

HPLCを用いたショウジョウバエの酸性 ホスファターズアロザイム精製の改良法

富永浩子 成瀬澄子

クロショウジョウバエの酸性ホスファターゼ (ACPH) は, *AcpH* 遺伝子座支配のアロザイム多型として生体内に存在する。自然集団内には *AcpH* 座に 4 種の対立遺伝子が見出されている (大羽, 1977)。

これらのアロザイムは分子量約 5 万の 2 つのサブユニットから成る塩基性の糖タンパク質である (Narise, 1984)。尚, このアロザイム間ではそれらが存在するリソゾームに結合する能力に違いがあり, ACPH¹ では全酵素の 24% が通常の精製過程, 即ち 0.1 M Tris-HCl pH 7.2 中での抽出によりリソゾームから遊離される。ACPH² では全体の 35% が, ACPH⁴ では 58% 以上が遊離することが見出され (Narise, 1985), その結果, 電気泳動上で活性の差が認められる (Fig. 1 参照)。最近, リソゾーム酵素がポリゾームで生合成された後にリソゾーム中に分布する機構が研究されているが, リソゾーム酵素は糖タンパク質でその糖鎖のマンノース-6-リン酸がリソゾームの受容体に結合するために重要な役割を演ずると考えられている (Kaplan et al., 1977; Natowicz et al., 1982; Rosenfeld et al., 1982)。

近年になってアロザイムタンパク質の一次構造及び塩基レベルで置換された部位が明らかになった (Thatcher, 1980; Benyajati et al., 1981) キイロショウジョウバエのアルコール脱水素酵素遺伝子座 (*Adh*) の例でいえば, *Adh* 座支配の ADH アロザイムのアミノ酸配列の研究の結果各々のアロザイムの移動度の変化に対応した一個のアミノ酸の置換が明らかにされた (Fletcher et al., 1978; Thatcher, 1980)。一方アイソザイムを示す酵素の中には翻訳後の修飾によって附加される糖鎖の糖残基の差異, 即ちリン酸及びノイラミン酸などの存在によって起ることも明らかにされている (Ostrowski et al., 1970; Dizik and Elliott, 1970)。

このような事実によって, ACPH アロザイムの遺伝的なリソゾームとの結合の差を構造上から明らかにするには, タンパク質部分と糖質部分との両面から解明されなければならない。そしてこの研究の推進には純粋な酵素を, 用いられる様々な分析法によって検出出来る程の量を如何に早く得られるかが重要な問題となってくる。

ACPH はクロショウジョウバエ中に微量に存在する酵素である。その精製は既に発表した (Narise, 1984) ように硫酸分画, イオン交換, 分子ふるい, ヒドロキシアパタイトクロマトグ

ラフィーと等電点分離をするクロマトフォーカシングを用いた。クロマトフォーカシングによる方法は夾雑タンパクの分離にはよい結果が得られたが、この段階での酵素標品は濃度がうすく且つ液量が多いため、サンプルの濃縮及び溶出後の処理に時間がかかった。この研究では、この精製過程を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の使用で時間を短縮し、酵素タンパク質のロスを少なくすることが出来るか否かを試みた。

HPLC がタンパク質の分離精製に用いられるようになったのは、1970年代後半より急激に飛躍した HPLC 用イオン交換体の開発の結果である (Chang et al., 1976; Fukano et al., 1978; Kato et al., 1983)。HPLC は短時間で高分離が得られ、且つ濃縮された標品が得られるので酵素の精製にはすぐれた特徴をもっている。イオン交換 HPLC はその後、種々のタンパク質の分離に利用され、(Schifreen et al., 1980; Takahashi et al., 1981; Strahler et al., 1983; kato et al., 1984)、現在では低速イオン交換クロマトグラフィーと同じように広く用いられつつある。

