

多糖ゲルによる糖質加水分解酵素の アフィニティークロマトグラフィー

荒木紀美・田中奈穂美・萩原歩美
波多野智子・小林幹彦

食生活科学科 食品化学研究室

Affinity chromatography of carbohydrate hydrolases by using polysaccharide gels

Motomi ARAKI, Naomi TANAKA, Ayumi HAGIWARA,
Tomoko HATANO, and Mikihiro KOBAYASHI
Department of Food and Health Sciences

Soluble starch, pectic acid and alginic acid were cross-linked by polyacrylamide. Several enzymes, including commercially available specimen and food material sources, were examined for their specificities to the polysaccharide gels. α -Amylase showed high affinity for the starch-gel in the presence of 3M ammonium sulfate and eluted with the buffer solution containing no ammonium sulfate. Pectinase and alginate-lyase bound to the pectin-gel and the alginate-gel, respectively. On the other hand, galactanase from the common bean (*Phaseolus vulgaris* L) bound to the starch-gel; however, trehalase did not bound to this gel. Highly purified alginate-lyase was obtained by the current affinity chromatography method. Based on these results, relationship between the chemical structure of the polysaccharide-gels and the substrate specificity of the enzymes was discussed.

Key words : polysaccharide-gel 多糖ゲル, hydrolase 加水分解酵素, α -amylase α -アミラーゼ, galactanase ガラクタナーゼ, trehalase トレハラーゼ, alginate-lyase アルギン酸リアーゼ

1. 緒言

酵素の精製には各種のクロマトグラフィー法が用いられるが、中でも精製効率が高いのはアフィニティークロマトグラフィーである。糖質の生合成や分解に関わる酵素では、基質となるオリゴ糖や多糖と酵素との親和性を利用して酵素と基質の複合体を分離し、精製度を高めた例が多くある。アミラーゼ類のデンプンやグリコーゲンへの吸脱着法は古くから用いられている古典的な酵素精製の手法である¹⁾。アミラーゼ以外の糖質加水分解酵素に関するアフィニティークロマトグラフィーによる酵素の精製としては、 α -1,3-グルカナーゼ²⁾、デキストラン α -1,2分岐除去酵素³⁾などの実施例が報告されている。これらの例では一般に既製品の多糖ゲルがマトリックスとして使用されているために、基質となる糖の構造に応じて任意のマトリックスを選択することには制限がある。

アフィニティークロマトの成否は酵素と多糖ゲルの親和性の強さに依存する。可溶性デンプンをエピクロルヒドリンで架橋したゲルをアフィニティークロマト担体として、タカアミラーゼ A (TAA) の親和性を評価したモデル実験では、酵素の結合量がカラムの平衡化に用いる緩衝液中に加えた硫酸の濃度に依存することが分かった。吸着された TAA は硫酸濃度を下げることで溶離が可能であった⁴⁾。本論文では、任意のゲル担体の選択性の幅を広げるために、エピクロルヒドリンよりも調製が容易なポリアクリルアミドゲルを多糖ゲルの架橋剤として使用し、ゲルの種類と供試酵素の吸着性、基質特異性について検討した結果を報告する。

2. 実験方法

1) ゲルの調製

アフィニティークロマトグラフィーに用いたゲル

は、多糖をエピクロロヒドリン⁴⁾または、ポリアクリルアミドで架橋して調製した⁵⁾。ゲルを作成した多糖は、可溶性デンプン、アルギン酸、ペクチン酸で、和光純薬(株)の製品を用いた。アクリルアミドは終濃度を30%、多糖は終濃度を5%として調製した。作成した多糖ゲルは乳鉢で磨砕し、水で十分洗浄後に使用した。

2) 酵素および基質

ペクチナーゼ、 α -アミラーゼおよび、CGTase (サイクロデキストリン合成酵素; コンチザイム) はアmanoエンザイム(株)の製品、アルギン酸リアーゼ (*Pseudoalteromonas* sp. strain No.1786 株のアルギン酸リアーゼ) はマルハ(株)で調製されたもの⁶⁾を用いた。又、エリンギのトレハラーゼといんげん豆のガラクタナーゼは、当研究室において、それぞれ市販品の食材から、先に述べた方法⁷⁾により調製した粗酵素標品を用いた。酵素活性の測定には、レモンのペクチン、可溶性デンプン、アルギン酸ナトリウム、ガラクトタンを、終濃度0.25%として各酵素液と反応させ、遊離した還元糖を測定した。アルギン酸リアーゼの活性は230nmの吸光度⁸⁾あるいは、生成還元糖量を測定した。

