

N-30

## カイコガ *bombyx mori* からのセリンラセマーゼ及び D-セリン脱水酵素の精製 Purification of serine racemase and D-serine dehydratase from the silkworm, *bombyx mori*

○相馬宏樹<sup>1</sup>, 隅田克己<sup>2</sup>, 吉谷康太<sup>2</sup>, 谷川実<sup>3</sup>, 西村克史<sup>3,4</sup>○Hiroki Soma<sup>1</sup>, Katsuki Sumida<sup>2</sup>, Kouta Yositani, Minoru Tanigawa<sup>4</sup>, Katsushi Nishimura<sup>3,4</sup>

Abstract: Silkworms contain high concentration of D-serine, an optical isomer of L-serine, and two enzymes for D-serine metabolism, serine racemase and D-serine dehydratase. We previously reported that the total amount of D-serine and activities of the two enzymes increased with age and formed peaks in spinning and pupal stages. To elucidate the physiological role of D-serine, we tried to purify serine racemase by ammonium-sulfate precipitation, hydrophobic interaction chromatography, and ion-exchange chromatography. The organs with serine racemase activity, in order of their abundance, fat body, ovary, gastrointestinal tract, and testis. An electrophoresis analysis of purified sample indicated that this purification procedure was not effective. The optimum pH of D-serine dehydratase was pH 8.4, and pyridoxal 5'-phosphate had no effect on the activity.

### 1. 目的

カイコガの体内には、高濃度の D-セリンが存在していることが確認されている。我々は、吐糸期から蛹期に D-セリン濃度や D-セリン脱水酵素とセリンラセマーゼの活性が最も高くなることを明らかにしてきた (Fig. 1)。しかし、カイコガにおける D-セリンや両酵素の役割はいまだ不明のままである。カイコガにおけるこれらの酵素の生理機能を明らかにするためには、構造や性質・機能を明らかにした上で、体内の局在性や発現レベルの変化等を詳細に調べる必要がある。本研究では、セリンラセマーゼと D-セリン脱水酵素の構造と性質を調べることを目的として、両酵素の精製を試みた。

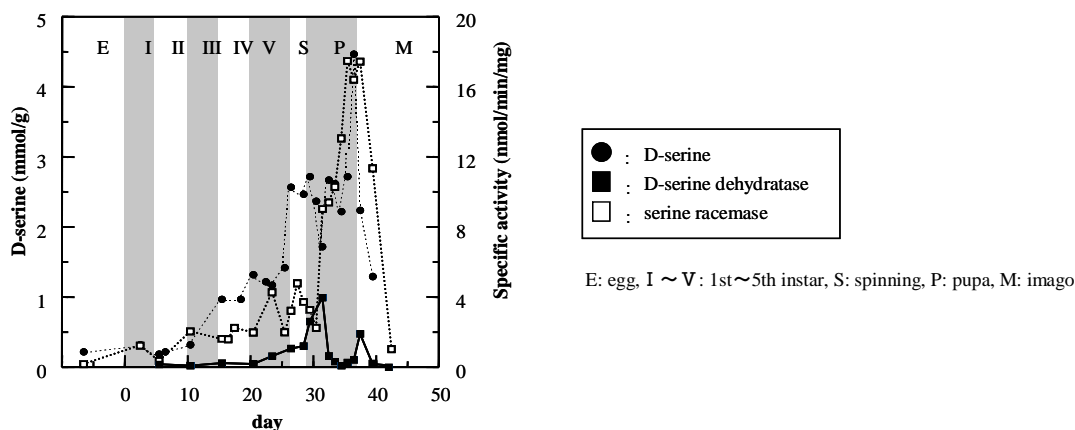


Fig. 1. Changes in D-serine concentration and serine racemase and D-serine dehydratase activities

### 2. 方法

桑の葉を用いて飼育したカイコガ (N4 株, 春麗鐘月株) の 5 日目の蛹を用いた。解剖バサミを用いて各器官を摘出した後、器官を電動ホモジナイザーを用いて破碎し、破碎液を遠心分離し、上清を無細胞抽出液として用いた。硫酸アンモニウムによる塩析と疎水性カラムクロマトグラフィーと陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて無細胞抽出液よりセリンラセマーゼを精製し、得られたセリンラセマーゼをポリアクリルアミド電気泳動に供し、精製度検定を行った。また、無細胞抽出液を用いて D-セリン脱水酵素の pH 依存性と安定性を調べた。タンパク質の定量には、Bradford 法を用いた。D-セリン脱水酵素の測定には hydrazine 法を用い、セリンラセマーゼの活性測定には D-セリン脱水酵素法を用いた。

