米糠ホスファチジン酸ホスファターゼの分離・精製 ならびに性状について†

高野克己*・鴨居郁三*・小原哲二郎*

Purification and Properties of Rice Bran Phosphatidate Phosphatase

(Studies on The Mechanism of Lipids-hydrolysing in Rice Bran Part VII)

Katsumi TAKANO*, Ikuzo KAMOI* and Tetsujiro OBARA*

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

Phosphatidate phosphatase (EC 3.1.3.4) extracted from rice bran was purified 222 fold with a yield of 5.2% by ammonium sulfate precipitation and column chromatographies on decylamin-Sepharose, DEAE-cellulose, chromatofocusing and TOYOPEARL HW-55 F. The molecular weight and the isoelectric point of the enzyme were estimated to be 280 000 and 5.3, respectively. The enzyme showed optimum pH of 5.0 and optimum temperature of 60°C. The enzyme activity increased 1.6 fold with addition 10 mM Ca^{2+} and was inhibited by Ni^{2+} , Mg^{2+} and PCMB. The enzyme was stable over the pH range of 3.0~8.0 and below 40°C. The K_m of the enzyme for phosphatidic acid was estimated to be $1.25 \times 10^{-3}\text{M}$.

(Received Aug. 11, 1989)

著者らは、米糠中における脂質の分解機構を解明するため、これに関与する脂質分解酵素について研究を行い、すでに米糠中のリパーゼ、エステラーゼ¹⁾²⁾、ホスホリパーゼ C³⁾、ホスホリパーゼ D⁴⁾ およびホスホリピドアシルヒドロラーゼ⁵⁾ を分離・精製し、その諸性状を明らかにしている。

また、前報⁶⁾において米糠中における脂質分解機構とこれら酵素との関係について検討を行い、従来リパーゼ単独の作用とされていた脂質分解のイニシエーターは、ホスホリパーゼ D (EC 3.1.4.4) であることを報告した。すなわち、その分解はまず油貯蔵体・スフェロゾームの主要膜成分であるホスファチジルコリンがホスホリパーゼ D によってホスファチジン酸に分解されて、スフェロゾームの崩壊が起こり、その後内部のトリアシルグリセロールにリパーゼが作用し、遊離脂肪酸が増加することが明らかになった。

一方、このようにホスホリパーゼ D の作用によって生じたホスファチジン酸は、米糠中に著しい蓄積は見られず、またそのリゾ体の生成も確められないことから⁷⁾、ホスファチジン酸は速やかに脱リン酸化されジアシルグリセロールとなることが推察される。

この反応に関与するホスファチジン酸ホスファターゼ (Phosphatidate phosphatase, EC 3.1.3.4, PAPase) は、植物ではテンサイ、ホウレンソウ、キャベツ、ニンジン⁸⁾、ダイズ⁹⁾、エンドウ、ペニバナ¹⁰⁾ およびカリフラワー¹¹⁾ などに存在することが報告されているが、その性状は現在までほとんど明らかにされていない。そこで、先の推論を明確にするためには米糠 PAPase の性状を知ることが重要と考え、米糠中における PAPase の活性を調べたところ、明らかに活性が認められたので、以下本酵素を各種クロマトグラフィーにて分離・精製し、その性状を検討した。

† 米糠中の脂質分解機構に関する研究 (第7報) (前報, 文献 6), 7), 9))

* 東京農業大学農芸化学科 (〒156 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)

試料および実験方法

1. 試料

酵素抽出の試料には前報¹²⁾と同様水稲うるち「ニホンバレ」玄米の胚芽を用いた。

2. 粗酵素液の調製

粗酵素液は前報⁹⁾に準じ、脱脂胚芽（ヘキサシ）に 10 倍量の 10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.0, 1 mM CaCl_2) を加え、酵素を抽出 (P-1) し、これを硫酸塩析 (60% 飽和) して粗酵素液 (P-2) とした。

3. 基質

基質のホスファチジン酸は、ホスファチジルコリンにホスホリパーゼ D を作用させ調製した¹³⁾。すなわち、前報⁷⁾に準じ卵黄より精製したホスファチジルコリン 1 g にエチルエーテル 7.5 ml, 1 M 塩化カルシウム 3.75 ml, 0.2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) およびキャベツ葉より調製したホスホリパーゼ D 溶液を加え、30°C, 20 時間反応させた。0.5 M EDTA 溶液 5 ml を加え反応を停止させ後、クロロホルム:メタノール混液 (2:1 v/v) 50 ml およびクロロホルム 50 ml にて反応生成物を抽出した。この抽出液を中和後、減圧濃縮しホスファチジン酸を得た。

