

カエル(*Rana catesbeiana*)水晶体アルデヒド還元酵素の精製とその性質

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2012-05-09 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤井, 豊 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/5376

カエル(*Rana catesbeiana*)水晶体アルデヒド 還元酵素の精製とその性質

藤 井 豊

化 学 教 室

(平成5年10月29日受理)

要約：カエル水晶体アルド・ケト還元酵素を Red Sepharose クロマトグラフィー，ゲルろ過クロマトグラフィー，Mono S/Matrex Orange A クロマトグラフィーにより単一に精製した。電気泳動上およびゲルろ過の結果から本酵素は分子量40,000の単量体酵素と判明した。基質 p-nitrobenzaldehyde および DL-glyceraldehyde に対する K_m 値はそれぞれ0.140および10.0mMと求められ高 K_m 型アルド・ケト還元酵素即ちアルデヒド還元酵素と判明した。カエル水晶体では本酵素以外に有意なアルド・ケト還元酵素（アルドース還元酵素，プロスタグランジン F 合成酵素など）は検出されなかった。カエル水晶体の構造蛋白質 ρ -クリスタリン（一次構造上アルド・ケト還元酵素の一員であるが酵素活性はない）に対する抗体を用いたウェスタンブロットで本酵素は認識されず， ρ -クリスタリンとは免疫学的に異なる蛋白質であった。これらのデータをもとに ρ -クリスタリンの分子進化について考察した。

はじめに

アルド・ケト還元酵素はプロスタグランジン (PG) F 合成酵素，アルドース還元酵素，アルデヒド還元酵素およびカルボニル還元酵素など種々の酵素より構成されるファミリーである¹⁾。このファミリーに属する酵素は各々幅広い基質特異性を示し種々のカルボニル化合物，例えば PGD₂，PGE₂，アルドース，クロルデコンなどの抗生物質およびステロイド化合物などを NADPH を補酵素として対応するアルコールへと還元する。さらに Fe³⁺や PGH₂などのエンドパーオキシドも還元することができる大変ユニークな多機能酵素で，P₄₅₀に劣らず薬物代謝に重要な役割を果たしている。また，分子量がわずか3～4万の単量体酵素でありながら少なくともカルボニル化合物とエンドパーオキシド化合物に対してそれぞれ異なる触媒部位を持っている^{2,3)}。一方，遺伝子的にアルド・ケト還元酵素の一員でありながらその酵素機能を失っている蛋白質の存在が知られている。それはカエル水晶体の構造蛋白質 ρ -クリスタリン⁴⁾

で、全水晶体蛋白質の18%におよぶ驚異的な発現率を誇っている。仮に ρ -クリスタリンに酵素活性が保持されていたらそれは明らかに生理的必要性を逸脱してしまう。この大過剰の酵素活性が生体にとって脅威となったため、 ρ -クリスタリンはその分子進化の過程で酵素活性を放棄したものと考えられるが、そのオリジナル酵素が如何なるものであったのか未だに不明である。一般的に分子進化の中立説に従えば、 ρ -クリスタリンのように元々のアルド・ケト還元酵素としての機能を放棄し、水晶体構造蛋白質として全く異なる機能を獲得するには遺伝子重複が起こるとされている。種々の動物の水晶体における主なアルド・ケト還元酵素はアルドース還元酵素とアルデヒド還元酵素である。特に前者は糖に対する親和性が他のアルド・ケト還元酵素より高く糖尿病性合併症の起因酵素として知られている。今回カエル水晶体のアルド・ケト還元酵素を精製しその性質を検討することで ρ -クリスタリンの分子進化について検討したので報告する。

実験材料および方法

実験材料と試薬

食用ガエル (*Rana catesbeiana*) は雌雄の体重200~300g のものを北陸実験動物より購入した。水晶体の摘出は始めに眼球を取り外し余分な筋肉を切除した後、眼球底部より切開し水晶体を傷つけないように注意しながらピンセットで摘出した。摘出した水晶体は Steinberg の平衡塩類溶液中で付着している虹彩や毛様体をピンセットで注意深く除去し実験に使用するまで -80°C で保存した。

