

架橋細胞壁を用いたアフィニティカラムへの ペクチナーゼの吸着性

吉野(家護谷)世美子

Adsorption of Pectic Enzymes to Affinity Column with Cross Linked Cell Walls

Yomiko Kegoya-Yoshino

I. はじめに

ペクチン質はウロン酸を主体とし、種々の中性糖類を含む複雑な多糖類であり、その構造の詳細は不明確である。著者らは、今までペクチン質のポリガラクトuronanに特異的に作用する種々のペクチン質分解酵素を用いて酵素化学的手段により構造を解析する方法を試みてきた。構造解明に必要な種々のペクチン質分解酵素のうち、ポリガラクトuronanの還元末端に作用し、不飽和のジガラクトuron酸を放出する酵素(Exopolysaccharuronatase; Exo-PGL)は *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* W 2 から菌体内酵素として調製されるが^{1,2)}、著者らはこの酵素をペクチン酸を架橋して調製したゲル(Cross Linked Pectic Acid; CLPA)を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した²⁾。しかし、CLPAは調製に非常に労力を要するので、酵素の最終精製段階での使用には非常に有効であるが、粗酵素での大量処理にはかえって労力を要す。そこで、後に畑中らは、このCLPAにかわるアフィニティ担体として柑橘類の内果皮を架橋した架橋細胞壁(Cross Linked Cell Wall; CLCW)の調製法を検討し、その無水ガラクトuron酸量(ペクチン酸量)を調べた結果、CLCWが非常に有効な陽イオン交換体であることを示した³⁾。Exo型の代表的なペクチン質分解酵素である Exopolysaccharuronase(Exo-PG)を西洋ニンジンから抽出すると他の作用形式のペクチナーゼをもたないので有用な酵素起源であるが、抽出液の酵素活性が非常に弱いので有効な濃縮法と精製法の検討が必要である。また Exo-PGL

についても架橋ペクチン酸にかわる CLCW の有効性を調べておく必要がある。そこで、今回は柑橘類の他に、起源の異なる CLCW を調製し、Exo-PGL と Exo-PG を用いて吸着性を試験し、さらに大量の酵素をカラム処理することによりペクチナーゼの精製の手段としての有効性について検討したので報告する。

II. 実験方法

1. CLCW の調製

温州みかん、カリフォルニアオレンジ、グレープフルーツの内果皮、ふすま(小麦ふすま、日清製粉製)は水洗して余分な粉を水洗除去後乾燥したもの、おから(みずず豆腐製、乾燥おから)を通常の下でアルカリケン化後、架橋し、架橋細胞壁を調製した³⁾。各 CLCW の膨潤率、遊離のカルボキシル基量(無水ガラクトuron酸量またはペクチン酸量)等は畑中ら³⁾にしたがって測定した。

2. 酵素の調製

Exo-PGL: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* W 2 (IFO 13921) は前報^{1,2)}と同組成の培地 31 を、450 ml ずつ 31 の三角フラスコ 6 個に入れ、あらかじめ同培地 50 ml で 30℃、24 時間振盪培養(往復振盪; 120 rpm/min)した菌液をそれぞれのフラスコに接種し、48 時間往復振盪培養後、菌体を超音波処理し、得られた酵素液から 0.3 飽和硫酸塩析物を除いた上澄みを粗酵素液とした。

Exo-PG: セイヨウニンジン (*Daucus carota* L.) 2 kg を細片とし、同量の 1 M-NaCl とともにミキサーで粉碎し、防腐剤として少量のトルエンを加えて 4℃ で一夜酵素を抽出した。抽出物をナイロンネットでろ過し、ろ液を遠心分離して沈殿物を除去し、上澄

みを0.02M 酢酸緩衝液 (pH4.0) で透析し、これを粗酵素液とした。後述の吸着試験用の酵素液は限外ろ過 (アミコン PM-10, 排除限界 MW = 1×10^4) で濃縮して用いた。

3. 酵素活性測定法

PGL 活性: 畑中ら⁴⁾によると不飽和ジガラクトロン酸と不飽和トリガラクトロン酸の $1 \mu\text{mole/ml}$ 溶液は232 nm で4.70の吸光度を示すので、235 nm における吸光度の増加から活性を計算した。すなわち、酸不溶性ペクチン酸⁵⁾ 0.2%, 35°C, 最適 pH で酵素液 1 ml が1分間に分解する不飽和のガラクトロン酸の μmole 数をもって酵素単位 (unit/ml) とした。

