ニチリンヒトデ幽門盲のうホスホリパーゼ A₂ 様酵素の精製と性質

岸村 栄毅, 林 賢治

(1996 年 11 月 27 日受付)

Purification and Properties of Phospholipase A₂-like Enzyme
from the Pyloric Caeca of the Starfish *Solaster paxillatus*

Hideki Kishimura* and Kenji Hayashi*

Phospholipase A₂-like enzyme was purified from the crude extracts of the pyloric caeca of the starfish *Solaster paxillatus* by heat treatment followed by gel filtration on a Sephacryl S-200, preparative polyacrylamide gel electrophoresis, and gel filtration on a Sephadex G-50.

The final phospholipase A₂-like enzyme preparation was nearly homogeneous in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and its molecular weight was estimated to be approximately 13,000. The enzyme mainly released oleic acid from 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine. For hydrolysis of egg yolk phosphatidylcholine, the optimum pH and temperature of this enzyme were in the range of pH 9-10 and 30-40°C, respectively, and the enzyme was activated by Ca²⁺. Starfish phospholipase A₂-like enzyme as well as porcine pancreatic phospholipase A₂ did not show the fatty acid specificity for hydrolysis of phosphatidylcholine prepared from scallop adductor muscle.

キーワード: ホスホリパーゼ A₂ 様酵素, 幽門盲のう, ニチリンヒトデ

ホスホリパーゼ (PLase) A₂ [EC 3.1.1.4] は, 1, 2-ジアシル-*sn*-グリセロ-3-リン脂質の *sn*-2 位脂肪酸を特異的に加水分解する酵素である。PLase A₂ は哺乳動物膵臓由来のものが最も古くから研究されており, 現在までに数種の哺乳動物から PLase A₂ が精製されている。¹⁻⁴⁾ 哺乳動物膵臓の PLase A₂ はその活性発現に Ca²⁺ を必要とし, 最適 pH を 9.0 付近に示す分子量約 14,000 の単量体であり, また, 分子内ジスルフィド結合の 1 つを Cys11 と Cys77 の間に有することを特徴とする。⁵⁾

一方, 海産無脊椎動物の消化腺由来の PLase A₂ に関する研究は少なく, わずかにイトマキヒトデ *Asterina pectinifera* の PLase A₂ について報告されているにすぎない。長谷川と佐々木⁶⁾ および Okabe and Noma⁷⁾ は, イトマキヒトデの凍結および新鮮な幽門盲のうでは PLase A₂ 活性が高く, また PLase A₁, リゾ PLase およびリパーゼ活性は低いことを見いだした。部分精製されたイトマキヒトデ幽門盲のうの PLase A₂ は, 最適 pH, Ca²⁺ 要求性および熱安定性において哺乳動物膵臓 PLase A₂ と類似していた。⁸⁾ しかしながら, その分子量

は SDS-PAGE 法により 40,000, ゲルろ過法により 72,000 と測定され, 哺乳動物膵臓 PLase A₂ の分子量と異なっていた。⁸⁾

本研究では, ヒトデ類の PLase A₂ の生化学的特性を解明するために, ニチリンヒトデ *Solaster paxillatus* の幽門盲のうから PLase A₂ の精製を試み, またその 2, 3 の性質を調べた。

実験方法

試料 ニチリンヒトデ *S. paxillatus* は 1996 年 1-3 月に函館沖で捕獲され, 分析まで -20°C で凍結保存した。ホタテガイ *Patinopecten yessoensis* は 1996 年 1 月に噴火湾で捕獲され, 分析まで -35°C で凍結保存した。

アセトンパウダーの調製 ニチリンヒトデ幽門盲のうのアセトンパウダーの調製は前報⁹⁾と同様に行った。

粗酵素液の調製 アセトンパウダーに 50 倍容量の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を加え, 4°C で 3 時間酵素を抽出した。この溶液を 10,000 × g で 10 分間遠心分離し, 上清を凍結乾燥により濃縮した。次に, この濃縮液を pH 4.0 に調整し, 70°C で 3 分間加熱した。加

* 北海道大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan).

