

アカガイアスパラギン酸ラセマーゼ精製の再検討

環境生物化学研究室 三浦 輝
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哺乳類、鳥類、両生類、魚類における D-アミノ酸およびそれに特異的な酸化酵素の存在について研究を行ってきた。その中で、当研究室で調べてきた様々な生物と比較し、二枚貝組織には多量の D-アスパラギン酸が存在していること、特にアカガイには L-体とほぼ同量の D-アスパラギン酸が存在していることを明らかとした。さらにこのアカガイの足と外套膜にアスパラギン酸ラセマーゼが存在することを見いだした。次いで、アカガイ足筋肉から本酵素を単一に精製することにも成功し、動物由来の D-アスパラギン酸もアスパラギン酸ラセマーゼによって生合成されていることを明らかにした。

アスパラギン酸ラセマーゼは微生物では数種報告されているが、動物由来としては初めての報告であり、これまで報告されているアミノ酸ラセマーゼとは異なり PLP 依存性であるなど特異的な性質を持っていることが明らかになった。

この D-アスパラギン酸、アスパラギン酸ラセマーゼのアカガイ中における機能として、当研究室では、嫌気的環境下でのエネルギー獲得に使われる代謝経路といわれる「L-アスパラギン酸-コハク酸経路」の貯蔵物質であると考え、嫌気的条件下において生理的に不活性な D-アスパラギン酸をこの代謝経路で利用するために L-アスパラギン酸に変えるのがアスパラギン酸ラセマーゼだと推察している。

そこで本研究では、この酵素の酵素学的諸性質を調べるための材料となる高い活性の精製酵素を高収率で得るための精製条件の再検討を行ったのでこれを報告する。

2. 試料・実験方法

[試料]

アカガイ (養殖, 青森県産:天然, 宮城県三陸産:天然)は浜鰻(新潟県長岡市)から購入し、足の筋肉(229.02 g)を用いた。

[実験方法]

アカガイの足のホモジネート作製

1.2 ~ 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

1st Sephacryl S-100 カラムクロマトグラフィー

2nd Sephacryl S-100 カラムクロマトグラフィー

3. 本研究の改良点

- これまで室温で行ってきた硫酸ナトリウム分画を、一定温度(30)で行った。
- Blue Sepharose カラムクロマトグラフィーにおいて素通りタンパク質洗浄の流速を 5 ml/min から 1ml/min に下げた。
- AMP Sepharose カラムクロマトグラフィーにおいて素通りタンパク質のクロマトグラフィーを数回くりかえし行った。

4. 結果

Blue Sepharose カラムクロマトグラフィーの溶出図を Fig. 1 に示した。ここでは活性の高かった Fraction No. 15 ~ 20 を回収、濃縮し AMP Sepharose カラムクロマトグラフィーのサンプルとした。

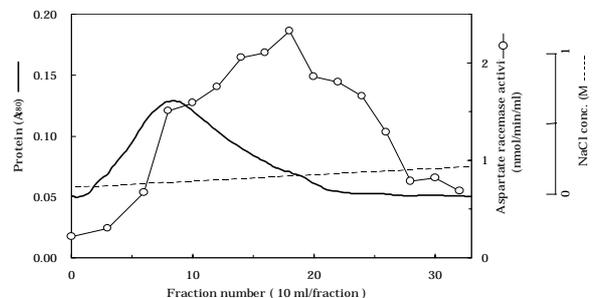


Fig.1. Blue Sepharose column chromatography of aspartate racemase from *S. broutonii*. The fractions 15~20 were pooled.

AMP Sepharose カラムクロマトグラフィーの溶出図を Fig. 2 に示した。ここでは活性の高かった Fraction No. 20~24 を回収、濃縮し次のゲル濾過 Sephacryl S-100 カラムクロマトグラフィーのサンプルとした。

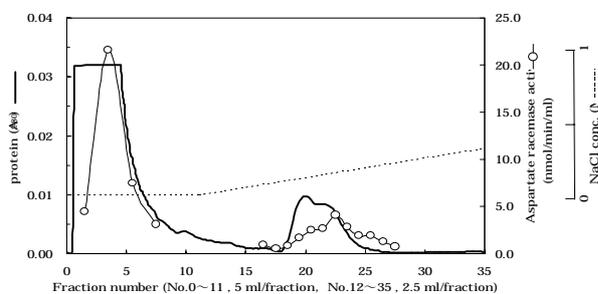


Fig. 2. AMP Sepharose column chromatography of aspartate racemase from *S. broutonii*. The fractions 20~24 were pooled.