3) 分画の方法

アフィニティークロマトグラフィーによる分画の実験では、各種糖質ゲル3gに、3M硫酸アンモニウム(硫酸)と酵素液を混合し、マグネチックスターラーを用いて4℃で静かに24時間攪拌し、ゲルおよび酵素を10ml容の注射器に充填したものを簡易カラムと

して分画に供した。画分No. 1~6は3M硫酸を含む緩衝液で、No. 7~12は硫酸を含まない緩衝液を用い、5ml/tubeでそれぞれ溶出した。アルギン酸リアーゼの分画では、この方法の他に、フラクションコレクターを用いたグラジエント溶出を行った。

4) 分析法

タンパク質は280nmの吸光度(A280)で測定した。還元糖および全糖量の測定は、ソモギー・ネルソン法⁹⁾とフェノール硫酸法¹⁰⁾により行った。アルギン酸リアーゼの実験では、活性測定法として、230nmによる吸光度測定(A230)も併用した。又、SDSゲル電気泳動は、マルチゲルIIミニ10(13W)(第一化学薬品)を用い、Laemmli法で分析した。泳動用緩衝液は0.025Mトリス、0.192Mグリシン、0.1% SDS、pH8.4(同社)とし、分子量マーカー「第一」(同社)を用いて分子量を測定した。

3. 実験結果

1) 多糖ゲルの種類と酵素の親和性

はじめに、 α -アミラーゼを用いて、多糖ゲルの架橋法による差異の有無について検討した。エピクロロヒドリン(EPゲル)とポリアクリルアミド(PAゲル)で架橋した可溶性デンプン(SSTと略記)をカラムに充填し、 α -アミラーゼを分画してパターンを比較した(図1)。この結果、酵素タンパクと活性はゲルに高い親和性を示して強く吸着され、硫酸を含まない緩衝液で溶出された。ゲルの調製法による差は認められず、アクリルアミド架橋による簡便な方法でも目的に

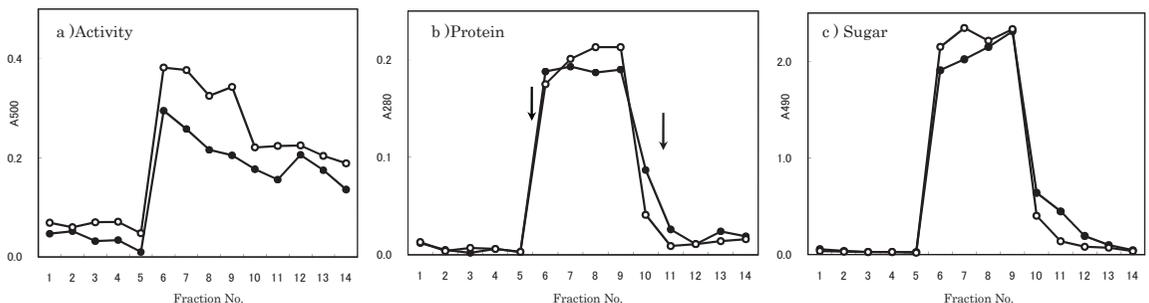


図1 α -アミラーゼのデンプンゲルによるアフィニティークロマトグラフィー

a、酵素活性 (A500) ; b、タンパク質量 (A280) ; c、全糖量 (A490)。○、SST-EPゲル(エピクロロヒドリン架橋のデンプンゲル) ; ●、SST-PAゲル(ポリアクリルアミド架橋のデンプンゲル)。画分No. 1~5は3M硫酸(AmSと表示)で溶出、No. 6~10は3M硫酸+0.1%デキストリンで溶出、No.11~14は40mM酢酸緩衝液(pH5.2)で溶出。図中の矢印は溶媒の切換え点を表す。

