米糠ホスホリピドアシルヒドロラーゼ の分離・精製ならびに性状について†

高野 克己・嶋 居 郁 三・小原 哲二郎*

Purification and Properties of Rice Bran Phospholipid Acylhydrolase (Studies on The Mechanism of Lipid-hydrolysing in Rice Bran Part V)

Katsumi TAKANO*, Ikuzo KAMOI*, Tetsujiro OBARA*

Department of Agricultural Chemistry, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1,
Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156

Two phospholipid acylhydrolases of pI 5.4 and 9.5 in rice bran were purified by precipitation with ammonium sulfate and column chromatography on *n*-decylamine-Sepharose 4B, phosphatidylcholine-AH-Sepharose 4B and isoelectric focusing, up to the specific activity of 119 and 953-fold, respectively. The main phospholipid acylhydrolase (pI 9.5) showed estimated molecular weight of about 40,000 when determined by gel filtration on a TOYOPEARL HW-50 F column. The enzyme had optimum pH of 8.0~9.0 and showed the highest activity at 37°C. There was an obligatory requirement of calcium ion and 0.2 mM of calcium ion was essential for maximal activity. It was stable below pH 8.0 and 30°C, inhibited by Al^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} and EDTA. (Received Feb. 6, 1986)

著者らは米糠中の脂質分解機構を解明するため、これに関与するリン脂質分解酵素について一連の研究^{1)~4)}を行い、すでに米糠よりホスホリパーゼCおよびホスホリパーゼDを分離・精製し、その性状を明らかにしている。

本報告では、すでに米糠中に存在が知られている⁵⁾にもかかわらず、その性状が十分把握されていないホスホリドアシルヒドロラーゼ (Phospholipid acylhydrolase, PAHase, EC 3.1.1.4, EC 3.1.1.32) について、疎水性アフィニティクロマトグラフィー²⁾を用い、分離・精製し、その性状を明らかにすることを目的とし実験を行った。

試料および実験方法

1. 試料

酵素抽出の試料には、茨城県産「ニホンバレ」の胚芽²⁾を用いた。

2. 基質

基質のホスファチジルコリンは、前報¹⁾と同様卵黄より調製した。

3. 粗酵素液の調製

粗酵素液は前報に準じ、脱脂 (*n*-ヘキサン) 胚芽に10倍量の10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.0, 1 mM 塩化カルシウム) を加え、酵素を抽出し、これを硫酸塩析 (0.65 飽和) して粗酵素液とした。

4. 酵素活性の測定

PAHase の活性測定は、前報¹⁾に従った。すなわち、酵素液 0.5 ml に 0.2 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.5) 0.2 ml, 2 mM 塩化カルシウム溶液 0.1 ml および蒸留水 0.1 ml を加え、37°C にて5分間インキュベートした後、基質乳化液 (10 mM ホスファチジルコリン) 0.1 ml を加え、37°C にて反応を行った。PAHase 活性は反応時間90分まで直線的に増加したので、本実験においては反応時間60分間とした。以下、反応によって生成した脂肪酸をローダミン法⁶⁾にて比色定量 (515 nm) し、酵素単位

† 米糠中の脂質分解機構に関する研究 (第5報) (前報, 文献 1)~4))

* 東京農業大学農芸化学科 (〒156 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)

(Unit) は1分間に1 μmol の脂肪酸を遊離する力価を1単位とした。

なお、グリセリン脂質のアシルエステルに作用する酵素は、その位置特異性によりホスホリパーゼ A_1 (EC 3.1.1.32) および A_2 (EC 3.1.1.4) 活性に分けられるが、本報告ではこれらの両活性を PAHase 活性として測定した。

5. *n*-デシルアミン・セファロース 4B ゲルの調製

ゲルの調製は前報²⁾に従った。すなわち、臭化シアン活性化セファロース 4B に常法⁸⁾に準じ、*n*-デシルアミンを結合させた。

なお、リガント量は未反応の *n*-デシルアミンを TN BS⁹⁾法にて定量し求めた結果、5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ gel であった。

6. ホスファチジルコリン-AH-セファロース 4B ゲルの調製

ゲルの調製は BARSUKOV らの方法¹⁰⁾に従った。すなわち、AH-セファロース 4B を 0.5 M 塩化ナトリウム溶液および蒸留水 (pH 5.0) にて洗浄後、これに酸化ホスファチジルコリンおよび1-エチル-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジミドを加え、pH 5.0 に調整した後、20°C にて24時間反応を行い、ホスファチジルコリン-AH-セファロース 4B を得た。

なお、リガンド量はゲルを過塩素酸にて分解した後、SHIBUYA らの方法¹¹⁾にてリンを測定し求めたところ、ゲル1 ml 当たり約0.16 μmol のホスファチジルコリンが結合していた。

