HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	酵母燐脂質分解酵素の燐脂質への結合とその活性
Author(s)	僧都, 博
Citation	低温科學. 生物篇, 29, 9-17
Issue Date	1972-02-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17778
Type	departmental bulletin paper
File Information	29_p9-17.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Hiroshi SOUZU 1971 The Relationship between Phospholipase Activity and Binding of the Enzyme to Phospholipids in Baker's Yeast. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 29.*** (With English Summary p. 17)

酵母燐脂質分解酵素の燐脂質への結合とその活性*

僧都　博
(低温科学研究所)

(昭和46年9月受理)

I. 緒　言

細胞の凍結融解によって，細胞内に異常代謝がおきて，細胞成分が分解流出することがしられている[1]。さきに著者は，酵母細胞を凍結融解または凍結乾燥したときに，細胞内の燐脂質の分解反応が誘起されることを示し，この反応が，細胞の生残率の低下をともなわないような条件下での凍結融解及び凍結乾燥処理によっては誘起されないこともたしかめた[2]。この燐脂質の分解は，細胞内に存在する酵素が上述のような処理によって活性化されるためにおきるものと推定される。このように，細胞の障害が異常代謝と深い関係にあるらしいことが考えられるが，このような異常代謝が，その結果として，細胞の生存に大きな影響を与えるであろうことは容易に想像される。したがって，そのような変化をおこす原因となる細胞内の構造または機能の変化の情況を知ることは，細胞の凍結障害の機構の解明に役立つであろう。

凍結融解等の影響が酵素の側により大きくあらわれるのか，逆にこの場合の基質となる燐脂質の側にでるのか，あるいはこれらの両方に対するものなのかは今の所明らかではない。しかし，先の報告でものべたように，凍結融解または凍結乾燥等の処理によって脂質が抽出されやすくなることから[2]，脂質と蛋白質間または脂質相互間の結合に変化を生じている可能性が強い。この報告では機械的に破壊した酵母細胞についての遠心分劃から，燐脂質及び燐脂質分解酵素が細胞原形質部に相接して存在するらしいことを確かめた。またこの原形質部分をラウリル硫酸ナトリウムによって溶解し[3-5]，これが燐脂質分解活性に与える影響を調べることによって，細胞内における燐脂質と酵素蛋白質の結合状態を推測しようとした。

II. 材料と方法

材料：市販のパン酵母(日甜イースト)を前報通り[2]に培養し，蒸溜水で3度洗い，0.5M トリス-マレイン酸緩衝液 (pH 6.08) に浮遊したものを使用した。

細胞成分の分劃：上記細胞浮遊液 (200 mg 湿重量/ml) を 0°C に冷却し，フレンチプレスで破壊したのち約2分の1容の上記緩衝液 (0.1M) を加え，12,000×g で15分間遠沈した。未破壊の細胞及び破壊された細胞壁等を含んだ沈澱から，上層部にある破壊細胞壁部分を分けとって，0.1M の上記緩衝液で3度洗ったものを細胞壁劃分とした。この遠沈の上清を 105,000×g で90分間遠沈した上清を水溶性劃分とした。橙褐色，ゼリー状の沈澱に上記緩衝液 (0.1M) を加え

* 北海道大学低温科学研究所業績　第1160号

て蛋白質濃度 30 mg/ml の浮遊液とし，10 KC 超音波で 5 分間処理して均一にしたものを原形質劃分とした。以上の試料は，それぞれ使用時まで −25°C で凍結保存した。

界面活性剤処理： 溶解度をみるためには，上記原形質劃分浮遊液を 1 ml 当たり蛋白質量 3 mg または 1 mg とし，これに 0.2M ラウリル硫酸ナトリウム（以下 SDS と略記）を滴下し，30°C，15 分後に 530 mμ における吸収を，蒸溜水を対照として測定した。吸収は最初の 10 分で平衡に達し，その後の 5 分間では変化はなかった。

酵素活性測定用としては，同じ浮遊液 1 ml を蒸溜水で 10 倍に稀釈し，これを 30°C 恒温水槽中で振盪しながら 0.2M SDS を加え，最終濃度で 0.6 mg SDS/mg 蛋白質として 15 分間保ち，溶解の完了をまって 0°C に冷却した。溶解した試料を，5×10^{-4}M の EDTA を含む 0.005M トリス−マレイン酸緩衝液で平衡にしたセファデックス G-25 カラムに注入し，同じ緩衝液で 1 時間 5 ml の速度で通過させて SDS を除去した。

