



Title	酵母ミクロソーム燐脂質に対する燐脂質分解酵素の作用について
Author(s)	僧都, 博; SOUZU, Hiroshi
Citation	低温科学. 生物篇, 31, 1-7
Issue Date	1974-01-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17802
Type	departmental bulletin paper
File Information	31_p1-7.pdf



酵母ミクロソーム磷脂質に対する磷脂質 分解酵素の作用について*

僧 都 博
(低温科学研究所)
(昭和48年9月受理)

I. 緒 言

著者はさきに酵母細胞を凍結融解したとき、その細胞の脂質が抽出され易くなり、それと共に磷脂質の分解反応がおきることを報告した¹⁾。この磷脂質の分解反応は細胞内にもともと存在する分解酵素(ホスホリパーゼCと考えられる)が細胞の凍結融解による何等かの構造的変化で活性化される結果おこるものと推定された。酵母細胞内においてこの酵素と磷脂質がどのような関係におかれているのか、またどのような変化がそれらの間におきて磷脂質分解反応が進むようになるのかは明らかでない。一方、凍結融解処理をした細胞の生存率が、処理後磷脂質の分解反応が進行するにつれて低下するという結果も得られ、この酵素が正常な細胞生理の面でも重要な役割をになっているであろうことが推察された²⁾。

Cl. welchii のホスホリパーゼCは赤血球³⁾、肝臓⁴⁾、腫瘍等³⁾の細胞膜及び肝臓、筋肉等のミクロソーム画分⁵⁾または肝ミトコンドリア⁶⁾等の多くの膜系に対して影響を与えることが知られている。

この実験はこれら二つの酵素の酵母ミクロソーム画分に対する作用を比較することによって酵母のホスホリパーゼCの細胞内における様子を類推しようとしたものである。

II. 材料と方法

材料: 前報通り¹⁾市販のパン酵母を麦汁培地で培養し蒸溜水で洗ったものを5°C冷蔵庫に保存し、1~2日以内に使用した。*Cl. welchii* ホスホリパーゼCはシグマ社から購入し、-25°Cで保存したものを使用時に蒸溜水に溶かして使用した。

酵母ミクロソームの調製: 上記細胞浮遊液(約200mg湿重量/ml)に使用直前に約1/3容の0.5Mトリス-マレイン酸緩衝液(pH 6.10)を加え、0°Cに冷却し、フレンチプレスで4°C冷室で破壊した。破壊後の浮遊液に等量の0.1M同上緩衝液を加え、12,000×gで15分間遠沈し、沈澱は捨てた。この上清を105,000×g120分間遠沈し、得られた沈澱を上記緩衝液(0.1M)に浮遊し(蛋白質濃度約30mg/ml)超音波処理して均一化したものを以下の実験に使用した。この試料は使用時まで-25°Cで凍結保存した。

酵素作用の測定: 細胞内ホスホリパーゼ作用の測定には、上記浮遊液0.8mlを1M酢酸緩衝

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1262号

液 (pH 3.20) 1.0 ml 及び 0.2 M CaCl_2 0.2 ml と混ぜ、蒸留水で全量 10 ml として 37°C で反応させた。

Cl. welchii ホスホリパーゼ反応の測定には、同じ浮遊液 0.8 ml をとり、これに 1 M トリス緩衝液 (pH 6.10) 1 ml, 0.2 M CaCl_2 0.2 ml 及び酵素液 (2 mg/ml) 0.5 ml を加え、蒸留水で全量 10 ml として同じく 37°C で反応させた。両試料とも一定時間後に 5 M 硫酸 0.2 ml を加えて反応をとめ遠心して生じた沈澱から 2:1 クロロホルム-メタノール液で脂質を抽出した。抽出液を Folch の方法⁷⁾ で洗ったのち前報通り¹⁾ に磷脂質量を測定した。原試料中の磷脂質量と反応後の磷脂質量との差を酵素による分解量とした。

磷脂質成分の分離及び定量： 前報¹⁾ と同様に薄層クロマトグラフィーによって脂質成分を分離、同定した。またこれも前報¹⁾ 通り展開した薄層から各成分を抽出し有機燐を分解定量した。