Red Sepharose, Sephadex G-100, Sephacryl S 300および Mono S (HR 5 / 5) は Pharmacia 社より, Matrex Orange A および PM-10限外濾過膜は Amicon 社より, アルドース還元酵素阻害剤: AL-1576 (spiro [2,7-difluorofluorene-9,4'-imidazolidine]-2',5'-dione) は Alcon 社より, NADPH はオリエンタルイースト社より, および p-nitrobenzaldehyde は和光純薬工業社よりそれぞれ購入した。その他の試薬は主にナカライテスク社および和光純薬工業社より試薬特級品を購入して使用した。

酵素の精製方法

- 1) 粗抽出: 凍結水晶体 (3.5g) を15倍量の10%グリセロールと 5 mMメルカプトエタノールを含む pH7.2の25mM トリス塩酸緩衝液 (緩衝液A) で Potter Elvehjem 型ホモジナイザーを用いてホモジナイズし, 10,000xg で15分間遠心分離し得られた上清を粗抽出画分とした。
- 2) Red Sepharose クロマトグラフィー: 上記粗抽出画分を緩衝液Aで平衡化した Red Sepharose カラム (1.5 x 15cm) に通した。その後0.1M塩化カリウムを含む緩衝液Aで

カエル(*Rana catesbeiana*)水晶体アルデヒド還元酵素の精製とその性質

カラムを洗浄し、0.1-1.0M塩化カリウムのリニアグラジエントで酵素を溶出し Red Sepharose 画分とした。

- 3) ゲルろ過クロマトグラフィー：上記 Red Sepharose 画分を PM-10を用いて限外濾過濃縮し、2.5%グリセロールを含む pH6.5の10mM リン酸ナトリウム緩衝液（緩衝液B）で平衡化した Sephacryl S-300または Sephadex G-100 (1.5×180cm) で分離した。酵素活性画分を集めてゲルろ過画分とした。
- 4) Mono S/Matrex Orange A クロマトグラフィー：上記ゲルろ過画分を緩衝液Bで平衡化した Mono Sカラムに通した。本酵素はこの条件で Mono Sカラムに吸着されず素通りするのでその素通り画分を同じく緩衝液Bで平衡化した Matrex Orange Aカラム (0.5×3 cm) に通した。十分カラムを洗浄した後0.1mM NADPH を含む緩衝液Bで酵素を溶出して精製した。

酵素活性の測定

アルド・ケト還元酵素の活性測定は Fujii ら⁵⁾の方法に従った。測定溶液 (1 ml) は0.2mM -NADPH, 1mM p-nitrobenzaldehyde および酵素 (1~5 ミリユニット) を含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液, pH6.5を用いた。反応は37°Cで酵素を添加して開始し、反応速度の測定はギルフォードスペクトロフォトメーター (モデル260) を用いて NADPH の消費速度を340 nm における吸光度の減少速度として求めた。NADPH のモル分子吸光係数は6,300を用い、酵素活性1ユニットとは1分間に基質1マイクロモル (NADPH: 1マイクロモルに相当) を消費する酵素量と定義した。また基質特異性を検討する場合は1mM p-nitrobenzaldehyde の代りに種々の合成化合物を種々の濃度で用い、基質は終濃度の100倍濃いエタノールまたは水溶液として調製した。

蛋白質濃度の測定

クロマトグラフィーの蛋白質溶出曲線は280nm における吸光度をモニターして求めた。各画分の蛋白質濃度は Schaffner と Weissman⁶⁾の色素結合法あるいはアミノ酸分析法により測定した。蛋白質をアンブルに取り 6N-HCl を用いて減圧下封入し110°Cで加水分解した。得られたアミノ酸をフェニルチオカルバミル誘導体とし逆相クロマトグラフィーにより分析した。

