ヤツデヒトデ幽門盲のうホスホリパーゼ A₂ の部分精製と性質

小山 法 希,¹ 岸村 栄 毅,^{1*} 林 賢 治,¹ 藤田 大 介²

(2000 年 10 月 18 日受付, 2001 年 2 月 2 日受理)

¹北海道大学大学院水産科学研究科, ²富山県立水産試験場

Partial Purification and Properties of Phospholipase A₂ from the Pyloric Ceca of Starfish *Coscinasterias acutispina*

Noriki Koyama,¹ Hideki Kishimura,^{1*} Kenji Hayashi,¹ Daisuke Fujita²

¹Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hokkaido 041-8611, ²Toyama Prefectural Fisheries Experimental Station, Toyama 936-8536, Japan

Phospholipase A₂ (PLA₂) was partially purified from the pyloric ceca of starfish *Coscinasterias acutispina* by gel filtration on Sephacryl S-200, DEAE-cellulose anion exchange chromatography, and gel filtration on Sephadex G-50. The final enzyme preparation was mainly released oleic acid from 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine. The partially purified PLA₂ from the pyloric ceca of *C. acutispina* as well as porcine pancreatic PLA₂ did not show the fatty acid specificity for hydrolysis of egg yolk and soybean phosphatidylcholines. For hydrolysis of egg yolk phosphatidylcholine, the optimum pH and temperature of the partially purified PLA₂ were in the range of pH 10-11 and 50-60°C, respectively, and the activity was enhanced by 1 mM or higher concentration of Ca²⁺. The partially purified PLA₂ from the pyloric ceca of *C. acutispina*, however, hydrolyzed phosphatidylcholine more effectively than phosphatidylethanolamine, unlike porcine pancreatic PLA₂.

キーワード：ホスホリパーゼ A₂, 部分精製, 基質特異性, ヤツデヒトデ, 幽門盲のう

ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) [EC 3.1.1.4] は, 1,2-ジアシル型グリセロリン脂質の *sn*-2 位の脂肪酸エステルを特異的に加水分解する酵素であり, は乳動物すい臓の PLA₂ が古くからよく研究されている。¹⁻⁴⁾ は乳動物すい臓 PLA₂ は分子量約 14,000 で, 分子内に 7 つのジスルフィド結合を有する安定なタンパク質である。また, その活性発現には 1 mM 以上の濃度の Ca²⁺ を必要とし, pH 9 付近に最適 pH を示す。⁵⁾

先に, 我々は北海道沿岸で採取されたヒトデ類 4 種 (イトマキヒトデ *Asterina pectinifera*, ニチリンヒトデ *Solaster paxillatus*, ニッポンヒトデ *Distolasterias nippon* およびヒトデ *Asterias amurensis*) の幽門盲のうから調製した粗酵素液中のホスホリパーゼ A (PLA) 活性を測定し, イトマキヒトデ幽門盲のうの PLA 活性が他 3 種のそれらに比べ著しく高値であることを見出した。⁶⁾ そこで, イトマキヒトデ幽門盲のうから PLA₂ を

精製したところ, 本酵素は pH 9.0 付近に最適 pH を有し, 1 mM 以上の Ca²⁺ 濃度により強く賦活され, また, 基質リン脂質の *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た。⁷⁾ イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ のこれらの性質は, は乳動物すい臓 PLA₂ のそれと同様であった。しかしながら, イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ はホスファチジルエタノールアミン (PE) に比べてホスファチジルコリン (PC) をよく分解し, 基質の極性基に対する特異性においてブタすい臓 PLA₂ と異なる性質を示した。⁷⁾

一方, 前報^{8,9)}において我々は, イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ の全アミノ酸配列を決定した。イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ は 137 アミノ酸残基から成り, その分子量は 15,300.1 と算出された。また, 本 PLA₂ は Cys-11 および pancreatic ループ様配列を有することからグループ I PLA₂⁵⁾ に属すると考えられた。しかし

* Tel : +81-138-40-5519, Fax : +81-138-40-5518, E-mail : kishi@fish.hokudai.ac.jp