この研究では ACPH アロザイムの精製過程の一つの段階としてイオン交換 HPLC を用いることにより、時間の短縮と高濃度の純粋酵素タンパク質が得られることを示した。又、アロザイムのように電荷が違うのみで構造的に類似度の高いものを、イオン交換 HPLC により分離出来ることを示唆した。

材 料 と 方 法

材 料

クロジョウジョウバエの3つの電気泳動型即ちアロザイム系統 (Acph-1, Acph-2, Acph-4) は、野外集団から採取した1雌系統の中から交配によってそれぞれの対立遺伝子について同型接合にされたものである。それらの多くは以前の研究に使われていたものと同じである (Narise, 1985)。

各系統別にイースト、糖を含む寒天の通常餌上に卵を産ませ、25°C で生育させたハエを羽化後2日以内に集め、-70°C に保存したものを材料とした。

方 法

酵素の抽出及び部分精製

各系統の親バエからのアロザイムの抽出及び部分精製は前の方法に従って行った (Narise, 1984)。即ち、-70°C 保存の凍結ハエ 240 g を 0.1 M Tris-HCl pH 7.4 中で金属ホモジナイザーにかけ、20,000 g、30分遠心した上清を粗酵素液とした。硫酸プロタミンによる沈殿物を除いた後、硫安濃度 35% に保ち乍ら pH 4.2 に下げ、直ちに遠心して沈殿物を除去する。上清は pH を中性にした後、85% 飽和硫安の下で1時間攪拌した後沈殿物を集めると、粗酵素液の活性

の約75%が得られる。これを DE-52, セファデックス G-150, ヒドロキシアパタイト, CM-52 カラムを順次通すことによって約 500 倍の活性をもつ酵素液となった。収量は約20%であったが, 240 g のハエから得られたタンパク質は約 30 mg であった。この標品は約 20% の夾雑タンパクを含んでいるので, これを除くため, イオン交換 CM-高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた。

CM-HPLC による精製

上述の部分精製標品を 20 mM K-リン酸緩衝液 pH 6.0 に一晚透析し, 0.22 μ m のフィルター (Millipore) を通し, 減圧して脱気した後, JASCO-HPLC システムにポンプを用いて導入した。流速は 0.8 ml/min であった。このシステムはポンプ (JASCO, Twinkle), UV モニター (ISCO, UA-5), CM-カラム (TSK-gel, IEX 535 CM, 東洋ソーダ, 内径 5.7 mm, 長さ 300 mm), 濃度勾配作成器 (JASCO, GP-A 40) によって構成されている。サンプル導入後は 20 mM から 400 mM の K-リン酸緩衝液 pH 6.0 のリニアグラジエントを用いて溶出を行なった。ACPH⁴ アロザイムはこの条件では分離が悪いので, 5 mM K-リン酸緩衝液でカラムに吸着させ, 5 mM から 400 mM のリニアグラジエントで溶出を行なった。タンパク質のピークを集め, ディスク電気泳動法によって活性に対応するタンパク質が単一か否かを伴定した。

電気泳動

薄層寒天ゲル電気泳動は泳動槽に 0.025 M K-リン酸緩衝液 pH 6.8 を用い, ゲル緩衝液として 0.025 M Tris-HCl pH 7.9 を用いる不連続系で水平に泳動した。ゲルは 1 % アガロース, 2 % ポリビニールピロリドンを含み, 16.5 × 18 cm のガラス板上に 0.7 mm の厚さで作られた。泳動は定電圧で通常90分間泳動した。ディスクゲル電気泳動は 7.5 % アクリルアミド, pH 4.3 で行った (Narise, 1984)。泳動後, タンパク質はクマシーブリリアントブルー R により染色し, 酵素染色は pH 5.0 中で α -ナフチルリン酸を基質にし, ファーストブルー B で発色させた。