熱終了後ただちに溶液を冷却し、生じた沈殿を遠心分離 (10,000×g, 10 分間) により除去した。得られた上清は pH 8.0 に調整し、これを粗酵素液とした。

脂質の抽出および分析 脂質の抽出および脂質成分の薄層クロマトグラフィー (TLC), 分取 TLC, TLC-FID 法およびガスクロマトグラフィー (GLC) による分析は前報^{10,11)}と同様に行った。

酵素活性の測定 基質には卵黄由来のホスファチジルコリン (PC, 和光純薬工業) を用いた。10 μ l (100 μ g) の基質 {ベンゼン-エタノール (1:1, v/v) に溶解} を分注した試験管に CaCl₂, デオキシコール酸ナトリウムおよび Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) を、それぞれ終濃度が 5 mM, 2.7 mM および 50 mM となるように加えて容量を 100 μ l とした。この溶液に 30 μ l の酵素溶液を添加して酵素反応を開始し、37°C で 30 分間または 3 時間反応を行った。酵素反応は 0.65 ml のクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) を添加することにより停止し、クロロホルム層に回収された基質分解物の成分組成を TLC または TLC-FID {展開溶媒: クロロホルム-メタノール-酢酸-水 (55:17:6.5:2.5, v/v/v/v)} により分析した。活性の単位は 1 分間に 1 μ g の基質を加水分解する活性を 1 ユニットとした。

酵素の基質位置特異性の分析 1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (フナコシ) をニチリンヒトデ精製酵素で加水分解した後、基質加水分解物から遊離脂肪酸を分取 TLC {展開溶媒: ヘキサン-ジエチルエーテル-酢酸 (85:15:1, v/v/v)} により分画し、その組成を GLC により分析した。また、比較のためブタ膵臓由来 PLase A₂ (ブタ PLase A₂, 天野製薬) を用いて同様の分析を行った。

酵素の基質脂肪酸特異性の分析 ホタテガイ貝柱から調製した PC をニチリンヒトデ精製酵素またはブタ PLase A₂ で約 50% 加水分解した後、基質加水分解物中の遊離脂肪酸の組成を GLC により分析した。ホタテガイ貝柱 PC の sn-2 位に結合する脂肪酸の組成は、ホタテガイ貝柱 PC をブタ PLase A₂ で完全に加水分解することにより分析した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 1) 調製用電気泳動は pH 8.9 の 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。¹²⁾ 試料を上端から約 4 cm まで泳動後、ゲルを 5 mm の等間隔に切断し、得られた 8 つのゲル断片をそれぞれ試験管に分取した。それぞれの試験管に 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を加えてタンパク質を溶出後、溶出液を凍結乾燥により一定容量に濃縮した。上端のゲル断片から抽出された試料溶液を B1 画分とし、下端に向かって順に B1-B8 画分とした。

2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-

PAGE) は、0.1% SDS を含む 20% ポリアクリルアミドスラブゲルを用いて Fling and Gregerson の方法¹³⁾に準じて行った。ゲルの染色には Coomassie Brilliant Blue R-250 を用いた。分子量マーカーには牛乳 β -ラクトグロブリン (Sigma Chemical Co.), 卵白リゾチーム (Sigma Chemical Co.) および α -ブナガロトキシニン (和光純薬工業) を用いた。

タンパク質の定量 タンパク質の定量は、牛血清アルブミンを標準タンパク質として Lowry *et al.* の方法¹⁴⁾に

Fig. 1. Gel filtration of the crude enzyme solution prepared from the pyloric caeca of the starfish *S. paxillatus* on Sephacryl S-200.

The crude enzyme solution was applied on a column (3.9×44 cm) of Sephacryl S-200 equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and eluted with the same buffer at a flow rate of 27 ml/h. Each 2.7 ml fraction was collected. The solid line in the lower panel indicates absorbance at 280 nm and thin-layer chromatograms (upper panel) show the reaction products after incubation of egg yolk phosphatidylcholine with A1-A6 fractions. Abbreviations: PC, phosphatidylcholine; LPC, lysophosphatidylcholine; O, origin; F, front.