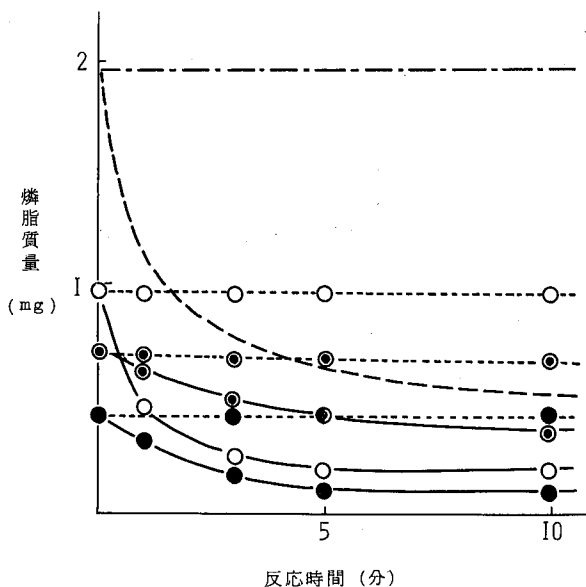
凍結融解： ミクロソーム浮遊液 (pH 6.10) 0.8 ml を中試験管にとり、*Cl. welchii* ホスホリパーゼ C (2 mg/ml) 0.5 ml を加え、これを液体窒素に浸して凍結した。約 5 分後試験管を 30°C 温湯に移して手で振りながら融解した。試料温度が 0°C 以上にならぬように注意しながらこの操作を 3 度くり返した。最後に融解したのち、ホスホリパーゼ反応の項に従って反応させた。

III. 結 果

1. 酵素の反応速度と pH の関係

すでに前報⁸⁾ で述べたように、酵母ミクロソーム画分に存在すると思われる磷脂質分解酵素は pH 3~4 附近に最大活性を持ち、pH 6 附近では殆んど活性を示さない。一方 *Cl. welchii* のホスホリパーゼ C は pH 7 附近に最大活性があることが知られているので^{9,10)}、反応液の pH を適当に選ばばこれら二つの酵素の活性をそれぞれ独立に測定することが出来る。

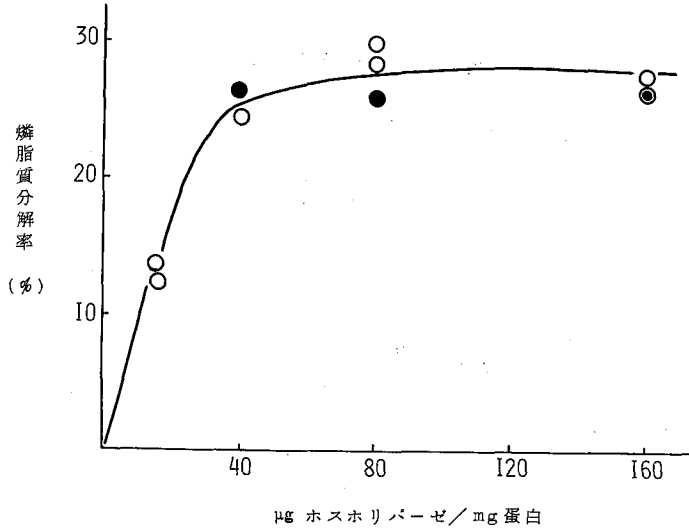
酵母ミクロソーム画分を 37°C, pH 3.20 でインキュベートすると約 10 分間で全磷脂質の約 70% が分解された。しかし反応時間を多少のばしてもそれ以上の分解は見られなかった。第 1 図に全磷脂質及び主要な磷脂質成分の細胞内酵素による分解速度を示した。主な 3 種の磷脂質



第 1 図 細胞内酵素によるミクロソーム磷脂質の分解

反応条件は本文参照

---, 全磷脂質 pH 3.20; - · - · -, 全磷脂質 pH 6.10;
—, 磷脂質 pH 3.20; ·····, 磷脂質 pH 6.10; ○, ホスファチデルコリン; ◐, ホスファチデルセリン; ●, ホスファチデルエタノールアミン

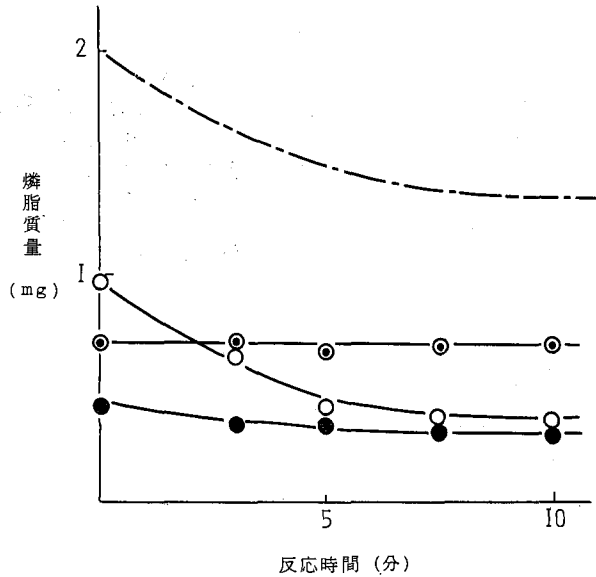


第2図 酵素濃度と全磷脂質分解速度との関係
(*Cl. welchii* ホスホリパーゼC)

