

Purification of Leukotriene A₄ hydrolase using Tricorn Mono P and Mono Q Columns

Tricorn Mono PおよびMono QカラムによるロイコトリエンA₄加水分解酵素の精製

S. Clegg
Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden

ロイコトリエンの過剰生成は、関節炎、喘息、乾癬のような炎症性疾患に非常に深く関わっています。スウェーデンのカロリンスカ研究所 (Karolinska Institute) にて行われた実験から、ロイコトリエンA₄加水分解酵素が炎症性ロイコトリエン LTB₄の生成にどのように関わっているかを示す決定的な結果が得られました。この研究においては、構造／機能解析用の高純度のロイコトリエンA₄加水分解酵素を十分量確保することが不可欠でしたが、Mono QおよびMono Pカラムを使用することで高純度精製が可能になりました。

ロイコトリエンの歴史

ロイコトリエンの歴史は平滑筋細胞において痙攣を引き起こす物質が喘息患者の痰から発見された1930年代にさかのぼります。1960年には、感作動物の肺において放出、蓄積されることが示されたため、「過敏症の遅反応性物質」(SRS-A)と名付けられ、その19年後にはSRS-Aの構造が解明されました(1)。その後、ストックホルムのカロリンスカ研究所のBengt Samuelsson博士らの研究結果から、SRS-Aの生物活性がロイコトリエンと呼ばれる物質群に依存していることがわかりました。博士はこのアラキドン酸の代謝解明への貢献が認められ、2人の共同研究者とともに1982年のノーベル医学・生理学賞を受賞しています。

ロイコトリエンは喘息、大腸炎、皮膚炎、関節リウマチ、敗血症性腹膜炎、アテローム性動脈硬化症などのさまざまな炎症性疾患に関与しています。これらの分子は5-リポキシゲナーゼの作用によりアラキドン酸が酸化されて生成されます。システイン基をもつロイコトリエン(LTC₄、LTD₄、LTE₄)は血管収縮や気管支痙攣、血管漏損に関与しています(2、3)。ロイコトリエンLTB₄は典型的な化学誘因物質として作用し、内皮細胞への好中球の付着と凝集を促進して炎症反応を引き起こします。

炎症起因物質として作用することから、LTB₄の生成パスウェイの解明に注目が集まりました。アラキドン酸は2段階反応を経て5-リポキシゲナーゼによりLTA₄に変換されます。LTA₄はLTA₄脱水素酵素によりLTB₄に変換されます(3)(図1)。LTA₄加水分解酵素の構造は最近X線結晶学を利用して解明されました。特定の酵素阻害剤を合成できれば、新規の抗炎剤の開発につながる可能性があります。LTA₄加水分解酵素の構造および機能の解明には、高純度かつ活性を保った状態の酵素を十分量確保することが不可欠でした。

精製ストラテジー

カロリンスカ研究所のロイコトリエン研究グループの実験技師Eva Ohlson氏は、長年さまざまな原料からLTA₄加水分解酵素の精製を行ってきました。(His)₆-tag融合LTA₄加水分解酵素として大腸菌に発現させ、十分量の酵素を精製しました。

菌体を回収し、核酸を除去した後、金属イオン(Ni²⁺)アフィニティークロマトグラフィーによりタンパク質の初期精製を行いました。「初期精製後の純度は必ずしも十分とはいえません。X線結晶構造解析やカイネティクス試験に適した純度に到達するまでに、少なくとも1~2ステップの最終精製が必要です」とOhlson氏は述べています。最終精製ステップには、LTA₄加水分解酵素の電荷特性を生かし、クロマトフォーカシングおよび陰イオン交換クロマトグラフィーの2つの精製方法を採用しました。Mono Pイオン交換担体によるクロマトフォーカシングを使用したのは、pHグラジエントをかけてタンパク質を等電点で分離するためです。目的のピークは幅0.05 pH以内に溶出され、高分離精製が行えます。LTA₄加水分解酵素はpH 7.5で負に荷電するため、陰イオン交換クロマトグラフィーでも精製できます。Mono PおよびMono Qカラムのどちらを用いても高分離能が得られるため、並行して使用し比較することも可能です。