Mg^{2+} による沈澱： セファデックス通過後の溶液（約 15 ml）を集め，これを 2 等分して一方を 3〜20 mM の $MgCl_2$ を含んだ 0.005M トリス−マレイン酸緩衝液（pH 6.08）500 ml に対して 4°C で一夜透析した。対照として他の一方を，$MgCl_2$ を含まず，5×10^{-4}M EDTA を含んだ同じ緩衝液に対して同様に透析した。

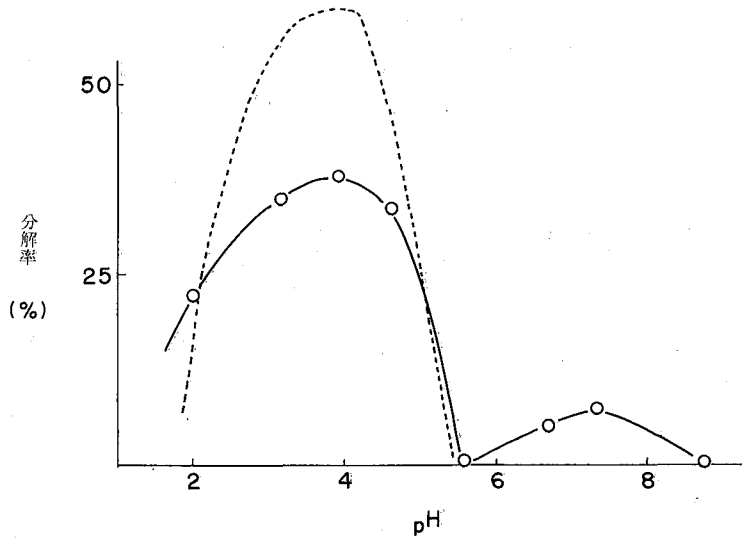
燐脂質の分解反応及び抽出： Mg^{2+} を含まぬ緩衝液で透析した試料では溶液全体を，また Mg^{2+} を含んだ緩衝液で透析した試料については，透析中に生じた不定形沈澱を遠沈で集めて少量の上記緩衝液に再浮遊したものを，それぞれ用いて反応を進めた。凍結融解または凍結乾燥処理をした未破壊の細胞浮遊液についても同様なあつかいをした。通常，酵母細胞では 200 mg 湿重量，原形質劃分では 20 mg 湿重量の固形分を含む浮遊液約 2 ml を試験管にとり，必要に応じて 2〜10 mM の Ca^{2+} または Mg^{2+} を加えて総量 2 ml としたものを 30°C 恒温水槽にひたす。これに 30°C に温めた 0.5M グリシン緩衝液（pH 2.0），酢酸緩衝液（pH 3.0〜4.5），トリス−マレイン酸緩衝液（pH 5.5〜6.8）またはトリス緩衝液（pH 7.2〜8.5）1 ml を加え，総量 3 ml で反応させた。反応は緩衝液を加えて pH を変えることによって始まるので，これから正確に 10 分後に 5M 硫酸 0.2 ml を加えて反応をとめ，10,000×g で 5 分間遠心して沈澱を集め，これから前報通り[2] クロロホルム−メタノールを用いて脂質を抽出した。上記細胞等の浮遊液に 0°C で直ちに 5M 硫酸 0.2 ml を加えて生じた沈澱から同様に抽出した脂質の量を測って対照とした。

燐脂質及び蛋白質の定量： 上記方法で抽出した脂質について渋谷らの方法[6] に従って分解した後に燐量を測定し燐脂質量を算定した。蛋白質量の測定には Lowry の方法[7] を用い，血清アルブミンを標準としてその含量を算定した。

III. 結 果

1. 凍結融解細胞及び細胞原形質劃分における燐脂質分解活性

酵母細胞を急速に凍結融解するか，または凍結乾燥後急速に復水すると燐脂質分解酵素による燐酸の分解流失が見られる。このとき活性と pH の関係は両処理試料の間で全く変化はなく，その活性の強さもほとんど変わらない。第 1 図実線は凍結融解細胞を例として，30°C 10 分間における燐脂質の分解率を，細胞総燐脂質に対する百分率で示したものである。この酵素



