

Die Isolierung und der Bestandteil des seltenen sauren Proteins im säugetierischen Organ

Teil 3 Die Verfeinerung und die einigen chemischen Eigenschaften der Ribose-5-Phosphat-Isomerase aus der Schweinemilz

Keisuke HORITSU

(Eingegangen am 25. September 1987)

Einleitung

Der Gegenstand dieses Versuchs und das Interesse daran sind mit dem Verfasser und einem ärztlichen Biochemiker vorgelegt.^{1~11)} Ein Beispiel, woran wir Interesse hatten, war es, daß solch ein seltenes saures Protein mit der Übermittlung der Mitteilung im Nervensystem verknüpft werden könne. Die Tätigkeit im Nervensystem zu klären das letzte Ziel unserer Forschung.

Ein Versuch war es, die Isomerase, Ribose-5-Phosphat-Isomerase aus dem Organ, der Schweinemilz zu entfernen, um das saure Protein zu verfeinern.

Zuerst wurde die Verfeinerung dieser Isomerase versucht. Und einige chemische Eigenschaften dieser Isomerase wurden mit eigenen Experimentellmethoden gemessen.

Dieser Versuchen wurde mehrere Male für die Bestätigung des experimentellen Ergebnisses wiederholt. Ein Teil dessen war in Abteilung Enzymchemie, Institut für Biochemie, Georg-August Universität Göttingen fertiggebracht.

Die Vorbereitungsmethode des Materials und das Verfahren der Isolierung des Enzymes werden teilweise vom Verfasser verbessert.

Experimenteller Teil und Ergebnisse

Die Vorbereitungsmethode des Materials und das Verfahren der Isolierung des Enzymes sind teilweise vom Verfasser verbessert worden. Sie sind neue Punkte.

Die Schweinemilz war ein stark durchblutetes Organ

Laboratorium für Biologie

von länglich abgeflachter Form makroskopisch von vielen mit Geweben gebundenen Fasern durchzogen und in eine rote und eine weisse Milzpulpe eingeteilt. In der roten Milzpulpe sind die malpighischen eingelagert, die beim Schwein schon mit blossen Auge sichtbar sind und als weissliche knötchenförmige Gebilde bzw. als weisse Milzpulpe bezeichnet werden können.

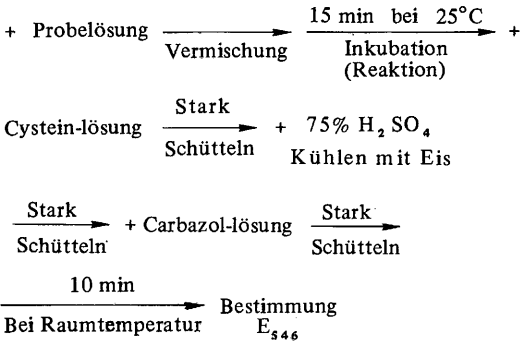
Nachdem die Schweinemilz aus der frischen Leiche heraus genommen worden war, wurde zuerst das frische Organ mit Eis abgekühlt, auf einer Stelle im Laboratorium eingefroren und dann aufgetaut. Das reine Organ wurde dadurch erhalten, unnötige Zellgewebe, die Epidermis, die Adern, die Arterie, und andere übrigen Gewebe wurden, wie im vorigen Bericht in bezug auf die Leber eingeteilt. Der Versuch über das Verfahren der Einteilung was auf dem Eis durchgeführt. Der Verfasser paßte aufmerksam auf die Reinheit und die Denaturierung auf, damit die Enzymreaktion nicht verursacht werden sollte.

Die mechanisch unvermischte Schweinemilz (278.7 g) wurde bei einer zweimaligen Passage durch einen Fleischwolf zu Brei verarbeitet. Sein Gewicht betrug 251.6 g. Er wurde mit verdoppelten Volumen (504 ml) Malonat-Puffer (0.05 M Malonat, pH 6.0, 1 mM EDTA, 1 mM Me: 2-Mercaptoethanol) versetzt. Dieser Extrakt (750 ml) wurde mechanisch mittels eines Magnetrührers 3 Stunden bei +2°C gerührt. Die gewonnene Suspension (550 ml) wurde zentrifugiert (4350 RPM, 28 min, +5°C), um überflüssiges Zellwandmaterial und faserige Bindegewebestrukturen abzutrennen. Das Dekantat wurde zuletzt noch über Glaswolle filtriert, um flotierendes Fett zu entfernen.