酵素活性及びタンパク質の測定

酸性ホスファターゼ活性及びタンパク定量の測定は Narise (1984) の方法に従って行なった。

結果と考察

クロショウジョウバエの ACPH は分子量 100.000 の 2 量体の糖タンパク質であり, 生体内では多型いわゆるアロザイムとして存在するので, 一個体を電気泳動の材料とした時, Fig. 1 に示すようなパターンが得られる。同型接合体は 1 本のバンドを持ち, それぞれの遺伝子型のちがいにより泳動距離がことなる。又, 遺伝子型の間で活性のちがいもみられる。異型接合体は両親のバンドとその中間に雑種酵素のバンドの 3 本を示すが両親の活性が異なるので 2 本にみえることもある。それぞれの同型接合体 (*Acph¹/Acph¹*, *Acph²/Acph²*, *Acph⁴/Acph⁴*) を別々に大量培

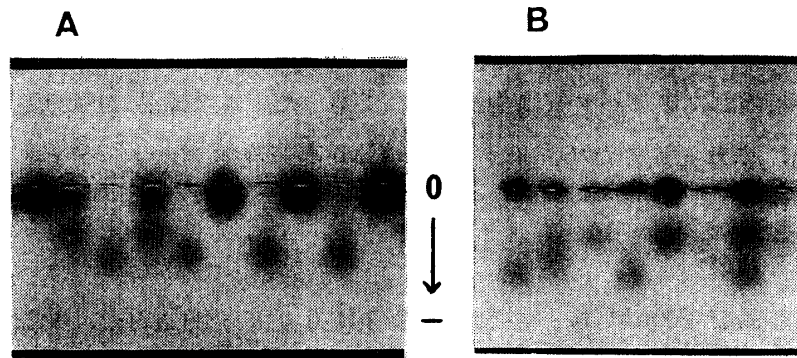


Fig. 1 クロシヨウジョウバエの *Acph* アロザイムの電気泳動

クロシヨウジョウバエ 1 匹ずつを別々に少量の 0.05 M Tris-HCl pH 7.0 又は水中ですりつぶし、濾紙に抽出液を含ませて薄層寒天ゲル上の各々の原点におく。90分泳動した後、 α -ナフチルリン酸を基質とし pH 5.0, 37°C で反応後 Fast-Blue B 液で発色させた。A. 左より 1, 6, 8, 10, *Acph*¹/*Acph*¹; 2, 4, *Acph*²/*Acph*¹; 3, 5, 7, 9, *Acph*²/*Acph*²。B. 左より 1, 4, *Acph*¹/*Acph*¹; 2 *Acph*¹/*Acph*²; 3, 5, 7 *Acph*¹/*Acph*¹。

養し、成虫から酵素を抽出し、硫酸分画、DE-52、ゲルろ過、ヒドロキシアパタイトを含む数段階の精製過程 (Narise, 1984) を経て、低速 CM-52 カラムクロマトグラフィーにより分離すると Fig. 2 に示すような大きい一つのタンパク質のピークが得られた。図からわかるように、このピークは活性を示すピークと完全には一致していないので単一のタンパク質が存在するとは認