PG 活性: 酵素活性は還元力を改変 Somogyi-Nelson 法⁶⁾ で測定した。酸不溶性ペクチン酸0.2%, 35°C, 最適 pH で酵素液 1 ml が1分間に分解するグリコシド結合の μmole 数をもって酵素単位 (unit/ml) とした。

4. 吸着試験法

各種 CLCW への酵素の吸着性は、プラスチック製の 5 ml 容の小カラムを用いて試験した。CLCW の粉末を3倍量の各 pH の0.2M 緩衝液で膨潤させ、さらに0.02M 緩衝液で洗浄、緩衝化させた後 2 ml をカラムに充填した ($1.3 \times 1.5 \text{ cm}$, 2 ml)。酵素液はあらかじめ0.005M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) で透析し、各 pH の0.05M 緩衝液で2倍に希釈して、各 pH の酵素液を調製した。この酵素液をそれぞれ 2 ml ずつ (Exo-PG: 0.3 unit/ml, Exo-PG: 0.2 unit/ml) 小カラムに流し、続いて 4 ml の0.02M 緩衝液で洗浄し、さらに Exo-PGL は0.2 M NaCl を含む0.05M トリシュー塩酸緩衝液 (pH8.5, 5°C) 6 ml, Exo-PG は0.2M 酢酸ナトリウム溶液 6 ml で溶出した。カラム処理は4°Cで流速40 ml/h で行い、フラクションは1 ml として酵素活性を測定し、溶出量 0~6 ml までを通過区分、7~12 ml までを溶出区分として回収し、それぞれの区分の酵素活性をカラム処理した全酵素単位に対する回収率で表した。緩衝液は pH 3 はクエン酸-リン酸二ナトリウム緩衝液, pH 4, 5 は酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液, pH 6, 7 はリン酸-カリウム-リン酸二ナトリウム緩衝液を用いた。

5. 酵素の精製試験

Exo-PGL は前述の培地 31 から得られた粗酵素液を0.02M リン酸緩衝液, pH6.0で緩衝化した CLCW カラム ($2 \times 8.0 \text{ cm}$, 25 ml) で吸着させ、

同緩衝液で洗浄後0.05M トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.8, 5°C) で洗浄し、最後に0.2M トリシュー塩酸緩衝液 (pH8.5, 5°C) で溶出した。Exo-PG はセイヨウニンジン 2 kg からの抽出酵素液を0.02M 酢酸緩衝液, pH 4 で緩衝化した CLCW カラム ($3 \times 11.5 \text{ cm}$, 80 ml) で吸着させ、同緩衝液で洗浄後、0.2M 酢酸ナトリウム溶液で溶出した。回収酵素のタンパク量を Lowry らの方法⁷⁾ で測定して単位タンパク量あたりの活性を求め、精製度を比活性と比較した。

III. 結果と考察

各種 CLCW の調製過程、および無水ガラクトロン酸量 (ペクチン酸量) を Table 1 に示した。Table 1 の CLCW の回収率は、アルカリケン化後の乾燥物に対する回収率を示しているが、いずれの CLCW も架橋後の回収率は非常に高かった。ただし、表には示していないが、柑橘類のアルカリケン化後の乾燥物はいずれも生の内果皮重量の約10%の回収率であるので必要量の約10倍の内果皮が必要である。柑橘類での無水ガラクトロン酸量はグレープフルーツが最も高く、続いてオレンジ、温州みかん、おからで、ふすまは他の4種に比較して極端に低かった。グレープフルーツ、温州みかんは前報の畑中らの値とほぼ一致している³⁾。水分含量はいずれも低く1.0%から3.5%の範囲であった。膨潤率は7.7倍から9.0倍の範囲で差はなかった。水分含量、膨潤率に大差がなかったため、無水ガラクトロン酸量が酵素の CLCW への吸着性に直接関係すると考えられるので、柑橘類とふすまでは酵素の吸着性に何らかの差があるのではないかと予想された。

