

# アカガイ由来アスパラギン酸ラセマーゼの精製

環境生物化学講座 阿部 勝正

指導教官 山田 良平

解良 芳夫

高橋 祥司

## 1.はじめに

無酸素耐性を示す事で知られるアカガイ *Scapharca broughtonii* の生体内、特に足と外套膜に高濃度の D-アスパラギン酸、およびアスパラギン酸ラセマーゼ活性が存在している事が明らかになっている。しかし、アカガイ中におけるこれらの生理的な機能、役割についての知見はまだ知られていない。

アカガイが嫌氣的条件下で長時間生存するためにはエネルギー通過として知られている ATP を生産する必要がある。アカガイの仲間は、「アスパラギン酸-コハク酸経路」とよばれる代謝系で ATP を産生することで嫌氣的条件下でも長時間生存できると報告されている。当研究室では、現在のところアカガイ中に多量に存在する D-アスパラギン酸はこの「アスパラギン酸-コハク酸経路」に入る一段階手前の貯蔵物質であると考え、また、アスパラギン酸ラセマーゼは嫌氣的条件下で、生理的に不活性な D-アスパラギン酸を生理的に活性な L-アスパラギン酸に変換する役割を担っているのではないかと考えている。

このアカガイにおける低酸素環境適応性と D-アスパラギン酸の関係を明確にするためにも、まずこのアスパラギン酸ラセマーゼの諸性質を検討する必要がある。本研究ではこの諸性質の検討に必要な高い活性の本酵素を高収率で得るために精製条件の検討を行った。

## 2.酵母 *Cryptococcus humicolus* UJ 1 からの D-アスパラギン酸オキシダーゼの精製

アスパラギン酸ラセマーゼを精製する際、D-アスパラギン酸オキシダーゼを用いた間接的測定法によりアスパラギン酸ラセマーゼの活性測定を行った(Fig. 1)。

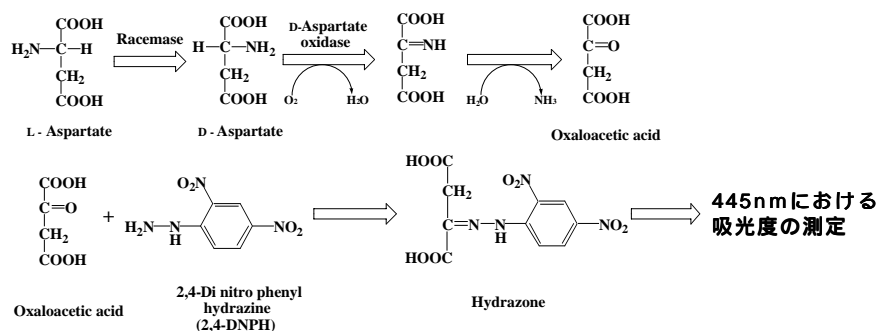
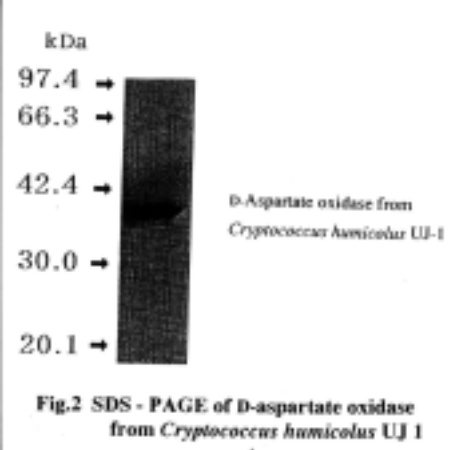


Fig. 1 D-アスパラギン酸オキシダーゼを用いた活性測定法の原理

この活性測定法では、D-アスパラギン酸オキシダーゼが必要になるが、この酵素は市販されていない。そこで、D-アスパラギン酸オキシダーゼを特異的に誘導合成する酵母 *Cryptococcus humicolus* UJ 1 からこの酵素を確立された精製法に従って精製した。

D-アスパラギン酸を唯一の窒素源とした酵母 *Cryptococcus humicola* UJ 1 の培養、超音波での菌体の破碎、10% ~ 35% 飽和硫酸分画、Butyl Sepharose カラムクロマトグラフィー、SP Sepharose カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過 Superdex 200 カラムクロマトグラフィーの過程を経て比活性 113  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$  の精製 D-アスパラギン酸オキシダーゼの精製酵素標品を得た。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)での分析により、単一にまで精製できたことを確認した (Fig. 2)。



### 3.アカガイからのアスパラギン酸ラセマーゼの精製

アスパラギン酸ラセマーゼは、微生物においては数種見いだされているが、動物由来のものとしては、粗酵素抽出液を含めまだ報告されておらず、当研究室の柴田らがアカガイから本酵素を動物由来のものとして初めて単一にまで精製する事に成功し、諸性質に関する研究も現在進行中である。これから、さらに進んだ酵素学的諸性質の検討を行うためには高い比活性の本酵素が多量に必要となる。