かなうゲルが得られることが分かった。

次にゲルの種類と酵素の種類を組み合わせることで親和性の強さを比較した(表 1)。α-アミラーゼはデンプンゲルに高い吸着性を示し、アルギン酸ゲルにも強く吸着された。CGTase もデンプンを基質とする酵素でデンプンゲルに吸着される⁴⁾が、α-アミラーゼと同様にアルギン酸ゲルにも親和性を示した。ペクチナーゼは 3 種類のゲルに 80% 前後の吸着性を示し、アルギン酸リアーゼも基質となるアルギン酸よりもペクチンに強く吸着された。

2) 硫酸の添加効果

ペクチナーゼとアルギン酸リアーゼについて、多糖

ゲルへの親和性と硫酸の添加効果について検討した。両酵素の基質に対する親和性は硫酸 (AmS と表示) の非存在下では極めて小さく、酵素活性の吸着はほとんど認められなかったが、3M 硫酸の存在下では親和性が増強された(図 2)。硫酸添加の場合の濃度と、多糖ゲルへの親和性の強さを比較したところ、硫酸濃度が 1.5M では親和性の増強効果は小さいことが分かった(表 2)。ペクチナーゼはアルギン酸ゲルよりもペクチンゲルへの親和性が強いのにに対して、アルギン酸リアーゼは基質のアルギン酸よりもペクチンゲルへの親和性が強い傾向が得られ、多糖の構造と基質特異性の関係を考える上で、興味深い結果となった。

表 1 各種の多糖ゲルへの酵素の吸着量

Enzyme \ Gel	Pectin-gel	Alginate-gel	Starch-gel
Pectinase	18.5 / 81.5	24.8 / 75.2	14.2 / 85.8
Alginate-lyase	27.6 / 72.4	50.8 / 49.2	47.9 / 52.1
α-Amylase	43.1 / 56.9	9.7 / 90.3	11.2 / 88.8
CGTase	9.6 / 90.4	—	—

* 酵素量: 非吸着酵素量 / 吸着酵素量 の比率を(%)で表示した。

表 2 酵素とゲルの親和性に及ぼす硫酸濃度の影響

Enzyme \ Gel (AmS M)	Pectin-gel		Alginate-gel	
	3.0 M	1.5 M	3.0 M	1.5 M
Pectinase	18.5 / 81.5	55.7/44.3	24.8 / 75.2	95.6/4.4
Alginate-lyase	27.6 / 72.4	88.4/11.6	50.8 / 49.2	98.3/1.7

* 酵素量: 非吸着酵素量 / 吸着酵素量 の比率を(%)で表示した。

3) 食材中の酵素とゲルとの親和性

アフィニティークロマトグラフィーによる酵素精製の有効性をより広く調べるために、食材中の酵素として、エリンギのトレハラーゼ(図 3a, b) と、いんげん豆のトレハラーゼ、ガラクタナーゼについて測定した(図 3c, d)。この実験では可溶性デンプンのゲルを用い、硫酸濃度 0 および 3M の 2 つの条件で比較した。エリンギのトレハラーゼは 3M 硫酸系ではタンパク質の吸着が強められたが、トレハラーゼ活性の吸着量には差がなかった。いんげん豆の酵素に関しては、3M 硫酸の存在下で 2 種類の可溶性デンプンゲルを用いて測定した。先に述べた結果と同様に、ゲルの架橋法による差異は見られず、ガラクタナーゼは両ゲルへの親和性が強く、吸着量が多いことが分かった

(図 3c, d)。一方、いんげん豆のトレハラーゼはほとんど吸着されず、エリンギの酵素との差が見られた。

4) アルギン酸リアーゼの精製

アルギン酸は海藻由来の多糖として、ゲル化特性に優れ、食品加工などに広く用いられている。アルギン酸リアーゼはアルギン酸分解酵素としてゲルの性状の改変に用いられる他、分解生成物のオリゴ糖の血圧低下作用が注目されている⁶⁾。本酵素の精製法はすでに茶木らによって報告されている⁸⁾が、ここでは、簡易精製法の確立をめざして検討した。図 4a, b に示したように、アルギン酸リアーゼの分画は硫酸の濃度勾配を 3M から 0M まで低下させるグラジエント法 (a) とステップワイズ法 (b) で比較した。a の結果では、