ゲル濾過 Sephacryl S-100 カラムクロマトグラフィーの溶出図を Fig. 3 に示した。活性が高く、SDS-PAGE 上でバンド数の少なかった Retention time 154~161 分の画分を回収、濃縮し 2 回目のゲル濾過 Sephacryl S-100 カラムクロマトグラフィーのサンプルとした。

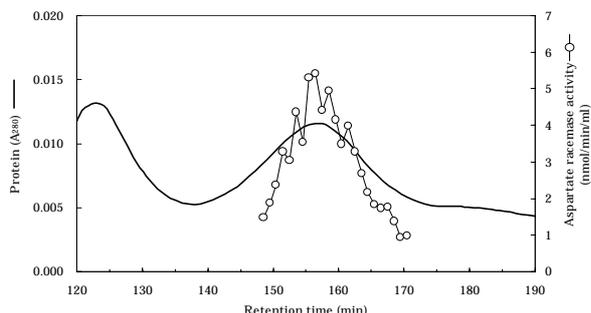


Fig. 3. 1st Sephacryl S-100 column chromatography of aspartate racemase from *S. broutonii*. The fractions with the retention time 154~161 min were pooled.

2 回目のゲル濾過 Sephacryl S-100 カラムクロマトグラフィーの溶出図を Fig. 4 に示した。1 回目と同様に活性の高い Fraction を SDS-PAGE により分析した結果 2 本のバンドが確認された。(Fig. 5)

これは、本酵素が単一に精製されていないことを示すが、これ以上精製を行うと活性、タンパク質共に全く回収できない可能性が考えられたため活性の高かった retention time 156~163 分の画分を回収、濃縮後、アスパラギン酸ラセマーゼの部分精製酵素標品とし、2 回目のゲル濾過 Sephacryl S-100 カラムクロマトグラフィーまでで精製を終了した。

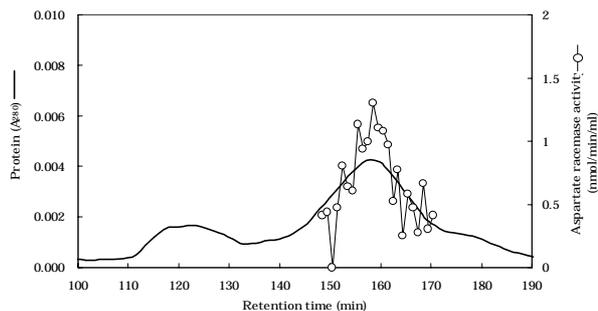


Fig. 4. 2nd Sephacryl S-100 column chromatography of aspartate racemase from *S. broutonii*. The fractions with the retention time 156~163min were pooled.

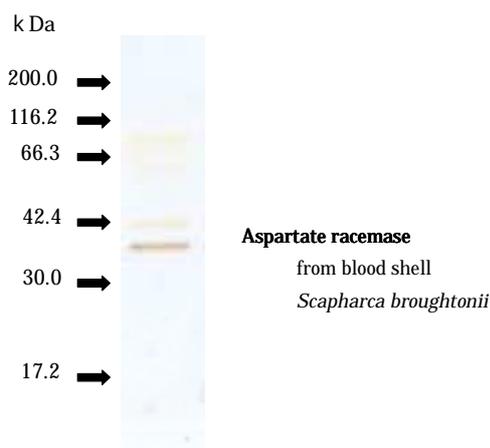


Fig. 5 SDS-PAGE of aspartate racemase

アカガイからのアスパラギン酸の精製表を Table 1 に示した。

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

Step	Total activity [nmol/min]	Total protein [mg]	Specific activity [μmol/min/mg protein]	Purification [fold]	Yield [%]
Homogenate	67490	23995	0.0028	1.0	100
Supernatant	42221	11776	0.0036	1.3	63
1.2~2.4 M Na ₂ SO ₄ precipitate	30433	3179	0.0096	3.4	45
Blue Sepharose	13130	112.8	0.1200	41.0	19
AMP Sepharose	291	1.61	0.1800	64.0	0.43
1st Sephacryl S-100	146	0.10	1.5000	536	0.22
2nd Sephacryl S-100	77.3	0.05	1.5000	548	0.11

^a The Starting material was 229.02 g of foot muscle of blood shell.

5. まとめ

各精製段階において温度や流速などを改良し精製を行った結果、比活性 1.5 μmol/min/mg、精製度 548 倍、収率 0.11%の部分精製アスパラギン酸ラセマーゼを得た。これは去年のデータより、比活性、精製度共に下回る値となった。また、今回の研究では、本酵素を均一精製することができなかった。