

疎水性クロマトグラフィに伴う耐熱性ホスファターゼ活性の変動

森 秀治 岡本 基 中田安成 遠藤 浩

要 約

耐熱性ホスファターゼを含んだ *Bacillus stearothermophilus* 粗酵素試料を, リゾース Iso による疎水性クロマトグラフィにかけ分離を行った。1.5M→0 M 硫酸アンモニウムの直線逆濃度勾配によって溶出を行ったところ, ホスファターゼは不活性な形で溶出され, これは硫酸アンモニウムによる濃度依存的阻害に起因することが判明した。ホスファターゼの反応混合液に種々の濃度の硫酸アンモニウムを添加したところ, 0.15Mの硫酸アンモニウム存在下で約80%の阻害が認められた。加えて, この阻害作用は単に硫酸アンモニウムの添加によって pH が酸性側に傾くことによるものではないことも明らかとなった。

キーワード: 耐熱性ホスファターゼ, 疎水性クロマトグラフィ, 硫酸アンモニウム, 濃度依存的阻害

はじめに

自身が持つ優れた触媒機能によって酵素は生体の多彩な生命現象を支えている。酵素が持つ極めて優れた反応特異性は, 近年, 様々な分野に応用され, 現に食品, 医療, 臨床検査, 遺伝子工学などの多くの分野で日常的に利用がなされている。しかしながら, 酵素の中には優れた触媒機能を持ちながらも安定性に欠けたりして, 未だ応用するには至らないものも多々見受けられる。

一方, 高温という特殊環境下で生育することができるいくつかの微生物が自然界に存在¹⁻⁴⁾することが知られており, これら微生物の構成成分の多くは熱に安定性を示すものに作り換えられており, その成分の一つである酵素についても高い熱安定性を有していることが報告⁵⁻⁹⁾され, 従来の酵素に比べてより安定な酵素試薬としての有用性が示唆されている。

本研究では, 酵素の中でも日常の検査用酵素試薬や分析用試薬として汎用されているホスファターゼに焦点を当て, 好熱細菌の抽出液中に存在する耐熱性ホスファターゼの酵素学的性状を明らか

にするために, 疎水性クロマトグラフィ担体上で本酵素の溶出パターンについて検討を行った。

材 料 と 方 法

1. *Bacillus stearothermophilus* は, ATCC (American Type Cell Culture) から購入した。p-ニトロフェニルリン酸・2ナトリウム塩, リゾチームおよび硫酸アンモニウムは和光純薬の製品を用いた。デオキシリボヌクレアーゼ I はシグマより得た。リゾース Iso 疎水性クロマトグラフィ用カラムは, ファルマシアバイオテックから購入した。その他の試薬はすべて市販の試薬特級を用いた。

2. ホスファターゼ活性の測定

ホスファターゼ活性は以下の方法に準じて測定した。基質溶液 (25mM p-ニトロフェニルリン酸 0.02ml, 2.5mM MgCl₂ 0.02ml, 0.1M glycine-NaOH (pH9.0) 0.05ml) 90 μ l に酵素溶液 10 μ l を添加し, 60 $^{\circ}$ C でインキュベートした。20分後, EDTA 溶液を 10 μ l 添加することによって反応を停止し, 反応に伴って生成されてくる p-ニトロフ

ェノール由来の405nmでの吸光度の増大を測定することによって、ホスファターゼ活性を見積もった。

3. 粗酵素試料の調製

55°C, 好氣的条件下で培養した中等度好熱細菌 *Bacillus stearothermophilus* に, 5 mM MgCl₂ 存在下でリゾチーム処理 (50mg リゾチーム/mg wet weight, 37°C, 2時間) を施し, 続いてデオキシリボヌクレアーゼ I 処理 (50 μ g デオキシリボヌクレアーゼ I /mg wet weight, 37°C, 30分間) を行った。両酵素による処理後, 12,000 \times g で15分間遠心し, 得られた上清を菌抽出液とした。次に, 菌抽出液に硫酸アンモニウム分画を施し, その40~50%飽和硫酸アンモニウム沈殿画分を回収し, これを10mM Tris-HCl 緩衝液 (TB, pH8.0) に溶解した後に同緩衝液に対して4°Cで透析した。透析後, 沈殿物を除くために遠心 (12,000 \times g, 15分, 4°C) を行い, 上清を回収し, これを粗酵素試料として本研究に用いた。