準じて行った。

結 果

酵素の精製 ニチリンヒトデ幽門盲のうから調製した粗酵素液をセファクリルS-200によるゲルろ過に供した。すなわち、あらかじめ50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)で平衡化したカラム(3.9×44 cm)に粗酵素液を添加し、同溶液でタンパク質を溶出した(Fig. 1)。Fig. 1に示すように、カラム溶出液をA1-A6の6画分に分画し、凍結乾燥により一定容量に濃縮した後、それぞれの画分中のPC分解活性を測定した。その結果、主要な活性はA2およびA3画分に認められ、遊離したLPCが強く検出された。この両活性画分のタンパク質組成をSDS-PAGEにより検討したところ、A3画分の組成がより単純であった(データは示さず)。そこで、A3画分について以後の精製を行った。A3画分を調製用電気泳動に供し、B1-B8の8画分を得た。それぞれの画分中のPC分解活性を測定したところ、Fig. 2に示すようにB3およびB4画分に主要な活性が認められた。これら両活性画分を合一し、セファデックスG-50によるゲルろ過に供した。あらかじめ10 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)で平衡化したカラム(3.9×70 cm)に活性画分を添加し、同溶液でタンパク質を溶出した(Fig. 3)。Fig. 3に示すように、カラム溶出液をC1-C10の10画分に分画し、これらを一定容量に濃縮後、それぞれの画分中のPC分解活性を測定した。その結果、C4画分に最も高い活性が認められた(Fig. 3)。この画分のタンパク質組成をSDS-PAGEにより分析した

Fig. 2. Thin-layer chromatograms of the reaction products after incubation of egg yolk phosphatidylcholine with B1-B8 fractions obtained from the preparative electrophoresis.

The abbreviations are the same as the legends of Fig. 1.

Fig. 3. Gel filtration of the active fractions (B3 and B4) obtained by the preparative electrophoresis on Sephadex G-50.

The active fractions were applied on a column (3.9×70 cm) of Sephadex G-50 equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and eluted with the same buffer at a flow rate of 19 ml/h. Each 2.5 ml fraction was collected. The solid line in the lower panel indicates absorbance at 230 nm and thin-layer chromatograms (upper panel) show the reaction products after incubation of egg yolk phosphatidylcholine with C1-C10 fractions. The abbreviations are the same as the legends of Fig. 1.

ところほぼ単一のバンドが検出された(Fig. 4)。そこでこのC4画分を精製酵素とした。

本酵素の精製過程の一例をTable 1に示す。幽門盲のうから調製した粗酵素液に対して、本酵素の比活性は130倍となり、活性回収率は5%であった(Table 1)。

酵素の性質 本酵素により1-パルミトイル-2-オレイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリンを加水分解し、その遊離脂肪酸の組成を分析した。その結果、ブタPLase A₂の場合と同様に、オレイン酸が主要成分(82.8%)

Table 1. Purification of starfish phospholipase A₂-like enzyme

Purification step	Fraction	Protein (mg)	Total activity (units) ^{*1}	Specific activity (units/mg)	Purity (fold)	Yield (%)
Crude enzyme solution		1175	264	0.2	1	100
Gel filtration on Sephacryl S-200	A3 ^{*2}	176	97.9	0.6	3	37
Gel filtration on Sephadex G-50	C4 ^{*3}	0.53	13.8	26.0	130	5

^{*1} A unit of activity was defined as μ g of phosphatidylcholines hydrolyzed per min.^{*2} A3 fraction in Fig. 1.^{*3} C4 fraction in Fig. 3. This fraction was obtained the gel filtration of B3 and B4 fractions in Fig. 2.**Table 2.** Composition of fatty acids released from 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine by starfish phospholipase A₂-like enzyme (%)^{*}

Fatty acid	Starfish enzyme	Porcine enzyme
16:0	17.2	15.4
18:1n-9	82.8	84.6

^{*} Data are expressed as weight percentage of total fatty acids.**Table 3.** Effects of metal ions and EDTA on the activity of starfish phospholipase A₂-like enzyme

Compounds	Final concentration (mM)	Relative activity (%)
CaCl ₂	10	100
MgCl ₂	10	80
CoCl ₂	10	28
ZnCl ₂	10	2
HgCl ₂	10	2
EDTA	10	3

であった (Table 2)。

本酵素の分子量は SDS-PAGE の移動度から約 13,000 と推定された (Fig. 4)。本酵素の卵黄 PC に対する活性の最適 pH は pH 9-10 の範囲にあり (Fig. 5a), また, 最適温度は 30-40°C の範囲にあった (Fig. 5b)。

本酵素の活性を 10 mM MgCl₂ を添加して測定したところ, 10 mM CaCl₂ を添加した場合の 80% に低下したが, 10 mM CoCl₂ を添加した場合は 28% に, 10 mM ZnCl₂ および HgCl₂ を添加した場合はいずれも 2% にまで低下した (Table 3)。一方, 本酵素の活性を 10 mM EDTA を添加して測定したところ, 10 mM CaCl₂ を