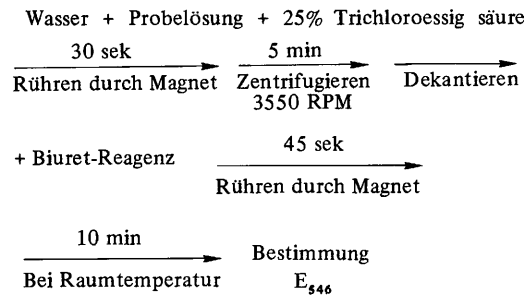
Die Bestimmung der spezifischen Aktivität ergab einen Wert von 7.3 IU/mg Protein. Aus dieser Probe ergab sich eine eindeutige Forgerung, daß die ungewöhnlich hohe Aktivität der Ribose-5-Phosphat-Isomerase in den Zellen der Milz zu suchen ist.

Die Enzymaktivität wurde mit der Extinktion an 546 nm durch den Cystein-Carbazol-Test bestimmt.

Tris/HCl Puffer pH 7.4 + Ribose-5-Phosphat Lösung



Auch der Proteinsgehalt wurde mit der Extinktion an 546 nm durch den Biuret-Methode bestimmt. Und BSA (Albumin: Rinder Serum Albumin) wurde als das Standardmaterial verwendet, um eine Standard-quantitativekurve zu schreiben.



Die Enzymaktivität zeigte eine ungewöhnlich hohe Stabilität des Enzyms gegenüber hohen Temperaturen. Ferner wurde durch präparative Hitzeschritte bei 80°C – 85°C eine hohe Ausbeute und eine hohe Anreicherung erreicht. Aber die Aktivitäten vielen anderen Enzymen fallen in meisten Fällen bei solch einer hohen Temperatur. Dieses Enzym aber wurde bei 83°C ± 0.5°C angereichert.

Jede 225 ml (550/2 ml) zentrifugiert filtrierte Lösung wurde bei 83°C ± 0.5°C für 17 min mit anspannender Aufmerksamkeit erhitzt. Danach wurde sie sofort mit Eis abgekühlt und dann zentrifugiert

(4350 RPM, +5°C, 32 min). Die flüssige Phase 425 ml, die von den Niederschlägen abgetrennt wurde, wurde zu 2000 ml mit 0.05 M Malonat Puffer pH 4.9 gemacht. Dann wurde die homogenisiert Flüssigkeit mit CM-Sephadex C-50 Teilung-Chromatographische-Säule (D 5.3 cm x H 7.5 cm) bei 4°C ± 0.5°C chromatographiert, die Elution war mit 0.05 M Malonat Puffer pH 6.0, der 0.03 M NaCl enthält, gemacht und die Eluatlösung 840 ml wurde gewonnen. Ammonium Sulfat wurde mit der Eis-Abkühlung über dem Magnetischerührer, bis 65% ige Sättigung erreicht wurde. Die gering gewordenen Niederschläge 4.4 g wurden mit Hilfe der Zentrifuge (12000 RPM, +5°C, 34 min, 27500 G) von der flüssigen Phase abgetrennt. Die homogenisierte Flüssigkeit 14 ml aus diesen zentrifugierten Niederschlägen wurde mit einem geringeren 0.05 M Malonat Puffer pH 6.0 gewonnen. Die Dialyse der Lösung war mit destilliertem Wasser vollführt. Nach der Dialyse wurde die Flüssigkeit mit Hilfe der Zentrifuge (20700 RPM, +5°C, 6 min, 47800 G) abgetrennt. Der 350 µl/10 l Me enthaltenen 0.02 M Tris/HCl Puffer pH 8.5 80 ml wurde der gewonnenen Flüssigkeit 20 ml addiert.

