電極液組成の影響を明らかにしている。

第5章は二成分タンパク質の分離過程を考察したものである。本章でも理論解析の有効性を実証するとともに、合わせて、分離におよぼす滞在時間と印加電圧の影響を考察した。

第6章は総括であり、今後の展望を述べている。

以上、本研究は連続式電気泳動過程を理論的、実験的に考察したものであり、ここで、開発した理論モデルとその数値シミュレーション法はバイオ物質の分離精製のための工業電気泳動装置の設計および操作に役立つものであって、化学工学および化学工業の発展に寄与する所が少なくない。

よって、本論文は工学博士の学位論文として合格と認める。