第1図　酵母燐脂質分解酵素の活性と pH の関係。反応条件は本文参照
実線，凍結融解酵母全細胞；
点線，細胞原形質部分（pH 5.5 以上では測定せず）

は pH 4 付近に最大活性点があり，pH 7.3 付近にもう一つの活性極大点が見られるが，その中間の pH 5.8 付近では活性はほとんど見られない。これは，細胞内に 2 種の酵素が存在する可能性を示すものであるが，蒸溜水に浮遊した凍結融解細胞でも最大活性（pH 4 における値）の 50% に近い活性が見られる[2]ところから，通常，細胞内で主要な役割を果しているのは，酸性側に活性を持つ酵素であろうと考えられる。

一方，細胞をフレンチプレスで破壊したときにも同様の酵素の活性化が見られるようになる。第 1 図に点線で示したのは，こうして破壊した酵母細胞から遠沈によって集めた原形質部分における酵素の活性と pH の関係である。10 分間当たりの分解率は凍結融解した細胞におけるよりも高くなっているが，その活性と pH の関係は凍結融解細胞に比べて変化は見られなかった。なおこの場合中性付近についての活性は調べなかった。

2. 燐脂質及び燐脂質分解酵素の細胞内分布

燐脂質とその分解酵素が，細胞内でどのような関係にあるかを知る目的で，酵母細胞をフレンチプレスで破壊し，これを分劃遠心によって，1) 破壊された細胞壁を含む劃分，2) 細胞原形質劃分，3) 水溶性劃分の 3 つに分け，それぞれの劃分の燐脂質含量及び燐脂質分解酵素の活性を調べた（第 1 表）。これらのうち 1) には細胞壁とともに，細胞膜の破片や付着した原形質の一部が含まれているものと思われるが，この部分の湿重量当たりの酵素の活性は細胞全体におけるよりも低い値を示した。原形質の集まりと考えられる 2) の部分には当然の事ながら燐脂質の含量は非常に高かった。またこの部分には燐脂質分解酵素も非常に高い活性で含まれていることが見出された。更に，この原形質浮遊液を液体窒素で急速に凍結融解しても酵素活性に変化は見られず，酵素の外液への遊離も見られなかった。3) の水溶性劃分には燐脂質はほとんど見られず，またこの劃分から得られた硫安分劃沈澱について，ホスファチヂルコリンを基

第1表 酵母の燐脂質及び燐脂質分解酵素の細胞内分布

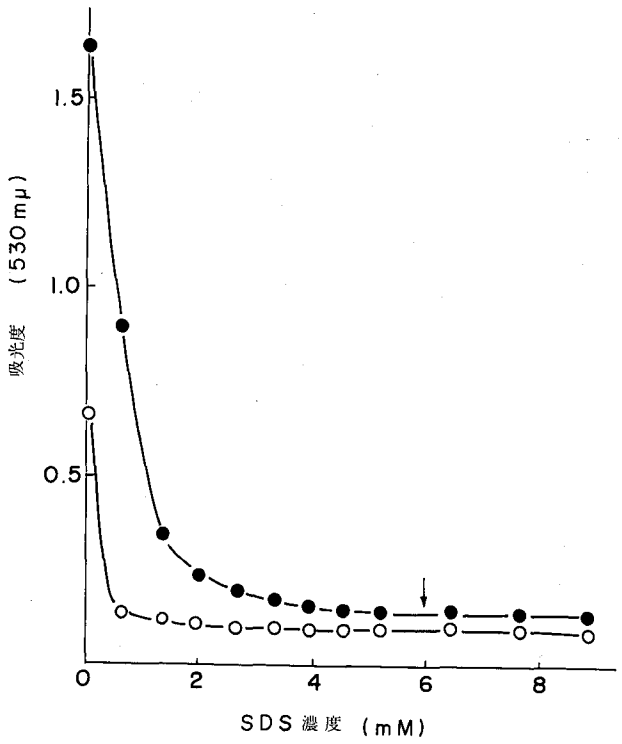
	燐 脂 質 (mg 燐脂質/g 湿重量)	分解酵素活性* (mg 燐脂質/g 湿重量/分)
凍結融解細胞	5.3	0.21
12,000×g 沈澱 (細 胞 壁)	3.2	0.07
105,000×g 沈澱 (原 形 質)	35.0	2.10
105,000×g 上清 (水溶性部分)	0	0