ながら、本酵素は、ブタすい臓 PLA₂ のアミノ酸配列に比較して β -ウィングに相当する部位に 16 残基の挿入と 3 残基の欠損を有し、新たなタイプのグループ I PLA₂ に分類された。⁹⁾

前述のように、イトマキヒトデ幽門盲の PLA₂ はは乳動物すい臓 PLA₂ とは異なる機能性および構造特性を有した。そこで本研究では、イトマキヒトデ幽門盲の PLA₂ の有する特異な性質がヒトデ類に共通のものであるかを明らかにするため、比較的 PLA 活性の高いヤツデヒトデ *Coscina asterias acutispina* の幽門盲のうから PLA₂ を部分精製し、その基本的な酵素化学的性状を調べた。

実験方法

試料 ヤツデヒトデ *C. acutispina* は 1999 年 7 月に富山県沿岸で採取し、分析まで -20°C で凍結保存した。基質リン脂質の調製に用いたスルメイカ *Todarodes pacificus* は 1997 年 9 月に北海道函館沖で採取し、分析まで -20°C で凍結保存した。卵黄 PC および大豆 PC は和光純薬工業㈱より購入した。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 (POPC) は Avanti Polar Lipid 社より購入した。ブタすい臓 PLA₂ は、天野製薬㈱および Sigma 社より購入した。

クロロホルム-メタノール粉末および粗酵素の調製 ヤツデヒトデ幽門盲のうのクロロホルム-メタノール粉末および粗酵素の調製は、前報⁷⁾と同様に行った。

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-炎イオン化検出器 (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。大豆 PC およびスルメイカ外套筋脂質からの PC および PE の調製は、分取 TLC {展開溶媒: クロロホルム-メタノール-酢酸-水 (55:17:3:2, v/v/v/v)} により行った。

酵素活性の測定 卵黄 PC を基質に用いて前報⁷⁾と同様に行った。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 (U) とした。

酵素の基質位置特異性の分析 POPC を基質に用いて前報⁷⁾と同様に行った。

酵素の基質脂肪酸特異性の分析 卵黄 PC および大豆 PC を基質に用いて前報⁷⁾と同様に行った。比較のためブタすい臓 PLA₂ (天野製薬㈱) を用いて同様の分析を行った。

酵素の基質極性基特異性の分析 スルメイカ外套筋脂質から調製した PC および PE を基質に用いて前報⁷⁾と同様に行った。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 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 15% ポリアクリルアミドスラブゲルを用いて Laemmli の方法¹²⁾に準じて行った。ゲルの染色には Coomassie Brilliant Blue R-250 を用いた。

タンパク質の定量 タンパク質の定量は、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として Lowry *et al.* の方法¹³⁾に準じて行った。

結 果

ヤツデヒトデ幽門盲の PLA 活性 ヤツデヒトデ幽門盲のうのクロロホルム-メタノール粉末から調製した粗酵素液の PLA 活性の測定結果を、他 4 種のヒトデ類のそれらと比較して Table 1 に示す。ヤツデヒトデ幽門盲のうの PLA 活性値 (5,400 U/g パウダー) および比活性値 (17 U/mg) はイトマキヒトデ幽門盲のう (PLA 活性値: 540,000 U/g パウダー, 比活性値: 1,400 U/mg) に比べて著しく低かったが、ニチリンヒトデ、ニッポンヒトデおよびヒトデ幽門盲のう (PLA 活性値: 1,000-27 U/g パウダー, 比活性値: 12-0.5 U/mg) より高かった。

次に、ヤツデヒトデ粗酵素 PLA の基質位置特異性の分析を行った。その結果を Table 2 に示す。ヤツデヒトデ粗酵素 PLA は POPC から主に *sn*-2 位のオレイン酸

Table 1. Phospholipase A activity of the crude enzyme from the pyloric ceca of starfish

	Activity (U/g powder)*	Specific activity (U/mg)
<i>Coscina asterias acutispina</i>	5,400	17
<i>Asterina pectinifera</i> ⁶⁾	540,000	1,400
<i>Solaster paxillatus</i> ⁶⁾	1,000	12
<i>Distolasterias nippon</i> ⁶⁾	70	0.5
<i>Asterias amurensis</i> ⁶⁾	27	0.5

* A unit (U) of activity was determined as the number of micrograms of phosphatidylcholines hydrolyzed per minute.

