



Title	キジラミのミモシン分解酵素の精製と諸性質
Author(s)	孙, 丽曼; 石丸, 哲二; 大城, 伸明; 玉城, 一; 知念, 功
Citation	琉球大学農学部学術報告 = The Science Bulletin of the Faculty of Agriculture. University of the Ryukyus(50): 143-149
Issue Date	2003-12-01
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3607
Rights	

キジラミのミモシン分解酵素の精製と諸性質

孙丽曼*・石丸哲二**・大城伸明****・玉城 一***・知念 功***

Liman SUN*, Tetsuji ISHIMARU**, Nobuaki OSIRO****, Hajime TAMAKI*** and Isao CHINEN****

Purification and properties of mimosine hydrolyzing enzyme of *Leucaena Psyllids* (Jumping Plant Lice)

キーワード：ギンネム，キジラミ，ミモシン分解酵素，精製，諸性質

Key words : *Leucaena*, Psyllid(anxious insect), Mimosine degradating enzyme, Purification, Properties

Summary

A crude enzyme of psyllid hydrolyzed mimosine, a strongly toxic substance for livestock, into 3-hydroxy-4(1H)pyridine, pyruvic acid, and ammonia with 1639.44mg of total protein, 307290 units of total activity and 1.87 of specific activity was obtained by homogenizing 3g of psyllid body with 200mM phosphate buffer(30ml) and centrifuging. Purification of the crude enzyme was carried out in order of 60% saturated ammonium sulfate fractionation, heat treatment at 60°C for 1hour, DEAE-TOYO Pearl L650, Buthyl Sepharose 4B columns chromatography and FPLC with RESOUCÉ Q, MONO Q and Superose 12 columns. Purified enzyme had 1071.71U/mg of specific activity, 0.14% of recovery, and 570 times of purification. The enzyme with molecular weight of about 50,000, maximum pH ranges of 7.5–8.5 and maximum temperature ranges of 5.5–6.5 showed homogeneity by electrophoresis. N terminal Amino acid sequence of the enzyme was found to be ELEDXKXKFXNPVIEA

緒言

ギンネムに存在するミモシンは毒性を有し、一般の動物が食すると食欲不振、体重増加の抑制、繁殖障害、脱毛などの中毒症状を起こすことが知られている。しかし、ウシやヒツジなどの反芻動物はこのようなミモシン中毒症を起こさない。それはルーメン内微生物がミモシン分解酵素を有し、ルーメン内でミモシンを分解し、無毒化するとされている¹⁻⁹⁾。

一方、ギンネムはミモシンが存在するためにそれを食する害虫等はないと言われていたが、近年ギンネムに特異的に寄生し、ギンネムの樹液を吸うキジラミが発生し、ギンネム群生林を枯らすことがある¹⁰⁻¹²⁾。琉球列島では1986年にはこのキジラミが大発生し、ギンネムを枯らし、大きな被害を与えたことがある。

元来、キジラミはカリブ海諸島に生息し、*Heteropsylla* spp(*Leucaena Psyllids*)といわれているが、通称はJumping Plant Liceと呼ばれている。成虫は体長1~2mmで羽を有し、ノミのように飛び跳ねるのが特徴である。幼虫はアブラムシによく似ている。キジラミはギンネム若葉部に密着し、樹液を吸い生育している。そのために葉は縮んで落葉し枯れた状態になる。沖縄本島では、キジラミは秋~春によく見られ、ギンネムに被害を与えている。

ギンネムキジラミは毒性のミモシンを有するギンネム樹液を常食とすることから、ミモシン分解酵素を有すると予測された。そのためにミモシンとキジラミ酵素抽出液を反応させ、その反応物をHPLCで調べた結果、ミモシンが減少し分解産物の3-hydroxy-4(1H)-pyridone(3,4-DHP)が増加した。更に反応液中にはケト酸含量が高かったことから、そのケト酸を調べた結果、それがピルビン酸であることがわかった。また、反応液からはアンモニアも検出された。これらのことから、キジラミはミモシン分解酵素を有し、ミモシンを3-hydroxy-4(1H)pyridone、ピルビン酸とアンモニアにすることがこれまでの研究で明らかとなった¹³⁾。