蛋白質の電気泳動およびウエスタンブロット

蛋白質の電気泳動は Laemmli⁷⁾の方法に従いドデシル硫酸ナトリウム存在下、15%ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。蛋白質バンドの染色はクマシーブリリアントブルー R250を用いて常法により検出した。ウエスタンブロットは Hsu ら⁸⁾の方法に従い Vector Stain ABC キットと一次抗体としてウサギ抗 ρ -クリスタリン抗体を用いて行った。

結 果

カエル水晶体アルド・ケト還元酵素の精製

表1はカエル水晶体からのアルド・ケト還元酵素の精製をまとめたものである。水晶体3.5gから調製された粗抽出画分の蛋白質量が896mgでこれは水晶体湿重量の25%に当たる。一方アルド・ケト還元酵素活性は全量0.387ユニットであり人肝臓のアルデヒド還元酵素⁹⁾の比活性(14.6ユニット/mg蛋白質)を用いて計算するとわずか0.027mg蛋白質当量と極めて少ないことが分かる。この粗抽出画分をRed Sepharose クロマトグラフィーで分離した結果を図1に示す。Red Sepharose はヌクレオチド依存性酵素のアフィニティー樹脂として知られている。 ρ -クリスタリンはNADPH結合能を保持しているのでRed Sepharoseに吸着され塩化カリウムのグラジエントにより一つの大きな蛋白質ピークとして溶出してくる。一方アルド・ケト還元酵素活性は ρ -クリスタリンの前に単一のピークとして溶出してきた。塩濃度を2Mまで上げててもその他に有意な活性は検出されなかった。従ってカエル水晶体ではただ一種のアルド・ケト還元酵素が発現されかつ ρ -クリスタリンとは異なる蛋白質であると推察された。このRed Sepharose画分をゲルろ過により分離したのが図2である。本酵素は分子量40,000の位置に単一のピークとして溶出してきた。この溶出位置は厳密に言えば ρ -クリスタリンの溶出位置より若干早く溶出する位置である。さらにこのゲルろ過画分をMono Sカラムに通して混在する ρ -クリスタリンを吸着除去し、未吸着のまま素通りするアルド・ケト還元酵素を図3に示したようにMatrex Orange Aに導き0.1mM NADPHでアフィニティー溶出し精製した。最終的に回収率13.2%, 比活性10.2ユニット/mg蛋白質の精製標品が0.005mg蛋白質量得られた(表1)。

