



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ハリナガオオバフンウニ内蔵ホスホリパーゼAの部分精製と性質
Author(s)	小山, 法希; KOYAMA, Noriki; 岸村, 栄毅 他
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 53(2), 57-62
Issue Date	2002-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/21967
Type	departmental bulletin paper
File Information	53(2)_P57-62.pdf



ハリナガオオバフンウニ内臓ホスホリパーゼ A の部分精製と性質

小山 法希¹⁾・岸村 栄毅¹⁾・林 賢治¹⁾

Partial Purification and Properties of Phospholipase A from the Viscera of the Sea Urchin *Strongylocentrotus franciscanus*

Noriki KOYAMA, Hideki KISHIMURA and Kenji HAYASHI

Abstract

Phospholipase A (PLA) was partially purified from the viscera of the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* by gel filtration on Sephacryl S-200, DEAE-cellulose anion exchange chromatography, and gel filtration on Sephadex G-50. For hydrolysis of egg yolk phosphatidylcholine, the optimum pH of the final enzyme preparation was in the range of pH 9-10. The partially purified PLA from the viscera of *S. franciscanus* hydrolyzed phosphatidylcholine more effectively than phosphatidylethanolamine like PLA₂ from the pyloric ceca of starfish.

Key words: *Strongylocentrotus franciscanus*, Sea urchin, Echinoderm, Viscera, Phospholipase A, Substrate specificity

緒 言

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選択的に加水分解する酵素であり、哺乳動物膵臓の PLA₂ が古くから研究されている (Nieuwenhuizen et al., 1974; Dutilh et al., 1975; Evenberg et al., 1977; Ono et al., 1984)。哺乳動物膵臓由来の PLA₂ は分子量約 14,000 であり、分子内に 7 個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 Ca²⁺ 濃度を必要とし、pH 9 付近に最適 pH を示す (Arni and Ward, 1996)。一方、海産無脊椎動物の PLA₂ に関する研究は少ない。Vaskovsky and Suppes (1972) は、ヒトデ類 5 種 (ヒトデ *Asterias amurensis*, ニッポンヒトデ *Distolasterias nippon*, エゾヒトデ *Aphelasterias japonica*, ユルヒトデ *Lysastrosoma anthosticta* および *Patiria pectinifera*) の幽門盲のうにホスホリパーゼ A (PLA) 活性を認めた。長谷川と佐々木 (1971) は、イトマキヒトデ *Asterina pectinifera* の幽門盲のうの PLA 活性値がラット肝臓の PLA 活性値より高値を示すことを報告した。また、長谷川と佐々木 (1971) および Okabe and Noma (1973) は、イトマキヒトデの凍結および未凍結の幽門盲のうの PLA₂ 活性が高く、PLA₁, リゾ PLA₂ およびリパーゼ活性の低いことを見出した。さらに、Okabe and Noma (1973) は、イトマキヒトデ幽門盲のうのホモジネートの PLA₂ 活性値がウニ膵臓の PLA₂ 活性値とほぼ同様であることを報告した。

近年、岸村と林 (1999) 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, ニチリンヒトデ *Solaster paxillatus*, ニッポンヒトデおよびヒトデ) の幽門盲のうから調製した粗酵素液の 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 種ヒトデ類の PLA 活性に比べ著しく高値であることを見出した。イトマキヒトデ幽門盲のうから精製された PLA₂ 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炭素鎖長や二重結合数によらず非選択的に加水分解した (Kishimura and Hayashi, 1999)。イトマキヒトデ幽門盲のうの PLA₂ のこれらの性質は、哺乳動物膵臓由来の PLA₂ の性質と同様であった。しかしながら、イトマキヒトデ幽門盲のうの 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) をよく加水分解し、基質の極性基に対する特異性においてブタ膵臓由来の PLA₂ と異なる性質を示した (Kishimura and Hayashi, 1999)。さらに、ヤツデヒトデ *Coscinasterias acutispina* の幽門盲のうから調製した部分精製 PLA₂ は、イトマキヒトデ幽門盲のうの PLA₂ と同様に PE に比べて PC をよく加水分解した (小山ら, 2001)。

以上のように、ヒトデ類幽門盲のうの PLA₂ は哺乳動物膵臓由来の PLA₂ とは異なる性質を有した。そこで本研究では、ヒトデ類幽門盲のうの PLA₂ の有する性質が棘皮動物に共通のものであるかを明らかにするため、ハリナガオオバフンウニ *Strongylocentrotus franciscanus* の内臓から

¹⁾ 北海道大学大学院水産科学研究科生物資源化学講座
(Laboratory of Marine Bioresources Chemistry, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

PLA を部分精製し、その酵素化学的性質を調べた。

試料および実験方法

試料

ハリナガオオバフンウニ *S. franciscanus* は 1995 年 1 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。基質の PC および PE 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漁獲され、分析まで -20°C で凍結保存した。卵黄 PC は和光純薬工業 (株) より購入した。