本研究では、そのキジラミのミモシン分解酵素を単離精製し諸性質を明らかにした。

*鹿児島大学大学院連合農学研究科（琉球大学）・**大分県武蔵町立武蔵中学校

琉球大学農学部生物資源科学科・*沖縄県立糸満高等学校

琉球大学農学部学術報告 50:143~149(2003)

実験方法

1. キジラミの採取

1995年11月~1996年4月, 1996年11月~1997年4月, 1997年11月~1998年1月に琉大及び琉大周辺に群生している1~2mのギンネムの葉部に寄生しているキジラミにビニール袋をかぶせて採取した。採取後はただちにポリバケツにキジラミを移し, エーテルで麻酔させ, 篩にかけ, 落下物から, ピンセットでつまみ集めて, 凍結保存した。

2. 酵素液の調製と精製法

(1) 粗酵素液

キジラミ 3g に 200mM リン酸緩衝液 (pH7.2) 30ml を入れ約 3 分間ホモゲナイズし, 遠心分離 (12,000rpm, 30min) して, 上清を得, それを粗酵素液とした。

(2) 硫酸沈殿法

粗酵素液に 60%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え, 一晚低温室中で静置し, その後遠心分離 (12000rpm, 20min) し, その沈殿物を 50mM リン酸緩衝液 (pH7.2) で再び溶解し, 遠心分離 (8000rpm, 15min) し。得られる上澄み酵素液を 50mM リン酸緩衝液 (pH7.2) で平衡化した G-25Sephadex (Pharmacia 社) カラム (4.2×145cm) にかけて, 脱塩した。

(3) 熱処理法

脱塩した酵素液 50ml は, 50℃で 1 時間, 振動付きインキュベーターにかけた。その後遠心分離 (12,000rpm, 20min) し, 上清を熱処理酵素液として得た。

(4) DEAE-TOYOPEARL 650M カラムクロマトグラフィー

熱処理酵素液は, 50mM リン酸緩衝液 (pH7.2) で平衡化した DEAE-TOYOPEARL 650M (東ソー株式会社) カラム (3.2×16cm) に吸着させ, 同緩衝液でカラムを洗浄した後, 200mM リン酸緩衝液 (pH7.2) を用い, フラクシオンコレクターで 10ml ずつ分取しつつ, 溶出した。

(5) ButhylSepharose 4B カラムクロマトグラフィー

DEAE TOYOPEARL カラムで得られた酵素液は, 1M になるように硫酸を加え, 1M 硫酸を含む 50mM リン酸緩衝液 (pH7.2) で平衡化した ButhylSepharose 4B (Pharmacia 社) カラム (3.2×16cm) に吸着させ, 同緩衝液で洗浄した後, 0.5M 硫酸を含む 50mM リン酸緩衝液 (pH7.2) で溶出した。

(6) RESOURCE-Q カラムクロマトグラフィー

Buthyl Sepharose 4B 酵素液は, まず 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.2) で一晚透析し, 遠心分離した。次にその酵素液は 0.2 μ m のフィルターを通し, 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) (緩衝液 A) で平衡化し, RESOURCE-Q (Pharmacia 社) カラム (6ml) にのせた。同緩衝液で洗浄した後, 1M 塩化ナトリウム入り 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) (緩衝液 B) の直線濃度勾配法で, 本酵素を溶出させた。上記の作業は Pharmacia 社製の FPLC により行い, 溶出は 0~60 分で緩衝液 B は 0~60% の濃度になるようにプログラムし, 流速は 1.0ml/min で行った。

(7) Mono-Q カラムクロマトグラフィー

得られた精製酵素液は緩衝液 A で 5~6 倍に希釈し 0.2 μ m のフィルターに通した後, 同緩衝液で平衡化した Mono-Q HR5/5 (Pharmacia 社) カラムにかけた。この場合も FPLC を用いた。緩衝液 A で洗浄した後, 緩衝液 B の直線濃度勾配法により本酵素を溶出した。溶出は 0~25 分で緩衝液 B は 0~50% の濃度になるようにプログラムし, 流速は 1.0ml/min で行った。