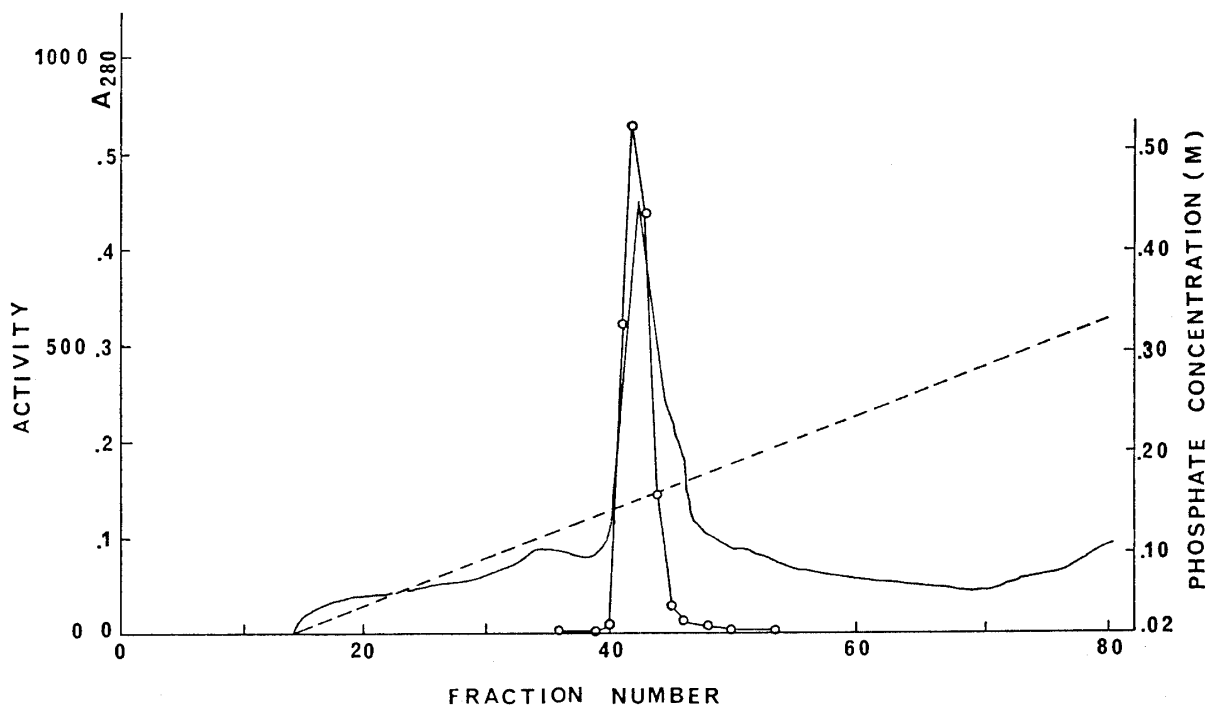


Fig. 2 部分精製された ACPH² の CM-52 カラムクロマトグラフィー

約 50 mg のタンパク質を含む酵素液 120 ml を CM-52 カラム (18×3.7 cm) にのせ、20–500 mM K-リン酸緩衝液 pH 6.0 の 800 ml で溶出した。流速は 80 ml/h, 分画は 6 ml で行い、回収された活性は約 60% であった。実線は 280 nm の吸光度を、丸印を結ぶ線は酵素活性を、点線はリン酸濃度を示す。実験は 1 mM EDTA, 5 mM β ME を含む液を用い、すべて 4°C で行った。