Table 2. Composition of fatty acids released from 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine by crude enzyme and partially purified phospholipase A₂ (PLA₂) from the pyloric ceca of starfish *C. acutispina*

Fatty acid % ^{*1}	Starfish crude enzyme (PLA ^{*2})	Starfish partially purified PLA ₂	Porcine pancreatic PLA ₂ ^{*3}
16:0	18.5	16.0	15.4
18:1n-9	81.5	84.0	84.6

^{*1} Area % of total fatty acids.

^{*2} Phospholipase A.

^{*3} Phospholipase A₂ (Amano Pharmaceutical).

を遊離させ、PLA の主要成分が PLA₂ であると考えられた。そこでヤツデヒトデ粗酵素から PLA₂ の精製を試みた。

ヤツデヒトデ PLA₂ の部分精製 ヤツデヒトデ幽門盲のうから調製した粗酵素は、セファクリル S-200 によるゲルろ過に供した。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) に本粗酵素液を負荷し、同緩衝液でタンパク質を溶出した。Fig. 1 に示すように、カラム溶出液を A1-A8 の 8 画分に分画し、次いで凍結乾燥により一定容量に濃縮した後、それぞれの画分の PLA₂ 活性を TLC により半定

量的に測定した。その結果、主要な PLA₂ 活性は A1-A3 画分に認められ、遊離した脂肪酸とリゾホスファチジルコリン (LPC) が強く検出された。これら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 画分の組成が最も単純であり、以後本画分について精製を行った。すなわち、A3 画分を 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に対して透析した後、あらかじめ同緩衝液で平衡化した DEAE-セルロースカラム (1.1×18 cm) による陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。タンパク質は 0-0.5 M NaCl により溶出した。その結果、Fig. 2 に示すように B1-B9 の 9 画分を

Fig. 1. Gel filtration of the crude enzyme prepared from the pyloric ceca of starfish *C. acutispina* on Sephacryl S-200. The crude enzyme was applied on a column (3.9 × 44 cm) of Sephacryl S-200 preequilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and eluted with the same buffer at a flow rate of 31 mL/h. Each 4.1 mL fraction was collected. The solid line in 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-A8. PC: phosphatidylcholine, LPC: lysophosphatidylcholine.

Fig. 2. DEAE-cellulose chromatography of the active fraction (A3) obtained from gel filtration in Fig. 1. The active fraction was applied on a column (1.1 × 18 cm) preequilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in the same buffer of total volume of 400 mL at a flow rate of 27 mL/h. Each 2.7 mL fraction was collected. The solid line and dotted line in lower panel indicates absorbance at 280 nm and NaCl concentration (M), respectively, and thin-layer chromatograms (upper panel) show the reaction products after incubation of egg yolk phosphatidylcholine with B1-A9. PC: phosphatidylcholine, LPC: lysophosphatidylcholine.

得た。それぞれの画分の PLA₂ 活性を TLC により測定したところ、B7 画分に最も高い PLA₂ 活性が認められた (Fig. 2)。そこで次に、B7 画分をセファデックス 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 B7 画分を負荷し、同緩衝液でタンパク質を溶出した。Fig. 3 に示すように、カラム溶出液を C1-C7 の 7 画分に分画し、それぞれの画分の PLA₂ 活性を

Fig. 3. Gel filtration of the active fraction (B7) obtained by anion exchange chromatography on DEAE-cellulose. The active fraction was applied on a column (3.9 × 64 cm) of Sephadex G-50 preequilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and eluted with the same buffer at a flow rate of 20 mL/h. Each 2.0 mL fraction was collected. The solid line in lower panel indicates absorbance at 230 nm. Insets show electrophoretic patterns on a SDS-PAGE. Lane 1 contains active fraction (C6). Lane 2 contains protein standards; bovine pancreatic trypsinogen (molecular weight, 24,000), bovine milk β -lactoglobulin (18,400), egg-white lysozyme (14,300). Thin-layer chromatograms (upper panel) show the reaction products after incubation of egg yolk phosphatidylcholine with C1-C7. PC: phosphatidylcholine, LPC: lysophosphatidylcholine.