次に小カラムを用いた Exo-PGL とグレープフルーツ、おから、ふすまとの吸着試験の結果を Fig. 1 の A, B, C に、Exo-PG とグレープフルーツ、おから、ふすまとの吸着試験の結果を D, E, F に示した。図は各 pH の CLCW でそれぞれ4回ずつカラム処理を行い、各フラクションについてそれぞれ酵素活性を測定した結果を平均値で表している。柑橘類ではいずれも同様の吸着パターンを示したので、グレープフルーツの結果を示した。Fig. 1-A では PGL 活性は溶出量 6 ml までの通過区分にはほとんど活性のピークは認められず、それ以降の溶出量12 ml までの溶出区分に活性が認められた。このことは酵素が pH 5, 6, 7 のいずれの pH においてもすべて CLCW に吸着したことを示している。次に Fig. 1-B のおからの CLCW をみると pH 5, 6

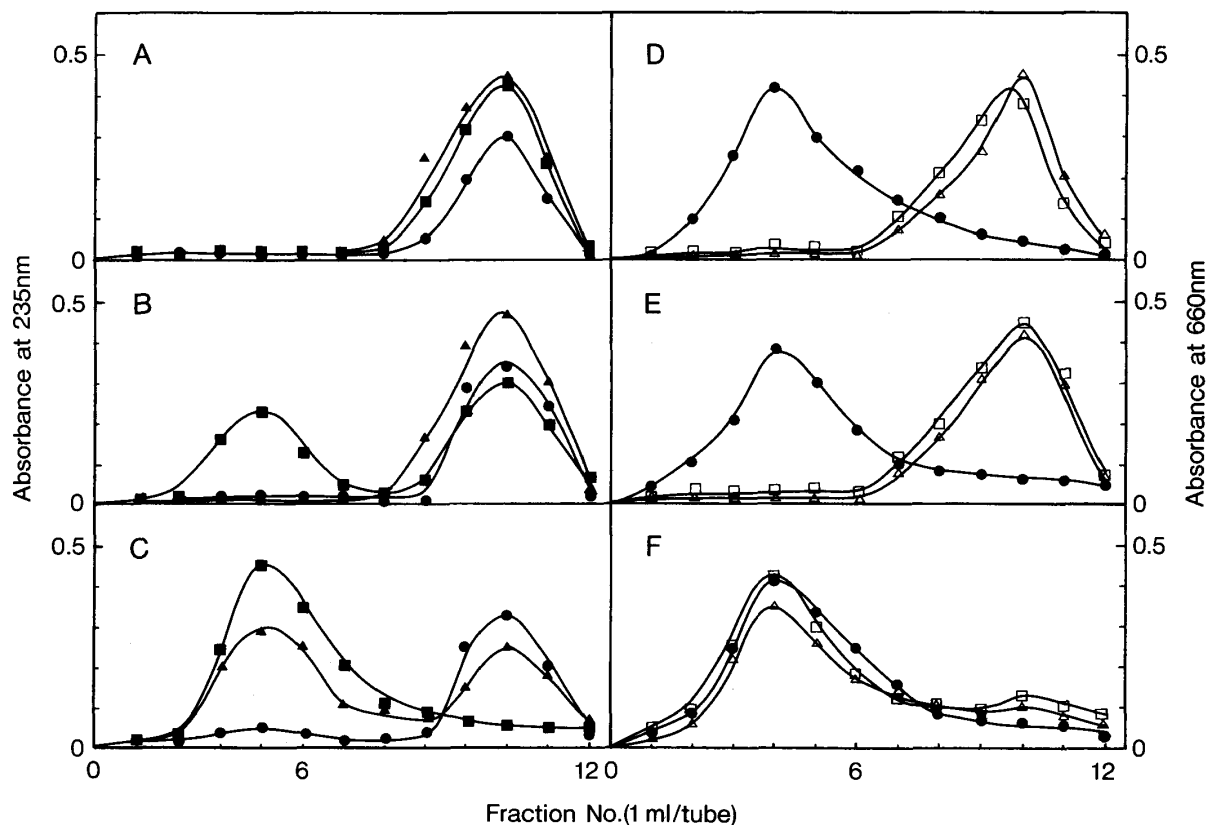


Fig 1. Adsorption of Pectic Enzymes to Affinity Column with Cross Linked Cell Walls.

A: PGL-Grapefruit, B: PGL-Okara, C: PGL-Fusuma,

D: PG-Grapefruit, E: PG-Okara, F: PG-Fusuma.

□: pH 3, △: pH 4, ●: pH 5, ▲: pH 6, ■: pH 7.

