

二枚貝のアスパラギン酸ラセマーゼ精製に関する研究

環境生物化学研究室 吉川 裕之

指導教官 山田 良平、解良 芳夫、高橋 祥司

1. はじめに

当研究室ではこれまで、二枚貝の一種であるアカガイ *Scapharca broughtonii* とその近縁種であるサルボウガイ *Scapharca subcrenata* の足と外套膜にL-体と同量のD-アスパラギン酸が存在し、アスパラギン酸ラセマーゼ[E.C.5.1.1.13]活性が確認された。これら二枚貝はL-アスパラギン酸 コハク酸経路によるエネルギー供給によって強い無酸素耐性を持つことが知られており、D-アスパラギン酸はエネルギー貯蔵物質として筋肉中に蓄えられると考えられているが、その詳細は不明であり、この環境適応メカニズムを解明するうえで、本酵素は重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、アカガイ足筋肉を用いてアスパラギン酸ラセマーゼの精製方法について様々な検討を行ってきた。その結果、硫酸ナトリウム分画、Blue Sepharose カラム、Mono S カラム、Sephacryl S-100 カラムを用いることで、世界で初めて動物組織から均一に精製することに成功し、いくつかの性質が明らかになった。

今後、さらに諸性質を解明するにあたって大量の精製酵素が必要である。しかし、先の精製法では最終的に得られる精製酵素の量が僅かであること、比活性・活性回収率が低いなど、解決しなければならぬ諸問題が残されていた。

そこで、先に確立した精製法をもとに、精製法の改良を行った。

2. アカガイ由来アスパラギン酸ラセマーゼの精製法の改良

これまでの研究により、アカガイ由来アスパラギン酸ラセマーゼはアデノシン-リン酸 (AMP) の添加によって活性化することがわかっている。そこで、本酵素は AMP と親和性があるのではないかと考え、AMP Sepharose カラムの検討を行なった。その結果、わずかではあるが吸着を示し、比活性の向上が見られた。そこで、この AMP Sepharose カラムを Mono S カラムの代わりに用いて、精製を行った。

今回の実験操作は、ホモジネート作製、1.2 2.4M 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を2回行なった。それぞれのカラムクロマトグラフィーのチャート図を Figure1 ~ 4 に示す。