TLC により測定した結果、C6 画分に最も高い PLA₂ 活性が認められた。C6 画分のタンパク質組成を SDS-PAGE により分析したところ数本のバンドが検出された (Fig. 3) が、本画分を部分精製酵素として以下の分析に供した。

本研究におけるヤツデヒトデ幽門盲の PLA₂ の精製過程を Table 3 に示す。ヤツデヒトデ幽門盲のうから調製した粗酵素に対して、本部分精製 PLA₂ の比活性は 58 倍であり、活性回収率は 13% であった。

ヤツデヒトデ部分精製 PLA₂ の性質 ヤツデヒトデ幽門盲のうより調製した部分精製 PLA₂ により POPC を加水分解し、その遊離脂肪酸を分析した。その結果、遊離した脂肪酸の主要成分はオレイン酸 (84.0%) であり (Table 2)、ヤツデヒトデ幽門盲のうの部分精製

Table 3. Purification of phospholipase A₂ from the pyloric ceca of starfish *C. acutispina*

Purification step	Protein (mg)	Total activity (U)*	Specific activity (U/mg)	Purity (fold)	Yield (%)
Crude enzyme	1,100	21,000	19	1	100
Sephacryl S-200	240	13,000	54	3	62
DEAE-cellulose	46	7,000	150	8	33
Sephadex G-50	2.5	2,700	1,100	58	13

* A unit (U) of activity was defined as the number of micrograms of phosphatidylcholines hydrolyzed per minute.
DEAE: diethylaminoethyl.

Fig. 4. Effects of pH and temperature on the activity of partially purified phospholipase A₂ from the pyloric ceca of starfish *C. acutispina*. 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 for 30 min.

PLA₂ はブタすい臓 PLA₂ と同様に *sn*-2 位の脂肪酸を特異的に遊離した。

ヤツデヒトデ幽門盲のうの部分精製 PLA₂ により卵黄 PC および大豆 PC を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、ブタすい臓 PLA₂ の場合とほぼ一致した (Table 4)。

ヤツデヒトデ幽門盲のうの部分精製 PLA₂ の卵黄 PC に対する活性の最適 pH は pH 10–11 (Fig. 4a) の範囲にあり、また、最適温度は 50–60°C 範囲にあった (Fig. 4b)。

また、本部分精製 PLA₂ の活性を種々の濃度の CaCl₂ (0–10 mM) を添加して測定したところ、1 mM 以上の

Fig. 5. Effect of calcium ion on the activity of partially purified phospholipase A₂ from the pyloric ceca of starfish *C. acutispina*. The activities were determined at pH 8.5 and various concentration of CaCl₂.

Table 4. Composition of fatty acids released from phosphatidylcholine (PC) by partially purified phospholipase A₂ (PLA₂) from the pyloric ceca of starfish *C. acutispina*

Fatty acid %* ¹	Egg yolk PC		Soybean PC	
	Starfish partially purified PLA ₂	Porcine pancreatic PLA ₂ * ²	Starfish partially purified PLA ₂	Porcine pancreatic PLA ₂ * ²
16 : 0	2.3	2.9	3.3	2.7
18 : 0	0.7	1.0	1.0	0.8
18 : 1n-9	59.0	57.6	14.1	12.3
18 : 1n-7	2.0	1.8	tr	tr
18 : 2n-6	24.9	24.2	74.6	76.5
18 : 3n-3	—	—	5.3	6.3
20 : 4n-6	5.5	5.6	—	—
22 : 6n-3	1.5	1.6	—	—
Others* ³	4.1	5.3	1.3	1.0

*¹ Area % to total fatty acids.

*² Phospholipase A₂ (Amano Pharmaceutical).

*³ Consisted of minor compounds (less than 1.0%).

tr: trace (less than 0.05%); —: not detected.