(8) 2nd Mono-Q カラムクロマトグラフィー

このように精製した酵素液を緩衝液 A で 5~6 倍に希釈し 0.2 μ m のフィルターに通した後, 再び, 同緩衝液で平衡化した Mono-Q HR5/5 カラムに添加した。緩衝液 A で洗浄した後, 緩衝液 B の直線濃度勾配法により本酵素を溶出させた。溶出は 0~25 分で緩衝液 B は 0~50% の濃度になるようにプログラムし, 流速は 1.0ml/min で行った。

(9) Superose-12 カラムクロマトグラフィー

2nd Mono-Q の活性画分を CENTRICUT (倉敷紡績株式会社), および Centricon (Amicon 社) によって限界濃縮を行った。濃縮液を 200 μ l を 0.15M 塩化ナトリウムを含む 50mM リン酸緩衝液 (pH7.2) で平衡化した Superose-12 (Pharmacia 社) カラムを用いた FPLC に添加した。流速 0.2ml/min でゲルろ過を行った。

3. 酵素活性の測定

50mM リン酸緩衝液 (pH7.2) で, まずミモシンを 1mg/ml 濃度に溶解し, その液を 10 μ l, 同緩衝液 90 μ l, 酵素液 25 μ l を添加して 50℃で 1 時間反応した。反応後 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸溶液を 50 μ l 加え, 30 分放置し, 次に 4N 水酸化ナトリウムを 25 μ l 加え, 生成したピルビン酸を測定した¹⁴⁾。

上記条件下で 1 分間に 1 nmol のピルビン酸が遊離する酵素量を 1 単位 (U) とした。

4. 3,4-DHP の測定

酵素反応で生じた 3,4-DHP は, カラム shimpack CLC-ODS (150×0.6cm) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。HPLC の条件: oven 温度 50℃, UVdetector 250nm, ポンプ流速 1.5ml/min で測定した。移動層は 30mM リン酸 2 水素カリウム (オキシダント測定用) 10mM リン酸をまぜ pH2.0 に調整後, その容量の 1/10 のアセトニトリル (高速液体クロマトグラフ用) を加える。その総容量の 0.01% 1-オクタンスルホン酸ナトリウム (イオンペアクロマトグラフ用) を加える。0.2 μ m のフィルターを通した後, 脱気し実験に用いた。試料は 0.2 μ m のフィルターを通した後分析した。

5. タンパク量の測定

タンパク量は Bradford 法¹⁵⁾を用いて測定した。標準タンパク質にはウシ血清アルブミンを使用した。なお, 各種カラムクロマトグラフィーの溶出液のタンパク量は波長 280nm で測定した。

6. 精製酵素の電気泳動法

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) はゲル濃度 12% で行なった。酵素タンパク質染色はクーマシーブルーリアントブルー (CBB R-250), 銀染色は和光純薬工業会社の銀染色キットを用いて染色した。分子量測定用タンパク質には Bovin Serum Albumin (68000), Ovalbumin (45000), Carbonic anhydrase (32000), β -Lact Globulin (18000), Lysozyme (14500) のフナコシ低分子用スタンダードを 1mg/ml になるように調製し, 5種類を混合してスタンダードとして用いた。

7. 分子量の測定

ゲルろ過クロマトグラフィーにより分子量は測定した。Pharmacia 社製の Superose 12 を用いた Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) により測定した。Blue Dextran 2000 を基準として既知のタンパク質の溶出時間を求めた。標準タンパク質は Serum Albumin (68000), Ovalbumin (45000), Cymotrypsinogen A (25000), Cytochrom (12500) を使用した。

8. N 末端の分析

最終的に Mono-Q クロマトグラフィーにより精製した酵素タンパク質を SDS-PAGE により分離した。ポリアクリルアミド上の目的タンパク質の上に polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad Lab.) をのせプロットングを行った。プロットングは 80 分行い, CBB で PVF 膜を染色したミモシン分解酵素のバンドを切り離した。切り離した PVDF 膜はピリジルエチル化を行い Applied Biosystems model 473A を用いるプロテインシーケンサーにかけた。

