



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	ブルーデキストランアフィニティクロマトグラフィーによるCandidaピルビン酸キナーゼの迅速精製とその吸着機構
Author(s)	河合, 啓一; 堀内, みどり; 後藤, 敦子; 堀津, 浩章
Citation	[岐阜大学農学部研究報告 = Research bulletin of the Faculty College of Agriculture Gifu University] no.[53] p.[275]-[282]
Issue Date	1988-12-25
Rights	
Version	岐阜大学農学部生物資源利用学科 (FACULTY OF AGRICULTURE GIFU UNIVERSITY, Department of Biotechnology)
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/5615

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

ブルーデキストランアフィニティクロマトグラフィーによる
Candida ピルビン酸キナーゼの迅速精製とその吸着機構

河合啓一・堀内みどり・後藤敦子・堀津浩章

生物機能工学講座
(1988年8月1日受理)

Rapid Purification of *Candida* Pyruvate Kinase
by Blue Dextran Affinity Chromatography and its
Adsorption Mechanism on Blue Dextran-Sepharose

Keiichi KAWAI, Midori HORIUCHI, Atsuko GOTO
and Hiroyuki HORITSU

Department of Biotechnology

(Received August 1, 1988)

SUMMARY

Rapid purification of *Candida* pyruvate kinase by blue dextran affinity chromatography and adsorption mechanism of the kinase on blue dextran-Sepharose were studied. The pyruvate kinase was eluted from a blue dextran-Sepharose column with a linear gradient of KCl(0-1M), MgCl₂(0-0.5mM) and fructose 1, 6-diphosphate(0-5mM), after the column was washed with several nucleotides such as NADH, NADP and AMP. The eluate was applied to Sephadex G-50 column. Using the two-step purification procedure, the kinase was purified to be electrophoretically homogeneous in about 40% yield.

Inhibition of *Candida* pyruvate kinase with Cibacron Blue F3GA was not overcome by a saturated level of fructose 1, 6-diphosphate. Further inhibition studies suggested that the substrate-binding site of the pyruvate kinase was responsible for the adsorption of the kinase to blue dextran-Sepharose, and one molecule of Cibacron Blue F3GA was bound per active site of the pyruvate kinase at a saturated level of either substrate, but two molecules of the dye were bound per active site of the kinase at unsaturated levels of both substrates.

Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. (53) : 275—282, 1988.

要 約

ブルーデキストランアフィニティクロマトグラフィーによる *Candida* ピルビン酸キナーゼの迅速精製とブルーデキストラン-セファロースへの本キナーゼの吸着機構について検討を加えた。本キナーゼを含む粗酵素液をブルーデキストラン-セファロースカラムに添着し、低濃度の塩化カリウム、ピロリン酸、あるいは NADH, NADP および AMP などのヌクレオチド類でカラムを洗浄したあと、塩化カリウム(0-1 M), MgCl₂(0-0.5mM) およびフルクトース 1, 6-ジリン酸(0-5 mM)の共存濃度勾配溶出法により本

酵素を溶出させた。次にセファデックスG-50ゲルクロマトグラフィーに供し酵素を精製した。二段階の精製操作で本キナーゼは比活性が35.9倍上昇し約40%の収率で精製され、電気泳動的に均一な酵素標品を得ることができた。チバクロンブルー-F3GA による *Candida* ピルビン酸キナーゼの阻害は、アロステリック賦活剤であるフルクトース 1, 6-ジリン酸の濃度を飽和条件としても解除されなかった。ブルーデキストランとチバクロンブルー-F3GA による阻害実験の結果から、本キナーゼ上の基質結合部位がブルーデキストラン-セファロースへの吸着に関与していることが示唆された。さらに、ADP およびホスホエノールピルビン酸のいずれか一方の基質が飽和レベルの場合、本キナーゼの活性中心あたり 1 分子のチバクロンブルー-F3GA が作用したが、両基質濃度が不飽和レベルの場合には 2 分子の色素が作用することが判明し、チバクロンブルー-F3GAの作用分子数が基質濃度に依存していることを認めた。