CaCl₂ により強く賦活された (Fig. 5)。さらに、本部分精製 PLA₂ 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 89% に低下したが、10 mM CoCl₂ を添加した場合は 29% に、10 mM ZnCl₂, HgCl₂ および EDTA 添加した場合はそれぞれ 15%, 8% および 10% にまで低下した (Table 5)。

ヤツデヒトデ幽門盲のうの部分精製 PLA₂ によりスルメイカ外套筋の PC および PE をそれぞれ加水分解し、基質の残存率の経時変化を TLC-FID 法により残存 PC

Table 5. Effects of metal ions and EDTA on the activity of partially purified phospholipase A₂ from the pyloric ceca of starfish *C. acutispina*

Compound	Final concentration (mM)	Relative activity (%) [*]
CaCl ₂	10	100
MgCl ₂	10	89
CoCl ₂	10	29
HgCl ₂	10	15
ZnCl ₂	10	8
EDTA	10	10

* The activities were expressed as percentage of that with presence of 10 mM CaCl₂, respectively.

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid.

Fig. 6. Time-course of hydrolysis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine with partially purified phospholipase A₂ from the pyloric ceca of starfish *C. acutispina*. Hydrolysis of squid phosphatidylcholine (●) and phosphatidylethanolamine (▲) with partially purified phospholipase A₂ from starfish *C. acutispina*. The proportion of residual substrate was determined by measurement of the amounts of phosphatidylcholine or phosphatidylethanolamine using TLC-FID.

または PE 量を測定することにより求めた。その結果、Fig. 6 に示すように本部分精製 PLA₂ は PE より PC をよく分解した。

考 察

本研究でヤツデヒトデ *C. acutispina* の幽門盲のうから PLA₂ を部分精製した。SDS-PAGE 分析の結果、部分精製されたヤツデヒトデ幽門盲のう PLA₂ にはまだ数種のタンパク質が存在した。しかしながら、本部分精製 PLA₂ は POPC から主にオレイン酸を遊離させたことより、sn-2 位に結合する脂肪酸を選択的に加水分解する PLA₂ が主要成分と考えられた。本 PLA₂ は部分精製標品ではあるが、その比活性値を他種動物由来 PLA₂ のそれらと比較した。その結果、本部分精製 PLA₂ の比活性値 (1,100 U/mg) はイトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ の比活性値 (119,000 U/mg)⁷⁾ より低かったが、ニチリンヒトデ幽門盲のう PLA₂ の比活性値 (26 U/mg)¹⁴⁾ より高かった。また、本部分精製 PLA₂ の比活性値は同様の方法で測定した Sigma 社製ブタすい臓 PLA₂ の比活性値 (4,300 U/mg) より僅かに低かったが、天野製薬社製ブタすい臓 PLA₂ の比活性値 (440 U/mg) より高かった。

水産動物の消化腺由来の PLA₂ は、これまでイトマキヒトデ幽門盲のう、⁷⁾ ニチリンヒトデ幽門盲のう¹⁴⁾ およびマダイ *Pagrus major* 幽門垂¹⁵⁾ および肝すい臓¹⁶⁾ から精製されている。本研究のヤツデヒトデ幽門盲のうの部分精製 PLA₂ は 1 mM 以上の濃度の Ca²⁺ により賦活され、また、Zn²⁺ および Hg²⁺ の重金属イオンや EDTA によって活性が著しく低下し、その二価金属イオン要求性においてイトマキヒトデ幽門盲のう⁷⁾ およびニチリンヒトデ幽門盲のう¹⁴⁾ の PLA₂ と類似していた。一方、マダイ幽門垂 PLA₂¹⁵⁾ マダイ肝すい臓 DE-1 PLA₂ および DE-2 PLA₂¹⁶⁾ は PC を基質とした場合それぞれ 0.1 mM, 10 mM および 10 mM 以上の濃度の Ca²⁺ により強く賦活され、本部分精製 PLA₂ はこれら PLA₂ と Ca 濃度依存性において異なった。本部分精製 PLA₂ の PC を基質とした場合の最適 pH (pH 10-11) は、ニチリンヒトデ幽門盲のう PLA₂ 様酵素 (最適 pH : pH 9-10)¹⁴⁾ およびマダイ肝すい臓 DE-1 PLA₂ (最適 pH : pH 10)¹⁶⁾ と類似したが、イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ (最適 pH : pH 9.0),⁷⁾ マダイ幽門垂 PLA₂ (最適 pH : pH 8.5)¹⁵⁾ およびマダイ肝すい臓 DE-2 PLA₂ (最適 pH : pH 9)¹⁶⁾ と相違した。また、本部分精製 PLA₂ の最適温度 (50-60°C) は、イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ (最適温度 : 50°C)⁷⁾ とほぼ同様であったが、ニチリンヒトデ幽門盲のう PLA₂ (最適温度 : 30-40°C)¹⁴⁾ とは異なった。さらに、卵黄 PC および大豆 PC 加水分解において、ヤツデヒトデ幽門盲のう部分精製 PLA₂ は、