Die Bestandteile der Flüssigkeit 100 ml wurden mit QAE-Sephadex Gel-Teilung-Chromatographische-Säule (D 3.3 cm x H 21 cm, bei + 3.5°C) getrennt. Die Elution war mit dem 0.1 M NaCl enthaltenen 0.02 M Tris/HCl, Me, pH 8.5 gemacht. Dabei wurde die Eluatlösung, 140 ml (niedrig aktiv enzymlich) + 800 ml (hoch aktiv enzymlich), gewonnen.

Auch Ammonium Sulfat wurde mit Eis-Abkühlung über dem Magnetischerührer addiert, bis 820 ml Flüssigkeit von 65% ige Sättigung erreicht wurde. Und die gering gewordenen Niederschläge 2.5 g wurden durch die Zentrifuge (20700 RPM, +5°C, 6 min, 47800 G) von der flüssigen Phase abgetrennt. Danach wurden die Niederschläge mit 0.05 M Malonat, 1 mM EDTA, 1 mM Me Puffer, pH 6.0 2 ml homogeniert. Diese Flüssigkeit war auch mit einer kleinen Ultra-zentrifuge 3 min lang zentrifugiert. Die gewonnene flüssige Phase 1.8 g wurde mit Sephadex G-100 Ionenaustauscher-Chromatographische-Säule (D 2 cm x H 40 cm, bei 3.5°C) chromatographiert. Die Eluation wurde mit dem 0.1 M KCl enthaltenen 0.05 M Malonat, 1 mM EDTA, 1 mM Me Puffer, pH 6.0

gemacht. Die enzymlichaktive Eluatlösung 52 ml wurde dialysiert und lyophilisiert. Die Ausbeute war 32 mg.

Die Chromatogramme von CM-Sephadex C-50, QAE-Sephadex A-50 und Sephadex G-100 sind in Abbildungen 1, 2 und 3 nacheinander gezeigt. Aber jedes Chromatogram zeigte jede Extinktion an 546 nm für Enzymaktivität und jede Extinktion an 280 nm für Proteinbestandteil.

Tabelle 1 Anreicherung der Ribose-5-Phosphat-Isomerase

Reinigungsschritte	Enzymaktivität Einheiten pro Fraktion	Protein mg pro Fraktion	Spezifische Aktivität (IU/mg Protein)
Rohextrakt	128700	17600	7,3
Hitzeschritte (83°C)	115600	773	195
CM-Sephadex C-50 (Fra. Nrn. 9-50)	88536	210	422
QAE-Sephadex A-50 (Fra. Nrn. 8-47)	76670	72,2	1062
Sephadex G-100 (Fra. Nrn. 12-25)	43161	10,7	4022

Auch an Tab. 1 sind die Anreicherungen des Ribose-5-Phosphat-Isomerase von fünf Stufen gezeigt.

Der Reinheitsgrad wurde während der Verfolgung der Anreicherung durch die analytische Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit Aktivitätsfärbung erreicht.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

Und der Bestandteil des Polyacrylamidgels war wie folgt.

Trenn-Gel ()/1.0 l	Sammels-Gel ()/1.0 l
30% Acrylamid/ 0.8% NN'-Methylenbis-acrylamid (15 ml)	30% Acrylamid/ 0.8% NN'-Methylenbis-acrylamid (1.0 ml)
1.4 M Tris/HCl Puffer, pH 8,9 (7.5 ml)	1.2 M Tris/HCl Puffer, pH 6,7 (0,5 ml)
Destilliertes Wasser (7.5 ml)	Destilliertes Wasser (8.0 ml)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (50 µl)	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (20 µl)
10%Ammoniumpersulfat (40 µl)	10% Ammoniumpersulfat (200 µl)

Als das Standardmaterial wurde Rider Serum Albumin (BSA) benutzt.