結 論

ピルビン酸キナーゼ (EC 2. 7. 1. 40) がブルーデキストランに吸着し、高濃度の硫酸アンモニウムや低濃度のフルクトース 1, 6-ジリン酸 (FDP) で解離することが発見されて以来¹⁾、ブルーデキストランやその青色色素部分であるチバクロンブルー-F3GA を固定化した担体が種々の起源のピルビン酸キナーゼの分離精製に用いられている²⁻⁵⁾。

ピルビン酸キナーゼとこれらの色素との相互作用については、ブルーデキストランに吸着した酵素が FDP により解離すること、また *Neurospora crassa* ピルビン酸キナーゼに対するチバクロンブルー-F3GA の作用部位がホスホエノールピルビン酸 (PEP) や ADP が結合する基質結合部位ではなくアロステリックエフェクターである FDP の結合部位である⁶⁾ことから、ピルビン酸キナーゼは FDP 結合部位を介してブルーデキストランに吸着するものと結論されている。しかしながら前報⁷⁾で *Candida guilliermondii* AHU 4101 のピルビン酸キナーゼのブルーデキストランへの吸着部位が FDP 結合部位ではなく基質結合部位であることを認め、従来より得られている結論とは全く異なった吸着機構であることを明らかにしたが、その詳細な機構については不明な点が残されている。

一方、ピルビン酸キナーゼは解糖系の最終末反応に位置し ATP を供給する酵素として古くからその酵素学的性質や調節機構に関し多くの研究がなされてきた。本酵素はクレアチン、ホスホグリセリン酸、PEP、ADP など重要な生体内化合物の酵素分析法に使用されているとともにクレアチンキナーゼ、グリセリン酸キナーゼ、ホスホグルコムターゼ等の酵素活性を測定する際に共役酵素として利用されている酵素で、高純度の酵素標品を得るための迅速精製法の確立が強く望まれている。

そこで本研究では *Candida utilis* のピルビン酸キナーゼをブルーデキストランアフィニティクロマトグラフィーにより迅速に精製する方法を確立するとともに、本キナーゼのブルーデキストラン-セファロースへの吸着機構について検討を加えたので得られた結果について報告する。

実験材料および方法

使用菌株および培養方法

C. utilis IAM4277 を用い、グルコース；4.0%，ポリペプトン；1.0%，酵母エキス；1.0%， KH_2PO_4 ；0.5% および $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；0.2% (pH5.5) からなる培地にて 30°C で 24 時間振盪培養した。

無細胞抽出液の調製

培養菌体を 5 mM EDTA および 5 mM 2-メルカプトエタノールを含む 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液、pH6.5 (以下クエン酸緩衝液) で洗浄し、海砂 A (15~25 メッシュ) を菌体湿重量の 2 倍量加え冷却しながら菌体を摩砕した。次いで 5 倍量の氷冷クエン酸緩衝液を加え充分懸濁後遠心分離し、得られた無細胞抽出液を粗酵素液として使用した。

酵素活性の測定

ピルビン酸キナーゼの活性は Aust^ら⁸⁾の方法に準じ、乳酸脱水素酵素を用いる共役法により 340nm における吸光度の減少速度から求めた。酵素単位は 25°C で 1 分間に 1 μmol の基質を消費する酵素量を 1 unit と定義した。

Table 1. Elution of *Candida* pyruvate kinase from blue dextran-Sepharose column with various ligands

Ligand (30mM)	Enzyme eluted (%)	Ligand (30mM)	Enzyme eluted (%)
PEP	45.1	ATP	7.3
2-Phosphoglycerate	20.4	ADP	47.7
3-Phosphoglycerate	6.2	AMP	2.9
Pyruvate	1.5	GTP	98.6
Lactate	3.0	CTP	90.1
Glycerol	0.9	NADP	58.6
FDP	84.9	NADPH	78.3
Fructose 6-phosphate	3.0	NAD	1.8
Glucose 6-phosphate	2.5	NADH	0.9
Pyrophosphate	98.0		
Orthophosphate	5.0		