プロテインシーケンサーはプロトコールに従った。決定されたアミノ酸配列のホモロジー検索はインターネットを用いて行った。

実験結果

1. 酵素の精製

(1) キジラミ粗酵素液の酵素活性

キジラミ 30g に 250mM リン酸緩衝液 (pH7.2) を入れ, ホモゲナイズし, 遠心分離し, 調製した酵素液のミモシン分解酵素活性は, 総タンパク量 1639.44mg, 総活性 3072.90 Unites, 比活性 1.87 であった。

(2) 硫酸沈澱画分の精製効果

その粗酵素液に硫酸の飽和濃度が 60% になるように硫酸を加え, 一晚静置し, 遠心分離し, 得られた硫酸画分の酵素活性は, 粗酵素液に比べて, 1.13 倍精製された。

(3) 脱塩処置と熱処理の効果

その硫酸画分を G-25 Sephadex G-25 カラムにのせ, 脱塩し, 熱処理すると, 活性収量は 74.95% で, 1.42 倍に精製された。

(4) DEAE-TOYOPEARL 650M カラムクロマトグラフィーの効果

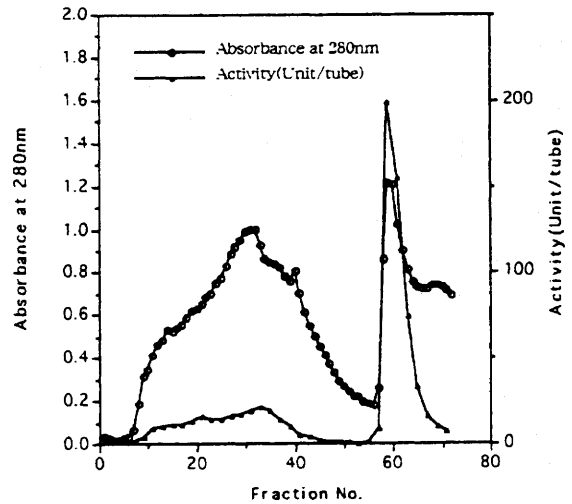


Fig.1 Anion-exchange column chromatography on DEAE-TOYOPEARL 650M of mimosine-degrading enzyme from psyllids.

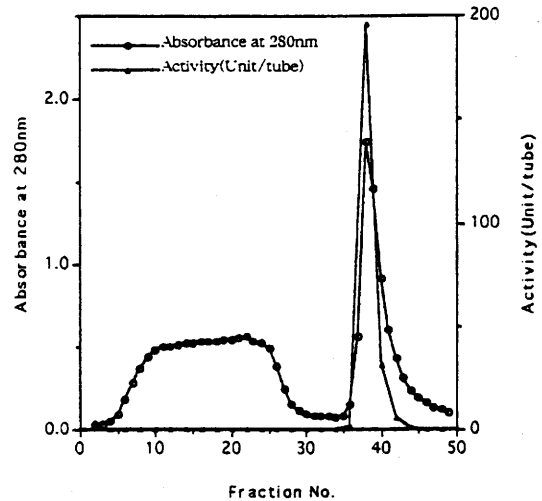


Fig.2 Hydrophobic interaction column chromatography on Butyl Sepharose 4B of mimosine-degrading enzyme from psyllids.