Diskussion und Schluss

Bereits waren viele Experimente über das Enzym, Ribose-5-Phosphat-Isomerase, angefertigt. Dabei wurde das Enzym aus den unterschiedlichen Rohmaterialien gewonnen, sei es tierischer oder pflanzlicher Herkunft. In der Arbeit vom Verfasser wurde seine Aufmerksamkeit das Enzym aus der Schweinemilz gerichtet, was eine ungewöhnliche Aktivität der Ribose-5-Phosphat-Isomerase aufweist. Bei der Durchsicht anderer Schriften bemerkt man, daß die unterschiedlichen Angaben über die Struktur des Enzyms und seinen Wirkungsmechanismus bestehen.

Bei der Anreicherung des Enzyms aus Schweinemilz wurde Ribose-5-Phosphat-Isomerase in elektrophoretisch reiner Form dargestellt. Sephadex-Ionenaustauscher werden aus neutralen Sephadex-Typen durch die Substitution mit dem funktionellen Austauscherguppen gewonnen.

Die Proteine und andere labilbiogene Substanzen können von dem hydrophilen Polysaccharid-Raumnetz nicht denaturiert werden. Die unspezifische Adsorption an Sephadex ist sehr gering. Da auch die hohen Substitutionsgrade zu keinem Aufbrechen der Matrix führen, können große Austauscherkapazitäten erzielt werden.

Als markanteste Eigenschaft muß noch die ungewöhnlich hohe Stabilität des Enzyms gegenüber Hitze betont werden, was bei Hitzeschritte der Präparaten nützlich sein kann.

Meiste Enzymeaktivitäten können nicht bei hoher Temperatur sowie über 80°C halten. Die experimentellmethode vom Verfasser hat jedoch eine markanteste Eigenschaft für Anreicherung von Ribose-5-Phosphat-Isomerase und ist ein neuer gewichtiger Punkt. Das heißt, dieses Enzym kann spielen eine wichtige Rolle in Pentose-Phosphat-Cyclus von biologischem Metabolismus spielen.

Dieses Enzym, Ribose-5-Phosphat-Isomerase, zeigte diese Aktivität bei hoher Temperatur, während viel andere Enzyme nicht diese Aktivität bei solcher Temperatur zeigen konnten. Weil es sehr ungewöhnliche