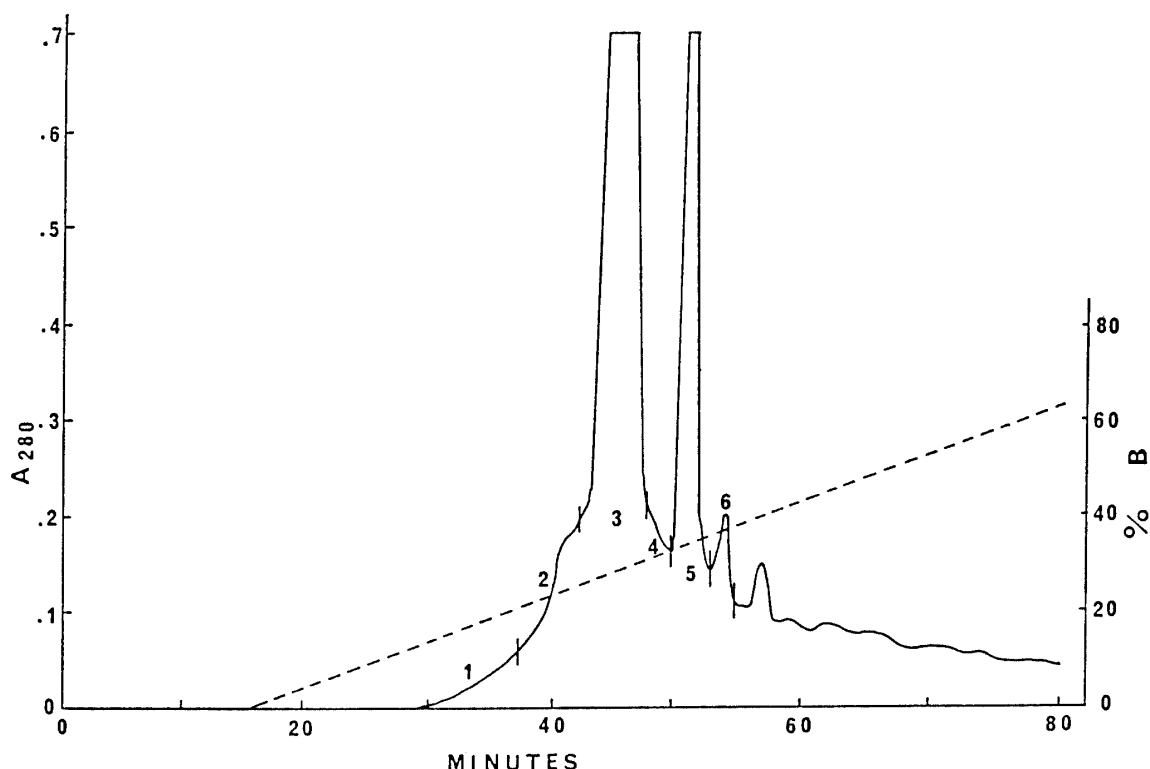


Fig. 3 部分精製された ACPH² の陽イオン交換 (CM-Silica) HPLC

約 20 mg のタンパク質を含む酵素液 50 ml はポンプによって 20 mM K-リン酸緩衝液 pH 6.0 (A) で平衡化したカラムにのせ、400 mM K-リン酸緩衝液 pH 6.0 (B) の 1 %/min の直線勾配により溶出した。流速 0.8 ml/min, 実線は 280 nm の吸光度, 点線は B 液の濃度を示す。実験は 1 mM EDTA, 5 mM β ME を含む緩衝液を用い, 室温で分離された。

めがたい。このことはこの標品をディスク電気泳動によって精製度を確かめると明らかとなる (Fig. 4-2)。従って、従来の方法では等電点による分離、クロマトフォーカシングによって純品を得た。

この実験では、高速液体クロマトグラフィーがクロマトフォーカシングの代りに用いられるか否かを調べた。即ち、低速 CM-52 から溶出された標品の活性の高い部分を 1 晩 20 mM K-リン酸緩衝液 pH 6.0 に透析し、フィルターを通した後、脱気して CM カラムを装備した HPLC に吸着させた。未吸着部分の洗浄後、20—400 mM の K-リン酸緩衝液 pH 6.0 のリニアグラジエントにより溶出した。ACPH² を用いた時の溶出パターンを Fig. 3 に示した。図示したように 2 つの大きなタンパク質のピーク (3 と 5) が得られたが活性の大部分はピーク 3 に見出された。この 2 つのピークの一部をディスク電気泳動により調べると、ピーク 3 では活性に対応するタンパク質の 1 本のバンドがみられたが、ピーク 5 ではかなり多くのタンパク質のバンドが存在していた (Fig. 4)。ピーク 3 の試料は量を増した時も 1 本のタンパク質以外のバンドは見出されなかった。Fig. 4 中のピーク 5 の試料はピーク 3 のその 3 倍量以上を用いているので活性に対応するタンパク質バンドが現われたが、ゲル上の活性は殆んど見られなかった。HPLC のこの操作はカラムの洗浄を含めても約 4 時間で終了するので、50 mg のタンパク質を含む試料の場合

