九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

デキストラン化学修飾によるL-α-グリセロホスフェートオキシダーゼの安定化

松本, 清
食品管理学研究室

田中, 孝
九州大学農学部食品分析学教室

筬島, 豊
九州大学農学部食品分析学教室

https://doi.org/10.15017/23506

出版情報：九州大學農學部學藝雑誌. 48 (1/2), pp.35-40, 1993-12. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

九大農学芸誌 (Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.)
第48巻 第1・2号 35-40 (1993)

デキストラン化学修飾によるL-α-グリセロホスフェートオキシダーゼの安定化

松本 清*・田中 孝・筬島 豊
九州大学農学部食品分析学教室

(1993年7月30日受理)

Stabilization of L-α-Glycerophosphate Oxidase by Chemical Modification with Dextran

Kiyoshi MATSUMOTO, Takashi TANAKA and Yutaka OSAJIMA
Laboratory of Food Analysis, Faculty of Agriculture, Kyushu University 46-09, Fukuoka 812

緒言

酵素は温和な条件で触媒作用を示し，優れた反応選択性を有することから，食品及び化学工業でのバイオリアクターをはじめ，分析，医療など多方面に渡って利用されている．しかしながら，酵素は安定性に欠けるという致命的な欠陥を有するため，その利用には自ずと限界がある．したがって，酵素の安定化がより広範な利用への鍵を握っていると思われる．酵素の安定化を図る手段としては，大きく分けて二つの方法が考えられる．一つは，まず好熱性微生物の検索を行い，次に遺伝子操作などによる耐熱性遺伝子の発現などを行う生物学的手段であり，もう一つは，化学的手段によって，酵素蛋白質を修飾しその安定性の向上を追求していく方法である（大島ら，1976）．生物学的手段による耐熱性酵素の開発例はすでにいくつか報告されているが，その数は現在のところ使用されている酵素数に対して少数に限られている．したがって，化学的手段による酵素の安定化が相補的手段として開発される必要がある．L-α-グリセロホスフェートオキシダーゼ（Jacobs and VanDemark, 1960 ; Kodi-tschek and Umbreit, 1969）はトリグリセリドキットなど臨床用酵素試薬として広く応用されている．この酵素の安定性を現状より高めることは酵素試薬の生産，流通段階でのコストダウンにつながり，そのメリットは大きいものと考えられる．そこで，本酵素の化学修飾による安定化を試みた．

一般に，熱安定性と長期安定性はパラレルな関係にあるといわれている．また，これまでに熱による酵素の失活は，酵素コンホーメーションにおけるアンホールディングによって起こることが知られている（Klivanov, 1979, 1983）．一方，ポリオールの添加による蛋白質の安定化効果は，遊離酵素系に関して多くの興味ある知見を与えている（月向，1985）．そこで，酵素分子表面にポリオール構造を導入すると同時に分子内架橋を施すことにより酵素の安定化が期待される．本研究ではポリオール構造を有する高分子としてデキストランを用い，酵素－デキストラン複合体（Lenders *et al.*, 1985）を調製し，その特性を評価した．

材料及び方法

試薬：L-α-グリセロホスフェートオキシダーゼ（GPO, EC 1. 1. 3. 21, *Aerococcus viridans* 由来）東洋醸造（現旭化成工業）製を用いた．デキストランはSigma社製（Dextran T70），水素化シアノホウ素ナトリウムはナカライテスク社製を用いた．その他の試薬は特級試薬をそのまま用いた．

装置：分光光度計は島津製作所製UV-300，恒温槽はColora社のCryothermostat EK 5型を使用した．

活性測定法：4-アミノアンチピリン15.2mg，フェ

*食品管理学研究室，
Laboratory of Food Quality Control.

ノール（5%）0.2ml, DL-グリセロ-3-リン酸 1.95g, ペルオキシダーゼ（54U/mg）4.63mg を混合し，0.05%（W/V）トリトン X-100 を含む 40mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）を用いて 50ml に定容し，反応混合液を調製した．試験管に酵素溶液（L-α-グリセロホスフェートオキシダーゼ）を 0.02ml 取り，37°C の恒温槽中で 5 分間保ち平衡化した．別に 37°C で平衡化した反応混合液 1.0ml をこの試験管に加え，37°C で 10 分間反応させた．10 分後，0.25%ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウムを 2 ml 加え反応を停止させ，500nm における吸光度を測定した．