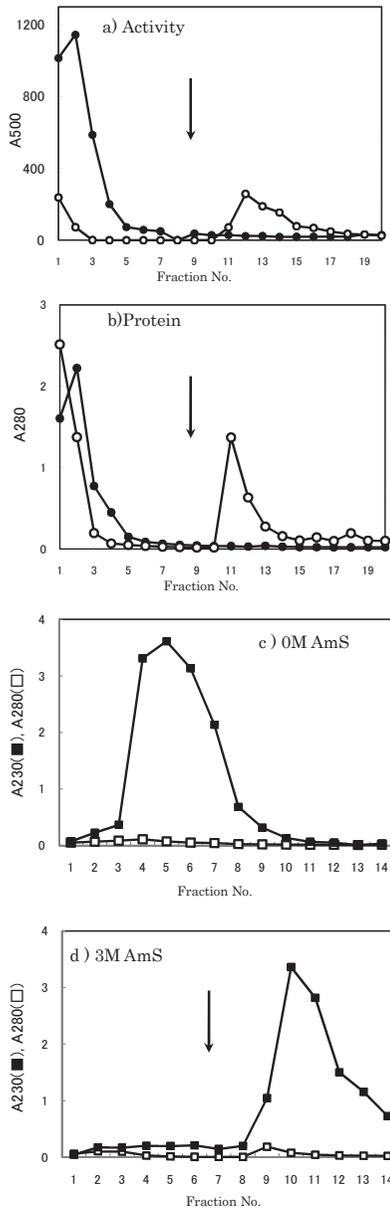


図2 ペクチナーゼおよびアルギン酸リアーゼのアフィニティークロマトグラフィー
 a、ペクチナーゼの酵素活性 (A500, 縦軸はグルコース換算した糖量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) で記載); b、ペクチナーゼのタンパク質量 (A280); ●、0M 硫酸の存在下 (40mM 酢酸緩衝液、pH5.2) で分画; ○、3M 硫酸の存在下で分画; c、アルギン酸リアーゼを 0M 硫酸の存在下で分画; d、アルギン酸リアーゼを 3M 硫酸の存在下で分画; 酵素活性 (A230)、■; タンパク質量 (A280)、□。図中の矢印は 3M 硫酸から 0M 硫酸へ溶媒の切り替え点を表す。