蛋白質の定量

蛋白質含量は標準蛋白質として卵白リゾチームを用い、Folin-Ciocalteu 法⁹⁾により測定した。

試薬類

チバクロンブルーF3GA はポリサイエンス社製の標品を Weber ら¹⁰⁾の方法で精製した。乳酸脱水素酵素（ブタ心筋）および NADH はオリエンタル酵母工業株式会社，FDP および ATP は協和醸酵工業株式会社よりそれぞれ購入した。

実験結果

ブルーデキストラン-セファロースからのピルビン酸キナーゼの溶出

粗酵素液（3.1 units, 2.0ml）をブルーデキストラン-セファロースカラム（0.6×3.0cm）に添着し、クエン酸緩衝液でカラムを洗浄後、各種の溶出剤（30mM）を用いて酵素の溶出効果を調べた。その結果を Table 1 に示す。本酵素は正反応の基質である PEP により45%、また ADP により48%の収率でカラムから溶出されたが、逆反応の基質であるピルビン酸および ATP ではそれぞれ1.5%および7.3%にすぎず良好な酵素の溶出はみられなかった。本酵素のアロステリック賦活剤である FDP も顕著な溶出を示した。しかしながらその類似化合物であるフルクトース 6-リン酸、グルコース 6-リン酸は酵素の溶出を引き起こさなかった。NADP(H) は良好な酵素の溶出を示したにもかかわらず、NAD(H) はほとんど酵素を溶出しなかった。またピロリン酸が高い溶出率を示した。これらの結果はピルビン酸キナーゼの溶出を引き起こす化合物は、その立体構造よりむしろそれらの化合物中に存在しているリン酸基とその結合位置が酵素の溶出に重要であることを示している。

ピルビン酸キナーゼの迅速精製

前述の酵素溶出実験の結果を基に、ブルーデキストラン-セファロースを用いるピルビン酸キナーゼの迅速精製法について検討を加えた。あらかじめクエン酸緩衝液で平衡化したブルーデキストラン-セファロースカラム（1.6×20cm）に10ml の粗酵素液（403units）を添着した。30mM KCl および 2 mM ピロリン酸ナトリウムを含む同緩衝液で非吸着蛋白質を洗浄除去したあと、クエン酸緩衝液でカラム内に残留している KCl およびピロリン酸を除去した。次いで NADH, NADP, AMP および PEP を各 1 mM となるようクエン酸緩衝液に溶解した溶液でカラムを洗浄し、吸着している夾雑蛋白質を溶出除去した。再度カラムをクエン酸緩衝液で洗浄後、KCl(0-1 M), MgCl₂(0-0.5mM) および FDP (0-5 mM) による共存濃度勾配溶出法を行った。その溶出パターンを Fig. 1 に示す。活性画分を集め濃縮後セファデックス G-50 カラム（1.2×26cm）に供した。この2段階精製操作による本酵素の精製結果を Table 2 にまとめた。比

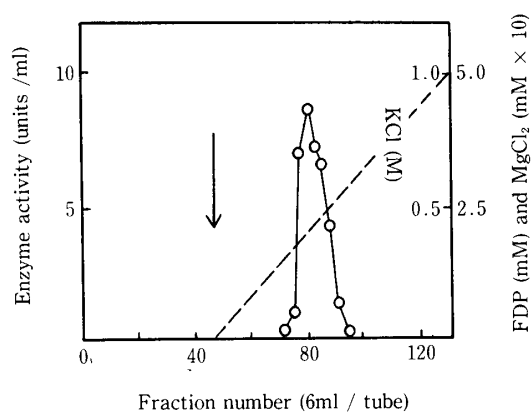


Fig. 1. Elution pattern of *Candida* pyruvate kinase from blue dextran-Sepharose. A crude extract (403 units, 10 ml) was applied to blue dextran-Sepharose column (1.6 × 20 cm) which had been equilibrated previously with 10 mM citrate buffer (pH 6.5). The column was washed with the buffer containing 30 mM KCl and 2 mM pyrophosphate and then with the buffer containing NADH, NADP, AMP and PEP at 1 mM. After the column was washed with citrate buffer, the kinase was eluted with a linear gradient of KCl (0–1 M), MgCl₂ (0–0.5 mM) and FDP (0–5 mM). The gradient was started at the arrow.