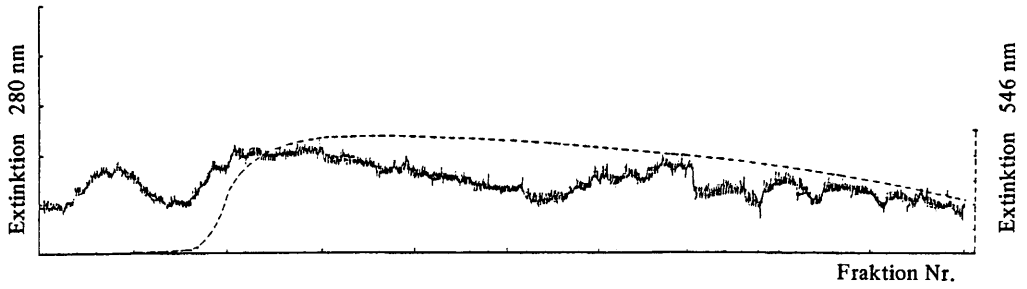


Abb. 1 Chromatographie von Ribose-5-Phosphat-Isomerase an CM-Sephadex C-50

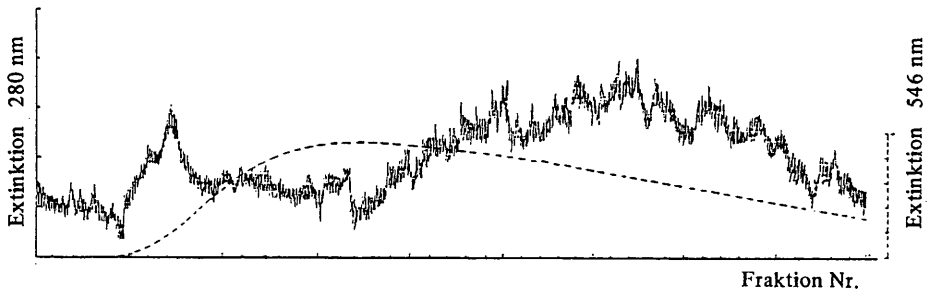


Abb. 2 Chromatographie von Ribose-5-Phosphat-Isomerase an QAE-Sephadex A-50

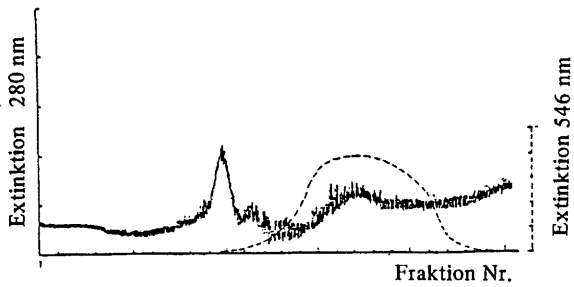


Abb. 3 Chromatographie von Ribose-5-Phosphat-Isomerase an Sephadex G-100

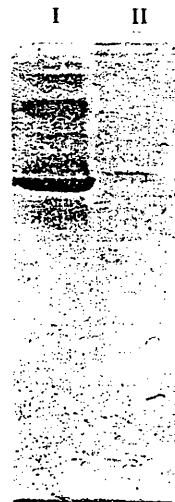


Abb. 4 Analytische Polyacrylamidgel-Elektrophorese
I: Rinderserumalbumin
II: Probe (Ribose-5-Phosphat-Isomerase)

Eigentümlichkeit hat, wurde dieses hohe Temperaturverfahren für seine Verfeinerung benutzt.

Andere Eigenschaften dieses Enzyms bei einem Experimentell-Prozess soll in der regelmäßig Zeitschrift berichtet werden.

Zur Ermittlung des Temperauroptimums wurde ein Testgemisch verwendet. Die Enzymsaktivität bei jeder Temperatur von 5°C bis 98°C wurde bestimmt.

Die Enzymsaktivität durchläuft bei 85°C ihrem Temperauroptimum, d.h. sie zeigte eine ungewöhnlich hohe Stabilität des Enzyms gegenüber hoher Temperatur. Dieses Enzym verlor seine Aktivität nur ein wenig über 65°C, während meiste Enzyme dabei ihre Aktivität größtenteils verlieren. Dieser Punkt ist sehr wichtig für die Anreicherung dieser Enzymsaktivität und auch ein neuer Versuch.

In einem Experiment wurde geprüft, wie sich dieses Enzym bei unterschiedlichen Partialsättigungen von Ammonium sulfat verhält. Die Aktivitäten des Enzyms in Niederschlag wurden bei einer fraktionierten Ammonium sulfat-Fällung bestimmt. Zu präparativen Zwecken wurde eine 60% – 65% ige Ammonium sulfat-Partialsättigung gewählt. Das war ein neuer Versuch. Die beiden Versuchen über Temperauroptimums und Ammonium sulfat-Fällung mögen dereinst berichtet werden.

Sephadex G-100 wurde als Ionenaustauscher-Chromatographische-Material erst experimentiert. Es hatte hohe Leistungsfähigkeit. Und Phospho-Cellulose, DEAE-Sepharose, PMB-6-Aminohexyl-Sepharose 4B wurden im Prozesse für die Anreicherung dieses Enzyms experimentiert. Dabei wurden einige neue Punkte entdeckt. Diese Entdeckungen und andere besondere Eigenschaften, zum Beispiel, Affinitätschromatographie, Hemmstoffe, Molekulargewicht, mögen bei einer anderen Gelegenheit berichtet werden.

Überzeugung

Ribose-5-Phosphat-Isomerase aus der Schweinemilz angereichert, in elektrophoretisch reiner Form dargestellt und ihre katalytischen Eigenschaften untersucht. Eine Anreicherung von 551 fache gelang in drei unterschiedlichen Chromatographieschritten, wobei

eine spezifische Aktivität von 4022 IU/mg Protein erzielt wurde. Einige unnötigen Epidermis, die Adern, die Arterie und andere Gewebe wurden entfernt vom Organ, Rohmaterial. Dieses Enzym besaß eine ungewöhnlich hohe Stabilität. Diese Enzymsaktivität erwies sich bei hoher Temperatur, während meiste andere Enzyme überhaupt keine Aktivität zeigen konnten. Und das Präparat des Enzyms wurde bei 83°C mit hoher Reinigung verfertigt. Dieser eine neue Punkt war sehr wichtig für Anreicherung von diesem Enzym.