しかし、これまでの方法では、比活性が低く、活性の回収率も低い。そこで、これまでの精製法を再度検討し、精製法の改良を試みた。改良点は、Mono S カラムクロマトグラフィーに変わり、AMP Sepharose カラムクロマトグラフィーを導入したことである。

実験操作は、アカガイの足先端のホモジネート作製、1.2 M -2.4 M 硫酸ナトリウム分画、Blue Sepharose カラムクロマトグラフィー、AMP Sepharose カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過 Sephacryl S-100 カラムクロマトグラフィーという手順で行った。

Blue Sepharose カラムクロマトグラフィーの溶出図を Fig. 3 に示した。ここでは活性の高かった Fraction No.18~22 を回収し、濃縮した。

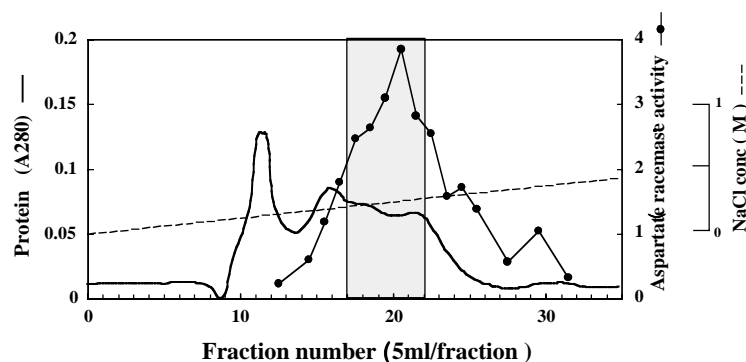


Fig. 3 Blue Sepharose column chromatography of aspartate racemase from *S. broutonii*  
スクリーンで示した画分を回収した。

AMP Sepharose カラムクロマトグラフィーの溶出図を Fig. 4 に示した。AMP Sepharose カラムクロマトグラフィーではほとんどのタンパク質が吸着せず、素通りした。この素通りタンパク質画分と、吸着タンパク質画分のアスパラギン酸ラセマーゼ活性を測定すると、両画分とも酵素活性が確認され、活

性の多くは素通り画分にあった。吸着していたタンパク質の画分では活性の回収率は低かったが、Mono S カラムを導入していた時と比較すると比活性で約 2.5 倍の向上が見られた。素通り画分は、Mono S カラムを導入していたときより比活性が低下し、他のタンパク質が多く混入しているものと思われた。カラムに吸着したタンパク質が少量であった理由として、アスパラギン酸ラセマーゼと AMP との親和性が低いことがすでにわかっており、AMP 吸着タンパク質と非吸着タンパク質が僅かな量で平衡に達したため少量しか吸着しなかったのではないかと考えられた。カラムに吸着し活性の高かった Fraction No.26 ~ 28 を回収し、濃縮した。

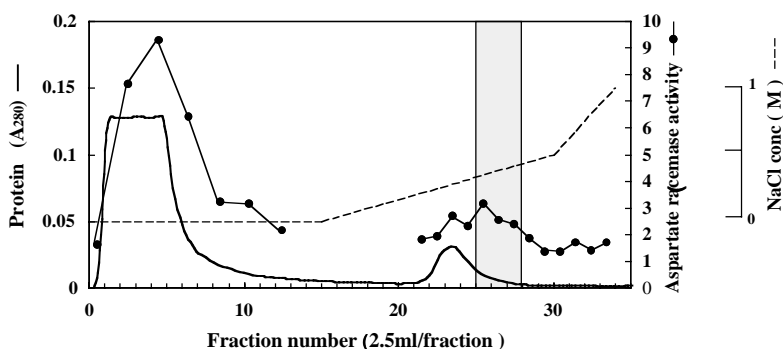


Fig. 4 AMP Sepharose column chromatography of aspartate racemase from *S. broutonii*  
スクリーンで示した画分を回収した。

Sephacryl S-100 カラムを用いた 1 回目のゲル濾過クロマトグラフィーの溶出図を Fig. 5 に示した。1 回目のゲル濾過後、活性のあった画分を SDS-PAGE により分析したが、どの画分にも複数のバンドが確認されたため、活性が高く、SDS-PAGE 上でバンドの数が少なかった retention time 154 ~ 161 分の画分を回収、濃縮し、再びゲル濾過 Sephacryl S-100 カラムクロマトグラフィーを行うことにした。