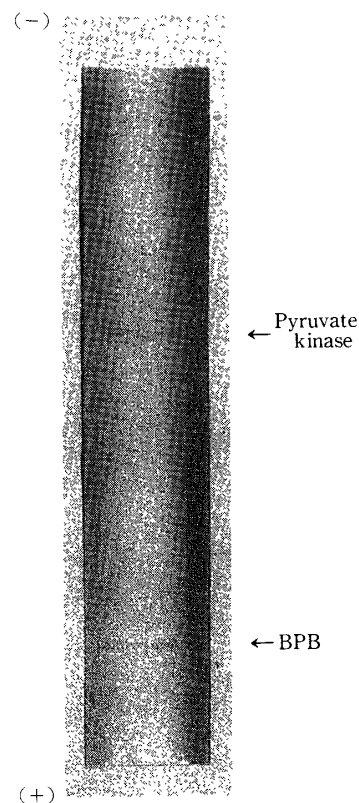


Fig. 2. Polyacrylamide gel disc electrophoresis of the purified *Candida* pyruvate kinase. The purified enzyme (13 μg) was subjected to 5% polyacrylamide gel disc electrophoresis at pH 8.6.

Table 2. Purification of pyruvate kinase from *Candida utilis* IAM 4277

Step	Total activity (units)	Specific activity* (units/mg protein)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude extract	403	3.2	100	1
Blue dextran eluate	186.4	74.6	46.3	23.3
Sephadex G-50 eluate	160.9	114.9	39.9	35.9

* ; units per mg protein.

活性は35.9倍上昇し、活性収率はおよそ40%であった。5%ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法により本精製酵素の純度を検定したところ、Fig. 2に示されるように単一の蛋白質バンドとして検出され、本精製酵素は電気泳動的に均一な標品であった。

ピルビン酸キナーゼとブルーデキストランおよびチバクロンブルーF3GAとの相互作用

i) 動力学的解析

アロステリック賦活剤である FDP 存在下でピルビン酸キナーゼ反応におよぼすブルーデキストランの影響について調べた。Fig. 3に示されるように、ADPを固定基質とした場合、その濃度が飽和、不飽和条件にかかわらずブルーデキストランはPEPに対して拮抗的に阻害した。一方、Fig. 4に示されるように、PEPを固定基質とした場合にはPEP濃度が飽和の時ADPに対して拮抗的に阻害したが、不飽和条件では非拮抗的阻害となり、本酵素に対するブルーデキストランの阻害型式がPEP濃度に依存して変化することが判明した。FDP非存在下では固定基質として用いたADPの濃度が不飽和の場合PEP結合部位間

に正の協同性がみられたが、ADPを飽和濃度にするとその協同性が消失した (Fig. 5 (A))。しかしながら、Fig. 5 (B) に示されるように、ブルーデキストランの色素部分であるチバクロンブルー-F3GAの添加によりこの協同性が再び出現したことから、チバクロンブルー-F3GAはADP結合部位に作用していることが示唆される。また Fig. 6 に示されるように、チバクロンブルー-F3GAによる阻害は高濃度のFDPでも解除されないことからチバクロンブルー-F3GAはFDP結合部位ではなく基質結合部位に作用しているものと解される。次に本阻害反応におけるチバクロンブルー-F3GAの濃度依存性について調べ、それらの結果をディクソンプロットとして Fig. 7 および Fig. 8 に示す。いずれか一方の基質が高濃度存在する場合 (Fig. 7)、本プロットは直線を示したが、両基質とも低濃度とした場合 (Fig. 8) では放物線状となりさらに Fig. 8 (B) にみられるように、その反応速度はチバクロンブルー-F3GA濃度の2乗に正比例することを認めた。このように、*Candida* ピルビン酸キナーゼに対するチバクロンブルー-F3GAによる阻害反応は阻害型式のみならず作用分子数も基質濃度に依存して変化することが判明した。

