

助成番号：225

アシルフォスファターゼの構造と機能について

高澤俊英

教養課程化学研究室

1. 目的

アシルフォスファターゼは、インビトロでは高エネルギーリン酸結合を含むアシルリン酸を特異的に加水分解する酵素で生物界に広く分布している。しかしその生理機能についてはインビトロの場合と同様に生体のエネルギー代謝系への関与が考えられているが、現在まで真の役割は明らかになっていない。従って本研究の最終目的は、この酵素の生理機能の解明であるが、本報告では、ニワトリ筋肉から単離精製した2種のアイソザイムノ分子量を決定し比較検討するのが目的である。

2. 方法

ニワトリ筋肉酵素の2種類のアイソザイムの調製——ニワトリ骨格筋から水で酵素を抽出し、ホスホセルロースクロマトグラフィー(0.1M酢酸緩衝液, pH5.0で吸着, 洗浄, 0.09Mリン酸二水素ナトリウムと0.01M2-メルカプトエタノールを含む0.2M酢酸ナトリウム緩衝液, pH5.3で一段階溶出)で約250倍に精製後, 0.01M2-メルカプトエタノールを含む0.1M酢酸ナトリウム緩衝液, pH5.3で平衡化したCM-セルロースカラムに吸着させる。その後, 同緩衝液中でのNaCl直線濃度こう配溶出法(NaCl濃度:0-0.2M)で溶出させ, 溶出するイオン強度の低い方からI, IIと命名した。これらアイソザイムI, IIは, 更にリン酸二水素ナトリウム直線濃度こう配溶出法(リン酸二水素ナトリウム濃度:0-0.1M)によるCM-セルロースクロマトグラフィーで精製した。精製したアイソザイムI, II標品は, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びpH4.3でのポリアクリルアミドゲル電気泳動に於いて単一バンドのみを与え, 電気泳動的に均一な標品である。

沈降平衡分析——沈降平衡分析は, 最も信頼性の高い低速沈降平衡法により, Beckman社製SpincoE型超遠心機(モノクロメーター及びブスキナー装備)を用いて行った。実験はアイソザイムI, II(各々0.12ml使用)をcharcoal-filled Epon 12 mm double-sectorセルに入れてAn-Gローター(マルチセルローター)を用い, 28,000rpm, 5℃で行った。ローターは, 沈降平衡に到達させる時間を短縮させるために最初の4~5時間は34,000rpmで高速回転させ, その後平衡実験スピードである28,000rpmにセットし, 数日間連続回転させた。

3. 結果と考察

分子量の決定は、次の式により行った。

$$M = \frac{2RT}{(1-\bar{v}\rho)\omega^2} \cdot \frac{d\ln C}{dr^2} \quad (1)$$

ここで M は分子量, ρ は溶媒の密度, \bar{v} は溶質の偏比容 (ml/g), ω は角速度 (rad/sec) で毎分回転数 (rpm) $\times \frac{2\pi}{60}$ から求まる, R は気体定数 8.31×10^7 (erg/deg·mol), T は温度 °K である。

偏比容は、各アミノ酸の偏比容の値として Cohn&Edsall のデータを用い、重量百分率で表わしたアミノ酸分析結果から計算し、その結果、アイソザイム I に対しては 0.731 ml/g, アイソザイム II に対しては 0.729 ml/g と求まった。

アイソザイム I については、溶液状態で保存中に分子間 S-S 結合の形成により 2 量体を形成する傾向が強いのので沈降平衡の実験前に SH 剤ジチオスレイトールを 0.1M 濃度に加え、4°C で 4 時間インキュベートし単量体へ解離させた。その後このサンプルを 0.2M NaCl と 5mM ジチオスレイトールを含む 5mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH5.3 で平衡化した Sephadex G-50 カラムでクロマトグラフィーを行い、極く微量残存する 2 量体及び過剰の SH 剤を除いた。この様にして得られた単量体画分を同じ条件で再クロマトグラフィー後、同緩衝液に対して透析後超遠心分析に供した。アイソザイム II サンプルは、保存中に 2 量体を形成しないのでそのまま直接透析後分析した。

図 1 はアイソザイム I について低速沈降平衡法により 0.2M NaCl と 5mM ジチオスレイトールを含む 5mM 酢酸ナトリウム緩衝液中で分子量を求めた結果である。図 1a はセル中での溶質濃度分布で、代表的な一つのサンプル濃度 ($A_{280} = 0.392$) について平衡スピード 28,000rpm で 120 時間回転後得られた結果で、ローター中心からの距離の 2 乗 (r^2 : cm^2) に対してタンパク質濃度こう配 (A_{280})