7. 等電点電気泳動

pH 3.5~10.0 のキャリヤンホラインを用い LKB 8100 (110 ml) カラムを使用して、常法に従い等電点電気泳動を行った。泳動は4°C にて300 V、24時間行い泳動終了後、内容を2 ml ずつ分取した。

8. 分子量の測定

トヨパール HW-50 F によるゲルろ過法にて分子量を測定した。すなわち、10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.0, 1 mM 塩化カルシウムを含む) で平衡化させたトヨパール HW-50 F のカラム (1.2×60 cm) に酵素液および分子量既知の下記タンパク質を添加し、同緩衝液にて溶出 (35 ml/h) を行い、溶出後は1 ml ずつ分取した。分子量は標準タンパク質との溶出位置の比較により推定した。

なお、分子量既知の標準タンパク質としては Albumin (bovine serum, 68000), Albumin (hen egg, 45000), Chymotrypsinogen A (25000) および Cytochrome C (12500) を用いた。

9. タンパク質の定量

Lowry 法の改良法¹²⁾により行った。

実験結果および考察

1. 米糠 PAHase の精製

粗酵素液を *n*-デシルアミン・セファロース 4B カラム (2.4×28 cm, pH 7.0) に添加し、前報に従い10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.0, 1 mM 塩化カルシウムを含む) 250 ml, 1.5 M 塩化ナトリウム溶液 200 ml, 0.5% β -サイクロデキストリン溶液および0.2 M 塩化ナトリウムを含む0.5% β -サイクロデキストリン溶液それぞれ250 ml にて順次溶出を行った。溶出液は8 ml ずつ分取し、その280 nm におけるタンパク質吸収および酵素活性を測定した。

その結果 PAHase は、このゲルに疎水的に吸着し、0.5% β -サイクロデキストリン溶液にて溶出⁹⁾され、この活性画分を A-1 画分とした。

次にホスファチジルコリン-AH-セファロース 4B ゲルを用い、先の A-1 画分の精製を試みた。すなわち、上記ゲルを充填したカラム (1.5×8 cm) に A-1 画分を添加した後、10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.0) 120 ml にて未吸着タンパク質を除去し、次に0.5% β -サイクロデキストリンを含む同緩衝液 80 ml および0.5% デ

Fig. 1 Affinity chromatography of rice bran phospholipid acylhydrolase, A-1 on phosphatidylcholine-AH-Sepharose 4B

The enzyme (A-1) was applied on phosphatidylcholine-AH-Sepharose 4B column (1.5×8 cm, ligand concentration: 0.16 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ gel) previously equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. The enzyme eluted the same buffer, 0.5% β -cyclodextrin (β -CD) and 0.5% sodium deoxycholate (SDC).

Fig. 2 Isoelectric focusing of rice bran phospholipid acylhydrolase

Isoelectric focusing was carried out for 24 h at 300 V using ampholyte (pH ranges from 3.5-10.0). ●—●, phospholipid acylhydrolase activity; —, pH; ----, protein (A_{280}).

オキシコール酸ナトリウムを含む同緩衝液 120 ml を流下させた。溶出液は 4 ml ずつ分取した。

その結果は Fig. 1 に示したように、PAHase は 0.5% β -サイクロデキストリン画分に溶出され、この活性画分を A-2 画分とした。

次に得られた A-2 画分について、さらに等電点電気泳動法による精製を進めた結果 (Fig. 2), pH 5.4 および pH 9.5 に等電点を持つ 2 画分が得られ、それぞれ AA-3 画分および AB-3 画分とした。その活性割合は 33 : 67 であった。

以上の精製結果を Table 1 に示した。すなわち、上記

精製操作によって等電点の異なる 2 種の PAHase の存在が確認され、それぞれ抽出液に比べ、AA-3 (pI 5.4) は 119 倍に AB-3 (pI 9.5) は 953 倍に比活性が上昇した。

なお、A-2 画分は A-1 画分に比べ、比活性が約 9 倍に上昇し、活性回収率も約 43% であり、ホスファチジルコリン-AH-セファロース 4B ゲルは米糠 PAHase の精製に対し有効であった。本ゲルはリガンドの構造から、酵素の吸着には疎水性、イオン性および基質親和性などの相互作用が考えられるが、米糠 PAHase は β -サイクロデキストリン溶液にて溶出されたことから、今回のクロマト条件においてはゲルに対し主に疎水的な力によって吸着したものと推察された。