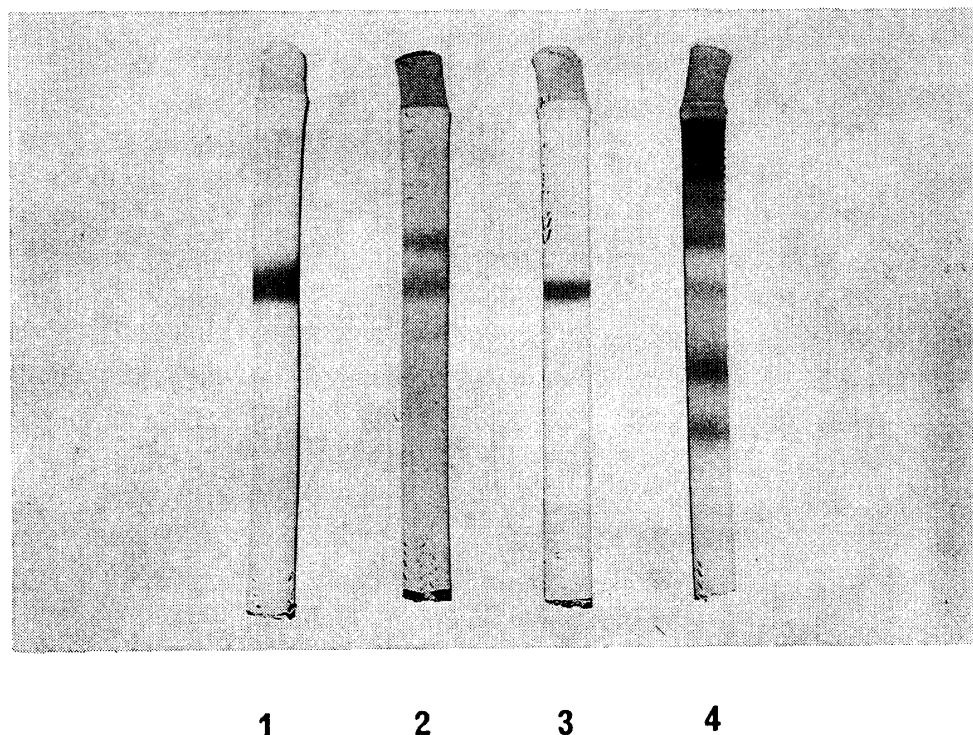


Fig. 4 ACPH² の CM-クロマトグラフィー分画のディスク電気泳動

1. ACPH² の CM-HPLC の分画 3 (活性染色)
2. CM-52 低速液体クロマトグラムのピーク
3. ACPH² の CM-HPLC の分画 3
4. ACPH² の CM-HPLC の分画 5

ゲル 2, 3, 4 はタンパク染色を行った。

には、酵素の分離と回収をよくするために 2 回に分けて行なっている。回収率は同じ条件下でも実験毎に変わり、50 から 90 % と大きくふれるが、その原因は未だ不明である。しかし回収された活性の 85 % 以上は常にピーク 3 に存在するので、分離は極めて良いといえる。

従来の精製法におけるクロマトフォーカシングと比べると、CM-HPLC による分離に要する時間は非常に短くなった。クロマトフォーカシングでは、この段階の試料の濃度が非常にうすく硫酸沈殿による濃縮が不可能であるので、試料の濃縮のため及び溶出された試料の中から夾雑物(ポリバッファー)を除くために非常に長時間を必要とした。クロマトフォーカシングのみで 4 ~ 5 日が必要であったが HPLC を用いるとこの操作は 1 日で終り、全行程も 6 日間であった。

ACPH¹ 型は ACPH² と全く同じ条件で CM-HPLC により純粋タンパク質として分離された。溶出パターンも殆んど等しいが、溶出される B 液の濃度が少し高い方に傾いていた。即ち ACPH¹ では B 液濃度 175—190 mM により溶出され、ACPH² では 140—155 mM であった。ACPH⁴ アロザイムは等電点が最も酸性であるため (Narise & Tominaga, 1987) 前記条件では酵素の前に溶出される夾雑タンパク質との分離が悪い上、時にはカラムへの吸着が充分でなく洗浄中に流れ出ることもあった。そのためカラムへの吸着には 5 mM K-リン酸緩衝液 pH 6.0 を用いて行った。ACPH² に比べてグラジエントの勾配が少し急になったが、夾雑タンパクから完全に