Die Hitzschritte und die Chromatographien der CM-Sephadex C-50, QAE-Sephadex A-50 und Sephadex G-100 waren nützlich für die Anreicherung und die Reinigung des Enzyms. Es war durch die partialverbesserten Polyacrylamid-Elektrophorese festgestellt und gewonnen. Auch Sephadex G-100 war erst für diese Reicherung dieses Enzyms gebraucht. Ein Erfolg war bei der Reinigung des Enzyms erzielt.

Einige andere gewonnenen Eigenschaften sollen später schriftlich gefaßt werden.

Zusammenfassung

Dieses Enzym, Ribose-5-Phosphat-Isomerase, wurde aus der Schweinemilz, indem einige unnötige Epidermis, Ader, Arterie und andere Gewebe entfernt worden waren, gewonnen.

Es besaß eine ungewöhnlich hohe Stabilität gegen hohe Temperatur. Es wurde mit den neuen entdeckten Hitzschritten bei 83°C isoliert. Und für die Anreicherung und die Reinigung dessen wurden die Chromatographien der CM-Sephadex C-50, QAE-Sephadex A-50 und Sephadex G-100 verwendet und das war ein neuer Versuch. Viele partielle Verbesserungen waren beim Experimentellprozess vollgeführt. Und einige andere gewonnenen Eigenschaften dieses Enzyms mögen später schriftlich gefaßt werden.

Bibliographien

- 1) A. Gardemann, G. F. Domagk; *Arch. Biochem. Biophys.* 220 347 1983.
- 2) H. Gueltekin, G. F. Domagk; *Z. Physiol. Chem.* 364 1134 1983.

- 3) P. V. Hauschka, J. P. Lian, P. M. Gallop; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72 3925 1975.
- 4) P. V. Hauschka, P. A. Friedman, H. P. Traverso, P. M. Gallop; *Biophys. Res. Comm.* 71 1207 1976.
- 5) T. Kato, Y. Kato, H. Kasai, T. Okuyama; *J. Biochem.* 82 1297 1977.
- 6) J. Stenflo, P. Ferlund, W. Egan, P. Roesps Troff; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71 2730 1974.
- 7) K. Horitsu, H. Gueltekin, G. F. Domagk; *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* 92(3) B88 1984.
- 8) K. Horitsu; *Bull. Tokyo Kasei Daigaku*, 26 133 1986.
- 9) K. Horitsu; *ibid.* 27 201 1987.
- 10) H. Gueltekin, K. Horitsu, G. F. Domagk; *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* 57(3) B33 1987.
- 11) H. Gueltekin, K. Horitsu, G. F. Domagk; *Int. J. Biochem.* 19 671 1987.

Fußnote: Dieser Forschungsbericht mußte wegen des Etats und des Wegen, weil eine Person nur einmal in Jahr ihn vorlegen darf, äußerst verkürzt werden.

哺乳動物器官の希有酸性蛋白質の単離と組成

第3報 豚脾臓由来のリボース・5・リン酸・異性化酵素の精製と若干の化学的性質

堀 津 圭 佑

(昭和62年9月25日受理)

本酵素, リボース・5・リン酸・異性化酵素, が不必要な表皮, 静脈, 動脈その他の組織を除去した豚脾臓から得られた。それは高温度において非常な安定性があり, 83°Cの新発見の熱処理で単離された。その濃縮と精製にあたり, CM-Sephadex C-50, QAE-Sephadex A-50 と Sephadex G-100 のクロマトグラフィーが用いられ, 新しい試みであった。多くの部分的改良が実験過程においてなされた。この酵素のいくつかの他の得られた特徴は後日記されるであろう。