4. リソース Iso 疎水性クロマトグラフィ

粗酵素試料は FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) システムに接続されたリソース Iso 疎水性クロマトグラフィ用カラムによって分画された。3 M硫酸アンモニウムを含んだ10 mM TB (pH 8.0) を粗酵素試料に等量添加し, これを1.5M硫酸アンモニウムを含んだ10mM TB (pH8.0) であらかじめ平衡化されたリソース Iso 疎水性クロマトグラフィ用カラムに添加した。同緩衝液でカラムを洗浄 (流速; 2.0ml/分) した後, カラムに結合した粗酵素試料を硫酸アンモニウムの直線逆濃度勾配 (硫酸アンモニウム濃度; 1.5M \rightarrow 0 M, 流速; 2.0ml/分) によって溶出した。溶出後, 各フラクション中のホスファターゼ活性を上記の方法にて測定した。

結果と考察

Bacillus stearothermophilus から得た粗酵素試料をリソース Iso 疎水性クロマトグラフィ用カラムに添加し, 硫酸アンモニウムの直線逆濃度勾配によって分画した後, 各フラクション中のホスファターゼ活性を測定してみると, 驚くべきことに

どのフラクションにもホスファターゼ活性を検出することができなかった (図1)。この活性消失の原因を明らかにするために, 分画後の各溶出液を10mM TB (pH8.0) によって10倍希釈し, あらためてホスファターゼ活性を同様に測定してみると, 溶出液中の硫酸アンモニウム濃度1.2M付近 (フラクション43番付近) で鋭い単一ピークとしてホスファターゼが実は溶出されていることが判明し (図2), このことから活性阻害作用を持った何らかの物質が溶出液中に存在することが示唆された。

阻害作用を示す可能性が高い物質として硫酸アンモニウムが第一の候補に考えられたため, ホスファターゼ活性に及ぼす硫酸アンモニウムの影響について検討を行った (図3)。その結果, 硫酸アンモニウムは濃度依存的にホスファターゼ活性を阻害し (図3, ■), 最終濃度0.15M硫酸アンモニウムの存在下で約80%の活性阻害が認められた。この濃度 (0.15M) は, 本クロマトグラフィに用いた平衡化緩衝液 (1.5M硫酸アンモニウムを含んだ10mM TB (pH8.0)) を酵素反応液に添加した場合と同じ濃度であり, この知見はクロマトグラフィ後の活性消失の主要原因が硫酸アンモニウムによるものであることを強く示唆するものである。また, クロマトグラフィ後の溶出液をあらかじめ10倍希釈して酵素反応に供する場合に, 酵素反応液中の硫酸アンモニウム濃度は最も高い場合でも0.015Mとなり, この濃度では活性阻害はほとんど観察されないことも明らかとなった (図3)。

一方, 硫酸アンモニウム溶液の pH は酸性側に傾いているため (pH5.4), 活性阻害の原因が単に硫酸アンモニウムの添加に伴う pH の低下による可能性が考えられた。そこで, あらかじめ pH を9.0に合わせた硫酸アンモニウム溶液を調製し, 阻害活性の有無について検討した。その結果, その阻害作用は, pH を合わせていない場合 (図3, ■) に比べて多少弱くなるものの依然として強い阻害作用を示した (図3, ○)。

現在のところ, この阻害作用の詳細については明らかではないが, ウシ小腸粘膜由来のアルカリ性フォスファターゼについては, 硫酸アンモニウムと同じ無機塩であるリン酸塩¹⁰⁾やarsenate誘