ii) 差スペクトルパターン

対照セルにはクエン酸緩衝液を、試料用セルには精製酵素 (0.22 μ M)、KCl(40mM) あるいはグリセロール (50%) を入れた後、両セルに0.60 μ M となるようチバクロンブルー-F3GAを添加したときの差スペクトルパターンを Fig. 9 に示す。精製酵素存在下におけるパターンは波長620nmに最大差スペクトル強度を有し、赤方移動効果が観察され、酵素とチバクロンブルー-F3GAとの相互作用を示している。さらにこの差スペクトルパターンはチャージ効果を誘起する物質として用いたKCl存在下におけるパターンと類似しており、グリセロール存在下や Thompson ら¹¹⁾が示したエチレングリコールあるいは乳酸脱水素酵素存在下における疎水効果に起因する差スペクトルパターンとは異なっていた。

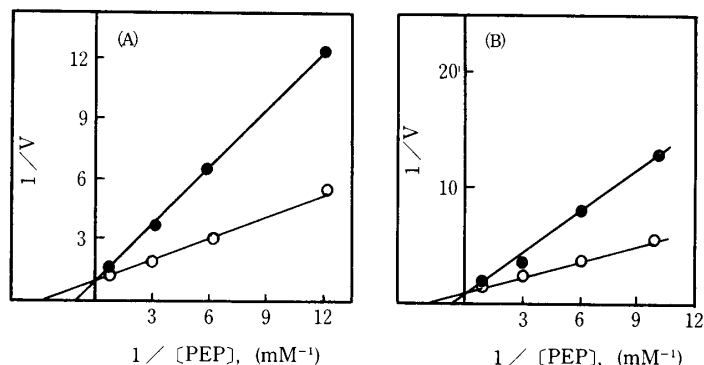


Fig. 3. Competitive inhibition of blue dextran with respect to PEP in the presence of 0.5 mM FDP. (A) : the concentration of ADP was held constant at 0.1 mM in the absence (○) and presence (●) of 60 μ M blue dextran. (B) : the concentration of ADP was held constant at 4.0 mM in the absence (○) and presence (●) of 150 μ M blue dextran.

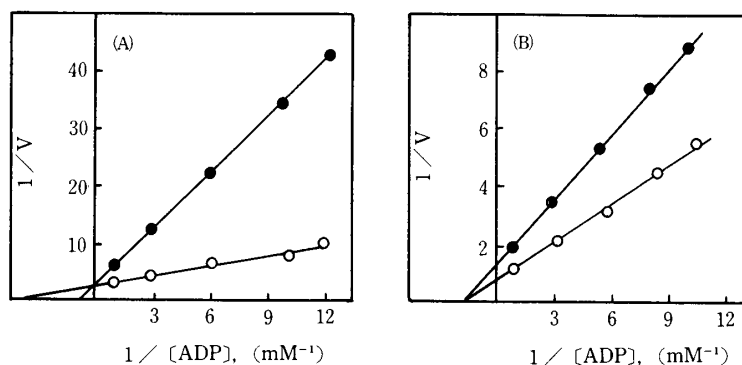


Fig. 4. Double-reciprocal plots for the pyruvate kinase reaction in the presence of 0.5 mM FDP. (A) : the concentration of PEP was held constant at 5.0 mM in the absence (○) and presence (●) of 150 μ M blue dextran. (B) : the concentration of PEP was held constant at 0.05 mM in the absence (○) and presence (●) of 60 μ M blue dextran.