Table 4. Composition of fatty acids released from scallop PC^{*1} by starfish phospholipase A₂-like enzyme

Fatty acid	Partial hydrolysis ^{*3}		Complete hydrolysis ^{*4}
	Starfish enzyme	Porcine enzyme	Porcine enzyme
14:0	1.7	1.6	2.5
15:0	0.6	0.6	0.8
I 16:0	0.3	0.3	0.3
16:0	5.1	4.6	4.9
16:1n-9	0.8	0.7	0.9
16:1n-7	1.6	3.6	2.7
18:0	0.7	0.6	0.4
18:1n-9	3.6	8.0	4.8
18:1n-7	2.6	2.2	3.0
18:2n-6	0.7	1.8	1.0
18:3n-3	0.4	0.7	0.5
18:4n-3	1.4	0.6	1.7
20:1n-11	0.3	0.3	0.3
20:4n-6	2.7	2.8	4.5
20:5n-3	42.0	45.8	39.9
21:5n-3	1.2	0.6	1.9
22:5n-6	2.6	2.4	1.4
22:5n-3	0.9	1.3	1.9
22:6n-3	30.8	21.5	26.6

^{*1} Phosphatidylcholine (PC) isolated from scallop adductor muscle.^{*2} Data are expressed as weight percentage of total fatty acids.^{*3} Scallop PC was partially hydrolyzed by phospholipase A₂-like enzyme from the starfish *S. paxillatus* (45.6% hydrolysis) or porcine pancreatic phospholipase A₂ (48.4%).^{*4} Scallop PC was completely hydrolyzed by porcine pancreatic phospholipase A₂.

I : iso.

Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of starfish phospholipase A_2 -like enzyme.

Electrophoresis was performed using a 0.1% SDS-20% polyacrylamide slab gel. Lane 1 contains protein standards; α -bungarotoxin (molecular weight: 7,980), lysozyme (14,300), β -lactoglobulin (18,400). Lane 2 contains phospholipase A_2 -like enzyme from the starfish *S. paxillatus*.

添加した場合の3%に低下した (Table 3)。

本酵素によりホタテガイ貝柱PCを約50%加水分解した場合の遊離脂肪酸の組成を分析した。その組成パターンは、ブタ臍臓由来PLase A_2 でホタテガイ貝柱PCを約50%加水分解した場合の遊離脂肪酸のそれとはほぼ一致した (Table 4)。

考 察

本研究ではニチリンヒトデ *S. paxillatus* の幽門盲のうから卵黄およびホタテガイPCを加水分解する酵素を精製した。酵素の精製過程においてpH 4.0, 70°Cで3分間の加熱処理を行ったが、本酵素の活性はこの加熱処理に対して安定であった。一方、ヒトデ類の幽門盲の中には種々のプロテアーゼが存在するが、¹⁵⁾ 加熱処理後の粗酵素液中にプロテアーゼ活性は検出されなかった。

最終的に精製された酵素はSDS-PAGEにおいてほぼ単一な成分を示した。また、本酵素中にはオリーブ油分解活性は検出されず、リパーゼ様酵素は含まれないことが確認された。精製された酵素はSDS-PAGEの移動度から分子量約13,000と推定された。また、1-パルミトイル-2-オレオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリンから主にオレイン酸を遊離させたことより、本酵素は*sn*-2位脂肪酸を選択的に加水分解するPLase A_2 様酵素であった。さらに、本酵素はアルカリ性域に最適pHを有し、また、 Ca^{2+} により賦活された。本酵素のこれらの性質

Fig. 5. Effects of pH and temperature on the activity of starfish phospholipase A_2 -like enzyme.

a: The activities were determined in 50 mM buffer solutions [acetic acid-sodium acetate (pH 4.0-7.0), Tris-HCl (pH 7.0-9.0), and glycine-NaOH (pH 9.0-11.0)] at 37°C.

b: The activities were determined at pH 8.5 and at various temperatures.