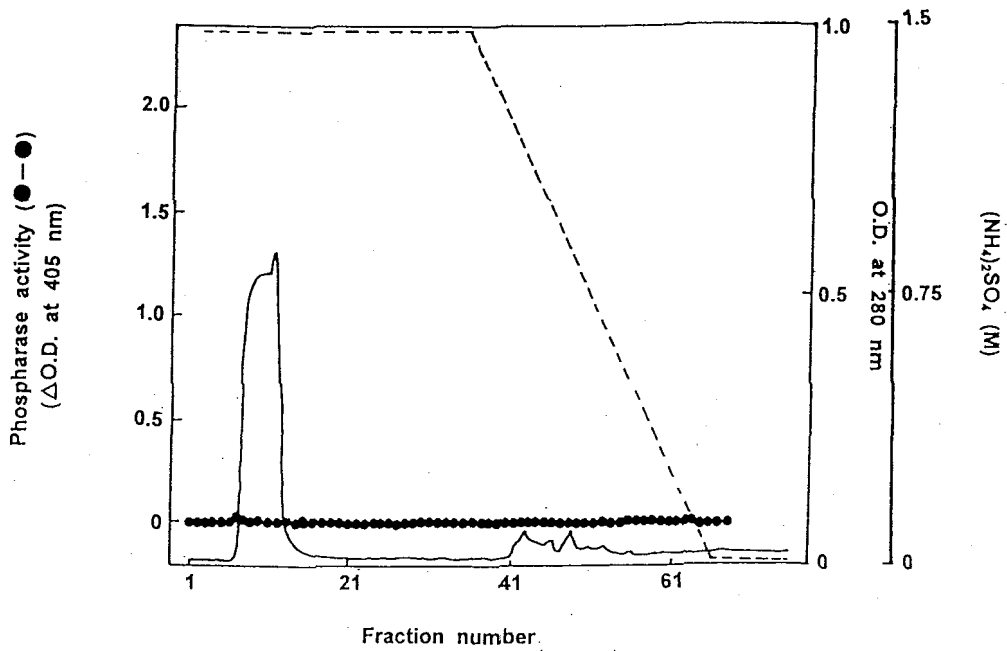


図1 リソース Iso 疎水性クロマトグラフィ後の耐熱性ホスファターゼの活性消失
それぞれ、280nmでの吸光度(—), 硫酸アンモニウム濃度(-----), ホスファターゼ活性(●-●)を示す。分画後、各溶出液10 μ lをホスファターゼ活性の測定に供した。

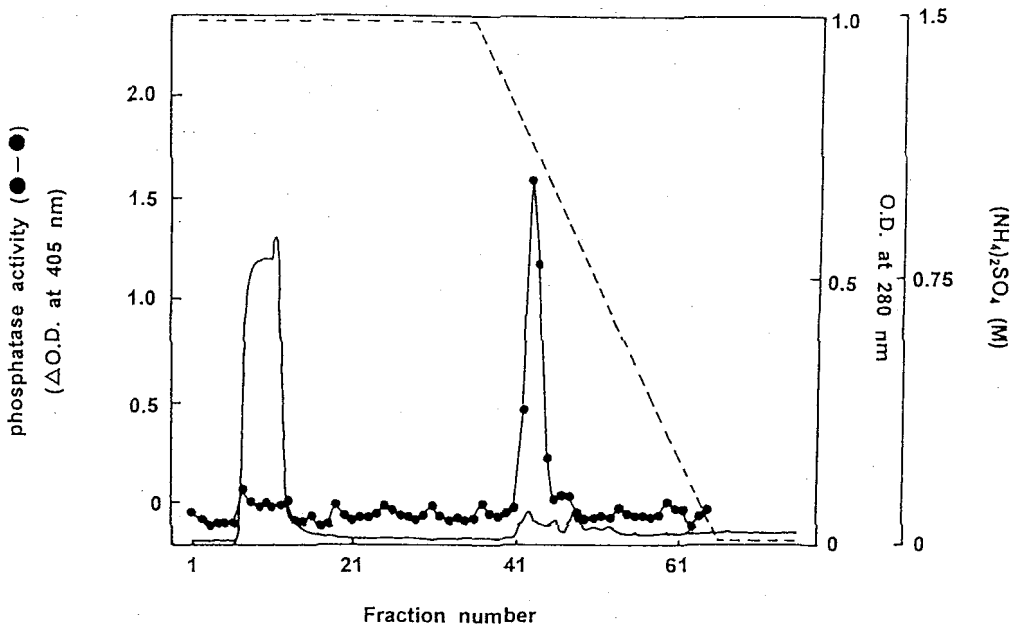


図2 リソース Iso 疎水性クロマトグラフィ担体上での耐熱性ホスファターゼの溶出パターン
それぞれ、280nmでの吸光度(—), 硫酸アンモニウム濃度(-----), ホスファターゼ活性(●-●)を示す。分画後、各溶出液を10mM TB(pH8.0)で10倍希釈し、その10 μ lをホスファターゼ活性の測定に供した。