考 察

ブルーデキストラン-セファロースやブルーセファロースはヌクレオチド類を基質または補酵素とする酵素のほか、種々の酵素や蛋白質を吸着することが明らかにされている。本研究ではブルーデキストランアフィニティクロマトグラフィーを導入した *Candida* ピルビン酸キナーゼの迅速精製法の確立を図った。すなわち本キナーゼの精製に際しては、ブルーデキストラン-セファロースに対する本酵素の吸着および溶

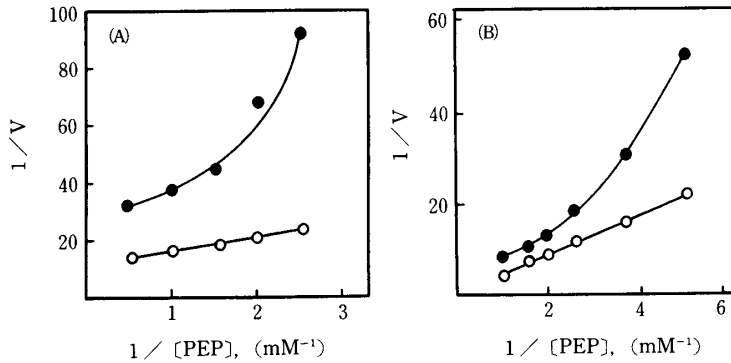


Fig. 5. Effect of Cibacron Blue F3GA on allosteric activation of *Candida* pyruvate kinase by ADP. (A) : allosteric activation of the kinase by ADP. The reactions were carried out at either 0.1 mM (●) or 4.0 mM (○) ADP. (B) : effect of Cibacron Blue F3GA on allosteric activation of the kinase by ADP. The reactions were carried out in the absence (○) and presence (●) of 20 μ M Cibacron Blue F3GA. The concentration of ADP was held constant at 4.0 mM.

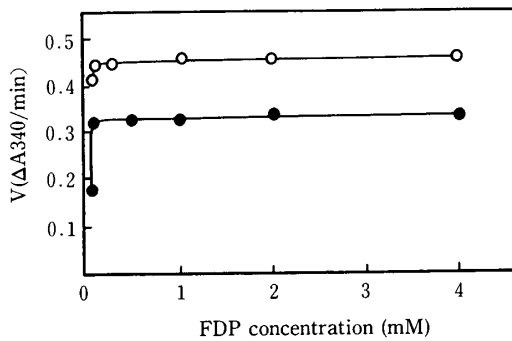


Fig. 6. Effect of FDP concentration of *Candida* pyruvate kinase activity in the absence (○) and presence (●) of 10 μ M Cibacron Blue F3GA.

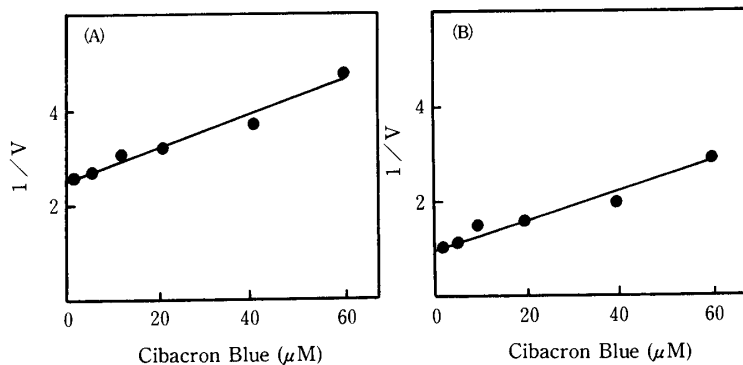


Fig. 7. Plots of the reciprocal of the initial velocity against the concentration of Cibacron Blue F3GA in the presence of 0.5 mM FDP. (A) : a saturated level of PEP (5.0 mM) and an unsaturated level of ADP (0.1 mM). (B) : an unsaturated level of PEP (0.05 mM) and a saturated level of ADP (4.0 mM).