熱処理後の酵素液を DEAE-TOYOPEARL 650M カラムにのせると大部分の本酵素がカラムに吸着されたので, 200mM リン酸緩衝液で溶出した。吸着部の比活性は, 25.49U/mg で, 活性収量は 40.71% で 13.6 倍に精製された (Fig.1)。

(5) Butyl Sepharose 4B カラムの効果

前カラムの吸着を 1M になるように硫酸を加え, Butyl-Sepharose カラムにのせ, 硫酸濃度が 0.5M になるように硫酸を加えた 50mM リン酸緩衝液 (pH7.2) で溶出した。その溶出部の酵素の比活性は 94.80U/mg で, 活性収量 32.23% で, 50.58 倍に精製された (Fig.2)。

(6) RESOURCE-Q カラムの効果

前カラムの活性部を, 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) で一晚透析したのち, RESOURCE-Q カラムにのせ, 1M 塩化ナトリウム入り同緩衝液で溶出した。本酵素は塩濃度 27

%で溶出され、比活性は 87.93U/mg、活性収量 6.5% になり、46.91 倍に精製された (Fig.3)。

(7) Mono-Q カラムの効果

前カラムの活性画分を 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) で希釈後、Mono-Q カラムに添加し、1M 塩化ナトリウム入り同緩衝液溶出した。本酵素は塩濃度 28%で溶出され、その比活性 107.04U/mg で、活性収量は 3.41%で、57.11 倍に精製された (Fig.4)。

(8) 2nd Mono-Q カラムの効果

前カラムの活性部を 20mM Tris HCl 緩衝液 (pH7.5) で希釈後、Mono-Q カラムに添加し、1M 塩化ナトリウム入り同緩衝液溶出した。本酵素は塩濃度 27%で溶出され、比活性は 245.79U/mg で、活性収量は 1.18%となり 115.56 倍に精製された (Fig.5)。

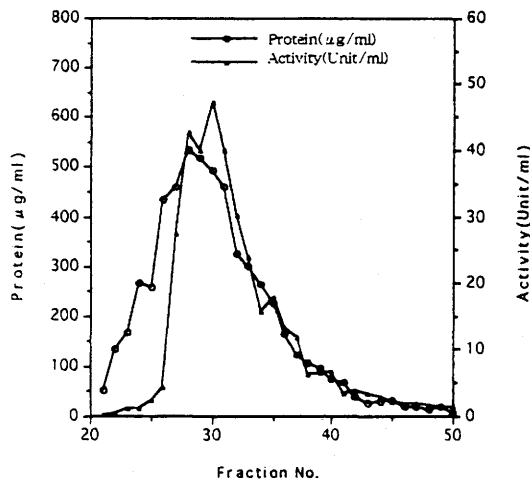


Fig.3 Anion-exchange chromatography on RESOURCE Q of mimosine-degrading enzyme from psyllids.

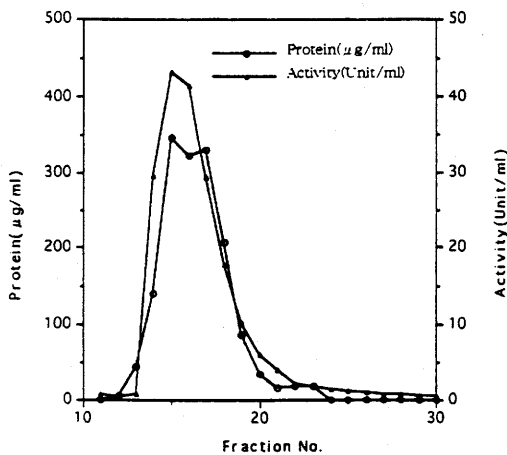


Fig.4 Anion-exchange chromatography on Mono-Q (5/5) of mimosine-degrading enzyme from psyllids.

(9) Superose-12 カラムの効果

前カラムの活性を集め濃縮後 Superose-12 カラムに添加し、0.15M 塩化ナトリウム入り 50mM リン酸緩衝液で溶出した。この Superose-12 ゲルろ過クロマトグラフィーでは単一なタンパク質のピークは得られなかった。0.14%の活性収量で約 570 倍に精製され、比活性は 1071.71U/mg となった (Fig.6)。