* 30°C, pH 4.0 での燐脂質の減少量。反応条件は方法の項参照

質としておこなった反応の結果からも，燐脂質分解酵素の存在は認められなかった。以上の結果からこの酵素は原形質部分に密着した状態で存在するのではないかと考えられた。

3. 原形質劃分の SDS による溶解と Mg^{2+} による再沈澱

破壊した細胞から得られた原形質部分は緩衝液に浮遊するとややあかみを帯びた乳濁色を呈するが，これに加える SDS 濃度を高めて行くと次第に濁りが消えて，最後にはうすい黄色を帯びたほとんど透明な溶液となる。第2図は，1 ml 当たり 3 mg 及び 1 mg 蛋白質量となるように浮遊した原形質に SDS を加えて 30°C に 15 分間置いたのちにおける吸光度と SDS 最終濃度との関係を示したものである。この図から見ると，蛋白質濃度 1～3 mg の範囲では，蛋白質 1 mg 当たり約 0.15 mg の SDS を加えることによって吸収はほとんど一定値に達する。しかし，この程度の SDS 処理ではのちに述べる酵素活性の変化は見られなかった。酵素活性の阻害及び Mg^{2+} によるこれの復活が見られるようになる SDS 濃度は蛋白質 1 mg 当たり約 0.6 mg であって，それより低い濃度では活性阻害が小さく，またそれより高い濃度では Mg^{2+} による活性復活が弱かった。従って以後の実験にはみなこの濃度を使用した。



第2図 酵母細胞原形質の溶解と SDS 濃度との関係
各 SDS 濃度で 30°C, 15 分後の吸収
—○—, 1 mg 蛋白質/ml; —●—, 3 mg 蛋白質/ml。酵素活性測定実験には矢印の濃度 (0.6 mg SDS/mg 蛋白質) を使用

上述の条件で溶解した原形質はセファデックス通過によって SDS を除いても全く沈澱は生じない。更にこれを 5×10^{-4} M の EDTA を含んだ 0.005 M トリス-マレイン酸緩衝液 (pH 6.08) に透析しても変化は見

第2表　SDS で溶解した酵母細胞原形質の沈澱と Mg^{2+} 濃度の関係

	Mg^{2+} 濃度 (mM)	燐脂質回収率 (%)	燐脂質，蛋白質比
未溶解原形質	—	—	1 : 1
SDS 溶解原形質*	—	100.0	1 : 1.1
Mg^{2+} による再沈澱	3	41.3	—
	5	82.5	1 : 0.92
	15	87.2	1 : 0.95

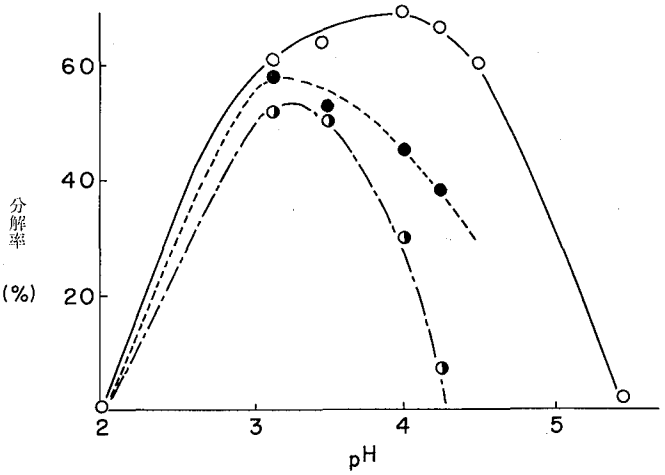
*　セファデックス処理により SDS 除去後のもの

られなかった。一方，SDS 除去後の同じ試料を，3～15 mM の Mg^{2+} を含んだ上記緩衝液 (EDTA は含まない) に透析すると，約 30 分後に濁りが生じて来て数時間以内に不定形の沈澱を生じた。沈澱は Mg^{2+} 2 mM 以下ではほとんど生じないが，15 mM で溶液中に含まれる燐脂質の 85～90% が沈澱として回収された。しかし，Mg^{2+} 20 mM までの増加では，それ以上の回収は見られなかった。また沈澱前の溶液中と沈澱中とでは燐脂質，蛋白質比が異なり，沈澱中では蛋白質の比率が減少しているのが認められた (第 2 表)。