クロロホルム-メタノール脱脂粉末および粗酵素液の調製

ハリナガオオバフンウニ内臓のクロロホルム-メタノール脱脂粉末および粗酵素液の調製は、前報 (岸村・林, 1999) 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 および TLC-炎イオン化検出器 (TLC-FID) 法による分析は前報 (Hayashi, 1989; Hayashi and Kishimura, 1996) と同様に行った。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)} 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 (Kishimura and Hayashi, 1999) と同様に行った。活性の単位は 1 分間に 1 μg 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 (Kishimura and Hayashi, 1999) 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 (1970) の方法に準じて行った。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. (1951) の方法に準じて行った。

結 果

ハリナガオオバフンウニ内臓の PLA 活性

ハリナガオオバフンウニ内臓のクロロホルム-メタノール脱脂粉末から調製した粗酵素の PLA 活性の測定結果を、他 5 種のヒトデ類幽門盲の PLA 活性と比較して Table 1 に示す。ハリナガオオバフンウニ内臓の PLA 活性値 (120 U/g 脱脂粉末) および比活性値 (2.0 U/mg) はイトマキヒトデ、ヤツデヒトデおよびニチリンヒトデの幽門盲の (PLA 活性値: 540,000-1,000 U/g 脱脂粉末, 比活性値: 1,400-12 U/mg) に比べて低く、ニッポンヒトデおよびヒトデの幽門盲の (PLA 活性値: 70-27 U/g 脱脂粉末, 比活性値: 0.5 U/mg) と同程度であった。

ハリナガオオバフンウニ内臓の PLA の部分精製

ハリナガオオバフンウニ内臓から調製した粗酵素液は、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-A6 の 6 画分に画し、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 PLA 活性は TLC による酵素反応生成物の検出により行った。その結果、主要な PLA 活性は画分 A2 に認められ、遊離した脂肪酸とリゾホスファチ

Table 1. Phospholipase A activity of the crude enzyme from echinodermata

	Tissue	Activity (U/g powder)*1	Specific activity (U/mg)
<i>Strongylocentrotus franciscanus</i>	viscera	120	2.0
<i>Asterina pectinifera</i> *2	pyloric cecum	540,000	1,400
<i>Coscinasterias acutispina</i> *3	pyloric cecum	5,400	17
<i>Solaster paxillatus</i> *2	pyloric cecum	1,000	12
<i>Distolasterias nippon</i> *2	pyloric cecum	70	0.5
<i>Asterias amurensis</i> *2	pyloric cecum	27	0.5

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

*2 Kishimura and Hayashi, 1999.

*3 Koyama et al., 2001.

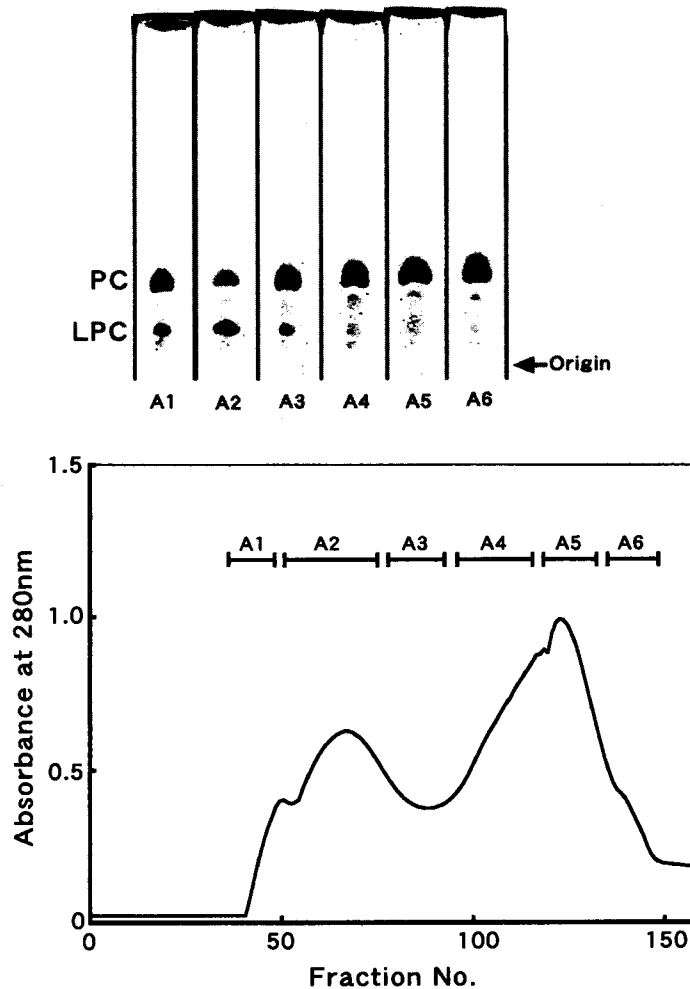


Fig. 1. Gel filtration of the crude enzyme prepared from the viscera of the sea urchin *S. franciscanus* on Sephacryl S-200. The crude enzyme was applied on a column (3.9×44 cm) of Sephacryl S-200 pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and eluted with the same buffer at a flow rate of 32 ml/h. Each 4.2 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-A6. PC: phosphatidylcholine, LPC: lysophosphatidylcholine.