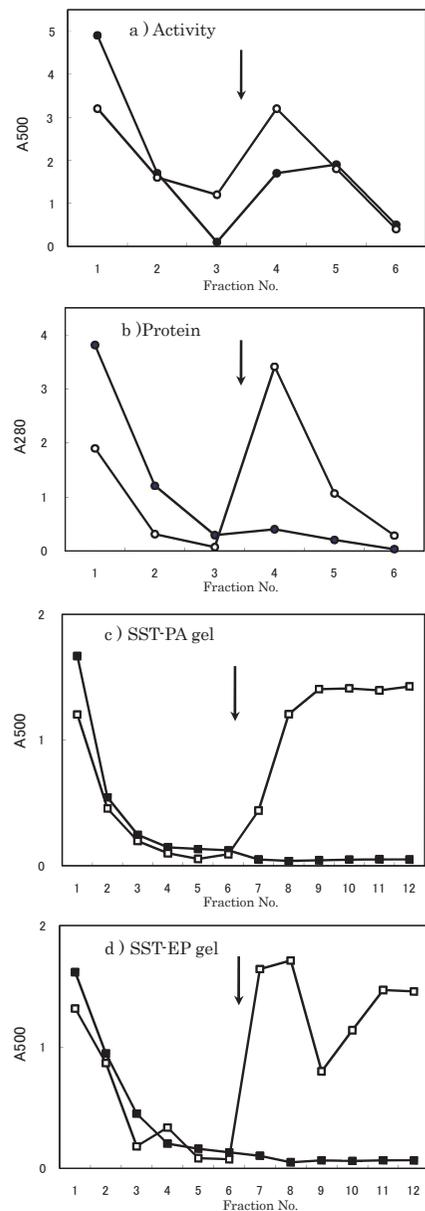


図3 トレハラーゼおよびガラクタンナーゼのアフィニティークロマトグラフィー
 a、エリンギのトレハラーゼの酵素活性 (A500)。b、エリンギのトレハラーゼのタンパク質量 (A280)。a、b は SST-PA ゲル (ポリアクリルアミド架橋のデンブングル) で分画したもの。●、0M 硫酸の存在下 (40mM 酢酸緩衝液、pH5.2) で分画; ○、3M 硫酸の存在下で分画。c、いんげん豆の酵素を SST-PA ゲルで分画したもの。d、いんげん豆の酵素を SST-EP ゲル (エピクロルヒドリン架橋のデンブングル) で分画したもの。■、トレハラーゼ活性 (A500); □、ガラクタンナーゼ活性 (A500)。図中の矢印は 3M 硫酸から 0M 硫酸へ溶媒の切り替え点を表す。

酵素活性とタンパク質の分離パターンには対応が見られ、画分 No.50 以降で溶出された活性では高い比活性が得られた。b の結果では、画分 No. 7 以降に高い比活性をもつ酵素が溶出された。表 3 に両カラムで得られた全活性、全タンパク質量、比活性をまとめた。最も高い比活性が得られたのは b の吸着画分で供試酵素の 5 倍程度に精製されることが分かった。

SDS ゲル電気泳動分析の結果、得られたピークのうち A2 ~ A6 および B1 では分子量 30.9kDa と 30.2kDa の 2 本のバンドが検出された (data not shown)。ピーク A2 ~ A4 ではこれらのバンドよりも

分子量が大きい複数のバンドも見られた。この酵素の精製品では分子量が 32.0kDa と報告⁸⁾されており、本実験で得られたピークでは精製操作の過程でプロテアーゼによる限定分解を受けた可能性が考えられる。又、図 4 c の結果から、アフィニティークラムの吸着成分ではアルギン酸リアーゼ活性のうち、A230 で測定したいわゆるリアーゼ活性 (加水分解後に二重結合を生成する反応) よりも、A500 で測定した還元糖生成の活性が高くなる傾向があった。従って、粗酵素標品中に共存する酵素でアルギン酸リアーゼとは異なる作用をもつ酵素が存在する可能性が示唆された。