図2に酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)由来のLTA₄加水分解酵素の最終精製時のクロマトグラムと酵素活性を示します。図2Aの例では、初期精製後、25 mM BisTris, pH 7.0で平衡化したMono P 5/200 GL(Tricornカラム)を用いてクロマトフォーカシングを行いました。アフィニティークロマトグラフィー精製後のサンプルをMono Pカラムに添加し、Polybuffer 74, pH 4.5によりpHグラジエント7.0~4.5で溶出しました。図2Bの例では、最終精製に陰イオン交換クロマトグラフィーのMono Q

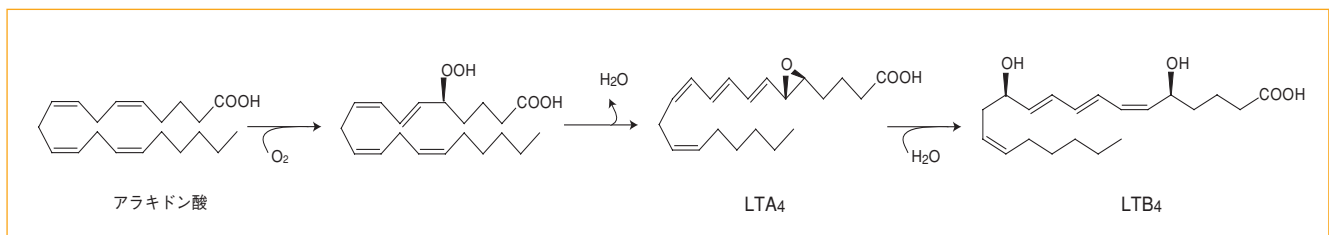


図1. LTB₄の合成

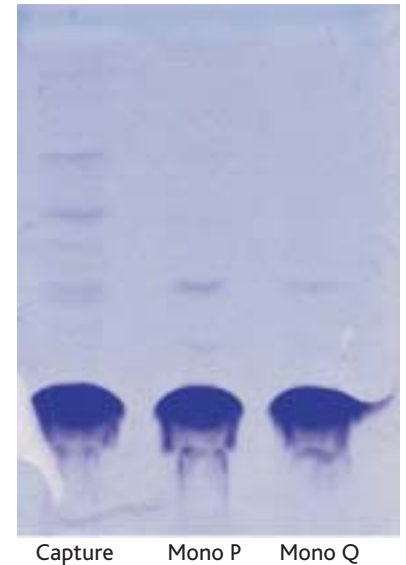
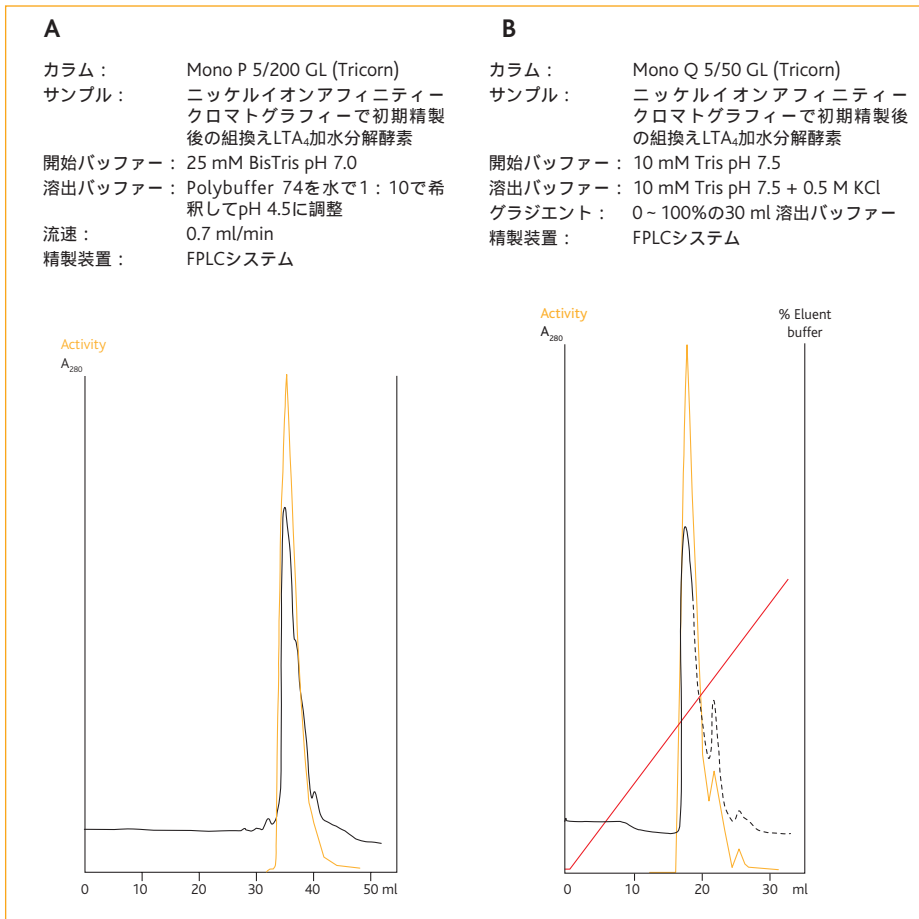