反応条件は本文参照。 反応時間 ○, 5分; ●, 10分; ◎, 20分

のうち最も分解の速いのはホスファチデルコリンで3分以内で殆んど最終分解量まで達した。ついで速いのはホスファチデルエタノールアミンで同じ時間で最終分解量の約80%に達した。最も遅いのはホスファチデルセリンでこの場合は3分間で最終分解量の約50%にしか達せず反応は10分程度継続した。一方同じ試料をpH 6.10でインキュベートすると磷脂質の分解は殆んど見られなかった。

次に同じ試料の *Cl. welchii* ホスホリパーゼCによる分解を見るとpH 6.10では全磷脂質の約30%が10分間の反応で分解されたが、反応時間をのばしても(最大20分)、酵素量を増しても(最大4倍)これ以上の分解は見られなかった(第2図)。pHを7.23まで上げて結果に差はなかった。分解速度の最も大きいのはホスファチデルコリンであって、総含量の約50%が5分間以内に分解され、ホスファチデルエタノールアミンは同じ時間に約20%が分解



第3図 *Cl. welchii* ホスホリパーゼCによる
ミクロソーム磷脂質の分解

反応条件は本文参照。---, 全磷脂質 pH 6.10; —, 磷脂質 pH 6.10; 他の記号は第1図に同じ

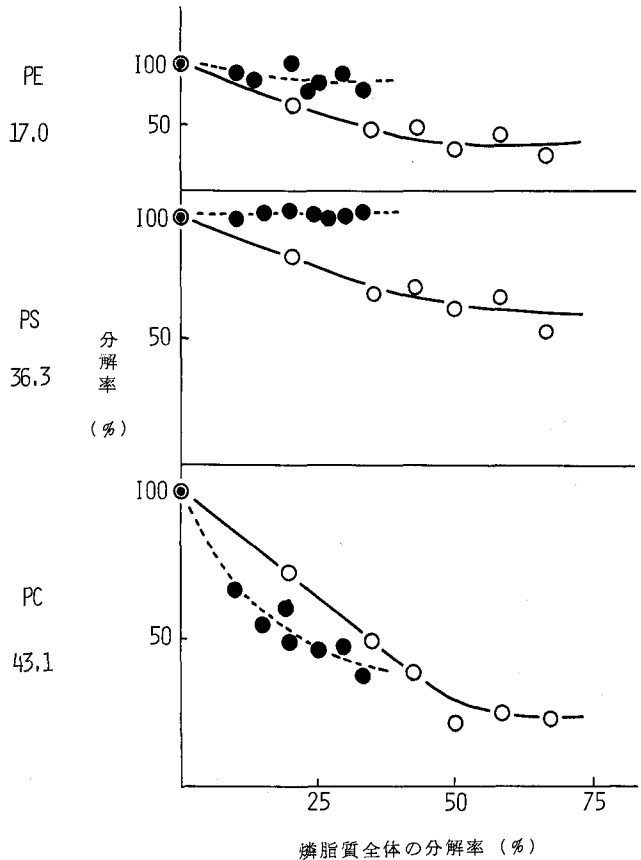
された。しかしホスファチジルセリンについては反応の進行が殆んど見られなかった(第3図)。

2. 構成磷脂質に対する酵素作用の特異性

ミクロソームを構成している主要な3種の磷脂質は細胞内酵素及び *Cl. welchii* ホスホリパーゼCに対してそれぞれ異なる反応を示した。第4図に磷脂質全体の分解率に対する各構成磷脂質の分解率を示した。3種のうち最も酵素の作用を受けやすいのはホスファチジルコリンであって細胞内酵素による分解においても全磷脂質の分解率に対して直線的に減少し、全磷脂質の50%程度が分解された段階では殆んど分解され得る最大値(約80%)にまで達した。また *Cl. welchii* ホスホリパーゼCによって分解される磷脂質の大部分はこの磷脂質であって全磷脂質分解率にしめる分解率では細胞内酵素による分解率よりも

高い値を示した。しかしその分解の最大値は約60%であった。ホスファチジルエタノールアミンでは細胞内酵素によってその約67%が最終的に分解されたが全磷脂質分解率に対するこのものの分解率はホスファチジルコリンの場合よりも少なかった。また *Cl. welchii* ホスホリパーゼCの作用は比較的受けにくく、最終的な分解率も約18%にとどまった。ホスファチジルセリンはどの酵素に対しても抵抗が強く、細胞内酵素によつては最終的にその45%が分解されたが、*Cl. welchii* ホスホリパーゼCによっては全く分解されなかった。