平山ら⁵⁾は米糠抽出液中に pI 3.9 および pI 8.4 の PAHase を認め、その活性割合は 47 : 53 であったと報告しており、今回得られた AA-3 画分 (pI 3.9) および AB-3 画分 (pI 9.5) と等電点、活性割合に多少の違いが見られた。この点については、平山らは「コシヒカリ」を試料とし、硫酸塩析により得られた粗酵素を直接等電点電気泳動にかけているのに対し、本報告では試料として「ニホンバレ」を用い、前述の精製法により得られた酵素についての結果であり、試料の品種および精製法などの差異により、多少の違いが見られたものと考えられる。

今回は得られた両画分のうち活性割合が 67% を示し、その比活性も 952 倍に上昇した AB-3 画分を米糠中の主要 PAHase とした。本画分については今回精製度の確認は行わなかったが、以下その性状を検討することとした。なお、等電点 pH 5.4 を示す AA-3 画分は本精製法では比活性の上昇率が低く十分精製が出来なかったもので、その性状についての試験は行わなかった。

Table 1 Summary of purification process of phospholipid acylhydrolase from rice bran

Stages	Total protein (mg)	Total activity (Units)	Specific activity (Units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Extract*	3 580	16.0	0.0045	1	100
Crude enzyme (Ammonium sulfate)	935	9.76	0.0104	2.3	62.1
C ₁₀ -Sephacrose 4 B chromatography (A-1)	94.0	4.89	0.0520	11.6	50.1
PC-AH-Sephacrose 4 B chromatography (A-2)	7.0	3.36	0.480	107	21.5
Isoelectric focusing					
(AA-3)	2.8	0.24	0.536	119	1.5
(AB-3)	0.7	0.48	4.29	953	3.0

* Rice germ 200 g was used as the starting materials.

2. 米糠 PAHase (AB-3画分, pI 9.5) の性状

1) pH の影響

クエン酸緩衝液 (pH 3.0~6.0), トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.0~9.0) および炭酸水素ナトリウム・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.0~10.0) を用い, 至適 pH および pH 安定性を測定した。

結果は Fig. 3 に示した通りである。すなわち, 各 pH における活性を測定したところ, 至適 pH 8.5~9.0 を示しインゲン緑葉¹⁴⁾ (至適 pH 6~7) およびメロン種子¹⁵⁾ (至適 pH 5.0) の PAHase と異っていた。また, 各 pH に調整 (pH 3.0~10.0) した酵素液を 30°C にして 30 分間置いた後, 残存する活性を測定した結果, 活性は pH 8.0 以下で安定であった。

2) 温度の影響

各温度における活性を測定し, 最適温度を求めた。また, 酵素液を各温度で 30 分間処理した後, 残存する活性を測定し, 温度安定性を求めた。その結果 (Fig. 4), PAHase は 37°C にて最大活性を示し, また活性は 30°C 以下で安定であった。

なお, PAHase は 10°C においても 37°C の約 50% の活性が認められた。

Fig. 3 Effect of pH on rice bran phospholipid acylhydrolase

Buffer used were 0.1 M citrate (pH 3.0~6.0), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0~9.0) and 0.1 M carbonate (pH 9.0~10.0). Optimum activity (○—○): the reaction were carried out at 37°C for 20 min at different pH and were expressed as percentage of the maximum activity. pH stability (●—●): the enzyme was incubated at various pH values at 30°C for 30 min and the remaining activity were expressed as percentage of the initial activity.

3) 各種試薬の影響

酵素に各種試薬を 1 mM となるように加え, 30°C, 30 分間処理した後, 酵素活性を測定し, 各種試薬の影響を

Fig. 4 Effect of temperature on rice bran phospholipid acylhydrolase

Optimum activity (○—○): the reaction were carried out under various temperatures as indicated in the figure and were expressed as percentage of the maximum activity. Heat stability (●—●): the enzyme was incubated at various temperatures as indicated in the figure and the remaining activity were expressed as percentage of the initial activity.

Table 2 Effect of various reagents on rice bran phospholipid acylhydrolase

Reagent (1 mM)	Relative activity (%)
Control	100
MgCl ₂	76
NiCl ₂	59
FeCl ₂	54
CuCl ₂	30
CoCl ₂	28
AlCl ₃	10
EDTA	17
PCMB*	121
CH ₃ ICOOH	82

* *p*-chloromercuribenzoic acid

The rice bran phospholipid acylhydrolase was incubated with various reagents (1 mM) at 30°C for 30 min. The activity after the incubation was expressed as percentage of the control.

調べた。

なお、活性は無添加の対照を 100% とし、相対活性で表示した。結果は Table 2 に示したように PAHase は、 Al^{3+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} および EDTA によって著しく阻害を

Fig. 5 Effect of calcium concentration on rice bran phospholipid acylhydrolase

Calcium ($CaCl_2$) was added to the each enzyme solution with the the concentration as indicated in the figure. The relative activity were expressed as percentage of the maximum activity (0.2 mM Ca^{2+}).