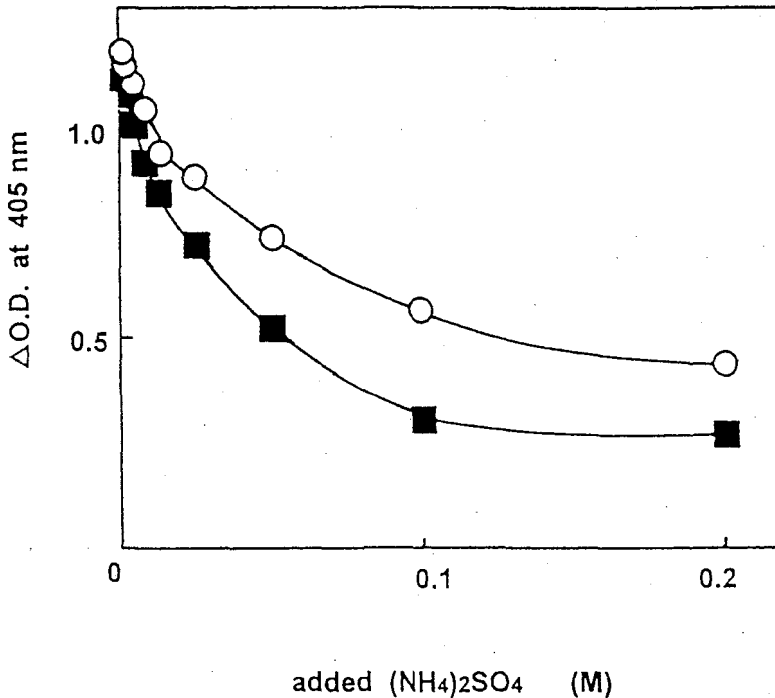


図3 耐熱性ホスファターゼ活性に及ぼす硫酸アンモニウムの作用
種々の濃度の硫酸アンモニウム溶液(■; pH 5.4, ○; pH 9.0)の存在下, ホスファターゼ活性(60°C, 20分)を求めた。

導体¹¹⁾によって活性阻害を受けることが報告されている。加えて、この阻害作用という性質が契機となって、アルカリ性ホスファターゼのために様々なアフィニティリガンドが開発¹¹⁻¹³⁾されている。従って、本研究で見出された耐熱性ホスファターゼに硫酸アンモニウムが阻害作用を示すという知見は、今後、本酵素に対するアフィニティリガンドを作製したり簡便な精製法を開発する上で興味深いものと考えられる。

文 献

- 1) Kristjansson JK (ed.): Thermophilic bacteria. CRC Press, Boca Raton. 1991.
- 2) Cowan DA: Biotechnology of the archaea. Trends Biotechnol 10: 315-323, 1992.
- 3) Zeikus JG: Thermophilic bacteria: ecology, physiology and technology. Enzyme Microbiol Technol 1: 243-252, 1979.
- 4) 大島泰郎, 小野寺一清, 軽部征夫, 水上茂樹(編): 特

殊環境に生きる細菌の巧みなライフスタイル. 共立出版, 東京. 1993.

- 5) Zamost BL, Nielsen HK and starnes RL: Thermostable enzymes for industrial applications. J Industr Microbiol 8: 71-82, 1991.
- 6) 近藤仁司: 耐熱性酵素の性質と検査薬への応用. 検査と技術 22: 111-117, 1994.
- 7) Sonnleitner B and Fiechter A: Advantage of using thermophiles in biotechnological processes: expectations and reality. Trends Biotechnol 1: 74-80, 1983.
- 8) Kristjansson JK: Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes. Trends Biotechnol 7: 349-353, 1989.
- 9) Kelly RM and Brown SH: Enzymes from high-temperature microorganisms. Current Opinion Biotechnol 4: 188-192, 1993.
- 10) Landt M, Boltz SC and Butler LG: Alkaline phosphatase: affinity chromatography and inhibition by phosphonic acids. Biochemistry 17: 915-919, 1978.
- 11) Brenna, O, Perrella M, Pace M and Pietta PG: Affinity- chromatography purification of alkaline phosphatase from calf intestine. Biochem J 151:

291-296, 1975.

- 12) Mossner E, Boll M and Pfeleiderer G: Purification of human and bovine alkaline phosphatases by affinity chromatography. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 361 : 543-549, 1980.
- 13) Seargeant LE and Stinson RA: Affinity elution from a phosphonic acid-Sepharose derivative in the purification of human liver alkaline phosphatase. J Chromatogr 173 : 101-108, 1979.

Alteration of thermostable phosphatase activity after hydrophobic chromatography

Shuji MORI, Motoi OKAMOTO, Yasunari NAKATA and Hiroshi ENDO

Abstract

Thermostable phosphatase partially purified from thermophilic bacteria, *Bacillus stearothermophilus*, was chromatographed on Resource Iso hydrophobic resin. When linear reverse gradient elution with 1.5 M \rightarrow 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was performed, phosphatase was found to be eluted as latent form, which revealed dose-dependent inhibitory effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on phosphatase. When various concentrations of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ were added into phosphatase reaction mixture, about 80% inhibition was observed in the presence of 0.15 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Acidification by adding $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was not responsible for this inhibition, because addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution which pH was previously adjusted to 9.0 showed same inhibitory effect.

Key words : thermophilic phosphatase, hydrophobic chromatography,
ammonium sulfate, dose-dependent inhibition

School of Health Sciences, Okayama University