出特性を考慮に入れ、あらかじめブルーデキストラン-セファロースカラムに吸着している夾雑蛋白質を種々の化合物を用いて溶出除去した後、KCl, MgCl₂および FDP を用いる共存濃度勾配溶出法を適用し本キナーゼの溶出を行った。次いでセファデックス G-50 カラムで脱塩精製した。その結果、わずか 2 段階の精製操作で収率約 40% で電気泳動的に均質な酵素標品を得ることに成功した。このように、目的とする酵素とブルーデキストランとの吸着・解離特性を酵素の精製操作に巧みに導入することにより、目的酵素を効率良く短時間に分離精製することが可能である。ブルーデキストラン-セファロースやブルーセファロースは生体由来の固定化リガンドとは異なり、化学的にも生物学的にも安定で吸着容量の低下をほとんど伴わず反復使用に耐え、さらにその酵素吸着容量も比較的高いことから極めて優れたアフィニティ担体と言えよう。

一方、酵素とブルーデキストランとの相互作用の機構に関しては、ヌクレオチド類を基質やエフェクターとして作用する酵素がブルーデキストランに特異的に吸着しその吸着部位はヌクレオチド類の結合部位であることが明らかにされている。ピルビン酸キナーゼは ADP / ATP を基質としているため、直接的な証明はなされていないが、これらヌクレオチド基質の結合部位がブルーデキストランへの吸着に関与しているものと考えられていた。しかし Kapoor と O'Brien⁶⁾ は *N. crassa* のピルビン酸キナーゼに対するチバクロンブルー-F3GAの作用部位が ADP / ATP 結合部位ではなく FDP 結合部位であることを明らかにした。

本研究において *Candida utilis* 由来のピルビン酸キナーゼのブルーデキストランへの吸着部位を明らかにするために、各種酵素溶出剤による酵素溶出効果およびブルーデキストランやチバ

クロンブルー-F3GA を用いた酵素阻害反応の動力学的解析を行った。その結果, *C. utilis* のピルビン酸キナーゼは FDP 結合部位ではなく基質 (ADP と PEP) 結合部位を介してブルーデキストラン-セファロースに吸着するものと推定され, その吸着力は差スペクトルパターンから静電的相互作用によることが明らかとなった。また, ADP が高濃度の場合に PEP 結合部位間の正の協同性が消失したが, チバクロンブルー-F3GA の添加により再び出現したことは ADP 結合部位にチバクロンブルー-F3GA が作用することを示している。しかしながら, *Candida* ピルビン酸キナーゼに対するチバクロンブルー-F3GA の阻害形式と作用分子数が基質濃度に依存していることなどを考慮すると, チバクロンブルー-F3GA は ADP 結合部位のみならず PEP 結合部位にも作用することが推定された。これらの結果とブルーデキストラン-セファロースに吸着した本キナーゼが ADP のみならず PEP によっても溶出されることを考え合わせると, *Candida* ピルビン酸キナーゼは ADP 結合部位と PEP 結合部位を介してブルーデキストラン-セファロースに吸着しているものと推察される。

引用文献

- 1) Haeckel, R., Hess, B., Lauterborn, W. & Wüster, K. H. : Purification and allosteric properties of yeast pyruvate kinase. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **349** : 699-714, 1968.
- 2) Staal, G. E. J., Koster, J. E., Kamp, H., Milligen-Boersma, L. V. & Veeger, C. : Human erythrocyte pyruvate kinase. Its purification and some properties. Biochim. Biophys. Acta, **227** : 86-96, 1971.
- 3) Röschlau, P. & Hess, B. : Affinity chromatography of yeast pyruvate kinase with Cibacronblau bound to Sephadex G-200. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **353** : 441-443, 1972.
- 4) Blume, K. G., Hoffbauer, R. W., Busch, D., Arnold, H. & Löhr, G. : Purification and properties of pyruvate kinase in normal and in pyruvate kinase deficient human red cells. Biochim. Biophys. Acta, **227** : 364-372, 1971.
- 5) Kawai, K., Kumagai, K., Oshika, A. & Horitsu, H. : Affinity chromatography of *Candida* pyruvate kinase on blue dextran-Sepharose. J. Ferment. Technol. **61** : 647-649, 1983.
- 6) Kapoor, M. & O'Brien, M. D. : Studies of the structure-function relationships of *Neurospora crassa* pyruvate kinase : interaction with blue dextran-Sepharose 4B and Cibacron Blue 3G-A. Can. J. Microbiol. **26** : 613-621, 1980.