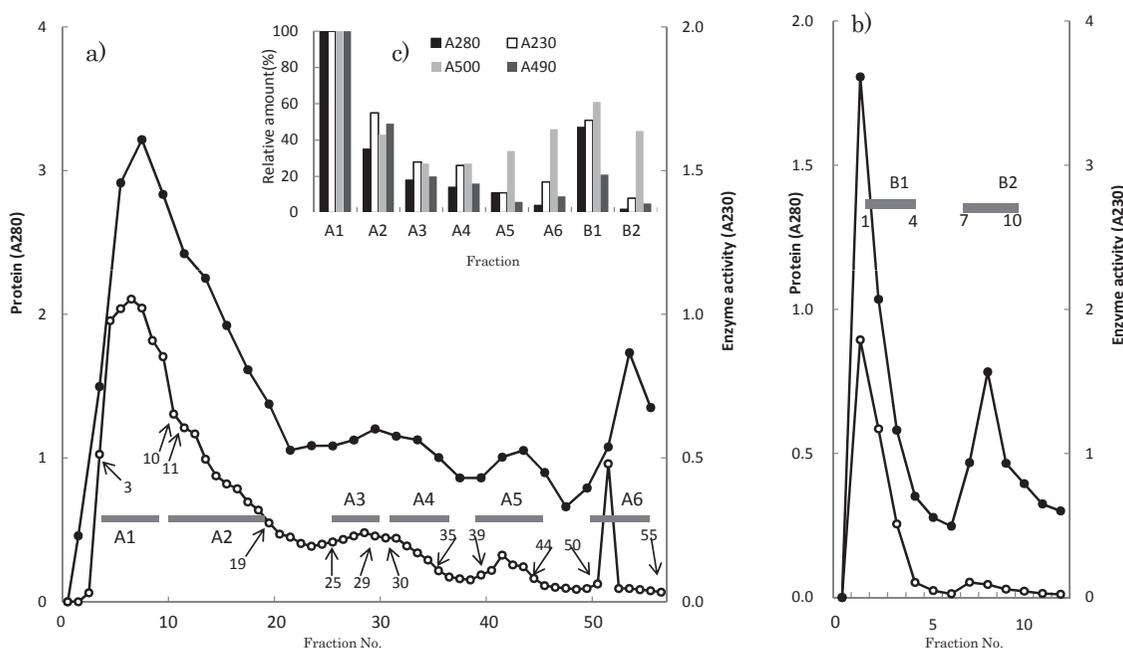


図 4 アルギン酸リアーゼのアフィニティークロマトグラフィー

a、グラジエント溶出法で分画；b、ステップワイズ溶出法で分画；●、酵素活性 (A230)；○、タンパク質量 (A280)。c、活性ピーク画分の測定値のまとめ。■、A280；□、A230；■、A500 (酵素活性、還元糖量)；■ A490 (全糖量)。

表 3 *Pseudoalteromonas* sp. strain No. 1786株のアルギン酸リアーゼの精製

		Total activity (Units)*	Total protein (mg)	Specific activity (Units/mg)
Gradient	A 1	3.3	0.46	7.2
	A 2	8.6	0.71	12.1
	A 3	4.2	0.47	8.8
	A 4	4.8	0.56	8.5
	A 5	4.5	0.49	9.3
	A 6	5.8	0.40	14.6
Step-wise	B 1	4.8	0.38	12.5
	B 2	5.9	0.20	30.4

* 酵素活性(Units)は暫定的な値であり、1 unitsはNelson-Somogyi法によるglucose量(μg)に相当する。

4. 考察

先に報告したように、酵素と基質の親和性を強めるためには硫酸存在下でのアフィニティークロマトグラフィーが有効である⁴⁾が、本研究ではさらにこの詳細を検討し、ゲル化させた多糖の化学構造と酵素の基質特異性に関して新たな事実が示された。3M 硫酸添加の系では図2、図3に示したように酵素の多糖ゲルへの吸着性が高くなることが確認されたが、硫酸濃度が1.5Mの場合には効果が小さかった(表2)。硫酸は塩析効果が高く、タンパク質は親水性が減少して溶解度が低下し、不溶性に変化して沈殿する。一方、疎水性基をもつゲル(担体)を充填したカラムにタンパク質溶液を添加し、親水性の移動相(溶出液)で溶出すると、タンパク質の分子表面の疎水性部分と担体上の疎水性基間の結合力の弱いものから順番に溶出される。この方法は、疎水性クロマトグラフィーとよばれている¹⁴⁾が、本研究におけるアフィニティークロマトグラフィーの結果には、基質多糖への親和性と硫酸添加による疎水性の改変の2つの原理が機能している可能性が推測された。3M濃度の硫酸は硫酸塩析では約61%飽和の濃度に相当し、試料タンパク質の溶解度がかなり低下する条件であり、疎水度も大幅に増大するものと考えられる。

供試酵素とその基質特異性に鑑み、アフィニティークロマトグラフィーの担体とした多糖ゲルの化学構造との関係についても興味深い知見が得られた。すなわち、表2と表3で得られた酵素種と多糖ゲルの相関を見ると、例えば、 α -アミラーゼやアルギン酸リアーゼがペクチンゲルに親和性を示し、 α -アミラーゼがアルギン酸ゲルに親和性を示すなどの結果が得られた。これらのデータは一見、酵素の基質特異性と矛盾し、アフィニティークロマトグラフィーが機能していないようにも解釈される。しかし、上述したように硫酸添加のクロマト条件が酵素タンパク質に疎水的な構造の変化をもたらし、疎水性クロマトグラフィー的な作用とアフィニティークロマトグラフィー的な作用とが相俟って酵素が分離された可能性も考えられる。

そこで、アフィニティークロマト剤として用いた多糖ゲルの化学構造を供試酵素の基質特異性と対比させて、酵素の多糖ゲルへの親和性について新たな考察を加えてみた。グルコースとガラクトースはエピマーの関係でC4位のOH基が逆向きであるが、C2、C3、

