

## 酵母からのミクロソームの迅速な調製法

青木 央 宮崎俊一 澤谷拓治

### Rapid Preparation Techniques of Microsomes from Yeast

Hiroshi Aoki, Syun-ichi Miyazaki and Takuji Sawaya

#### 要 旨

ミクロソームを可能なかぎり短時間で調製することは、膜結合性タンパク質の酵素学的な研究や酵素の工業利用を考える上で重要である。そこで遺伝子組換え技術によってチトクロームP-450を生産する酵母から実用レベルでのミクロソームを迅速に精製する方法を他の方法と比較して紹介する。

ミクロソーム<sup>1)</sup>は細胞中での小胞体からなり、酵母のミクロソームの主成分はタンパク質生成の場として働くりボソームである。本技術ノートでは遺伝子組換え技術によってチトクロームP-450 dの酵素を生産する酵母A H22株<sup>2)</sup>から活性を有するミクロソーム画分を得るための、従来法と比較して能率の良い方法を紹介する。ミクロソームの調整作業は試料である細胞から破碎、ホモジェナイズ、分画精製からなる。一般的に酵母を破碎した懸濁液をつくるには、酵素(1-3βグルカナーゼとマンナーゼを主成分としたザイモリエイス20Tや100T)を用いて細胞壁を消化した後、浸透圧ショックと超音波処理によって破碎懸濁液を得る方法と、酵素を一切用いないでガラスビーズを用いて機械的に磨砕する2つの方法がある。そして、酵母の破碎懸濁液からミクロソームを分画する方法としては超遠心分離機を用いて遠沈させる方法とショ糖密度勾配遠心を行う方法とがある。したがって、ミクロソームを得る方法としては4通りの組み合わせを選択できる。現在、酵母からのミクロソーム調整法としては酵素を用いた後、遠沈でミクロソームを得ている例が多い。以下、実施例を紹介する。

#### 酵母破碎懸濁液の調製法の実施例

- a) 酵素による方法：集菌した酵母をミクロソーム調製液A(10mM Tris·HCl(pH7.5), 0.65M Sorbitol, (0.1mM DTT, 0.1mM EDTA))に懸濁し、ザイモリエイス20T(生化学工業(株), 東京)を1mg/mlとなるように加え30℃で約1~2時間ゆっくり振とうする。その後、遠心機を用いて集菌した後、調製液B(10mM Tris·HCl(pH7.5) 2M Sorbitol, (0.1mM DTT, 0.1mM EDTA))で菌体を洗ってザイモリエイスを除去してから、再び調製液Aに懸濁する。同様の操作を再度繰り返して菌体を洗浄後、氷水で冷却しつつ間欠的に超音波処理をして酵母を破碎し、10000×gで10分間遠心して上清を破碎懸濁液とする。
- b) ガラスビーズ破碎による方法：集菌した酵母を緩衝液(0.1M NaHCO<sub>3</sub>(pH8.3), 0.5M NaCl)に懸濁して30mlとした液を冷却した専用の50mlボトルに移し、ガラスビーズ(0.45-0.5mm φ)を加えてボトルを満たす。偏心回転型破碎機(B. Braun homogenizer(MSK))にセットして1分間破碎したら氷水につけて冷却し、再び1分間破碎する。懸濁液をガラスろ過器で吸引ろ過してビーズを除き10000×gで10~20分間遠心をして上清に酵母の破碎懸濁液を得る。

酵母ミクロソームの分画法の実施例

a)遠沈法による分画：酵母の破碎液を前述のようにあらかじめ10000×gで20分間予備遠心して得られた上清を105000×gか、または125000×gで60～90分間超遠心して出来たペレットをミクロソーム画分とし、緩衝液に懸濁してミクロソームとする。

b) ショ糖密度勾配による分画：Cs<sup>+</sup>を用いた分画法 (Bergstrand & Dallner法) は小胞体の荷電を消すことで凝集を高め、沈降速度が促進される効果を遠心分画法に応用した方法である。原法では5 mM Tris・HCl(pH8.0), 15mM CsClのショ糖液を用いるが、CNBr-担体とタンパク質とのカップリングを試みている関係から緩衝液の組成を変更してミクロソームの分画をした。1.3Mショ糖液 (0.1M NaHCO<sub>3</sub> (pH8.3), 0.5M NaCl)と0.6Mショ糖液(0.1M NaHCO<sub>3</sub> (pH8.3), 0.5M NaCl) でステップ密度勾配をつくり、さらに破碎懸濁液を重層する。すぐに100000×g (Beckman 55.2Ti, 48800rpm), 90分間遠心を行う。0.6Mと1.3Mのショ糖液の界面には滑面ミクロソームのバンドが現れる。また粗面ミクロソームは沈澱する。<sup>3)</sup>

チトクローム P-450 d の発現酵母の培養液 6 l か集菌後、ガラスビーズとショ糖密度勾配法を併用すると従来の酵素と遠沈法を組み合わせた方法に比べて作業時間が約130分～190分節約され、約4時間で終了した。作業時間が短縮された主な理由は酵素を作用させる時間と懸濁—遠沈—懸濁による試料の洗浄操作が減ることである。そして、チトクローム P-450dの基質となる7-エトキシマリン (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, USA) に対する活性を調べた結果、表のようになり、滑面ミクロソーム画分に活性が認められた。

ミクロソーム画分の性質と  
エトキシマリンに対する水酸化活性

ショ糖密度	性質	色調	全蛋白質量 mg/ml	活性 <sup>1)</sup> nmol/ml/nmolP450
0.6M	?	淡黄	23-30	n.d
0.6/1.3M	滑面ミクロソーム	やや赤い	6-16	0.4-0.6
1.3M	粗面ミクロソーム	白濁	16-31	0.04以下

注1) エトキシマリンに対する水酸化活性の測定条件  
0.5mM 7-エトキシマリン, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM Potassium Phosphate Buffer(pH7.4), 0.5mM NADPH, 室温

以上をまとめると、ガラスビーズとショ糖密度勾配法の組み合わせは極めて時間効率がよく、高価な酵素を使用しないので経済的であり、しかも、作業工程中の緩衝液を比較的自由に選択できるというメリットがある優れた方法であると考えられる。

謝 辞

チトクローム P-450 d の発現酵母 A H 22株を提供していただきました東北大学反応化学研究所の清水透助教授に感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 毛利秀雄, 香川靖雄編: 実験生物学講座, 第6巻細胞分画法, 東京, 丸善, 52 (1984)
- 2) Shimizu, T., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y., Takahashi, M., Ogoma, Y. & Hatano, M.: FEBS Lett., 207 (2), 217 (1986)
- 3) Rickwood, D: Centrifugation(2nd) in A Practical Approach, Oxford and Washington DC, IRL press, 171 (1987)