

カレイのうま味成分（イノシン酸）を分解する酵素（IMPase）の単離・同定

生物科学科 准教授

大島 朗伸

研究成果の概要

昨年度の研究結果から、カレイの筋肉に存在する IMPase は、膜画分に結合している事が予想されていた。そこで本年度は、1% TritonX-100 を用いて膜画分からの IMPase 可溶化実験を試みた。膜を可溶化し、遊離されるタンパク質を更なる精製に用いるためには、大量の膜標品が必要となる。これまでは 5 mL 程度のカレイの筋肉のホモゲナイズ試料を用いて実験を行ってきたが、今回は 5 倍容の 25 mL のムシガレイ筋肉のホモゲナイズ標品を用いて実験を開始し、精製の各段階で得られた試料を SDS 電気泳動で分析した。

- 右図の 6 番レーンが可溶化後の試料とその試料中に含まれるタンパク質の分子量を示している。タイ、タラ、メバル、酵母の IMPase の SDS-PAGE での分子量は、それぞれ 89 kDa, 67 kDa, 94 kDa, 55.4 kDa と報告されていることから、63kDa 付近に確認出来るタンパク質が IMPase に該当すると予想した。

続いて、カレイの筋肉の膜画分を TritonX-100 で可溶化した標品中に含まれる IMPase の分離を、ConA-Sepharose 4B カラムを用いて試みた。まず膜を超遠心分離機で単離した際の上清を用いて IMPase 活性を測定したところ、意外にも上清中に IMPase 活性が観察された。膜から自然に外れてきた IMPase タンパク質が混入したものであることが示唆された。この上清画分①、膜を可溶化した上清画分②及び、②を ConA-Sepharose 4B カラムで分画し、IMPase 活性を示した画分③をそれぞれ SDS-PAGE で分析した。

- 右図の①、②、③番レーンは、それぞれ上述の①、②、③に対応する。63kDa 付近にタンパク質のバンドが観察されると予想したが、ConA-Sepharose 4B カラムで分画後に活性を示した画分には 30kDa 付近と 16kDa 付近にバンドが観察された。

また、TritonX-100 で膜画分を可溶化した試料を ConA-Sepharose 4B カラムで分画すると、活性画分は観察されたが、280 nm の吸光度ではタンパク質の溶出位置を確認することは出来なかった。これは、可溶化された IMPase タンパク質量が極めて低かったためと考えられた。このため、続いて予定していた AMP-Sepharose 4B を用いたアフィニティークロマトグラフィーでの精製へと進めることは出来なかった。

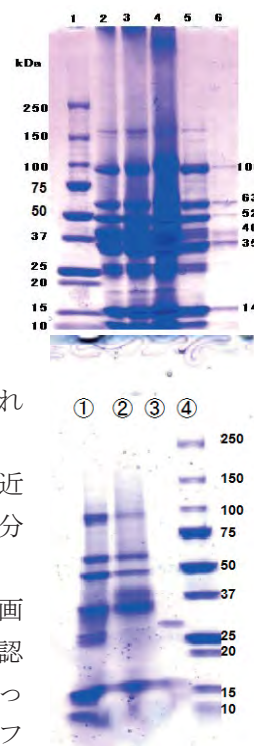
今後は、試料中の IMPase の回収率を高めるため、ホモゲナイズされた試料を 1% Triton X-100 で直接処理した後、硫酸分画を行った試料を ConA-Sepharose 4B カラムで分画する手法を用いることにより、IMPase の回収率を上げ、最終的に AMP-Sepharose 4B による精製まで繋げたいと考えている。予備実験では、従前の方法より、ConA-Sepharose 4B カラムで分画する際のタンパク質量として 2 倍以上の収量が得られている。さらに、ConA-Sepharose 4B カラムからの溶出条件についても、先行研究で用いられている $MnCl_2$, $CaCl_2$ を含む緩衝液から、これらの陽イオンを含まない緩衝液に変更し、ConA-Sepharose 4B と IMPase との親和性を低下させることで、より容易に吸着された IMPase を溶出できるのではないかと考えている。

社会への貢献・その他

浜田高等学校との高大連携実習の実習テーマの一つとして、島根県水産技術センターより提供を受けたノドクロとキアンコウの試料を用いて IMPase 活性の測定実験を行った。（2015 年 7 月 14～16 日）

学会発表

- 種々のカレイのイノシン酸分解酵素活性について、小酒由佳、佐々木秀明、大島朗伸 中国四国地区生物系三学会合同大会（愛媛）（2015 年 5 月）
- 魚種の違いによるイノシン酸分解酵素活性について、小酒由佳、佐々木秀明、大島朗伸 第 52 回好塩微生物研究会（神戸）（2015 年 12 月）



a
植物資源

b
動物資源

c
微生物資源