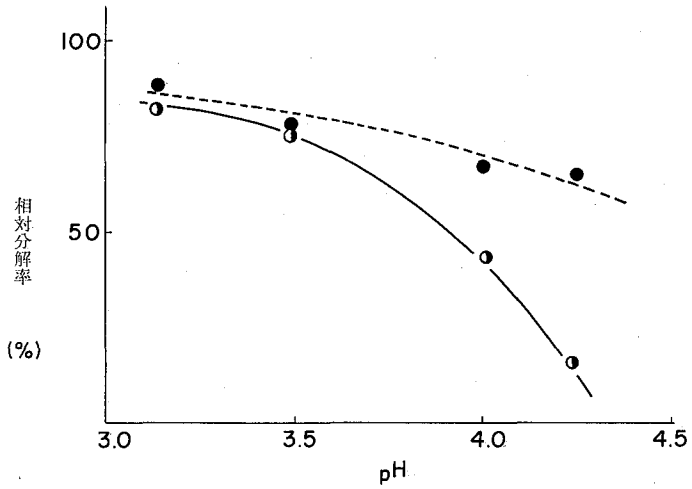
4. 原形質の溶解及び再沈澱の酵素活性に与える影響

細胞原形質を上述の条件で処理すると，SDS を除去したのちでも酵素の活性はもとのものとは変わっており，とくに pH 3 付近よりアルカリ側における活性の低下がいちじるしかった。その結果活性は pH 3.14 で最大となり pH 4.3 では全く見られなかった。

一方，一度溶解した試料を Mg^{2+} を含む緩衝液に透析することによって再沈澱させた場合には，溶解したままの試料にくらべて pH 4 付近における活性の変化が小さく，もとの試料と溶解したままの試料の中間の値を示した (第 3 図)。これら三者の関係を SDS 処理前の試料の酵素活性を 100 として示したのが第 4 図である。この図から見られるように，pH 3.1 から 3.5



第3図　酵母細胞原形質の溶解状態または Mg^{2+} 沈澱後における酵素の pH 活性変化。反応条件は本文参照
—○—, 対照；—◐—, SDS 溶解試料；┈●┈, Mg^{2+} による沈澱



第4図 酵母細胞原形質の SDS 溶解及び Mg^{2+} 再沈澱の酵素活性に与える影響。記号は第3図に同じ

付近では，溶解試料及び Mg^{2+} による再沈澱試料とも活性に大きなへだたりはなく，それぞれ溶解前の試料にくらべて 85～80 及び 90～80% 程度であるが，pH 4.01 では Mg^{2+} による沈澱では 64% の活性に対して溶解試料では 46%，また pH 4.23 では，それぞれ 57% 及び 15% とその差は一層大きくなっている。また Mg^{2+} のかわりに Ca^{2+} を用いた場合にも同様の結果が得られた。一方，Mg^{2+} による沈澱または溶解前の試料に対して，燐脂質分解の際の反応混液に2価カチオンを加えても大きな効果はなかった。すなわち，いずれの pH 域においても Mg^{2+} 及び Ca^{2+} 2.5 mM の添加でかすかに活性は増したが，それより高濃度では僅かながら阻害的であった。

IV. 考 察

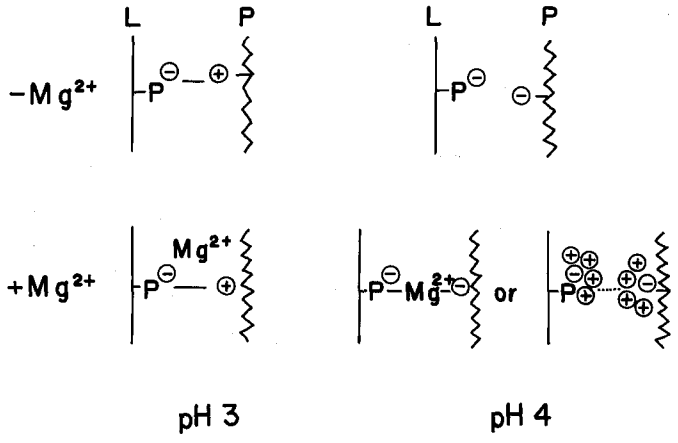
細胞内に共存している酵素とその基質が，凍結融解等の処理の後にのみ反応し得るようになるのは，正常な細胞内では酵素の活性発現を妨げているなんらかの障壁があって，処理によってそれがとり除かれるためであろう。酵素活性の妨害の機構としては，1) pH の影響あるいは阻害剤の共存による酵素の活性そのものの阻害，2) 立体障害等基質の側に原因のあるもの及び 3) 酵素及び基質の分離局在による接触の妨害等が考えられる。