は哺乳動物膵臓由来の PLase A₂ のもの⁵⁾と同様であった。

水産動物の消化腺由来の PLase A₂ は、イトマキヒトデ⁸⁾の他にマダイ *Pagrus major* 肝膵臓¹⁶⁾から精製されている。本研究の PLase A₂ 様酵素は、熱安定性および Ca²⁺ 要求性において、イトマキヒトデ⁸⁾およびマダイ¹⁶⁾の PLase A₂ と類似していた。また、本酵素はイトマキヒトデ⁸⁾およびマダイ¹⁶⁾の PLase A₂ と同様に、Zn²⁺ および Hg²⁺ の重金属イオンによって失活した。本酵素の最適温度 (30–40°C) は、イトマキヒトデの PLase A₂ (最適温度: 37°C)⁸⁾とほぼ同様であった。また、本酵素の最適 pH (pH 9–10, 基質: PC) は、イトマキヒトデの PLase A₂ (最適 pH: pH 9.0, 基質: PC)⁸⁾とほぼ同様の結果を示したが、マダイ肝膵臓 PLase A₂ (最適 pH: pH 8.0, 基質: ホスファチジルエタノールアミン)¹⁶⁾とは若干相違した。一方、本酵素の分子量 (約 13,000) は、イトマキヒトデ (分子量: 40,000)⁸⁾およびマダイ (分子量: 20,000)¹⁶⁾のそれと相違した。

ホタテガイ貝柱 PC 加水分解において、ニチリンヒトデ幽门盲の由来の PLase A₂ 様酵素は基質 sn-2 位に結合する脂肪酸をその鎖長や二重結合数によらず非特異的に加水分解し、ブタ PLase A₂ と同様の性質を示した。

文 献

- 1) W. Nieuwenhuizen, H. Kunze, and G. H. de Haas: Phospholipase A₂ (phosphatide acylhydrolase, EC 3.1.1.4) from porcine pancreas. *Methods Enzymol.*, **32B**, 147–154 (1974).
- 2) C. E. Dutilh, P. J. van Doren, F. E. A. M. Verheul, and G. H. de Haas: Isolation and properties of phospholipase A₂ from ox and sheep pancreas. *Eur. J. Biochem.*, **53**, 91–97 (1975).
- 3) A. Evenberg, H. Meyer, H. M. Verheij, and G. H. de Haas: Isolation and properties of phospholipase A₂ and phospholipase A₃ from horse pancreas and horse pancreatic juice. *Biochim. Biophys. Acta*, **491**, 265–274 (1977).
- 4) T. Ono, H. Tojo, K. Inoue, H. Kagamiyama, T. Yamano, and M. Okamoto: Rat pancreatic phospholipase A₂: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J. Biochem.*, **96**, 785–792 (1984).
- 5) 岡本光弘, 東城博雅: 膵臓, その他の消化器および膵臓由来ホスホリパーゼ A₂ の構造と機能. 蛋白質 核酸 酵素, **36**, 316–324 (1991).
- 6) 長谷川洋子, 佐々木禎一: ヒトデ内臓脂質に関する研究第2報 ヒトデ内臓の phospholipase A 活性の検討. 札幌医誌, **40**, 1–6 (1972).
- 7) H. Okabe and A. Noma: Studies on the phospholipase A₂ in pyloric caeca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Tohoku J. Exp. Med.*, **110**, 263–271 (1973).
- 8) H. Okabe, A. Noma, and K. Ohno: Partial purification and properties of phospholipase A₂ from the starfish *Asterina pectinifera*. *Biochim. Biophys. Acta*, **398**, 149–158 (1975).
- 9) 岸村栄親, 林 賢治: ヒトデ *Asterias amurensis* からトリブシン様酵素の精製とその性質. 日本誌, **55**, 1415–1420 (1989).
- 10) K. Hayashi: Occurrence of diacyl glyceryl ethers in liver lipids of gonatid squid *Gonatopsis borealis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 1383–1387 (1989).
- 11) K. Hayashi and H. Kishimura: Preparation and purification of DHA-enriched triacylglycerols from fish oils by column chromatography. *Fisheries Sci.*, **62**, 842–843 (1996).
- 12) 宮崎 香, 萩原秀昭: ゲルディスク電気泳動法. 「蛋白質・酵素の基礎実験法」(堀尾武一, 山下仁平編), 南江堂, 東京, 1987, pp. 282–301.
- 13) S. P. Fling and D. S. Gregerson: Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity Tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.*, **155**, 83–88 (1986).
- 14) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–273 (1951).
- 15) 岸村栄親, 林 賢治: ヒトデ類のプロテアーゼ活性. 日本誌, **55**, 843–846 (1989).
- 16) N. Iijima, M. Nakamura, K. Uematsu, and M. Kayama: Partial purification and characterization of phospholipase A₂ from the hepatopancreas of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1331–1339 (1990).