図3. 各精製ステップで溶出されたLTA₄加水分解酵素のSDS-PAGE解析
 ニッケルイオンアフィニティークロマトグラフィーによる初期精製、Mono Pカラムを使用した1回目の最終精製ステップ、Mono Qカラムを使用した2回目の最終精製ステップ

図2. LTA₄加水分解酵素の精製

- (A) 最終精製ステップにMono P 5/200 GL (Tricorn) カラムを用いたクロマトフォーカシング。
 25 mM BisTris-HClでカラムを平衡化してpH 7.0に調整し、Polybuffer 74, pH 4.5によりpHグラジエント7.0~4.5で溶出しました。
- (B) 最終精製ステップにMono Q 5/50 GL (Tricorn) カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー。
 カラムを10 mM Tris-HCl, pH 7.5で平衡化し、0~0.5 M KClのリニアグラジエントで溶出しました。

5/50 GLカラムを使用しました。カラムを10 mM Tris-HCl, pH 7.5で平衡化し、0~0.5 M KClのリニアグラジエントで溶出しました。最終精製ステップ後に、アミノペプチダーゼ活性測定法によって目的ピークと酵素活性の一致を確認しました。

図3は、最終精製としてMono PによるクロマトフォーカシングとMono Qによるイオン交換クロマトグラフィーを連続して行った場合の例で、SDS-PAGEにより純度向上を確認した結果を示しています。Mono Pを用いたクロマトフォーカシング後に残っていた夾雑物は、続くMono Qによる2回目の精製により除去できました。

まとめ

カロリンスカ研究所におけるロイコトリエン研究の過去20年の成功には、Mono PおよびMono Qカラムを用いた精製により、純度の高いLTA₄加水分解酵素を機能・構造研究に使用できたことが大きく貢献しています。ロイコトリエンの生成と炎症性疾患の関係をより深く理解することは、新規の抗炎症剤の開発につながります。

参考文献

1. Wetterholm, A. Leukotriene A₄ hydrolase—a bifunctional zinc metalloenzyme. Thesis-Dept. of Physiological Chemistry, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden (1993).
2. Jala, V. R. and Haribabu, B. *Trends Immunol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2004.04.003>.
3. Samuelsson, B. *et al. Science* 237, 1171-1176 (1987).

謝辞

本稿執筆にあたり、実際に精製操作を行い、有益なご意見と適切な助言をくださったスウェーデン、ストックホルムのKarolinska Institute (Department of Medical Biochemistry and Biophysics) のEva Ohlson氏に御礼申し上げます。

※ 現在、MonoBeads担体はHRカラムの伝統を引き継いだTricornカラムにパッキングされて販売されています。Tricornカラムは旧型のHRカラムと同等の高い分離能をもち、ÅKTAdesignシステムをはじめ高分離能液体クロマトグラフィーシステムへの接続が容易な最新のデザインになっています。

ご注文情報

製品名	包装	コード番号	価格(円)
Mono Q 5/50 GL	1本	17-5166-01	154,000
Mono P 5/200 GL	1本	17-5171-01	220,000
Polybuffer 74	250 ml	17-0713-01	39,900