以上のミモシン分解酵素の精製過程の各段階におけるタンパク量および酵素活性の結果は Table1 にまとめた。

最終段階の本酵素を SDS-PAGE で純度を調べた結果、ほぼ均一なバンドが得られた (Fig.7)。

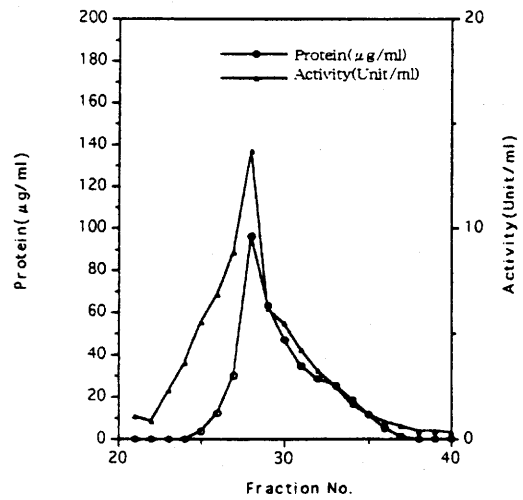


Fig.5 Anion-exchange chromatography on Mono-Q (5/5) of mimosine-degrading enzyme from psyllids.

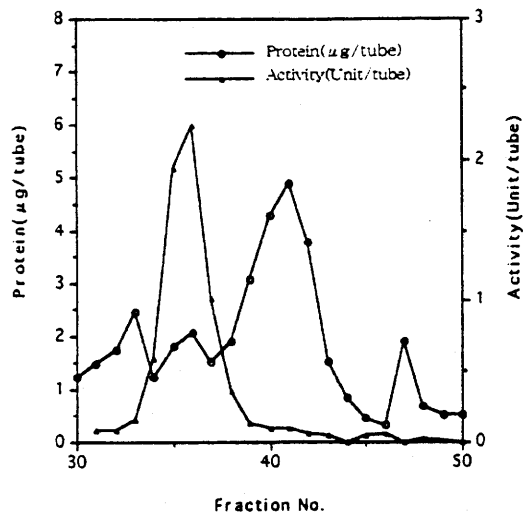


Fig.6 Gel filtration on Superose 12 of mimosine-degrading enzyme from psyllids.

Table 1 Purification of mimosine-degrading enzyme from psyllids.

Step	protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Fold
Crude	1639.4400	3072.90	1.87	100.00	1.00
Ammonium sulfate precipitation	1388.3904	2953.14	2.13	96.10	1.13
G-25 sephadex & Heat treatment (50°C) 1 hour	862.6310	2303.03	2.67	74.95	1.42
DEAE TOYO-PEARL 650M	49.0880	1251.05	25.49	40.71	13.60
Buthyl Sepharose 4B	10.4469	990.42	94.80	32.23	50.58
RESOURCE Q	2.2710	199.69	87.93	6.50	46.91
Mono-Q	0.9776	104.65	107.04	3.41	57.11
2nd Mono-Q	0.1422	34.96	245.79	1.18	115.56
Superose12	0.0039	4.18	1071.71	0.14	571.77

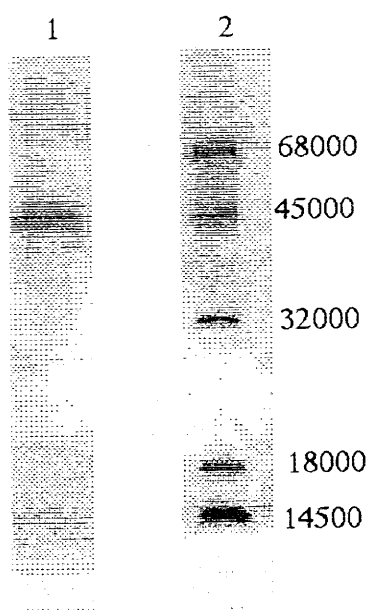


Fig.7 SDS-PAGE of the Mimosine-degrading Enzyme. Lane 1, Mimosine-degrading enzyme; lane 2, standard

2. 分子量

Superose-12 ゲルろ過カラムで、FPLC により本酵素の分子量を求めた結果、約 51000 と推定された (Fig.8)。なお、タンパク質の溶出時間はミモシン分解活性を測定して求めた。また、SDS-PAGE により求めた分子量は約 50000 であったことから、本酵素はモノマーであると思われる。

