速 報

高速液体クロマトグラフィーによる 天然水中の溶存金属酵素アルカリホ スファターゼの同定

原口紘彦^①, 渡辺正海, 小林憲正,
松井正宏, 岩瀬公一, 藤原祺多夫,
不破敬一郎*

(1980 年 4 月 8 日受理)

近年, 自然環境における微量重金属の分布, 循環, 存在状態などの挙動に関心が持たれている。河川水, 湖沼水, 海水など天然水中の重金属に関しても, 地球化学, 環境科学, 生態学的な観点から多くの分析結果が報告されている。このような多くの研究例にもかかわらず, 天然水中の重金属の溶存状態に関する研究は少なく, 現在でも明確に議論することは難しい状況である。

一方, 生物体中の微量金属の生化学的研究の進歩により, 金属酵素の存在が見いだされ, 酵素化学的, 生物無機化学的研究から生体内の作用機構も明らかにされている。金属酵素は活性中心に数個の金属イオンを保持し, 特異的, 選択的かつ高い酵素活性を示す。なかでも, 亜鉛含有酵素は種類も多く, 生体中に広く分布しており, その働き的重要性が認められている²⁾。最近では, 特異的かつ選択的な高い酵素活性を利用する金属酵素の分析化学への応用も進められている³⁾。

本研究では, このような金属酵素の天然水中の存在を, 高速液体クロマトグラフィーを利用して同定することを目的とした。天然水中の溶存金属酵素の存在は, 天然水中の微量金属元素の存在状態, 生物活動, 物質代謝などとの関連で興味深いものである。

天然水試料としては, 不忍池(東京都)及び霞ヶ浦(茨城県)より採取した陸水を用いた。採取した試料は, 0.45 μm のミリポアフィルターを使ってろ過した後, 限外ろ過によって (500~1000) 倍に濃縮した。濃縮試料中のアルカリホスファターゼの酵素活性を調べるために, 基質として *p*-ニトロフェニルリン酸塩 (*p*-NPP) を使

う次の式 (1) の酵素反応によって生成する *p*-ニトロフェノールの 410 nm における吸光度の時間変化 (dA/dt) を測定した⁴⁾。

試料濃縮にはアミコン社製限外ろ過装置を限外ろ過膜 UM-10 とともに用いた。このろ過膜によって分子量 10000 以上の分画が濃縮される。酵素活性測定のための吸光度測定には, 島津 UV-210A 分光光度計(温度コントローラー付き)を用いた。高速液体クロマトグラム測定には, 島津 LC-3A 高速液体クロマトグラフ装置(検出器: SPD-2A UV 分光光度計)を使用した。分離カラムには水系のポーラスゲルを詰めたカラム W-71 (7.9 mm ϕ $\times$ 50 cm) を用い, 溶離液にはリン酸二水素カリウム-水酸化カリウム (2 g/l) の緩衝液 (pH 7.3) を 1.0 ml/min で流した。溶出液中の亜鉛濃度の測定には, 米国 Jarrell-Ash 社誘導結合アルゴンプラズマ発光分析装置 (Model 975 Plasma Atom Comp) を用いた。

1000 倍濃縮した試料の式 (1) に関するリン酸エステル加水分解酵素活性は, 基質 *p*-NPP {1 mM/0.6 M トリス-塩酸 (pH 8.0)} 2 ml に試料 0.5 ml を添加した場合, 25°C において $dA/dt = 0.02 \text{ min}^{-1}$ の大きさで測定された。更に, 限外ろ過前に EDTA を添加するか, 濃縮後 EDTA を加えるアポ化操作を行うと, 酵素活性は失活した。このアポ化試料に亜鉛を添加する(ホロ化)と, 酵素活性は回復した。以上の実験によって, 湖水中にアルカリホスファターゼの存在が推定された。

Fig. 1 には, 濃縮試料の高速液体クロマトグラムを示す。Fig. 1, (A) は, 500 倍濃縮した試料 100 μl を注入した場合のクロマトグラムであり, 吸光度は 210 nm で測定したものである。Fig. 1, (B) は, Fig. 1, (A) のクロマトグラム中 (11.3~12.3) 分の間の溶出液フラクションを集めて, もう一度カラムを通したものである。この場合, 検出器の感度を約 256 倍に上げて吸光度を測定した。(8~15) 分の溶出液中に高分子物質に由来する吸収ピークが見られる。現在のカラムの溶出条件で *E. coli* アルカリホスファターゼ (Sigma 社製 P-4377) を流した場合, そのピークは溶出時間 12.2 分の位置に現れる。ゆえに, Fig. 1, (B) のクロマトグラム中, 矢印部分のピークが, アルカリホスファターゼによるものであると推定される。このことを更に確認するために, 500 倍濃縮試料 20 μl にアルカリホスファターゼ 20 μg を添加して測定したクロマトグラムを Fig. 1, (C) に示す。Fig. 1, (B) で推定された溶出ピークがアルカリ

* 東京大学理学部化学教室: 東京都文京区本郷 7-3-1

Fig. 1 Chromatograms of concd. lake water samples

Column: Shimadzu W-71 aq. porous gel; Carrier: 0.2% KH_2PO_4 -KOH buffer (pH 7.3); Flow rate: 1.0 ml/min; Pressure: 90 kg/cm²; (A) 500-fold concd. lake water sample of Kasumigaura: 100 μl ; (B) Fraction of (A) between 11.3 min and 12.3 min; (C) (20 μl of 500-fold concd. lake water sample of Kasumigaura)+(20 μl of 1.0 mg/ml alkaline phosphatase from *E. coli*.)