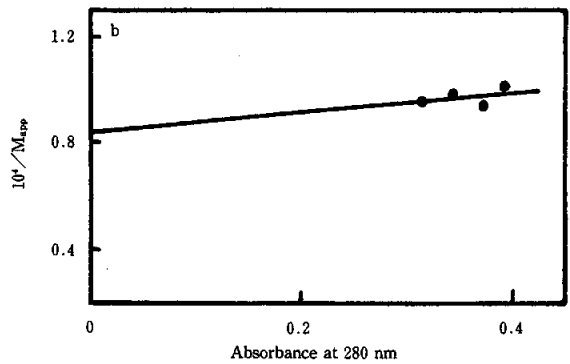
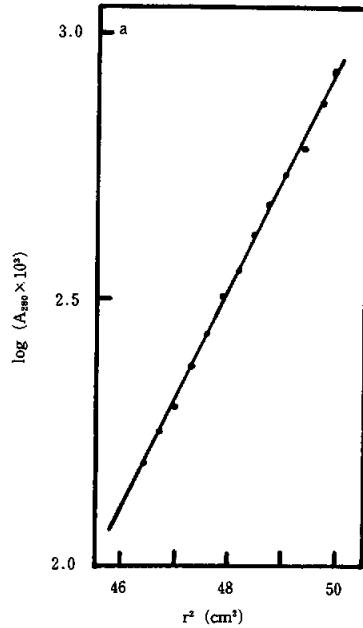


図 1 アイソザイムの分子量決定

の対数をプロットしたものである。セル中のメニスカスからボトムまで全濃度域において直線関係が得られた。この結果は他の3種類のタンパク質初濃度で分析した場合も同様であった。この事から、分析に使用したサンプルの純度は非常に高く、不純物はほとんど存在せず、又セル中のメニスカスからボトムまでの全域に於いて濃度依存性のタンパク質の解離又は会合は起こっていないものと考えられる。分子量の決定に必要なこの直線のこう配は、最小2乗法により求めた。このようにして実験により求めた数値を(1)式に代入して、使用したタンパク質濃度の各々について見かけの分子量 M_{app} が求まる。図1bは、用いたタンパク質濃度に対して見かけの分子量の逆数をプロットした結果である。タンパク質の見かけの分子量は一般に濃度依存性があるが、このプロットの直線の傾きが正であるから溶質分子であるタンパク質の可逆的な解離・会合は存在しない事を示唆している。このプロットを最小2乗法によりタンパク質濃度0に外挿してアイソザイムIの分子量は11,900と求まった。

図2は、アイソザイムIIについて、Iの場合と同様に低速沈降平衡法により分子量を求めた結果である。図2aはタンパク質濃度 $A_{280} = 0.402$ のサンプルについて、28,000rpmで150時間回転後得られた結果である。このプロットも図1aと同様にセル中のメニスカスからボトムまで直線関係が得られサンプルの解離・会合は観察されず、分析に用いた標品の均一性が高い事を示している。図2bはタンパク質濃度に対して見かけの分子量の逆数をプロットしたもので、濃度0への外挿により分子量は12,000と求まった。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によりアイソザイムI、IIのおおよその分子量を見積った場合、Iについては9,400で、IIについては11,400となり、分子量に若干の差がある結果が得られた。この事からアイソザイムIは artifactsで、IIにプロテアーゼが作用した結果生じたフラグメントではないかという可能性も考えられた。しかし正確度の高い低速沈降平衡法による分子量決定の結果アイソザイムIとIIの間には分子量に違いがない事が明らかになったので、IはIIのフラグメントではなく、両者はアミノ酸置換の結果生じた一次構造の異なるアイソザイムである事を強く示唆している。この結論は各々の一次構造を明らかにする事により証明される問題である。

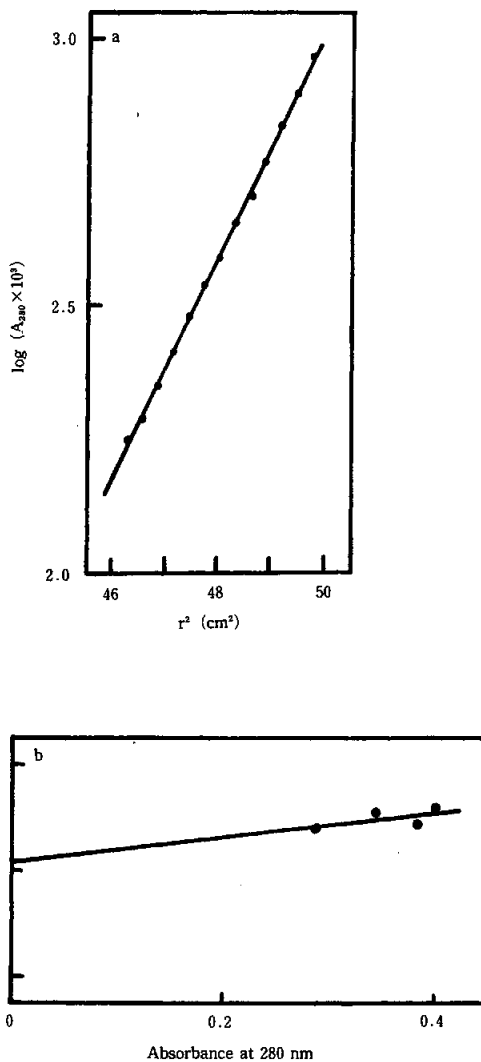


図2 アイソザイムIIの分子量決定