Column size is 1.3 × 1.5 cm, 2 ml.

では酵素活性のピークはすべて溶出区分に認められ、酵素が CLCW に吸着したことを示しているが pH 7 では通過区分にも活性のピークが認められ、活性の割合は通過区分が43%、溶出区分が57%であり柑橘類に比較しておから CLCW への吸着性は低かった。ふすまではさらに吸着力は低く、pH 5 では大部分の活性が溶出区分に認められたが、pH 6 では通過区分と溶出区分に同程度の活性のピークが認められ、また pH 7 ではすべての活性が通過区分に認められ、pH が高くなるにしたがって CLCW への吸着性は低くなった。続いて PG と各 CLCW との吸着性はグレープフルーツでは pH 3, 4 では通過区分に酵素活性のピークは認められずほとんどすべての酵素活性が溶出区分に認められ吸着したことを示したが、pH 5 では逆に通過区分に大部分の酵素活性が認められ、吸着性は pH が高くなると低下した。この傾向はおからにおいても同様で、pH 3, 4 では酵素は吸着したが、pH 5 では吸着しなかった (Fig. 1-E)。ふすまではさらに吸着性は低く、pH 3, 4, 5 のすべての pH で通過区分に大部分の酵

素活性のピークが認められ、酵素は吸着しなかった。以上、回収酵素の通過区分と溶出区分の酵素活性の割合について述べたが、酵素の回収率 (カラムに流した酵素の全活性に対するカラム処理後の回収した通過区分と溶出区分の合計) は PGL では pH に影響され、pH が低くなると低くなった。すなわち酵素の回収率は、グレープフルーツでは pH 5 で通過区分 (溶出量 0 ~ 6 ml) に処理酵素の 6%、吸着区分 (溶出量 7 ~ 12 ml) に 62% の合計 68%、おからでは前者が 12%、後者が 54% の合計 66%、ふすまでは前者が 10%、後者が 59% の合計 69% であったのに対し pH 6, 7 ではいずれの CLCW でも両者の合計の回収率は 90% 程度を示した。これは、この酵素が中性付近の pH で安定性が高く、酸性側の pH で急激に低下する²⁾ ということと一致しており、カラム処理中に一部失活したものと考えられる。一方、PG の回収率は本実験での pH 3, 4, 5 の範囲での結果に差は認められなかった。CLCW はペクチナーゼにとってはアフィニティの高分子架橋体であると同時にガラクトロン酸のカルボキシル基が交換基と

Table 1. Some Properties of the CLCWs

Property	Grapefruit	Orange	Satsuma mandarin	Okara	Fusuma
Yield ^a (%)	92.9	91.0	88.0	90.8	95.4
Moisture(%)	2.5	3.5	3.1	2.2	1.0
Swelling volume ^b (ml/g)	9.0	8.5	7.7	7.9	7.9
Free carboxyl ^c (meq/g)	2.35	1.98	1.55	1.13	0.44
Pectic acid ^c (%)	41.4	34.8	27.3	19.8	7.8

^a Expressed as a percentage of the dried saponified AIS powders.

^b Measured by suspending 1.0 g of dried CLCW in water in a 20-ml measuring cylinder and by reading the bed volume after 6 hr incubation at room temperature.

^c The procedure used was essentially the same as that described by Hatanaka³⁾. To a dried CLCW (1.0 g), previously treated with 0.6 N hydrochloric acid-70% ethanol and washed successively with ethanol, acetone, and ether, were added 99% ethanol (5 ml), degassed deionized water (100 ml), and sodium chloride (1 g), and the mixture was titrated with 0.1 M sodium hydroxide solution in the usual way. A titer of 1 ml is equivalent to 0.1 meq of free carboxyl or 17.6 mg of anhydrogalacturonic acid (or 17.6 mg of pectic acid).