Conway と Downey[8] によれば，正常な酵母細胞内の pH は 5.6～5.8 である。しかし，著者が凍結融解後の酵母について測定した所では 5.2～5.4 であった（未発表データ）。細胞内の pH が凍結によって 5.2 まで変わったとすると，この酵素の活性は最大値の 50% に近くなり（第1，3図），この値は蒸溜水浮遊の酵母細胞を凍結融解または凍結乾燥したのちにおける燐脂質の分解速度とよい一致を示す（第1節参照）。このことは細胞内の pH 変化によって酵素の活性化がもたらされた可能性のあることを示すものと思われる。一方，Conway と Downey[8] によれば細胞の pH は，凍結融解法で測った場合とその他の方法で測ったものとの間に差は見られない。このことが正しければ，著者の使用した酵母では細胞内 pH は正常なものでも 5.2 付

近と考えられ細胞内 pH 変化によって酵素の活性が変化するとの説明はつけにくい。酵素活性阻害物質の存在については，全細胞に比較して原形質部分を集めたときの酵素活性が高くなっていること及び水溶性部分には酵素活性が全く見られないことから，水溶性阻害物質の存在する可能性は考えられよう。しかし，水溶性部分から硫安分劃で得られた蛋白質中にも酵素の活性はみられて居らず，なお今後に問題を残すものと考えられる。

酵素，基質の分離局在に関しては，第1表に見られるように，酵素は原形質部に集まって居り，細胞内においても相接して存在する可能性が強い，このことは，この酵素が燐脂質とともに膜を形成している蛋白質の一種である可能性を示すものと思われる。SDS 処理及び Mg^{2+} による酵素活性の変化の事実はこの考えを支持すると同時に，凍結融解等の処理による酵素活性発現の機構をも暗示すると思われる。

マイコプラズマの細胞膜では，膜を形作っているリポ蛋白質は界面活性剤の作用によって構成脂質と蛋白質とに解離することが知られている[3-5]。酵母の原形質部分に集まっている膜においても SDS 処理の結果同様のことがおきると考えられるが，これから SDS が除去されたとき，Mg^{2+} のない状態では第5図上段に示すような結果になると考えられる。すなわち pH 3 付近では負電荷を帯びた脂質（燐酸基）と正電荷を帯びた蛋白質（一部のアミノ酸）の間に静電気的な結合が生ずるのに対して，pH 4 よりアルカリ側では蛋白質の側にも負電荷が強くなるために両者は反撥して接触は妨げられる。一方，Mg^{2+} の存在下では同図下段に示すようになり，pH 3 付近では Mg^{2+} とは無関係に上段に示したと同様な結合が生ずる。しかし，pH 4 よりアルカリ側では，脂質及び蛋白質の両負電荷が Mg^{2+} の正電荷を介して結合するか[9]，あるいは2個の負電荷のまわりを Mg^{2+} の正電荷で囲む結果，両者の反撥を防ぎその接触を容易にする。こうして，解離された燐脂質と蛋白質の間の再結合をもたらすこととなろう。酵素が活性を示すためにはこのような基質との接触は不可欠のものと思われる。今回の実験において，溶解しない試料及び Mg^{2+} による沈澱では反応時に加えた Mg^{2+} が活性にあまり影響を与えないこと及び pH 3 付近では溶解したままの試料と Mg^{2+} によって沈澱した試料の活性が溶解前の試料に比して殆んど同じ値を示した。このことは Mg^{2+} が酵素蛋白質と燐脂質の結合に役立つもの