GPO-デキストラン-グリシン複合体の調製：デキストラン（T70）300mg を 6 ml の脱イオン水に溶解し，過ヨウ素酸ナトリウム 400mg を加え，室温で 75 分間穏やかに攪拌した．その後，脱イオン水中で 1 時間毎に脱イオン水を換え 4 回透析を行った．このようにして得られた活性化デキストラン溶液 1 ml と 0.2M リン酸塩緩衝液（pH 8.0）1 ml に GPO 2.5mg を溶解した酵素溶液を混合し，水素化シアノホウ素ナトリウム 16mg を添加し，5°C下で 16 時間反応させた．その後，未反応のアルデヒド基をブロックするために，グリシン溶液（250 mg/ml）を 0.7ml 加え，さらに 3 時間反応させた．その後，5°C下で 10 mM リン酸塩緩衝液（pH 8.0）中で透析を行った．なお，過ヨウ素酸ナトリウムの量は目的に合わせて 30～400mg まで変化させた．また，GPO-デキストラン-グリシン複合体を GPO-Dextran-Gly と表示した．

アルデヒド基の定量：活性化デキストランに導入されたアルデヒド基の定量は 3, 5-ジニトロサリチル酸法により行った．

熱安定性試験：調製修飾酵素標品（GPO-Dextran-Gly）をそれぞれ一定量試験管に取り，50°C の恒温槽中で一定時間加熱処理した後，氷冷した．その後，37°C で平衡化して活性を測定した．なお，修飾後の残存活性が異なるため，熱安定性試験では酵素溶液のユニット数を約 0.5U/ml に統一して行った．

結果及び考察

1．活性化デキストラン調製における酸化剤量の検討

酸化剤である過ヨウ素酸ナトリウムの量を変化させ種々の活性化デキストランを調製し，活性化デキストランに導入されたアルデヒド基を測定すると共に，酵素との反応によって調製された複合体（GPO-Dextran-Gly）の残存活性及び熱安定性を測定し Table 1 に示した．なお，修飾後の残存活性は修飾前の GPO の活性を 100%として相対値で表示し，熱処理後の残存活性は未処理の複合体，すなわち，修飾後熱処理で行っていない標品の活性を 100%として相対値で表示した．過ヨウ素酸ナトリウムの量が，30mg から 400mg へと増加するにつれて活性化デキストランに導入されるアルデヒド基は増加した．また，導入されたアルデヒド基が多いほど，修飾後の残存活性は低下するものの，熱安定性は増加する傾向が認められた．すなわち，熱安定性と修飾後の残存活性は相反する傾向にあり，優れた熱安定性を有し，かつ高い修飾後の残存活性を維持するためには，修飾段階での活性低下を防止する必要があると思われた．

Table 1. Relationship between amount of added $NaIO_4$ and thermostability of GPO-Dextran-Gly (50°C).

$NaIO_4$ (mg)	Molecular ratio $NaIO_4$/glucose unit	Aldehyde group (Maltose mg/ml)	Residual activity after modification (%)	Residual activity after heating at 50°C	
				30min (%)	60min (%)
Native	−	−	71.25	25.59	5.69
30	0.084	3.55	27.53	29.39	12.90
120	0.337	10.75	25.65	50.25	37.55
240	0.674	17.67	16.39	74.42	67.40
400	1.123	18.98	6.33	81.10	80.10

2．還元剤の検討

酵素と活性化デキストランとの反応はシッフ塩基を介して行われると考えられるので，修飾後の残存活性及び熱安定性に及ぼす還元剤の影響を調べた（Table 2）．修飾後の残存活性が低いものほど熱安定性は増加する傾向が認められた．還元剤無添加のものでは顕著な熱安定性は認められず，シッフ塩基の還元は熱安定性獲得には必須のものと思われた（German *et al.*, 1989）．水素化ホウ素ナトリウムは水素化シアノホウ素ナトリウムに比べ強い還元剤であるので，高濃度では，GPO の補欠分子族である FAD が還元され活性が失われた．また，水素化ホウ素ナトリウムはシッフ塩基だけを還元するのではなく，活性化デキストラン中のアルデヒド基まで還元してしまうため，修飾反応が水素化シアノホウ素ナトリウムの場合ほど進まず，顕著な熱安定性が認められないものと思われた（German *et al.*, 1989）．

Table 2. Effect of reducing agent on residual activity and thermostability of GPO-Dextran-Gly.