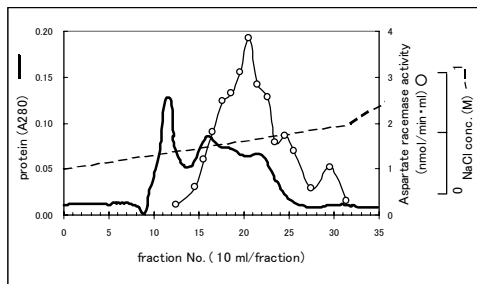


Figure 1. Blue Sepharose カラムクロマトチャート図

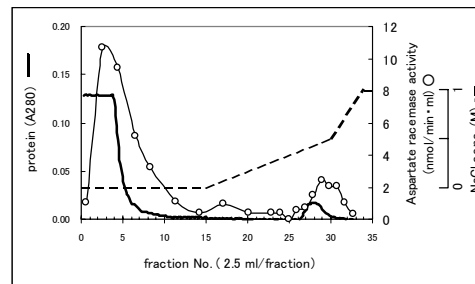


Figure 2. AMP Sepharose カラムクロマトチャート図

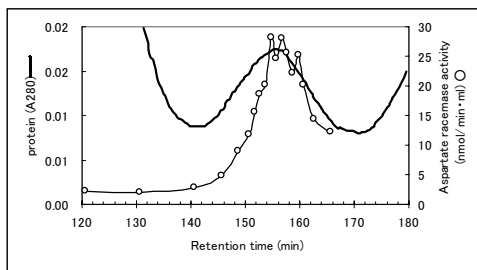


Figure 3. 1st Sephacryl S-100 カラムクロマトチャート図

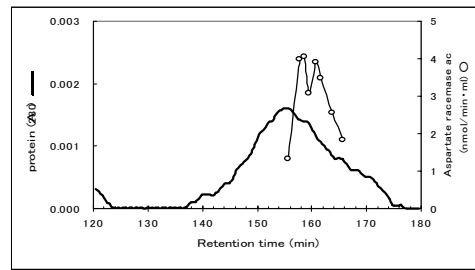


Figure 4. 2nd Sephacryl S-100 カラムクロマトチャート図

その結果を Table 1 に示す。改良前と同じく、SDS-PAGE 上で分子質量約 38.5kDa の位置に単一のバンドを示し (Figure 5) 今回の方法でも均一に精製出来ることがわかった。

さらに、AMP Sepharose カラム後の比活性、精製度が改良前の約 2.5 倍に向上し、比活性 9.0 $\mu\text{mol}/\text{min}$ per mg \cdot protein の精製酵素をタンパク質量 0.035mg、総活性 315nmol/min と約 8 倍量で得られ、今回の方法が大量精製に適しているように思われた。

しかし、比活性、活性回収率が改良前とほぼ同等の値であったことから、さらに改良が必要に思われた。

そこで、比活性の低下が見られた硫酸ナトリウム分画、Blue Sepharose カラムクロマトグラフィーと、活性回収率の低下が見られた AMP Sepharose カラムクロマトグラフィーについて、再度検討を行なった。

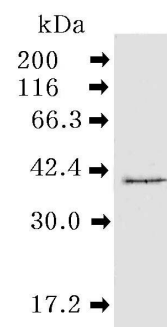


Figure 5. 精製アスパラギン酸ラセマーゼの SDS-PAGE 解析
銀染色法により染色した。

Table 1 改良後のアカガイ由来アスパラギン酸ラセマーゼの精製結果

Step	Total activity (nmol/min)	Protein (mg)	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)	Purification (fold)	Yield (%)
Homogenate	52220	22748	0.0023	1	100
Supernatant	45334	5632	0.0080	3.51	86.8
Na ₂ SO ₄ precipitate	22937	2755	0.0083 (0.010)	3.63	43.9
Blue Sepharose	7658	89	0.086 (0.273)	37.5	14.7
AMP Sepharose	950	0.85	1.12 (0.455)	487 (182)	1.82
1st Sephacryl S-100	377	0.071	5.31	2313	0.72
2nd Sephacryl S-100	315 (43)	0.035 (0.0044)	9.00 (9.65)	3921	0.60 (0.55)

・アカガイ足筋肉274gから精製を行った。

・()内は改良前の値を示す。

3. 精製法の更なる改良の試み

精製過程に AMP Sepharose カラムを用いることで、改良前の約 8 倍量の精製酵素を得ることができた。しかし、比活性、活性回収率の向上が見られなかったことから再度改良を行なった。

まず、硫酸ナトリウム分画について改良を行なった。前回は室温でゆっくり攪拌しながら硫酸ナトリウムを溶解させていたので、室温時間が長く、また硫酸ナトリウムが完全に溶解することはなかった。そのため、比活性の低下につながったと考えられた。そこで、今回は試料を 30 に加温しながら硫酸ナトリウムを溶解させることにした。

Blue Sepharose カラムクロマトグラフィーでは、精製を繰り返すに従って比活性、活性回収率の低下が見られた。原因としてカラムの汚れによる吸着力の低下が考えられたので、精製前に 6 M 尿素水溶液と 30% イソプロピルアルコールでカラムの洗浄を行なうことにした。AMP Sepharose カラムクロマトグラフィーでは、アプライ後ポンプを 1 時間停止させるために、1 回のアプライ量が少なく、時間が掛かった。また、1 回の精製で回収できる精製酵素量が少ないことから活性回収率の低下につながったと考えられた。そこで、ポンプを停止させるのではなく、流速を 0.5ml/min から 0.25ml/min に落とすことで AMP との接触時間を延ばし、1 回のアプライ量を増やすことにした。