なる弱酸性陽イオン交換体であるので、無水ガラクトツロン酸量は CLCW の吸着能に直接影響すると考えられる。したがってこれら5種の CLCW と PGL および PG との吸着性の結果は前述の CLCW の無水ガラクトツロン酸量 (Table 1) とほぼ一致した結果といえる。PGL と PG の CLCW への吸着 pH 領域が異なるのは、酵素が CLCW のイオン交換体としての影響を強く受けているためと考えられ、PGL の等電点が PG よりもアルカリ側にあることと対応している。

以上のように、柑橘類の CLCW 3種は他の2種に比べ、ペクチナーゼに対する吸着能が高く、アフィニティカラムの高分子架橋担体として有効であると考えられたので、グレープフルーツの CLCW を用いて大量の酵素処理に有効か否かを試験した。Exo-PGL は前述の培地 31 から得られた粗酵素を 25 ml の CLCW カラムで、Exo-PG はセイヨウニ

ンジシ 2 kg からの抽出酵素を 80 ml の CLCW カラムで処理し、精製度を比活性で比較した (Table 2)。Exo-PGL は菌体の超音波処理後の酵素液の比活性を 1 にすると硫酸塩析後は 2.0、CLCW 処理後は 43.3 となった。Exo-PGL の比活性 225.13 unit/mg, $\times 10^{-1}$ を前報の CLPA 処理後の比活性 656.8 unit/mg, $\times 10^{-1}$ と比較すると約 1/3 の精製度であるが、CLCW による精製過程において溶出までの洗浄段階を増やすか、あるいはグラジエント溶出することにより比活性は改善できるので、CLCW は CLPA にかわる有効なアフィニティ担体と考えられた。また、Exo-PG は抽出酵素の比活性を 1 にすると CLCW 処理のみで約 9 倍に精製され、同時に酵素液は 30 倍近く濃縮された。このことから、Exo-PG においては精製法と同時に濃縮手段として CLCW によるカラム処理が非常に有効な手段であることがわかった。

Table 2. Summary of Purification of Pectic Enzymes

Step	Activity (unit/ml)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg, $\times 10^{-1}$)	Purification (fold)	Yield of activity (%)
PGL					
Cell-free extract	1.26	143.4	5.20	1.0	100.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ [30% (w/v)] supernatant	0.84	83.3	10.51	2.0	58.1
CLCW eluate	1.20	60.7	225.13	43.3	42.3
PG					
Cell-free extract	0.02	48.4	0.67	1.0	100.0
CLCW eluate	0.54	35.1	6.10	9.1	72.6

以上のように、CLPAにかわるアフィニティ担体としてのCLCWの有効性について検討した結果、CLPAと同程度の効果が期待でき、Exo-PGL、Exo-PGのいずれのペクチナーゼの精製にも非常に有効な物質であることがわかった。

IV. おわりに

ペクチナーゼとしてExo-PGLとExo-PGを用い、温州みかん、オレンジ、グレープフルーツ、おから、小麦ふすまの5種から調製したCLCWに対する吸着性を試験し、さらに、これら酵素を大量処理することによりペクチナーゼの精製の一手段としての有効性について検討した。

その結果、温州みかん、オレンジ、グレープフルーツなどの柑橘類のCLCWは他の2種に比較していずれのペクチナーゼにおいても吸着力が強く、逆にふすまは最も吸着力が弱かった。これは調製したCLCWのガラクトロン酸量を測定した結果、すなわち柑橘類はガラクトロン酸量が多く、ふすまは少ないという結果と一致し、CLCWのイオン交換体としての影響を強く受けているためと考えられた。また、Exo-PGLとExo-PGの吸着pH領域はPGが酸性側にあるのに対しPGLはPGよりも高く、両者の等電点の違いによるものと考えられた。

グレープフルーツのCLCWを用いて大量の酵素

処理をした結果、Exo-PGLではCLCWの精製過程のみで前段階の約22倍に精製され、Exo-PGでは約9倍に精製されると同時に約30倍濃縮され、いずれのペクチナーゼの精製にも非常に有効なアフィニティ担体であることがわかった。

参考文献

- 1) Hatanaka, C., Kegoya, Y., and Imamura, T., *J. Fac. Appl. Biol. Sci., Hiroshima Univ.* **18**, 31-42 (1972)
- 2) Kegoya, Y., Setoguchi, M., Yokohiki, K., and Hatanaka, C., *Agric. Biol. Chem.* **48**, 1055-1060 (1984)
- 3) Hatanaka, C., Sakamoto, K., and Wada, Y., *Agric. Biol. Chem.* **54**, 3347-3348 (1990)
- 4) 畑中千歳, 小沢潤二郎, 農化, **43**, 764-772 (1969)
- 5) 畑中千歳, 小沢潤二郎, 農化, **42**, 645-650 (1968)
- 6) Hatanaka, C., and Kobara, Y., *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2943-2949 (1980)
- 7) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)