なお、得られたホスファチジン酸はケイ酸薄層クロマトグラフィーにて単一スポットであることを確認し、実験に供した。

4. 酵素活性の測定

酵素活性は、反応によって遊離するリンを PENNY の色素結合法¹⁴⁾により測定して算出した。

すなわち、酵素液 0.1 ml, 20 mM 3,3'-ジメチルグルタル酸緩衝液 (pH 5.0) 0.2 ml, 0.1 M 塩化カルシウム 0.1 ml および蒸留水 0.5 ml をスピットグラスに採り、37°C にて 5 分間予備加熱後 10 mM ホスファチジン酸乳化基質 0.1 ml を加え、同温度にて 1 時間反応させた後、この反応液 0.2 ml に 2.5 N 塩酸、2.6% モリブデン酸 (1:1 v/v) 混液 1.8 ml を加え、反応を停止させた。さらにこの溶液に蒸留水 0.5 ml および 0.125% マラカイトグリーン溶液 0.05 ml を添加し、遊離したリン量を比色定量 (650 nm) した。なお、活性単位 (Unit) は 1 分間に 1 μmol のリンを遊離する力価を 1 単位とした。

5. デシルアミン・セファロースゲルの調製

ゲルの調製は前報¹²⁾に従い、臭化シアン活性化セファロース 4B にデシルアミンを結合させた。なお、リガンド量は未反応のデシルアミン量を TNBS 法¹⁵⁾にて

測定し求めた結果、18 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ gel であった。

6. クロマトフォーカシング

ポリバッファー交換体 (PEB 94) およびポリバッファー (Polybuffer 74) を用い、クロマトグラフィーを行った。

すなわち、PEB 94 を 0.025 M ヒスチジン・塩酸緩衝液 (pH 6.2) にて緩衝化させた後、カラム (1.2×13.5 cm) に充填し、これに酵素液 (pH 6.2) を添加した。溶出は Polybuffer 74・塩酸 (pH 4.0) 150 ml にて 40 ml/h の流速で行い、溶出液を 2 ml ずつ分取した。

7. 等電点電気泳動

pH 3.5~10.0 のキャリーアノライトを用い、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、泳動終了後内容液を 2 ml ずつ分取した。

8. 分子量の測定

前法³⁾と同様、標準タンパク質として Ferritin (分子量 450 000), Catalase (240 000), Aldolase (158 000), Albumin (bovine serum, 68 000) を用い、TOYO-PEARL HW-55 F によるゲルろ過にて分子量を測定した。

9. タンパク質の定量

HARTREE の方法¹⁶⁾にて行った。

実験結果および考察

1. 米糠 PAPase の精製

粗酵素液 (P-2) をデシルアミン・セファロースカラム (2.0×17.5 cm, pH 7.0) に添加し、10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.0, 1 mM CaCl_2) 200 ml, 1.5 M 塩化ナトリウム溶液 150 ml および 0.5% β -サイクロデキストリン (β -CD) 溶液 200 ml を流下させた後、1.5 M 塩化ナトリウム存在下において β -CD 濃度 0~0.6 % のグラジエント溶出 (300 ml) を行った。溶出液は 5 ml ずつ分取し、酵素活性およびタンパク質濃度 (280 nm 吸収) を測定した。

その結果 (Fig. 1), PAPase はゲルに吸着され、 β -CD グラジエント画分 (0.2~0.3%, 1.5 M NaCl) に溶出されたので、この活性画分を P-3 画分とした。次にこの P-3 画分について上記緩衝液にて十分透析後、DEAE-セルロースによる精製を行った。

すなわち、DEAE-セルロースカラム (2.1×15.0 cm) に P-3 画分を添加し、10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.0) 150 ml を流下させて未吸着タンパク質を除去した後、塩化ナトリウム濃度 0~0.5 M のグラジエ

ト溶出 (3 ml 宛分取) を行った。PAPase 活性は 0.2 M NaCl 付近に溶出され、この活性画分を P-4 画分とし、脱塩後さらに TOYOPEARL HW-55 F によるゲ

Fig. 1 Hydrophobic affinity chromatography of rice bran phosphatidate phosphatase on decylamine-Sepharose

The enzyme solution (P-1) was applied to decylamine-Sepharose column (2.0×17.5 cm, ligand concentration at $18 \mu\text{mol/ml}$ gel) previously equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0, 1 mM CaCl_2). The column was washed with the same buffer (200 ml), and the same buffer containing 1.5 M NaCl (150 ml) or 0.5% β -cyclodextrine (β -CD, 200 ml). Then the enzyme was eluted with a linear gradient of 0 to 0.6% β -CD in the same buffer containing 1.5 M NaCl. ----, protein; ●—●, phosphatidate phosphatase activity; —, β -CD