図1 カエル水晶体アルド・ケト還元酵素のRed Sepharose クロマトグラフィー

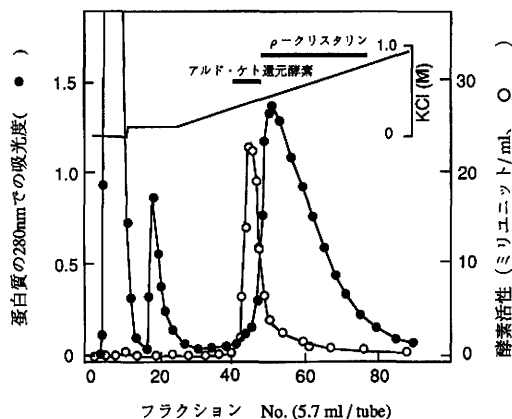


図2 カエル水晶体アルド・ケト還元酵素のRed Sepharose G-100ゲルろ過クロマトグラフィー

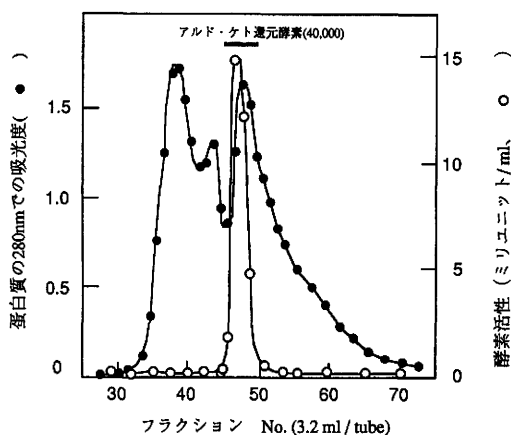


図3 カエル水晶体アルド・ケト還元酵素の Matrex Orange A クロマトグラフィー

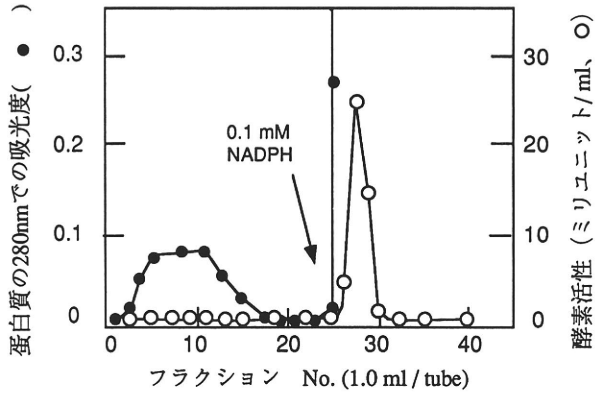
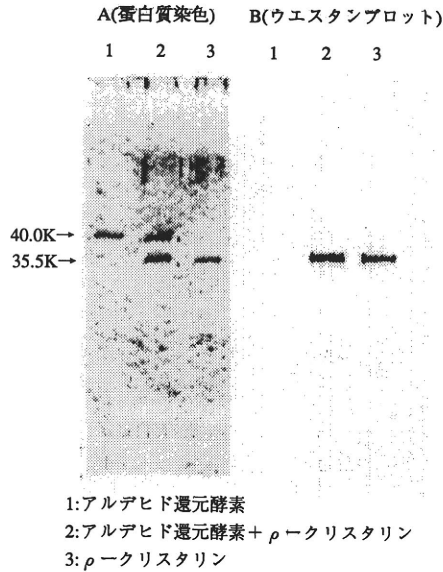


図4 カエル水晶体アルド・ケト還元酵素の電気泳動とウエスタンブロット



精製酵素の電気泳動とウエスタンブロット

精製酵素をドデシル硫酸ナトリウム存在下15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析したのが図4Aである。本酵素の分子量は図より40,000と求められ、 ρ -クリスタリンの分子量より約5,000ほど大きい。先のゲルろ過の結果と総合すると本酵素は分子量40,000の単量体酵素であると判明した。一般的にアルド・ケト還元酵素は分子量30,000~40,000の単量体酵素であることが知られている。

図4Bはウサギ抗 ρ -クリスタリン抗体 (IgG) を用いたウエスタンブロットの結果である。本酵素は抗 ρ -クリスタリン抗体により認識されず ρ -クリスタリンとは免疫学的にも異なる蛋白質であることが判明した。

表1 カエル水晶体アルド・ケト還元酵素の精製

ステップ	蛋白質量	活性	比活性	収率
	mg	ユニット	ユニット/mg	%
1.粗抽出画分	896	0.387	0.0004	100
2.Red Sepharose 画分	28.0	0.318	0.0114	82.2
3.ゲルろ過画分	7.00	0.137	0.0196	35.4
4.Mono-S/Orange-A 画分	0.005*	0.051	10.2	13.2

*アミノ酸分析により求めた

精製酵素の基質特異性と阻害

表2は本酵素の基質特異性を評価したものである。本酵素はp-nitrobenzaldehydeを最も良い基質とし、次いでDL-glyceraldehydeを良い基質とした。これら二つの基質に対するKm値はそれぞれ0.14および10.0mMと求められアルド・ケト還元酵素の高Km型酵素に相当するアルデヒド還元酵素であることが判明した。本酵素はD-xyloseおよびD-galactoseを還元したが良い基質とは言えず、またD-glucoseはほとんど還元されなかった。同様にPGE₂やPGD₂も全く還元されなかった。また、アルドース還元酵素の阻害剤であるAL-1576の本酵素に対する阻害を検討した。本酵素に対するAL-1576の50%阻害濃度(IC₅₀)は 3.5×10^{-7} Mと求められた。この値は人胎盤アルドース還元酵素とアルデヒド還元酵素に対する50%阻害濃度それぞれ 5.0×10^{-9} および 8.3×10^{-8} Mと比較すると明らかに後者の人胎盤アルデヒド還元酵素のものに近い⁹⁾。