分離させることが出来た。ACPH⁴ の溶出濃度は 105~120 mM であった。3 種のアロザイムとも回収率は以前の方法 (Narise, 1984) に比べて 1.5 倍増加されて、240 g のハエより約 3 ~ 4 mg が得られた。

1 つの電荷の異なるアミノ酸の差異によって生ずるアイソザイムは、構造上の類似性が高く、いくつかの異なったクロマトグラフィーを用いても分離することが困難な場合が多い。Bostick et al (1980) は血清中に含まれるクレアチンキナーゼの 3 種のアイソザイムを陰イオン交換 HPLC で分離した。血清中にはその 1 種が多量に含まれており、それ以前に用いていた電気泳動による分離では量的な差異がはっきりさせられなかった。

クロショウジョウバエ ACPH の精製に関する我々の実験では、純品にすることを目的としたので 3 種のアロザイムの混合物からの分離は行っていない。しかし、生体からアロザイムの各々のバンドを分離し、その量的関係を知ることも必要となる場合がある。Fig. 1 からわかるように *Acph* 座の異型接合体は 2 本の親バンド (この場合、両親のバンドの濃さに差があるので一方が見えにくい) の中間に雑種酵素のバンドがあるので、その各々を分離することは低速クロマトグラフィーでは不可能であった。このような場合は分離用電気泳動によって分離するのが通常であるが、バンド間の距離がアロザイムのように接近しているものではお互いの混在はまぬがれない。従って収量が悪く量的関係をみるのは不適當であった。この実験で行った HPLC を生体からの粗酵素に用いるとき、ACPH¹, ACPH², ACPH⁴ が溶出される液の濃度に差があるので、分離は可能であると思われる。*Acph*¹/*Acph*² 及び *Acph*²/*Acph*⁴ の異型接合体では各々の雑種バンドは、その中間に位置するのでかなり接近しているが、前述した各アロザイムの溶出濃度から推定して分離可能であろう。勿論この場合の検出は酵素活性によるのでそれに伴う検出システムを必要とする。又、HPLC による分離は緩衝液の種類によって、たとえ同じ pH でも全く異なるクロマトグラムを得ることがある (加藤芳男 & 中村孝司, 1984) ので、他の緩衝液を試みることも必要であろう。

要 約

クロショウジョウバエの酸性ホスファターゼの 3 種のアロザイム (ACPH¹, ACPH², ACPH⁴) の精製過程にイオン交換—高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いることにより、純粋な酵素タンパク質を得た。この ACPH アロザイムは数段の低速クロマトグラフィーによる精製手段を用いても約 20% の夾雑タンパク質を除くことが出来なかった。CM-HPLC の使用により数時間でそれら夾雑タンパク質を酵素タンパク質から完全に除くことが出来た。この方法はクロマトフォーカシング及び分離用電気泳動に比べると、時間の短縮と共に、高濃度の標品が得られることから酵素の回収率がよくなった。

ある組織及びある器官から、それらのもつ同一酵素のアイソザイムを分離することは従来のクロマトグラフィーでは困難であった。HPLC による ACPH アロザイム分離の結果は Acph 座の同型接合体及び異型接合体より各々のアイソザイムを分離することが出来ることを示唆した。