第 5 図

であり，このような結合がおきれば酵素が活性を示すのにこれ以上の2価カチオンは必要ないものと考えられる。

一般に正常な細胞の膜では燐脂質と蛋白質の結合は，疎水結合や水素結合に依存し，静電結合は大きな意味を持たないと信じられている[10]。一方，凍結融解等の処理によってこのような結合が破壊されると，細胞内の2価カチオンを介して新たな結合を生ずることも可能になり，この結果として酵素の活性がみられるようになることは考えられるであろう。

V. 摘 要

酵母細胞を破壊して遠心分劃すると，pH 4 付近に最大活性を持つ燐脂質分解酵素が，燐脂質含量の高い原形質部分に集まる。

原形質部分を緩衝液に浮遊したものは，ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) によって無色の溶液となる。一旦溶解したものは溶液から SDS を除去しても不溶性とはならないが，SDS 除去後に Mg^{2+} の存在下に透析すると不定形の沈澱となる。

溶解状態の試料では，燐脂質分解酵素の活性はもとの試料にくらべて酸性側に片より，最大活性は pH 3 付近となり，pH 4 よりアルカリ側では全く活性をうしなう。Mg^{2+} の存在下で再沈澱したものでは，溶解状態のものにくらべて活性の変化はすくなく，pH 4 付近での活性は前の2つのものの中間の値を示す。

酵素の pH 活性曲線の変化は酵素と燐脂質との間の結合の変化によるものと考えられるが，細胞に凍結融解等の処理をしたとき，この酵素の活性が見られるようになるのも，以上のような現象によって，酵素と燐脂質の間に新たな結合を生ずることによるためではないかと考えられる。

文 献

1) Souzu, H. 1967 Location of polyphosphate and polyphosphatase in yeast cells and damage to the protoplasmic membrane of the cell by freeze-thawing. *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 344–351.
2) 僧都 博 1969 酵母細胞脂質におよぼす凍結融解及び凍結乾燥の影響. 低温科学, 生物篇, **27**, 23–30.
3) Engelman, D. M., Terry, T. M. and Morowitz, H. 1967 Characterization of the plasma membrane of *Mycoplasma laidlawii*. I. Sodium dodecyl sulfate solubilization. *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 381–390.
4) Rottem, S., Stein, O. and Razin, S. 1968 Reassembly of *Mycoplasma* membranes disaggregated by detergents. *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 46–56.
5) Razin, S., Ne'Eman, Z. and Ohad, I. 1969 Selective reaggregation of solubilized mycoplasma-membrane proteins and the kinetics of membrane reformation. *Biochim. Biophys. Acta*, **193**, 277–293.
6) 渋谷 勲・本田弘子・丸尾文治 1966 複合脂質分析法の改良—大腸菌ホスファチドへの応用. 脂質生化学研究, 117–121 pp.
7) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
8) Conway, E. J. and Downey, M. 1950 pH values of the yeast cell. *Biochem. J.*, **47**, 355–360.
9) Kavanau, J. L. 1965 *In* Structure and Function in Biological Membranes, Holden-Day, Inc.

San Francisco, London, Amsterdam, 132–170.
10) Benson, A. A. 1966 On the orientation of lipids in chloroplast and cell membranes. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **43**, 265–270.

Summary

Upon the disintegration and centrifugation of yeast cells, the phospholipid degradative enzyme which has its optimum activity near pH 4, was collected in the cytoplasmic fraction, together with majority of phospholipids.

The cytoplasmic fraction was solubilized readily with sodium dodecyl sulfate. In all cases removing of the detergent did not lead to the precipitation of solubilized materials. But, More than 90% of the lipids and protein in the solution were precipitated in the presence of Mg^{2+}. The ratio of protein to lipid in the precipitate was slightly lowere than in the original materials.

In a solubilized form, the activity of the enzyme diminished especially in a region from pH 3.5 to 5.5, thus the degradation velocity of phospholipids was about 85% at pH 3.14, but it was only about 15% at pH 4.23 of the original materials. The activity was partially recovered by Mg^{2+} precipitation, however, it was 95% at pH 3.14 and 57% at pH 4.23 of the original one.

The present results seem to indicate that the interaction which depends on the electrostatic force or divalent cation bridges between enzyme and substrates is essential for the activation of the enzyme. From the above results, it was conjectured that the activation of the phospholipid degradative enzyme in frozen thawed yeast cell is due to the new association between enzyme and substrates which was caused by the rupturing of the membranous lipoprotein structure.