Reducing agent	Concentration of reducing agent (mM)	Residual activity after modification (%)	Residual activity after heating at 50°C	
			30 min (%)	60 min (%)
— — —	—	33.39	46.15	19.79
$NaBH_3CN$	127.3	7.38	80.39	71.74
$NaBH_4$	10.6	12.34	57.56	36.34

3．修飾段階での活性低下の防止

GPO は活性化デキストランと 16 時間反応することにより，反応段階でその活性が約 80%低下し，さらに，透析により約 10%低下することがわかった．そこで，修飾段階での活性低下を防止するため安定化剤の添加を検討した．

（1）修飾段階における FAD 添加効果

比較的優れた熱安定性を示した活性化条件である過ヨウ素酸ナトリウム量 240mg 及び 400mg を用いて活性化デキストランを調製し，GPO の補欠分子族であるフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）を反応段階で 10mM 添加して酵素との修飾反応を行った．Table 3 に示すように，過ヨウ素酸ナトリウム 240 mg, 400mg の何れにおいても，修飾後の残存活性を FAD 無添加のものに比べ，2.33 及び 3.15 倍高くすることができた．これは，FAD 添加による活性のわずかな増加に加え，GPO の補欠分子族である FAD が水素化シアノホウ素ナトリウムによる還元から保護されたためと考えられた．

（2）硫酸アンモニウム添加効果

透析段階での活性低下を防止するため 10%硫酸アンモニウム添加緩衝液中で透析を行った．Table 4 に示すように，過ヨウ素酸ナトリウムの量にかかわらず，修飾後の残存活性を硫酸アンモニウム無添加のものに比べ約 1.5～2 倍高くすることができた．さらに，遊離の GPO 及び GPO-Dextran-Gly に硫酸アンモニウムを添加し長期安定性を検討し，Fig. 1 に示した．Fig. 1 から明らかなように，両者とも 10%濃度で優

Table 3. Effect of addition of FAD on residual activity after modification.

$NaIO_4$ (mg)	Residual activity after modification		(B)／(A) (fold)
	0 mM FAD (A) (%)	10 mM FAD (B) (%)	
240	16.39	38.11	2.33
400	6.33	19.93	3.15
Native	71.25	71.85	1.01

Table 4. Effect of 10% $(NH_4)_2SO_4$ dialysis on dextran modification.

$NaIO_4$ (mg)	Residual activity after modification		(B)／(A) (fold)
	0% $(NH_4)_2SO_4$ dialysis (A) (%)	10% $(NH_4)_2SO_4$ dialysis (B) (%)	
30	27.53	55.60	2.02
120	25.65	45.66	1.78
240	16.39	24.91	1.52
400	6.33	11.53	1.82
Native	71.25	72.81	1.02

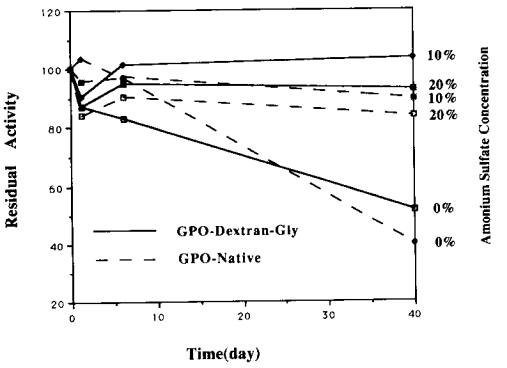


Fig. 1. Effect of addition of ammonium sulfate on long-term stability of modified GPO.

れた長期安定性を示した．これは，調製段階における透析中に酵素標品中に含まれていた安定化剤がはずれ，不安定化したものに，添加された硫酸アンモニウムが安定化剤として作用したものと思われる．また，同じ10%濃度においては修飾酵素の約50日後の残存活性は遊離酵素が約90%であるのに対し，修飾酵素は約100%とその差はあまり大きくないものの，修飾による安定化効果が認められる．より苛酷な条件である熱安定性試験では，両者の間に顕著な差が認められたことから，さらに長期的にみると熱安定性と同様に顕著な差が認められると思われる．