引用文献

- Benyajati, C., Place, A. R., Powers, D. A., and Sofer, W. (1981) Alcohol dehydrogenase gene of *Drosophila melanogaster*: Relationship of intervening sequences to functional domains in the protein. Proc. Natl. Acad. U. S. A. 78 : 2712
- Bostick, W. D., Denton, M. S., and Dinsmore, S. R. (1980) Liquid-chromatographic separation and on line bioluminescence detection of creatine kinase isoenzymes. Clin. Chem. 26 : 712
- Chang, S. H., Gooding, K. M., and Regnier, F. E. (1976) High-performance liquid chromatography of proteins. J. Chromatogr. 125 : 103.
- Dizik, M., and Elliott, R. W. (1977) A gene apparently determining the extent of scalylation of lysosomal α -mannosidase in mouse liver. Biochem. Genet. 15 : 31
- Fletcher, T. S., Ayala, F. J., Thatcher, D. R., and Chambers, G. K. (1978) Structural analysis of the ADH^s electromorph of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. 75 : 5609
- Fukano, K., Komiya, K., Sasaki, H., and Hashimoto, T. (1978) Evaluation of new supports for high-pressure aqueous gel permeation chromatography: TSK-Gel SW type columns. J. Chromatogr. 166 : 47
- Kaplan, A., Achord, D. T., and Sly, W. S. (1977) Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74 : 2026
- Kato, Y., Nakamura, K., and Hashimoto, T. (1983) New ion-exchanger for the separation of proteins and nucleic acids. J. Chromatogr. 266 : 385
- Kato, Y., Nakamura, K., and Hashimoto, T. (1984) New high-performance cation exchanger for the separation of proteins. J. Chromatogr. 294 : 207
- 加藤芳男, 中村孝司 (1984) イオン交換 HPLC. 宇井信生, 岩永貞昭, 崎山文夫共編, タンパク質ペプチドの高速液体クロマトグラフィー 化学増刊 102 : 223 化学同人
- Narise, S (1984) Purification and properties of acid phosphatase from *Drosophila Virilis*. Insect. Biochem. 14 : 473
- Narise, S. (1985) Activity differences between acid phosphatase allozyme variants of *Drosophila Virilis*: Differences in intracellular localization of allozymes. Genet. Res. Camb. 45 : 143
- Narise, S., and Tominaga, H. (1987) Comparison of purified acid phosphatase allozymes in *D. virilis*. Differences in carbohydrate content and composition of the allozymes. Biochem. Genet. 25. (in press)
- Natowicz, M., Baenziger, J. U., and Sly, W. S. (1982) Structural studies of the phosphorylated high mannose-type oligosaccharides on human β -glucuronidase. J. Biol. Chem. 257 : 4412
- 大羽滋 (1977), 集団の遺伝. UP バイオロジーシリーズ, 東京大学出版会, p. 99
- Ostrowski, W., Wasyl, Z., Weber, M., Guminska, M., and Lechter, E. (1970) The role of neuraminic acid in the heterogeneity of acid phosphomonoesterase from the human prostate gland. Biochem. Biophys. Acta. 221 : 297
- Rosenfeld, M. G., Kreibich, G., Popov, D., Kato, K., and Sabatini, D. D. (1982) Biosynthesis of lysosomal hydrolases: Their synthesis in found polysomes and the role of co- and post-

- translational processing in determining their subcellular distribution. J. Cell. Biol. 93 : 135
- Schifreen, R.S., Hickingbotham, J.M., and Bowers, G.N.Jr. (1980) Accuracy, precision and stability in measurement of Hemoglobin A1c by "high-performance" cation-exchange chromatography. Clin. Chim. 26 : 466
- Strahlar, J.R., Rosenblum, B.B., Hanash, S., and Butkunas, R. (1983) Separation of transferrin types in human plasma by anion-exchange high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 266 : 281
- Takahashi, N., Isobe, T., Kasai, H., Seta, K., and Okayama, T (1981) An analytical and preparative method for peptide separation by high-performance liquid chromatography on a macroreticular anion-exchange resin. Anal. Biochem. 115 : 181
- Thatcher, D.R. (1980) The complete amino acid sequence of three alcohol dehydrogenase alleloenzymes (*Adh^{N-11}*, *Adh^S* and *Adh^{UF}*) from the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Biochem. J. 187 : 875