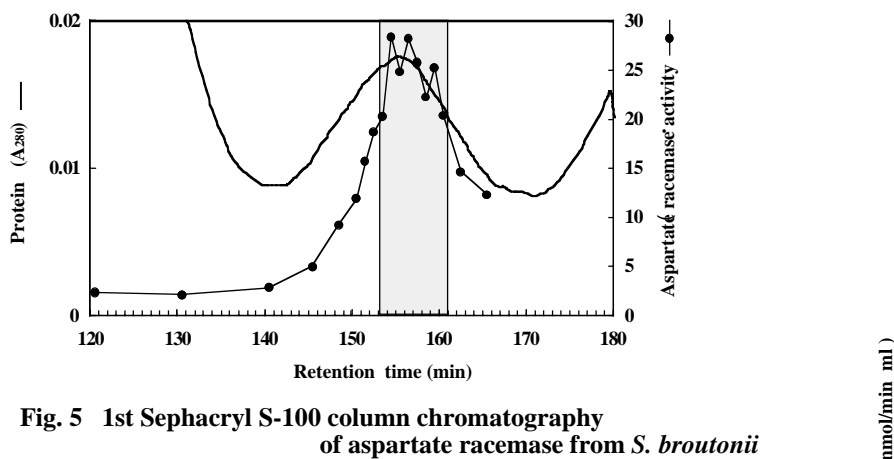
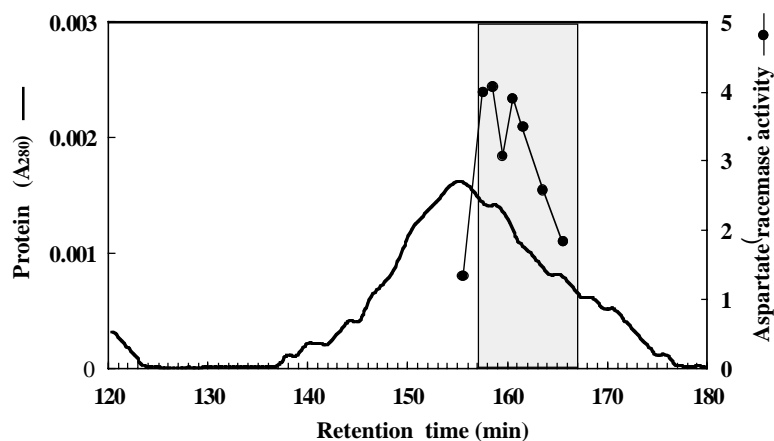


Fig. 5 1st Sephacryl S-100 column chromatography of aspartate racemase from *S. broutonii*  
スクリーンで示した画分を回収した。

Sephacryl S-100 カラムを用いた 2 回目のゲル濾過クロマトグラフィーの溶出図を Fig. 6 に示した。2 回目のゲル濾過後も同様に SDS-PAGE による分析を行った結果、retention time 158 ~ 167 分の画分が SDS-PAGE 上で単一のバンドを示したことからアスパラギン酸ラセマーゼが単一にまで精製できたと判断した。この画分を回収、濃縮し、アスパラギン酸ラセマーゼの精製酵素標品とした。

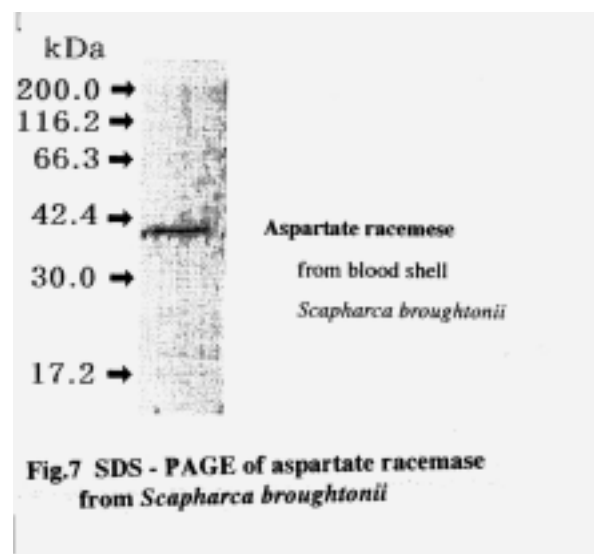
アスパラギン酸ラセマーゼの精製酵素標品は SDS-PAGE 上で分子質量約 38.5kDa の位置に単一のバンドを示した( Fig. 7)。



**Fig. 6 2nd Sephacryl S-100 column chromatography of aspartate racemase from *S. broutonii***  
スクリーンで示した画分を回収した。

#### 4.まとめ

アスパラギン酸ラセマーゼの精製表を Table 1 に示した。Mono S カラムに変わり AMP Sepharose カラムを導入した今回の精製によって比活性 13.3  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ 、精製度 5760 倍、収率 0.1 %で精製アスパラギン酸ラセマーゼを得ることができた。以前に行ったときと比較すると、収率を上げる事はできなかったが、比活性は 1.4 倍、精製度も 1.5 倍の向上がみられた。



**Table 1 Purification of aspartate racemase from *Scapharca broughtonii***

Step	Total activity (nmol/min)	Total protein (mg)	Specific activity ( $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ )	Purification (fold)	Yield (%)
Homogenate	52200	22700	0.0023	1.0	100.0
Supernatant	45300	5630	0.0080	3.5	86.8
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitate	22900	2760	0.0083	3.6	43.9
Blue Sepharose	7660	89	0.086	37.4	14.7
AMP Sepharose	950	0.85	1.12	486	1.82
1st Sephacryl S-100	132	0.018	7.33	3190	0.25
2nd Sephacryl S-100	53	0.004	13.3	5760	0.1

Starting material was 274 g of foot muscle of blood shell .