3. 至適 pH

各種ことなる緩衝液を用いて、本酵素の至適活性値を調べた。pH3.5~7.5 は McIlvaine 緩衝液、pH7.5~8.5 は 0.1M Tris-HCl 緩衝液、pH8.5~10.5 は 0.1M 炭酸ナトリウム-ホウ酸混合緩衝液を用い、50°C で 1 時間反応した。その結果本酵素の至適 pH は 7.5~8.5 の範囲であることがわかった (Fig.9)。なお、酵素液は DEAE-TOYOPEARL 画分を用い

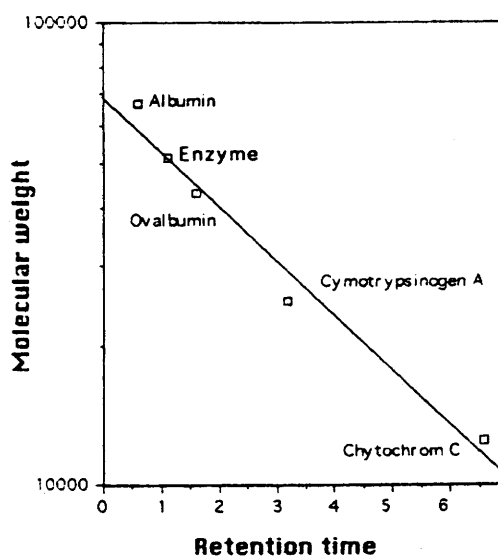


Fig.8 Molecular weight estimation of mimosine-degrading enzyme by FPLC gel filtration on Superose 12.

て行った。

4. 至適温度および熱安定性

50mM リン酸緩衝液 (pH7.2) を用いて 10°C~80°C の範囲で酵素反応をおこない、反応温度の酵素活性への影響を調べた。至適温度は 55°C~65°C であった (Fig.10)。次に本酵素液を各種の温度 (50°C~70°C) で 1 時間加熱した後残存酵素活性を測定して熱安定性を検討した。本酵素は 60°C まで殆ど安定で、90% 以上の酵素活性が存在した (Fig.11)。

5. ピリドキサル 5'リン酸の影響

アミノ酸代謝で補酵素として多く用いられているピリドキサル 5'リン酸 (PLP) を粗酵素に加え活性を測定した。PLP を加えると、酵素活性が Fig.12 に示すように上昇した。

6. N 末端の決定

ミモシン分解酵素の N 末端の 16 残基の内 14 残基を決定

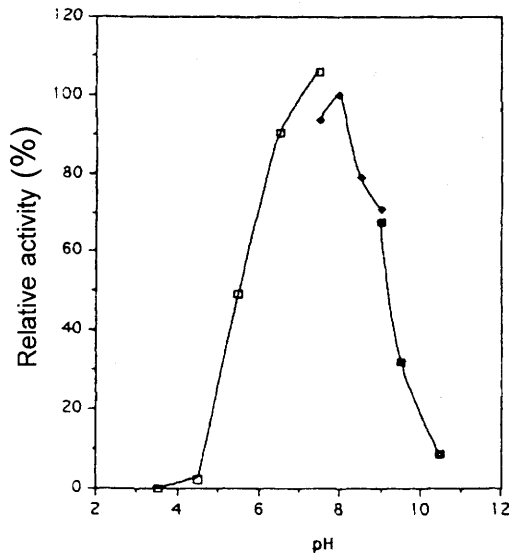


Fig.9 Optimum pH. The enzyme activities were measured at various pH. The buffer Systems used were; □, McIlvaine buffer; ◆, 0.1M Tris-HCl buffer; ◻, 0.1M Sodium carbonate-boric acid.