表2 カエル水晶体アルデヒド還元酵素の基質特異性

基 質	濃度	相対活性	Km
	mM	%	mM
p-nitrobenzaldehyde	1.0	100	0.140
DL-glyceraldehyde	10.0	68.3	10.0
D-xylose	100	4.6	N.D.
D-galactose	280	3.4	N.D.
D-glucose	280	n.d.	-
prostaglandin E ₂	1	n.d.	-
prostaglandin D ₂	1	n.d.	-

n.d.,非検出 N.D.,未決定

考 察

カエル水晶体アルデヒド還元酵素は蛋白質化学的にも免疫化学的にも ρ -クリスタリンと異なる蛋白質であることが証明された(図4)。水晶体構造蛋白質は多かれ少なかれ翻訳後修飾(グリケーション, デアミネーション, アスパラギン酸のDL変換など)を受けている, その翻訳後修飾が ρ -クリスタリンのオリジナルな酵素活性を引き出す可能性は充分考えられるがその証拠は今回も見い出されず従ってその可能性はないと考えられる。 ρ -クリスタリンの分子進化を考える上でアルデヒド還元酵素がその起源であるとすれば少なくとも両者の間に免疫化学的に共通な抗原性があってもよいがその証拠はないのでアルデヒド還元酵素が ρ -クリスタリンの起源である可能性は極めて小さいと考えられる。今回, カエル水晶体ではアルドース還元酵素やプロスタグランジンF合成酵素はまったくと言っていいほど検出されなかった。ところが, 人, ラット, マウス, ウサギ, イヌなど多くの動物種でアルドース還元酵素が水晶体のメジャーなアルド・ケト還元酵素として発現されている。例えばアルドース還元酵素が ρ -クリスタリンの起源であれば, 遺伝子重複の機構によりアルドース還元酵素の発現が抑制されても不思議はない。またアルドース還元酵素は糖に対する親和性が高いことから糖尿病性合併症の起因酵素とされ, 水晶体構造蛋白質へと機能転換を行うさいその酵素活性が生理的に極めて重大な脅威となり酵素活性を貫壁に放棄する必要に迫られたと推測できる。 ρ -クリスタリンにはまったくと言っていいほど酵素活性は検出できないのでこの推測を旨く説明できる。このような考えから, ρ -クリスタリンの起源酵素がアルドース還元酵素であるとする説はかなり有望である。今後 ρ -クリスタリンの起源を探る上で, 他の臓器に発現されているアルド・ケト還元酵素の遺伝子情報を調べまた遺伝子重複の実態を検討する必要があるものと考えられる。

参考文献

1. D. A. Caper, G. Wistow, C. Nishimura, C. Graham, K. Watanabe, Y. Fujii, H. Hayashi, and O. Hayaishi (1989) *Exp. Eye Res.* 49, 377-388
2. K. Watanabe, Y. Fujii, H. Ohkubo, S. Kuramitsu, H. Kagamiyama, and O. Hayaishi (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 272-278
3. K. Watanabe, Y. Fujii, K. Nakayama, H. Ohkubo, S. Kuramitsu, H. Kagamiyama, S. Nakanishi, and O. Hayaishi (1989) *Prog. Clin. Biol. Res.* 290, 365-379

藤 井 豊

4. Y. Fujii, K. Watanabe, H. Hayashi, Y. Urade, S. Kuramitsu, H. Kagamiyama, and O. Hayaishi (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 9914-9923
5. Y. Fujii, F. X. Zhao, S. C. J. Fu, N. Nakai, and C. Y. Lai (1991) *Protein Expression and Purification* 2, 420-425
6. Schaffner, W., and Weissmann, C. (1973) *Anal. Biochem.* 56, 502-514
7. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-688
8. Hsu, S. M., Raine, L., and Fanger, H. (1981) *J. Histochem. Cytochem.* 29, 577-580
9. H. Hayashi, Y. Fujii, K. Watanabe, and O. Hayaishi (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 1036-1040