ホスファターゼによるものであることがこの溶出曲線から確定された。この外、各フラクション中の亜鉛含量、リン酸エステル加水分解の酵素活性なども調べたが、*E. coli* アルカリホスファターゼと同じ溶出位置に、酵素活性のピークが存在した。これらの実験結果から、今回採取した湖水中に、*E. coli* 起源とほぼ同一の分子量(約 80000)⁶⁾を持つ亜鉛含有アルカリホスファターゼの存在が明らかとなった。

アルカリホスファターゼは、人体中の小腸や血清、牛乳や大腸菌などに存在して、リンの代謝に関与する重要な金属酵素である⁹⁾。天然水中でもその存在は酵素活性の測定から推定され、リン代謝との関係が議論されてきた¹⁰⁻¹²⁾。しかしながら、天然水中の溶存金属酵素としてのアルカリホスファターゼを液体クロマトグラフィー手法によって確認したのは、本研究が初めてである。現在、更に陸水や海水などの天然水について詳細な研究を継続

中であるが、このような研究に高速液体クロマトグラフィーの応用は、極めて有用である。

本研究は文部省科学研究費特定研究 (2)「トレース・キャラクターゼーション」(課題番号: 421704) の援助を受けたものである。

文 献

- 1) T. M. Florence, G. E. Batley: *Talanta*, **24**, 151 (1977).
- 2) J. F. Chlebowski, J. E. Coleman: "Metal ions in biological system", Ed. by H. Sigel, Vol. 6, p. 1~140 (1976), (Dekker, New York).
- 3) K. Kobayashi, K. Fujiwara, H. Haraguchi, K. Fuwa: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52**, 1932 (1979).
- 4) A. Torriani: "Procedures in nucleic acid research", Ed. by G. L. Cantoni, D. R. Davis, p. 224 (1966), (Harper & Row, New York, London).
- 5) T. G. Spiro: "Inorganic Biochemistry", Ed. by G. L. Eichhorn, Vol. 1, p. 549~581 (1973), (Elsevier, Amsterdam).
- 6) W. Reichardt, J. Overbeck, L. Steubing: *Nature*, **216**, 1345 (1967).
- 7) T. Berman: *Limnol. Oceanogr.*, **5**, 663 (1970).
- 8) R. J. Stevens, M. P. Parr: *Freshwater Biol.*, **7**, 351 (1977).
- 9) S. Niewolak: *Rocz. Nauk. Roln., Ser. H*, **98**, 147 (1978).

☆

Identification of dissolved metalloenzyme (alkaline phosphatase) in natural water by high performance liquid chromatography. Hiroki HARAGUCHI, Masami WATANABE, Kensei KOBAYASHI, Masahiro MATSUI, Kimikazu IWASE, Kitao FUJIWARA and Keiichi FUWA (Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo)

Metalloenzyme (alkaline phosphatase) dissolved in lake water has been identified by means of high performance liquid chromatography (HPLC). Water samples were collected from Shinobazu-no-ike Pond (Tokyo) and Lake Kasumigaura (Ibaraki), and filtered with a 0.45 μm Millipore filter just after sampling. Filtered water was concentrated to (500~1000) fold by ultrafiltration, where ultrafiltration membrane (Amicon UM-10) which concentrated the components of molecular weight larger than 10000 was used. The enzymatic activity of alkaline phosphatase was measured using *p*-nitrophenyl phosphate as a substrate. Addition of EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) to the concentrated lake water did not show any enzymatic activity, while the enzymatic activity was recovered with addition of zinc ion. The HPLC chromatograms of the concentrated lake water were examined, where an aqueous porous gel column W-71 from Shimadzu Co. Ltd., was used for separation. According to the chromatograms, the effluent at 12.2 min was corresponding to alkaline phosphatase. The

final identification was made by adding *E. coli* alkaline phosphatase to the concentrated lake water and by measuring the liquid chromatogram. Zinc was also found in the fraction of the effluent between 11.3 and 12.3 min. More details of the experiments will be published in near future.

(Received Apr. 8, 1980)

Keywords

Alkaline phosphatase

Enzymatic activity

High performance liquid chromatography

Metalloenzyme

Zinc

☆

☆

☆

☆