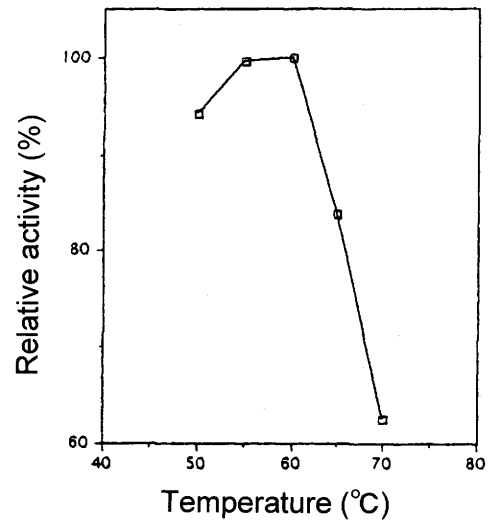


Fig.11 Thermal stability. The enzyme solution was kept at various temperature for 1 hour in 50mM phosphate buffer (pH7.2) and the remaining activities were measured.

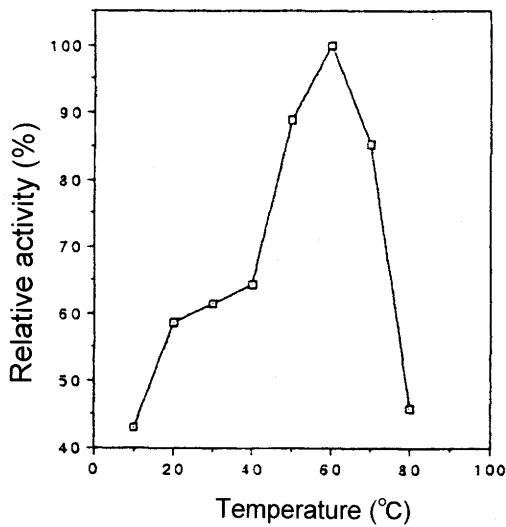


Fig.10 Optimum temperature. The enzyme activities were measured at various temperature in 50mM phosphate buffer (pH7.2).

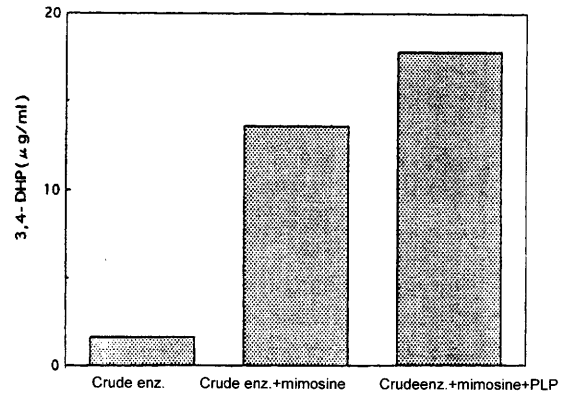


Fig.12 Activation of Mimosine-degrading Enzyme by Pyridoxal-5'-phosphate (PLP).

した。その結果、その残基は ELEDXXKKFXNPVIEA であることがわかった (Xは解析不可) (Fig.13)。

ホモロジー検索を行ったところ高い相同性のものは認められなかった。

考 察

精製過程で本酵素を 50°C で 1 時間熱処理を行ったが、活性収量は約 75% で比活性は 1.4 倍になったことから、本酵素は比較的の高い熱に安定で、60°C で 1 時間熱処理を行っ

ても 90% 以上活性が残存した。また精製過程で、1M の硫酸濃度で、Butyle Sepharose 4B カラムに本酵素は全て吸着され、0.5M 硫酸濃度で溶出されたことから、本酵素は疎水基を多く有すると考えられる。次に RESOURCE-Q カラムにのせた場合、活性収量が 32% から 6.5% に減少した。このことから本酵素は抽出が不完全であったとも考えられるし、また、同カラムに吸着されることにより不活性化したとも考えられる。

Tangendjaja¹⁶⁾ らはギンネム葉部からミモシン分解酵素を分離し、その分子量が 140,000 であるとし、一方、Murakoshi らはギンネムのミモシン合成酵素の分子量は 64,000 で二つのサブユニットからなると報告している¹⁷⁾。本研究で得たキジラミのミモシン分解酵素の分子量は 50,000 であり、ギンネム若葉部のミモシン分解酵素やミモシン合成酵素とは分子量が異なることから、全く別の酵素と思わ