C6位の配向性は同じである。デンプンとペクチンは共に1,4結合のポリマーであり、直鎖部分の構造は類似性が高い可能性がある。アルギン酸とガラクトランの化学構造上の共通点は、単糖の結合様式が β -1,4結合であることと、C6位に酸性基COOHを有することである。又、ペクチン酸とガラクトランとは構成単糖がガラクトン酸とガラクトースである点と結合様式のアノマー型が α -型と β -型である点で異なるが、1,4結合の直鎖構造をとる点が共通している^{12,13)}。このような化学構造上の類似点を踏まえて、図2、図3、表1、表2の結果を見ると、測定した4種類の酵素の挙動がある程度の説明できるように思われる。

本研究の目的の一つは、食材中の各種酵素を精製してその性質を明らかにすることである。そのためには酵素の精製法ができるだけ簡便で、容易であることが望ましく、アフィニティークロマトグラフィーに大きな期待をかけて検討を始めた。狙いの一部はアルギン酸リアーゼの精製(図4、表3)で証明され、いんげん豆のガラクタナーゼの精製(図3)でもこの手法が有効で、次の実験に進むことができた。上で述べたように最近では、酵素の精製法として疎水性クロマトグラフィーの有用性が注目されているが、タンパク質を扱う上で疎水的な性質の変化は等電点の変化などと同様に、異種タンパク質分子の分離に利用できるため、今後はこの点に着目した研究に興味を持たれる。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、アルギン酸リアーゼの粗酵素標品をご恵与賜り、貴重なご助言を頂きました(株)マルハグループ本社・中央研究所(現・(株)マルハニチロホールディングス) 茶木貴光博士、馬場貴司氏、樋浦望博士にお礼申し上げます。尚、この論文の主な部分は日本応用糖質科学会・平成19年度大会(8月29日)にて「多糖ゲルによる食材中の加水分解酵素の簡易精製」として口頭発表した。

文献

- 1) 中村道徳、貝沼圭二：澱粉・関連糖質酵素実験法（生物化学実験法 25）、3～8、学会出版センター（1989）.
- 2) K.Imai, T.Kikuta, M.Kobayashi and K.Matsuda : *Agric. Biol. Chem.*, 41,1339 ~ 1346 (1977). An α -1,3-glucanase from *Streptomyces* sp.KI-8: Production and purification.
- 3) Y.Mitsuishi, M.Kobayashi and K.Matsuda : *Agric.Biol. Chem.*, 43,2283 ~ 2290 (1979). Dextran α -1,2-debranching enzyme from *Flavobacterium* sp. M-73: Its production and purification.
- 4) M.Kobayashi,Y.Sasaki and S.Kobayashi : *Biosci.Biotech. Biochem.*, 61,813 ~ 816 (1997). Purification of amylase and other enzymes by forced-affinity chromatography method.
- 5) B.J.Davis : *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 121,404 ~ 427 (1964). Disk electrophoresis-II, Method and application to human serum protein.
- 6) 樋浦望、茶木貴光、小川博：日本農芸化学会誌、75,783 ~ 785 (2001). アルギン酸オリゴ糖ナトリウム塩の血圧上昇抑制作用.
- 7) 荒木紀美、中田陽子、菱田桂菜、池和田恵、谷亀久美子、小林幹彦：実践女子大学生活科学部紀要、46,1 ~ 8 (2009). エリンギ (*Pleurotus eryngii*) の子実体における糖質および糖質分解酵素の特徴.
- 8) T.Chaki,T.Baba, N.Hiura, and M.Kobayashi : *J.Appl. Glycosci.*, 55,81 ~ 88 (2008). Purification and characterization of alginate-lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No.1786.
- 9) M.Somogyi : *J.Biol.Chem.*, 195,19 ~ 23 (1952). Notes on sugar determination.
- 10) M.Dubois, K.A.Gilles, J.K.Hamilton, P.A.Rebers, F.Smith : *Anal.Chem.*, 28,350 ~ 356 (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances.
- 11) R.K. スコープス, 塚田欣司 (訳) : 新・タンパク質精製法－理論と実際、156 ~ 160、シュプリンガー・ジャパン (1995).
- 12) 国崎直道、佐野征男：食品多糖類、43 ~ 140、幸書房 (2001).
- 13) 原田篤也、三崎旭：総合多糖類科学、172 ~ 348、講談社 (1974).