基質リン脂質の 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、イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂,⁷⁾ ニチリンヒトデ幽門盲のう PLA₂¹⁴⁾ およびブタすい臓 PLA₂ と同様の性質を示した。

結局、ヤツデヒトデ幽門盲のうより調製された部分精製 PLA₂ はアルカリ性域に最適 pH を有し、1 mM 以上の濃度の Ca²⁺ により賦活された。また、本部分精製 PLA₂ は卵黄 PC および大豆 PC に対して 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た。本部分精製 PLA₂ のこれらの性質は乳動物すい臓 PLA₂ のもの⁵⁾ と同様であった。しかしながら、本部分精製 PLA₂ はイトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂⁷⁾ と同様に PE よりも PC をよく分解し、基質の極性基特異性においては乳動物すい臓 PLA₂ とは異なった。

文 献

- 1) Nieuwenhuizen W, Kunze H, de Haas GH. Phospholipase A₂ (phosphatide acylhydrolase, EC 3.1.1.4) from porcine pancreas. *Methods Enzymol.* 1974; **32B**: 147-154.
- 2) Dutilh CE, van Doren PJ, Verheul FEAM, de Haas GH. Isolation and properties of phospholipase A₂ from ox and sheep pancreas. *Eur. J. Biochem.* 1975; **53**: 91-97.
- 3) Evenberg A, Meyer H, Verheij HM, de Haas GH. Isolation and properties of pro-phospholipase A₂ and phospholipase A₂ from horse pancreas and horse pancreatic juice. *Biochim. Biophys. Acta* 1977; **491**: 265-274.
- 4) Ono T, Tojo H, Inoue K, Kagamiyama H, Yamano T, Okamoto M. Rat pancreatic phospholipase A₂: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J. Biochem.* 1984; **96**: 785-792.
- 5) Arni RK, Ward RJ. Phospholipase A₂-a structural review. *Toxicon* 1996; **34**: 827-841.
- 6) 岸村栄毅, 林 賢治. ヒトデ類幽門盲のうのホスホリパーゼ A 活性. 日本誌 1999; **65**: 110-111.
- 7) Kishimura H, Hayashi K. Isolation and characteristics of phospholipase A₂ from the pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1999; **124B**: 483-488.
- 8) Kishimura H, Ojima T, Tanaka H, Hayashi K, Nishita K. Amino acid sequence of phospholipase A₂ from the pyloric ceca of starfish *Asterina pectinifera*. *Fisheries Sci.* 2000; **66**: 104-109.
- 9) Kishimura H, Ojima T, Hayashi K, Nishita K. cDNA cloning and sequencing of phospholipase A₂ from the pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2000; **126B**: 579-586.
- 10) Hayashi K. Occurrence of diacyl glyceryl ethers in liver lipids of gonatid squid *Gonatopsis borealis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1989; **55**: 1383-1387.
- 11) Hayashi K, Kishimura H. Preparation and purification of DHA-enriched triacylglycerols from fish oils by column chromatography. *Fisheries Sci.* 1996; **62**: 842-843.
- 12) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.
- 13) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; **193**: 265-273.

- 14) 岸村栄毅, 林 賢治. 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. 日水誌 1998; **64**: 264-269.
- 15) Iijima N, Chosa S, Uematsu K, Goto T, Hoshita T, Kayama M. Purification and characterization of phospholipase A₂ from the pyloric ceca of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* 1997; **16**: 487-498.
- 16) Ono H, Iijima N. Purification and characterization of phospholipase A₂ isoforms from the hepatopancreas of Red Sea Bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* 1998; **18**: 135-148.