前回の精製法にこれら 3 つの改良を加え、精製を行った結果を Table 2 に示す。硫酸ナトリウム分画では比活性、活性回収率の向上は見られなかったが、これまで操作時間が 3 時間以上かかっていたのに対して、今回の方法では約 2 時間に短縮できた。また、Blue Sepharose カラムにおいては、比活性と活性回収率の向上が見られた。しかし、AMP Sepharose カラムクロマトグラフィーで大幅な失活が見られ、均一に精製することはできなかった。原因として、流速を落とすことでかえって 1 回の精製時間が長くなり、失活につながったと考えられた。そこで、AMP Sepharose カラムクロマトグラフィーの条件をもとに戻し、再度精製を試みた結果を Table 3 に示す。前回の精製の硫酸ナトリウ

ム分画で比活性、活性回収率の向上が見られなかったのは技術的な問題であったようで、今回の精製では改良前と比べて比活性で約3倍、活性回収率で約1.6倍の向上が見られた。

しかしながら、SDS-PAGE 上では分子質量約 38.5kDa と 35.0kDa のバンドが見られ(Figure 6)、均一に精製することはできなかった。38.5kDa のタンパク質はこれまでの研究で本酵素であることがわかっているが、35.0kDa のタンパク質は精製過程が進むにつれてバンドの色が濃くなり、38.5kDa のバンドが薄くなる傾向が見受けられた。また、ゲル濾過 Sephacryl S-100 カラムで分離できないことから、構造的に類似していると思われ、この 35.0kDa のタンパク質は本酵素が分解され、失活したもので

ある可能性が高いように思われた。原因として、AMP Sepharose カラム後の部分精製酵素を保存する際に、濃縮が不適切でタンパク質濃度が薄すぎたために失活したと思われた。このことから、本酵素を均一に精製するためには、失活を最小限に抑える必要があることがわかった。

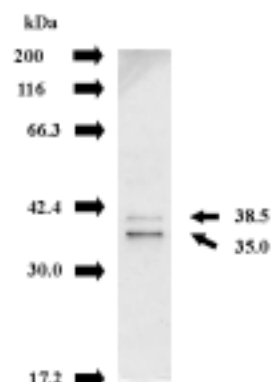


Figure 6. 精製アスパラギン酸ラセマーゼの SDS-PAGE 解析
銀染色法により染色した。

Table 2. Na₂SO₄分画、Blue Sepharose、AMP Sepharoseカラムの改良を行なったアカガイ由来アスパラギン酸ラセマーゼの精製結果

Step	Total activity (nmol/min)	Total protein (mg)	Specific activity (μmol/min·mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Homogenate	67490	23995	0.0028	1	100
Supernatant	36042	6415	0.0053	1.9	53
Na ₂ SO ₄ precipitate	30433	3179	0.0096	3.4	45
Blue Sepharose	13130	112.8	0.116	41	19
AMP Sepharose	291	1.612	0.181	64	0.43
1st Sephacryl S-100	149	0.097	1.50	536	0.22
2nd Sephacryl S-100	77.3	0.050	1.54	548	0.11

・アカガイ足筋肉229gから精製を行った。

Table 3. Na₂SO₄分画、Blue Sepharoseカラムの改良を行なったアカガイ由来アスパラギン酸ラセマーゼの精製結果

Step	Total activity (nmol/min)	Total protein (mg)	Specific activity (μmol/min·mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Homogenate	60374	12581	0.0048	1	100
Supernatant	51715	2350	0.0220	5	86
Na ₂ SO ₄ precipitate	42577	1750	0.0243	5	71
Blue Sepharose	14464	111	0.130	27	24
AMP Sepharose	732.4	0.430	1.70	354	1.2
1st Sephacryl S-100	28.2	0.067	0.421	88	0.05
2nd Sephacryl S-100	-	-	-	-	-