4．修飾酵素の評価

反応段階で10mMFADを添加したものについて，硫酸アンモニウム無添加と10%添加した緩衝液中で透析した修飾酵素の評価を熱安定性と修飾後の残存活性の二つの因子により行った．Table 5において，修飾後の残存活性をA，50°C，60分加熱処理後の残存活性をBとすると，(A×B) は修飾前のGPO活性100%から換算した総合的な残存活性を示しているといえる．この値を比較すると，過ヨウ素酸ナトリウム240mg-10%硫酸アンモニウム添加緩衝液透析で得られた修飾酵素は，遊離の9.57に対し37.31と最も優れていた．さらに，FAD添加及び硫酸アンモニウム添加透析の残存活性及び熱安定性に及ぼす影響をFig. 2にまとめて示した．修飾後の残存活性は，a (10F10A, FAD添加－硫酸アンモニウム添加)，b (10F0A, FAD添加－硫酸アンモニウム無添加)，c (0F10A, FAD無添加－硫酸アンモニウム添加)，d (0F0A, FAD無添加－硫酸アンモニウム無添加) の順で低くなった．熱安定性は，FAD添加または無添加の何れにおいても，すなわち，aとbまたはcとdの比較において，修飾後の残存活性が低いほどわずかに優れていた．これは，修飾後の残存活性が低いほど修飾反応が進み熱安定性が獲得されたものと思われた．一方，硫酸アンモニウム添加または無添加の何れにおいても，すなわち，aとcまたはbとdの比較において，FADを添加した方が修飾後の残存活性が高く，熱安定性も優れていた．これは，修飾効果とともに，FADが保護作用を示し，修飾後の残存活性が高くなり酵素が安定化されたものと思われた．

5．修飾酵素の特性とL-α-グリセロホスフェート定量への適用

Table 6に修飾酵素の特性を示した．至適pHは9.8，至適温度は40°Cであり，修飾による変化はほとんど認められなかった．一方，Km値は24.1となり，修飾により基質との親和性がやや低下した．

修飾酵素を凍結乾燥し，L-α-グリセロホスフェートの定量に適用した．Fig. 3に見られるように，濃度と吸光度の間には良好な直線性が認められ，修飾酵素の実用段階での問題はなかった．

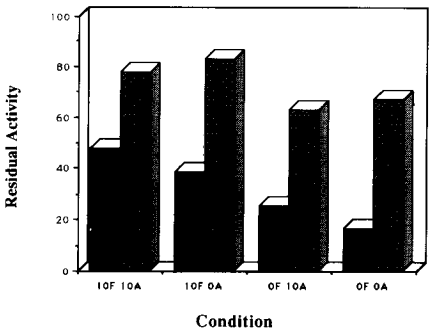
要　　約

Table 5. Effect of $NaIO_4$ on residual activity after modification and thermostability of GPO-Dextran-Gly (50°C).

NaIO4 (mg)	Concentration of $(NH_4)_2SO_4$ (%)	Residual activity after modification : A (%)	Residual activity after heating at 50°C		A×B (%)
			30 min (%)	60 min : B (%)	
400	0	19.93	98.49	97.44	19.42
400	10	26.15	91.31	88.70	23.20
240	0	38.11	91.66	84.27	32.12
240	10	47.68	88.69	78.26	37.31
Native	0	71.84	38.73	11.72	8.42
Native	10	69.57	33.94	13.76	9.57

Table 6. Characteristics of GPO-Dextran-Gly.

	pH Optimum	Temp. Optimum	Km value (mM)
GPO-Dextran-Gly	9.8	40	24.1
GPO-Native	10.0	37	4.1



Solid bar : Residual activity after modification (%)
Hatched bar : Residual activity after heating at 50°C, 60 min.(%)

10F 10A : 10 mM FAD ; 10% ammonium sulfate dialysis
10F 0A : 10 mM FAD ; 0% ammonium sulfate dialysis
0F 10 A : 0 mM FAD ; 10% ammonium sulfate dialysis
0F 0A : 0 mM FAD ; 0% ammonium sulfate dialysis

Fig. 2. Effect of addition of Fad and ammonium sulfate dialysis on residual activity after modification and thermostability of modified GPO.

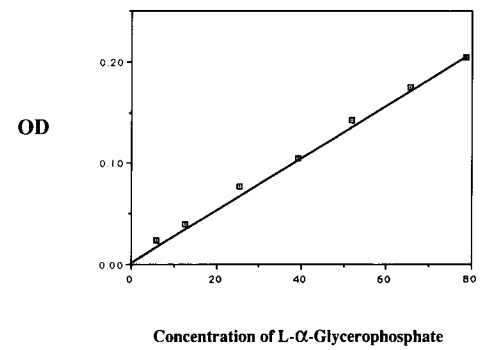


Fig. 3. Determination of L-α-Glycerophosphate (μM) by modified GPO.