Fig. 6 Estimation of molecular weight of rice bran phospholipid acylhydrolase

The enzyme (AB-3) was subjected to gel filtration (column, 1.2×60 cm) with TOYOPEARL HW-50 F previously equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0, 1 mM $CaCl_2$). Elution was performed with the same buffer at 4°C. The flow rate was adjusted to 35 ml per h, and 1.0 ml fractions were collected. The reference proteins were run under conditions.

受けた。なお、平山らは pI3.9 の PAHase は PCMB によって活性が阻害されたと報告しているが、本 PAHase は PCMB による活性阻害を受けなかった。

一般に Ca^{2+} はリン脂質分解酵素の活性発現に大きな影響を及ぼすことが知られている。そこで、次に PAHase 活性に対する Ca^{2+} の影響について検討を行った。すなわち、各 Ca^{2+} 濃度下における PAHase 活性を測定したところ、Fig. 5 に示したように 0.2 mM Ca^{2+} にて最大活性を示した。また、 Ca^{2+} 無添加では活性は認められず、0.2 mM Ca^{2+} が存在する反応液に EDTA を 0.2 mM となるように添加したところ、PAHase 活性は完全に失われた。

このことにより、米糠 PAHase の活性発現に Ca^{2+} が必須であることがわかった。

4) 分子量

ゲルろ過にて分子量の測定を行ったところ (Fig. 6)、米糠 PAHase の分子量は約 40 000 と推定され、平山ら⁵⁾の報告と一致した。

要 約

(1) 米糠 ホスホリビドアシルヒドロラーゼを *n*-デシルアミン・セファロース 4B ゲル、ホスファチジルコリン-AH-セファロース 4B ゲルおよび等電点電気泳動により分離・精製し、米糠中に pI5.4 (AA-3 画分) および pI9.5 (AB-3 画分) の 2 種のホスホリビドアシルヒドロラーゼを認め、それぞれ比活性は酵素抽出液に比べ 119 倍および 953 倍に上昇した。

(2) 主要ホスホリビドアシルヒドロラーゼ (pI9.5) の性状は以下の通りであった。すなわち、分子量約 40 000、至適 pH 8.5~9.0、最適温度 37°C、活性は pH 8.0 以下および 30°C 以下で安定であった。

また、活性に対する各種試薬の影響を調べた結果、活性発現に Ca^{2+} の存在は必須であり、 Al^{3+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} および EDTA は著しい活性阻害を示した。

研究を行うにあたり、米胚芽の採取に御便宜を賜った石岡酒造株式会社、武田守史氏に謝意を表します。また、実験に御協力下さった高橋英之、蓮池一昌の両君に感謝致します。

なお、本研究費の一部は財団法人食品科学振興財団、昭和 59 年度学術研究助成金によった。

文 献

- 1) 高野克己・鴨居郁三・小原哲二郎：日食工誌，33，

- 310 (1986).
- 2) 高野克己・鴨居郁三・小原哲二郎: 日食工誌, **33**, 501 (1986).
- 3) 高野克己・鴨居郁三・小原哲二郎: 日食工誌, **34**, 1 (1987).
- 4) 高野克己・鴨居郁三・小原哲二郎: 日食工誌, **34**, 8 (1987).
- 5) 平山 修・松田英幸: 農化, **49**, 569 (1975).
- 6) HIRAYAMA, O., MATSUDA, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 1831 (1972).
- 7) Enzyme Nomenclature, Recommendations (1984) of the Nomenclature Committee of IUB (Academic Press, Orlando) p. 273, 276 (1984).
- 8) CUATRECASAS, P.: *J. Biol. Chem.*, **245**, 3019 (1970).
- 9) 奥山典生・笠井久隆: 蛋白質 核酸 酵素, **18**, 1153 (1973).
- 10) BARSUKOV, L.I., DAM, C.W., BERGELSON, L.D., MUZIA, G.I. and WIRTZ, K.W.A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **513**, 198 (1978).
- 11) SHIBUYA, I., HONDA, H. and MALUO, B.: *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 1111 (1976).
- 12) ANDREWS, P.: *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964).
- 13) HARTREE, E.F.: *Anal. Biochem.*, **48**, 422 (1972).
- 14) MATSUDA, H., TANAKA, G., MORITA, K. and HIRAYAMA, O.: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 563 (1979).
- 15) AKHTAR, M.W., KAUSAR, N. and NAWAZIH, M.N.: *Pak. J. Sci. Res.*, **33**, 102 (1984).
- (昭和61年2月6日受理)
-