・アカガイ足筋肉 155 g から精製を行った。

4. サルボウガイ由来アスパラギン酸ラセマーゼの精製

二枚貝の一種であるサルボウガイ *Scapharca subcrenata* はアカガイの近縁種で、アカガイ同様、高い無酸素耐性を持つことが知られている。また、当研究室によって D-アスパラギン酸とアスパラギン酸ラセマーゼ活性の存在が確認されている。そこで、アカガイ由来アスパラギン酸ラセマーゼと比較するために、まず、アカガイと同様の精製方法を用いてアスパラギン酸ラセマーゼの精製を試みた。

精製結果を Table 4 に示す。Blue Sepharose カラム後と AMP Sepharose カラム後の比活性がアカガ

イの時に比べて約2倍の値を示し、アカガイよりもそれらのカラムへの吸着力が高いように思われた。また、1st Sephacryl S-100 カラム後の SDS-PAGE 解析では2本のバンドのみを示し、アカガイの時の4本に比べると夾雑タンパク質の除去効率も高いように思われた。よって、サルボウガイの方がアカガイから精製するよりもアスパラギン酸ラセマーゼを精製しやすいように思われた。

しかし、今回の精製では2nd Sephacryl S-100 カラムクロマトグラフィーを行なうだけのタンパク質量を得ることができず、均一な酵素を得ることができなかった。原因として最初の試料の量が少なかったこともあるが、硫酸ナトリウム分画での活性回収率が悪かったことが挙げられる。しかし、3.の実験で30 に加温しながら行なうことで比活性、活性回収率が向上することがわかったので、この方法を用いれば改善できると思われる。

また、最後に残った SDS-PAGE 上の2本のバンドがアカガイ同様、約38.5kDa と35.0kDa であったことから、サルボウガイから精製するにしても失活を最小限に抑える必要があることがわかった。

Table 4. サルボウガイ由来アスパラギン酸ラセマーゼの精製結果

Step	Total activity (nmol/min)	Total protein (mg)	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)	Purification (fold)	Yield (%)
Homogenate	6186	7002	0.0020	1	100
Supernatant	11408	1822	0.0063	3	184
Na ₂ SO ₄ precipitate	2689	282	0.0095	5	43
Blue Sepharose	2016	10.3	0.196	100	15
AMP Sepharose	473	0.21	2.25	1151	3.5
1st Sephacryl S-100	157	0.038	4.13	2113	1.2
2nd Sephacryl S-100					

・サルボウガイ足筋肉 103.6 g から精製を行った。

・()内はアカガイの時の値を示す。

5. まとめ

アカガイ由来アスパラギン酸ラセマーゼの精製法の改良

Mono S カラムの代わりに AMP Sepharose カラムを用いて精製を行った結果、AMP Sepharose カラム後の比活性、精製度が Mono S カラム後に比べて約2.7倍に向上した。

硫酸ナトリウム分画では、試料を30 に加温しながら硫酸ナトリウムを溶解させることで、比活性、活性回収率の向上が見られた。

Blue Sepharose カラムクロマトグラフィーでは、カラムを6M尿素水溶液と30%イソプロピルアルコールで洗浄してから試料をアプライすることで、高比活性の部分精製酵素を毎回安定して得ることができた。

サルボウガイ由来アスパラギン酸ラセマーゼの精製

Blue Sepharose カラム、AMP Sepharose カラム共にアカガイよりも吸着力が強いように思われた。また、ゲル濾過 Sephacryl S-100 カラムによる夾雑タンパク質の除去効率も高いように思われ、アカガイよりも精製しやすいように思われた。

今後の課題

アカガイ、サルボウガイ、いずれからの本酵素の精製にも大きな問題が残された。それは分解され失活した本酵素と思われる分子質量約35.0kDaのタンパク質を分離することは難しいということである。この問題を解決するには、失活を最小限に抑えるしかなく、ひとつひとつの操作を慎重かつ短時間でこなすよう努力する必要がある。