L-α-グリセロホスフェートオキシダーゼ (GPO) は，トリグリセリドキットなど臨床酵素試薬として広く応用されている．この酵素の安定性を現状より高めることは，酵素試薬生産，流通段階でのコストダウンにつながり，そのメリットは大きい．そこで，デキストラン化学修飾による安定化を試み，修飾酵素の安定性を熱安定性を指標として評価した．過ヨウ素酸ナトリウム ($NaIO_4$) で活性化し，アルデヒド基を導入したデキストランを調製した．これを酵素上のアミノ基とシッフ塩基を介して架橋させた後，水素化シアノホ

ウ素ナトリウムによる還元を行った．さらに，未反応のアルデヒド基をグリシンでブロックし，緩衝液中で透析を行った．得られた修飾酵素（GPO-Dextran-Gly）は，50°C，60分加熱処理に対し，未修飾酵素（GPO-Native）と比較して，高い熱安定性を示し，長期安定性においても優れていた．しかしながら，修飾後の残存活性が低いという問題があった．そこで，より優れたGPO-Dextran-Glyを得るために，反応の各段階について詳細に検討した．デキストラン活性化時の$NaIO_4$の量を変え修飾を行ったところ，導入されたアルデヒド基量が多いほど，修飾後の残存活性は低下するものの，熱安定性は増加する傾向が認められた．修飾段階での活性低下を防止するため補酵素FADを10mM添加することにより，また，10%硫酸アンモニウム緩衝液中で透析を行うことにより，修飾後の残存活性をそれぞれ1.5～3倍，1.5～2倍高くすることができた．10mM FAD添加，10%硫酸アンモニウム透析したGPO-Dextran-Glyは，修飾後の残存活性が47.7%（A），50°C，60分加熱処理後の残存活性78.3%（B）となり，修飾前のGPO活性100%から換算した総合的な残存活性（A×B）は，GPO-Nativeで9.6%であるのに対し，37.3%と優れていた．GPO-Dextran-Glyの凍結乾燥品は，その優れた熱安定性を保持し，実際に，L-α-グリセロホスフェートの定量に使用可能であった．

文　献

月向邦彦　1985　蛋白質は糖やポリオールの存在下でなぜ安定か．蛋白質・核酸・酵素，**30**: 1115-1126.

German, p., T. Slagmolen, R. R. Crichton　1989　Relation Between Stabilization and Rigidification of the Three-Dimensional Structure of an Enzyme. Biotechnol. Bioeng., **33**: 563-569.

Jacobs, N. J. and P. J. VanDemark　1960　The Purification and Properties of the α-Glycerophosphate-Oxidizing Enzyme of *Streptococcus foecalis* 10C1. Arch. Biochem. Biophys., **88**: 250-255.

Klivanov, A. H.　1979　Enzyme Stabilization by Immobilization. Anal. Biochem., **93**: 1-25.

Klivanov, A. H.　1983　Stabilizaton of Enzymes against Thermal Inactivation. Adv. Appl. Microbiol., **29**: 1-28.

Kocitschek, L. K. and W. W. Umbreit　1969　α-Glycerophosphate oxidase in *Streptococcus faecium* F24. J. Bacteriol. **98**: 1063-1068.

Lenders, J. P, P. German and R. R. Crichton　1985　Immobilization of a Soluble Chemically Thermostabilized Enzyme. Biotechnol. Bioeng., **27**: 572-578.

大島泰郎・藤田　忍・今掘和友　1976　酵素の安定性と安定化．今掘和友・成田耕造・徳重正信編：現代の酵素化学（化学増刊　65）．化学同人，京都

Summary

Thermostabilization of L-α-glycerophosphate oxidase (GPO) by chemical modification with oxidized dextran was performed. The enzyme was coupled with oxidized dextran produced by periodate oxidation, followed by reduction with sodium cyanoborohydride and glycine blocking. The modified enzyme (GPO-Dextran-Gly) thus obtained showed high resistivity against heat treatment compared with that of native GPO, though the residual activity after chemical modification was relatively low. In order to get modified enzymes with higher residual activity after modification, the repression of inactivation of GPO during the coupling reaction and the dialysis procedure was investigated. The addition of 10 mM flavine adenine dinucleotide (FAD) could repress the inactivation during the coupling reaction. Furthermore, dialysis of the coupled enzyme against a buffer solution containing 10% ammonium sulfate reduced inactivation during the dialysis procedure. After native GPO was heated at 50°C for 60 min in an incubator, the activity of GPO was reduced to 9.6% from the original (native 100%). On the other hand, the chemical modification with oxidized dextran itself reduced the GPO activity to 47.7% (A) from the original (native 100%). The modified enzyme (GPO-Dextran-Gly), however, acquired heat resistivity, and remamined its activity up to 78.3% (B) under the same heat treatment. Thus, the overall residual activity converted from the original activity (A×B) was calculated as 37.3%. The GPO-Dxtran-Gly was applied to the determination of L-α-glycerophosphate with a good applicability.