全磷脂質の分解に対する各構成磷脂質の分解率を二つの酵素について比較した結果では、細胞内酵素の場合に、ホスファチジルコリンの分解が全磷脂質の分解率60%附近で一定値に達したのち、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンともに最終分解率に達するまで徐々に分解が進んでいるのに対して、*Cl. welchii* ホスホリパーゼCの場合には、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンともに全磷脂質の分解率30%附近で最終値に達しているように見られた。



第4図 細胞内酵素と *Cl. welchii* ホスホリパーゼCの全磷脂質分解度に対する構成磷脂質分解度の比較
反応条件は本文参照。左の数値は全磷脂質含量に対する構成磷脂質含量比(%)。-O-, 細胞内酵素; ●●●, *Cl. welchii* ホスホリパーゼC

3. *Cl. welchii* ホスホリパーゼ C の作用に対する凍結融解の影響

すでに述べたように酵母細胞の磷脂質分解酵素は細胞の凍結融解によってその作用を示すようになる。この理由の一つとして、凍結によってマイクロソームの構造変化が起り、これにともなって酵素がその内部に入り得るようになることが考えられた。一方、マイクロソーム画分外から加えられた酵素はマイクロソーム組織内には入り得ないものと考えられたので、マイクロソームの凍結融解によってこの酵素の作用の増大が見られるか否かを調べた。マイクロソーム浮遊液に *Cl. welchii* ホスホリパーゼ C を加えたものを液体窒素で急速凍結融解したのちこのものの磷脂質分解活性を測定したが実質的に酵素活性の変化は認められず、凍結融解によって酵素と基質の接触増加がおきる可能性は否定された。

IV. 考 察

酵母細胞内にもともと存在する磷脂質分解酵素と *Cl. welchii* ホスホリパーゼ C との作用を比較したとき、最も大きな差異は、細胞内酵素がすべての基質を分解し得るのに対して、外から加えたホスホリパーゼ C ではその作用が特定の基質に限定されることであらう。これは主として酵素の基質との接触の差によるものと考えられる。第 2, 3 図の結果から容易にわかるように *Cl. welchii* ホスホリパーゼ C によるマイクロソーム磷脂質分解活性は通常の磷脂質ミセル分解反応などに比して非常に低く、最大活性を示す酵素濃度もすぐ飽和に達してしまう。このことは外から加えられた酵素がマイクロソームの内部に入り得ず、単に周辺部でしか作用出来ないことを示すものであろう。従ってこの酵素はマイクロソームの周辺に露出している磷脂質には近づくが、その内部で蛋白質との結合に関与している脂質には近づくないものと考えられる。第 4 図で *Cl. welchii* ホスホリパーゼ C 作用による全磷脂質の分解率に対するホスファチデルコリンの分解率が、細胞内酵素による同様の分解率よりも大きな値を示すのに、ホスファチデルセリンが全く分解されないのは、極性の小さいホスファチデルコリンはマイクロソームの周辺部であって酵素の作用を容易に受けるのに対して、極性の大きいホスファチデルセリンはその内部深く、酵素の近づく得ない部分に存在することを示すものであろう。この推定は膜の周辺部附近にはホスファチデルコリンが多く分布し、ホスファチデルセリンは膜の内部に集まって蛋白質との結合に関与しているとの考え方^{11,12)} を支持するものと思われる。

一方、細胞内に存在する酵素がマイクロソームを構成する蛋白の一部として存在するとすれば、脂質の種類による分解速度の差はあるとしても、すべての脂質を同様に分解することができるであらう。第 4 図はこの考えの妥当なことを示しているものと思われる。第 4 図において、細胞内酵素によってホスファチデルコリンの分解が極限に達したのち、ホスファチデルエタノールアミン、ホスファチデルセリンの順に最大分解率に達していることはそれが酵素反応の速度の差によるものであることを示している。一方 *Cl. welchii* ホスホリパーゼ C の場合には最大分解率の附近でホスファチデルコリン、ホスファチデルエタノールアミンともに同一点で反応の進行が停止し、その後もホスファチデルセリンの分解は見られない。このことはホスファチデルセリンが単なる速度のちがいで分解されないとは異なることを示すものであろう。