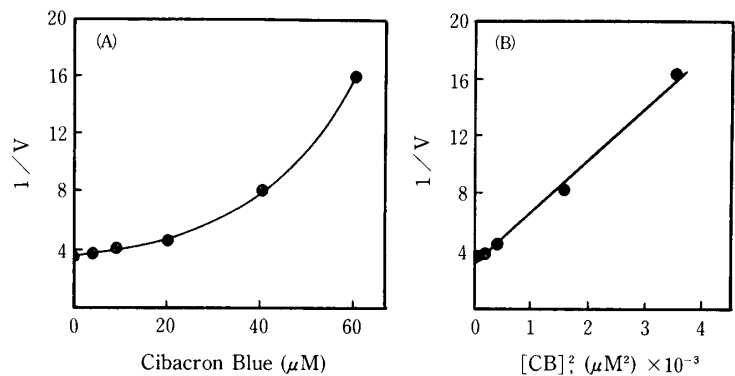


Fig. 8. Effect of Cibacron Blue F3GA on *Candida* pyruvate kinase. (A) : plots of the reciprocal of the initial velocity with respect to Cibacron Blue F3GA concentration at unsaturated levels of both PEP (0.05 mM) and ADP (0.1 mM). The FDP concentration was 0.5 mM. (B) : replots of the reciprocal of the initial velocity against the square of the Cibacron Blue F3GA concentration. The data from Fig. 8(A) were replotted.

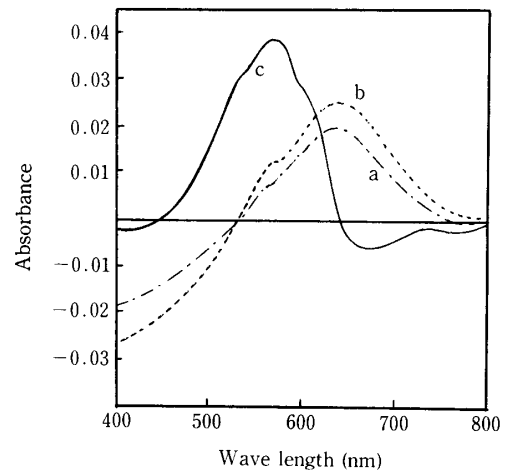


Fig. 9. Difference spectra of Cibacron Blue F3GA in the presence of *Candida* pyruvate kinase. The sample cuvette contained (a) purified enzyme (0.22 μM), (b) KCl (40 mM) and (c) glycerol (50%), while sample and reference cuvettes contained 0.6 μM Cibacron Blue F3GA.

- 7) Kawai, K., Kumagai, K., Mori, H. & Horitsu, H. : Interaction of *Candida* pyruvate kinase with Cibacron Blue. J. Ferment. Technol. **65** : 517-523, 1987.
- 8) Aust, A., Yun, S. L. & Suelter, C. H. : 'Pyruvate kinase from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)', in "Methods in Enzymology", Vol. 42, Wood, W. A. ed. New York • San Francisco • London : Academic Press Inc., 176-182, 1975.
- 9) Folin, O. & Ciocalteu, V : On tyrosine and tryptophan determinations in proteins. J. Biol. Chem. **73** : 627-650, 1927.
- 10) Weber, B. H., Willeford, K., Moe, J. G. & Piszkiwicz, D. : Hazards in the use of Cibacron Blue F3GA in studies of proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. **86** : 252-258, 1979.
- 11) Thompson, S. T. & Stellwagen, E. : Binding of Cibacron Blue F3GA to proteins containing the dinucleotide fold. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73** : 361-365, 1976.