

固定化酵素 (オ2報)

無機担体へのヌクレアーゼ P₁ の固定化

(ヤマサ醤油研) ○六川政治, 藤島鉄郎, 國中 明, 吉野 宏

1. 目的. 我々はこれまでヌクレアーゼ P₁ やアデニルデアミナーゼのような核酸関連化合物分解酵素の固定化を試みてきた¹⁾. 前報²⁾においては, A.E. Emery³⁾ によって見出された Metal Link Method を用いて Duolite A-4, Diaion HPA 10, 同 HPK 25, 同 CR 10 など各種イオン交換樹脂のチタンコンプレックスを調製し, ヌクレアーゼ P₁ を固定化したところ, 高分子 RNA に対する比活性が Native の 60~70% を示し, しかも長期に亘る連続反応にも耐え得る標品が得られたことを報告した. 本方法(配位結合法)によれば, 共有結合法より温和かつ迅速に固定化される為には活性の低下がより防止され, しかもイオン結合法よりは安定である等の時効が示された. 今回はそれに引き継ぎ, 軽石, 陶器片, アスベスト, シリカゲル等の多孔性(繊維状)無機物質を担体として Metal Link Method を施用したところ, 前報²⁾と同様, 良い結果が得られたので報告する.

2. 方法. ヌクレアーゼ P₁ は *P. citrinum* を培養しその水抽出液から調製した.

A) 固定化. 軽石等無機担体を 20% TiCl₄ 溶液に懸濁させて, 室温1時間攪拌した. 上澄を除いた後, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で充分洗浄した. 次にこの物を P₁ 溶液 (2mg protein/ml, pH 5.0) に再び懸濁させ, 20°C, 1時間攪拌した. 上澄を除いた後, 1M 食塩水 (pH 5.0) で5回, 0.1M 酢酸緩衝液で3回洗浄して固定化標品とした. 更に担体をカラムに充填し, P₁ 溶液を通液して固定化する方法も試みた. B) 活性測定. 担体を磨砕し適量の緩衝液に懸濁させ, RNA を基質として振盪させ 70°C, 30 分間反応後, ウラニル試薬可溶部の A₂₆₀ の増加より測定した. C) 連続分解反応. 固定化標品 10 ml をジヤケット付カラムに充填し 60°C で 1~3% RNA 溶液を通液した. D) 再生. 反応終了後 1N NaOH を流すと酵素蛋白質のみ溶出させることが出来, 担体はそのまゝ中和後, 再使用することが出来た.

3. 結果. 19,866.7U の P₁ の固定化を試みたところ, 各担体の活性固定化率は軽石 (42~48 mesh) 30.7%, 陶器片 (32~40 mesh) 18.3%, 同 (40~48 mesh) 23.8%, アスベスト 29.8%, キーゼルゲル 60 15.1% といずれも高い値を示したが, 石英砂 (40~48 mesh) では 0.1% と殆んど固定化されなかった. 軽石への蛋白質固定化率は 25.9% で, その時の比活性は Native が 9,830.6 $\mu\text{g protein}$ に対し 8,611.0 $\mu\text{g protein}$ と 87.6% の値を示した. 次に軽石固定化酵素の性質を調べたところ, 至適温度が 70° から 80° へとラフトし耐熱性の増加が若干認められたが, 至適 pH, Zn⁺⁺ 依存性などは Native と殆んど変らなかった. この固定化標品をカラムに充填し基質溶液を通液したところ 1% RNA の場合 SV13 迄完全分解し, SV30 でも 92% の分解率を示した. 3% RNA の場合でも SV4 迄完全分解, SV19.4 で 84% の分解率を示した. 1% RNA を基質とし 60°, SV4 で通液した時, 28日間に亘って完全分解可能であった. 更に最近得られた知見に際しても併せて報告する.

1) 藤島ら, 酵素工学会大会 (昭47), 2) 六川ら, 日農化大会 (昭51),

3) A.E. Emery, et al. Chem. Eng. 232 71 (1972).