以上の結果から細胞内に存在するホスホリパーゼは構成蛋白の一部としてミクロソームの内部にまで入り込んでいるものと推察される。このことは機械的に破壊した細胞を遠心分画したとき、この酵素の活性が殆んど 105,000×g 沈澱の部分(ミクロソーム画分)に集まり、それ以外の細胞壁画分や水溶性部分には見られないこと¹⁾及びこの沈澱を 0.3 M NaCl 溶液中で超音波処理をほどこしても酵素の遊離は見られないこと(僧都未発表)などの結果からも支持されるものと思われる。

V. 摘 要

酵母ミクロソームを pH 3.21 でインキュベートすると磷脂質全体の約 70% までが自己の持つ酵素によって分解された。一方 pH 6.10 で *Cl. welchii* ホスホリパーゼ C を作用させるとこの分解は約 30% であった。

ミクロソームを構成する三種の主要な磷脂質のうちホスファチデルコリンは最も分解を受け易く細胞内酵素によってその約 80% が、また外から加えたホスホリパーゼ C によってその 60% が分解された。ホスファチデルエタノールアミンも両方の酵素の作用を受けたが分解された率は細胞内酵素によって約 67%、外から加えた酵素によって約 18% にとどまった。一方ホスファチデルセリンは細胞内酵素によってはその約 45% が分解されたが外から加えた酵素は全く作用しなかった。

以上の二点から酵母の磷脂質分解酵素はミクロソームの構造の一部をなすことが推定され、また磷脂質の構造については極性の小さいホスファチデルコリンはミクロソーム膜の周辺部に多く分布し、極性の大きいホスファチデルエタノールアミン及びホスファチデルセリンは膜の内部に多く分布し、蛋白質との結合に関与していることが推定された。

文 献

- 1) 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.
- 2) Souzu, H. 1974 The phospholipid degradation and cellular death caused by freeze-thawing or freeze-drying of yeast. *Cryobiology*, (投稿中).
- 3) Gordon, A. S., Wallach, D. F. H. and Straus, J. H. 1969 The optical activity of plasma membranes and its modification by lysolecithin, phospholipase A and phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta*, **183**, 405-416.
- 4) Emmelot, P. and Bos, C. J. 1968 Studies on plasma membranes V. On the lipid dependence of some phosphohydrolases of isolated rat liver plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 341-353.
- 5) Duttera, S. M., Byrne, W. L. and Ganoza, M. C. 1968 Studies on the phospholipid requirement of glucose-6-phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **243**, 2216-2228.
- 6) Ottolenghi, A. C. and Bowman, M. H. 1970 Membrane structure: Morphological and chemical alterations in phospholipase-C-treated mitochondria and red cell ghosts. *J. Membrane Biol.*, **2**, 180-191.
- 7) Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- 8) 僧都 博 1971 酵母磷脂質分解酵素の磷脂質への結合とその活性。低温科学, 生物篇, **29**, 9-17.
- 9) Ansell, G. B. and Hawthorne, J. N. 1964 *In Phospholipids-Chemistry, Metabolism and Function*. Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York, 152-174.

- 10) 今井 陽・坂上利夫 1966 脂質の生化学. 朝倉書店, 東京, 164-170.
- 11) Kavanau, J. L. 1965 *In* Structure and Function in Biological Membranes, Holden-Day, Inc., San Francisco, London, Amsterdam, 132-170.
- 12) Coleman, R., Finean, J. B., Knutton, S. and Limbrick, A. R. 1970 A structural study of the modification of erythrocyte ghosts by phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta*, **219**, 81-92.

Summary

Following incubation of yeast microsomes at pH 3.20, approximately 70% of the total phospholipid in the microsomes was degraded by the enzyme which is present intrinsically in yeast cell. However, only 30% of the total phospholipid in the same microsome fraction was degraded by the action of *Cl. welchii* phospholipase C at pH 6.10.

Of the three main phospholipids which comprise the yeast microsome, phosphatidylcholine was the most labile; approximately 80% of it was degraded by the endogenous enzyme and about 60% was degraded by *Cl. welchii* phospholipase C. Phosphatidylethanolamine was affected also by both enzymes; about 67% of it was degraded by the endogenous enzyme, but only about 18% was degraded by *Cl. welchii* phospholipase C. Phosphatidylserine was the most stable of these three phospholipids; about 45% of it was degraded by the endogenous enzyme, but none was degraded by *Cl. welchii* phospholipase C.

From these results it is conjectured that the phospholipase C of yeast cells exists as a part of the microsome embedded in the lipid layer. Moreover, it is supposed that the more polar lipids might be specifically associated with protein and retained in the inner space of membrane, whereas the less polar lipid molecules may be exposed at the perimeters of the membrane in the microsome fraction.