1 : 日大理工・院・応化 2 : 日大理工・学部・応化 3 : 日大理工・教員・応化 4 : 日大短大・教員・応化

### 3. 結果と考察

#### 3-1 セリンラセマーゼ

陰イオン交換カラムクロマトグラフィー後における、セリンラセマーゼの全活性は、脂肪体、卵巣、消化管、精巣という順に高かった。各器官より精製したセリンラセマーゼのポリアクリルアミド電気泳動による精製度検定を行ったところ、どの試料にも数本のタンパク質バンドが見られ、均一に精製されていないことが分かった。また、どのタンパク質バンドがセリンラセマーゼのものであるかを特定することができなかったため、分子質量を算出することはできなかった。今後は、本酵素の安定化と精製方法を種々検討・最適化し、均一な試料を得て、構造と性質を調べる予定である。

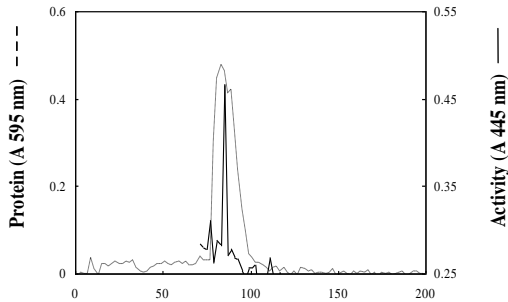


Fig. 2. Ion exchange chromatogram with DEAE Toyopearl (fat body)

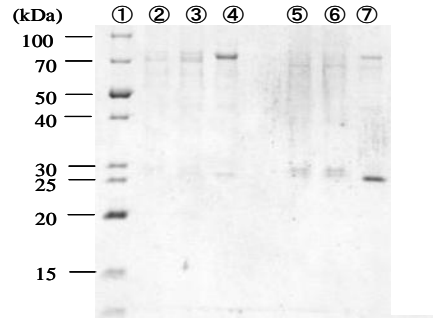


Fig. 3. Electrophoresis (fat body and ovary)

- ①: Marker
- ②: Cell free extract (fat body)
- ③: Ammonium sulfate precipitation (25-60 % , fat body)
- ④: DEAE Toyopearl (fat body)
- ⑤: Cell free extract (ovary)
- ⑥: Ammonium sulfate precipitation (25-60 % , ovary)
- ⑦: DEAE Toyopearl (ovary)

#### 3-2 D-セリン脱水酵素

D-セリン脱水酵素活性を最も高く示す器官は精巣であった。精巣の無細胞抽出液を用いて、pH 依存性と保存時の温度を検討した結果、最適 pH は 8.4 であり (Fig. 3), 保存温度は  $-20^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$  が適切であること (Table 1) が分かった。また、補酵素ピリドキサル 5'-リン酸の有無による活性の変化はほとんどないこと、長時間の透析により失活することが示された。今後の課題は、D-セリン脱水酵素の精製を進めて、その構造や性質を検討することである。

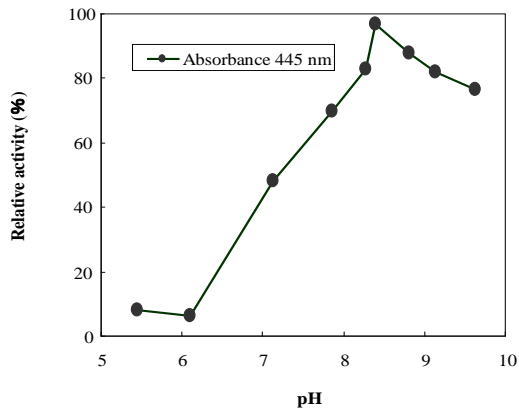


Fig. 3. Optimum pH of D-serine dehydratase

Table.1 Storage temperature of D-serine dehydratase

	Specific activity (nmol/min/mg)	Relative activity (%)
before storage	0.20	100
4 °C	0.02	10
-20 °C	0.12	60
-80 °C	0.12	60