ルろ過を行った。その結果、PAPase 活性はフラクションナンバー 30 付近に溶出されたので、この画分を P-5 画分とした。本画分について、さらにクロマトフォーカシングによる精製を試みた結果、Fig. 2 に示したように PAPase 活性は pH 5.3 付近に単一ピークとして溶出され、これを P-6 画分とした。P-6 画分について Disc-PAGE によるタンパク質純度の検定は行ななかったが Table 1 に示したように本画分は抽出液に比べ活性が 222 倍に上昇したので、本画分を精製酵素画分とし、以下性状を検討した。

Fig. 2 Chromatofocusing of rice bran phosphatidate phosphatase

The enzyme fraction (P-5) was applied on Polyexchanger (PBE 94) column (1.2×13.5 cm) previously equilibrated with 0.025 M histidine-HCl buffer (pH 6.2), and then the enzyme was eluted with Polybuffer 74-HCl (pH 4.0). ----, protein; ●—●, phosphatidate phosphatase; —, pH

Table 1 Summary of purification steps of phosphatidate phosphatase from rice bran

Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Extract (P-1)*	3690	23.2	0.0063	1.0	100
Crude enzyme (P-2) (Ammonium sulfate precipitation)	935	11.3	0.012	1.9	48.9
C_{10} -Sepharose chromatography (P-3)	44.5	5.9	0.133	21.1	25.2
DEAE-cellulose chromatography (P-4)	10.3	4.3	0.418	66.3	18.9
Gel filtration (P-5)	1.6	1.5	0.938	149	6.5
Chromatofocusing (P-6)	0.86	1.2	1.40	222	5.2

* Rice germ (200 g) was used.

なお、P-6 画分の活性回収率は 5.2% であった。

2. 米糠 PAPase の性状

(1) pH の影響

3,3'-ジメチルグルタル酸緩衝液 (pH 4.0~7.0), トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.0~9.0) およびホウ酸緩衝液 (pH 9.0~11.0) 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 にて活性を測定したところ、至適 pH 5.0 を示し、ラット肝臓 (pH 7.4~7.6)¹⁷⁾ および、酵母 (pH 7.0~8.0)¹⁹⁾ PAPase とは大きく異なっていた。また、各 pH に調整した酵素液を 30℃ にて 30 分間置いた後、残存する活性を測定したところ、活性は pH 3.0~8.0 で安定であった。

(2) 温度の影響

各温度にて活性を測定し、最適温度を求めた。また、酵素液を各温度で 30 分間置いた後、残存する活性を測定し、温度安定性を求めた。その結果は Fig. 4 に示したように、60℃ にて最大活性を示し、また 40℃ 以下でその活性は安定であった。

(3) カルシウム濃度の影響

一般に脂質分解酵素の活性には、カルシウム濃度が大

きく影響することが知られている。そこで、PAPase 活性に対するカルシウムの影響について検討を行った。その結果、PAPase はカルシウム濃度 10 mM で最大活性を示し、無添加の活性に比べ約 1.6 倍に賦活された。

Fig. 4 Effects of temperature on rice bran phosphatidate phosphatase

Optimum activity (○—○): the reaction was carried out at various temperatures for 60 min and the activity was expressed as percentage of the maximum activity. Heat stability (●—●): the enzyme was incubated at various temperatures for 30 min and the remaining activity was expressed as percentage of the initial activity.

Fig. 3 Effects of pH on rice bran phosphatidate phosphatase

Buffer solutions used were 0.1 M dimethylglutarate-NaOH (pH 3.0~7.0), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0~9.0) and 0.1 M borate-NaOH (pH 9.0~11.0). Optimum activity (○—○): the reaction was carried out at 37°C for 60 min at each pH and the activity expressed as percentage of the maximum activity. pH stability (●—●): the enzyme was incubated at various pH at 30°C for 30 min and the remaining activity was plotted as percentage of initial activity.

Table 2 Effect of various reagents on rice bran phosphatidate phosphatase activity

Chemicals (1 mM)	Relative activity (%)
Control	100
Al ³⁺	46
Co ²⁺	50
Ni ²⁺	0
Mg ²⁺	0
Cu ²⁺	49
Fe ²⁺	40
EDTA	65
PCMB*	23
CH ₂ ICOOH	67

* *p*-chloromercuribenzoic acid

The rice bran phosphatidate phosphatase was incubated with various reagents (1 mM) at 30°C for 30 min. The remaining activity was expressed as percentage of the control.

(4) 各種試薬の影響

酵素液に対し各種試薬を 1 mM となるように添加し、30℃ にて 30 分間置いた後、残存活性を測定した。Table 2 に示したように、活性は Ni^{2+} , Mg^{2+} によって著しく阻害された。動物起源の PAPase では活性発現に Mg^{2+} が必須とされているが、米糠中の PAPase は Mg^{2+} によって活性が著しく阻害され、動物起源の酵素^{17)~19)} と大きな相違が見られた。また、PCMB によっても約 80% の活性低下が見られ、活性発現に SH 基が関与することが推察された。なお、EDTA およびモノヨード酢酸によっても約 40% の活性阻害が認められた。

(5) 分子量

ゲルろ過法にて分子量の測定を行った結果、PAPase の分子量は約 280 000 であり、米糠中の他のホスホリパーゼ^{30)~5)} および酵母 PAPase¹⁹⁾ に比べ、大きな値であった。

(6) 等電点

等電点電気泳動にて PAPase の等電点を測定した結果、本酵素の等電点は 5.3 であった。

(7) Km 値

PAPase の反応速度と基質（ホスファチジン酸）濃度との関係について LINEWEAVER-BURK プロットを行ったところ、本酵素の Km 値は $1.25 \times 10^{-3} \text{M}$ と推定され、ラット肝臓¹⁷⁾ および酵母¹⁹⁾ PAPase の $0.05 \times 10^{-3} \text{M}$ に比べ大きな値であった。

しかし、この値は米糠ホスホリパーゼ D のホスファチジルコリンに対する Km 値 $7.14 \times 10^{-3} \text{M}$ ⁴⁾ に比べて小さく、このことから米糠中にホスファチジン酸の蓄積が認められない原因は、ホスホリパーゼ D によって生成したホスファチジン酸が本酵素によって速やかにジアシルグリセロールへと分解されるためと考えられた。

要 約

米糠ホスファチジン酸ホスファターゼ (PAPase) を分離・精製し、その性状を明らかにした。

(1) 米糠 PAPase を疎水性アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過およびクロマトフォーカシングによって精製した結果、その比活性は抽出液に比べ 222 倍に上昇した。

(2) 米糠 PAPase は pH 5.0, 60℃ で最大活性を示し、その活性は pH 3.0~8.0 および 40℃ 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試験したところ、 Ni^{2+} , Mg^{2+} および PCMB によって大きく活

性が低下した。

(3) ゲルろ過法にて分子量を測定したところ、本酵素の分子量は約 280 000 と推定され、その等電点は 5.3 であった。

(4) 米糠 PAPase の反応速度と基質濃度との関係について検討した結果、Km 値は $1.25 \times 10^{-3} \text{M}$ と推定された。

実験に御協力いただいた安東洋一君に感謝致します。

文 献

- 1) 青柳吉紀・高野克己・鴨居郁三・小原哲二郎：東農大農学集報, 30, 107 (1985).
- 2) 青柳吉紀・高野克己・鴨居郁三・小原哲二郎：東農大農学集報, 30, 119 (1985).
- 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) 高野克己・鴨居郁三・小原哲二郎：日食工誌, 34, 77 (1987).
- 6) 高野克己・鴨居郁三・小原哲二郎：日食工誌, 36, 468 (1989).
- 7) 高野克己・鴨居郁三・小原哲二郎：日食工誌, 33, 310 (1986).
- 8) KATES M.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, 33, 575 (1955).
- 9) SCHERER G.F.E. and MORRER J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84, 238 (1978).
- 10) GARDINER S.E. and ROUGHAN P.G.: *Biochem. J.*, 210, 949 (1983).
- 11) ALBAN G., JOYARD J. and DOUCE R.: *Biochem. J.*, 259, 775 (1989).
- 12) 高野克己・鴨居郁三・小原哲二郎：日食工誌, 33, 501 (1986).
- 13) 日本生化学会編：生化学実験講座 3 脂質の化学 (東京化学同人, 東京), p. 289 (1974).
- 14) PENNY C.L.: *Anal. Biochem.*, 75, 201 (1976).
- 15) 奥山典生・笠井久隆：蛋白質・核酸・酵素, 18, 1153 (1973).
- 16) HARTREE, E.F.: *Anal. Biochem.*, 48, 422 (1972).
- 17) HOSAKA K., YAMASHITA S. and NUMA S.: *J. Biochem.*, 77, 501 (1975).
- 18) BUTTEWITH S.C., HOPEWELL R. and BRINDLEY D.N.: *Biochem. J.*, 220, 825 (1984).
- 19) HOSAKA K. and YAMASHITA S.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 796, 102 (1984).

(平成元年 8 月 11 日受理)