ジルコリン (LPC) が強く検出された。次に、画分 A2 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-B8 の 8 画分を得た。それぞれの画分の PLA 活性を TLC による酵素反応生成物の検出を行ったところ、画分 B5 および画分 B6 に主要な PLA 活性が認められた (Fig. 2)。そこで、画分 B5 および画分 B6 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-C6 の 6 画分に分画し、それぞれの画分の PLA 活性を TLC による酵素反応生成物の検出を行った結果、画分 C2 に最も強い PLA 活性が認められた。画分 C2 のタンパク質

組成を SDS-PAGE により分析したところ数本のタンパク質が検出されたが (Fig. 3)、本画分 C2 を部分精製酵素として以下の分析に供した。

ハリナガオオバフンウニ内臓の PLA の精製過程を Table 2 に示す。ハリナガオオバフンウニ内臓から調製した粗酵素に対して、部分精製 PLA の比活性は 10 倍であり、活性回収率は 2% であった。

ハリナガオオバフンウニ内臓の部分精製 PLA の性質

ハリナガオオバフンウニ内臓より部分精製した PLA の卵黄 PC に対する活性の最適 pH は pH 9-10 の範囲にあった (Fig. 4)。次に、部分精製 PLA 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、それら基質の残存率の経時変化は TLC-FID 法により求めた。その結果、Fig. 5 に示すように部分精製 PLA は PE より PC をよく加水分解した。

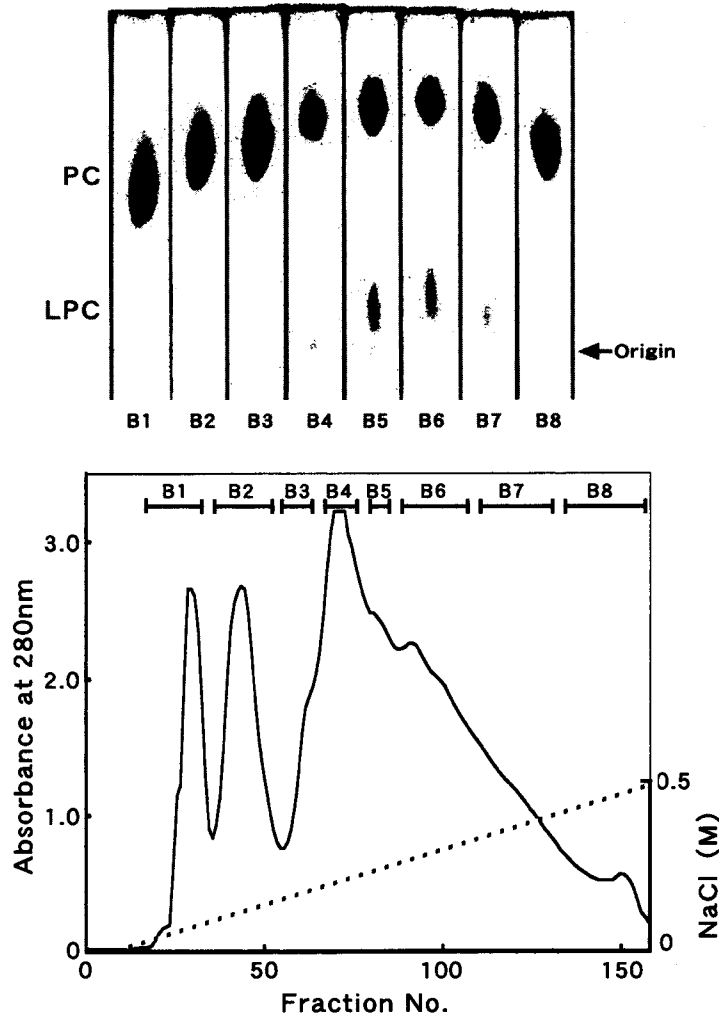


Fig. 2. DEAE-cellulose chromatography of the active fraction (A2) obtained from gel filtration in Fig. 1. The active fraction was applied on a column (2.0×25 cm) pre-equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in the same buffer of total volume of 500 ml at a flow rate of 27 ml/h. Each 3.6 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-B8. PC: phosphatidylcholine, LPC: lysophosphatidylcholine.

考 察

本研究において、ハリナガオオバフンウニ *S. franciscanus* の内臓からクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) による脱脂処理に対して非変性の PLA が部分精製された。SDS-PAGE 分析の結果、部分精製 PLA は、まだ数種のタンパク質の存在が確認された。ハリナガオオバフンウニ内臓の部分精製 PLA の比活性値 (15 U/mg) は、イトマキヒトデ幽門盲のうの PLA₂ (119,000 U/mg) (Kishimura and Hayashi, 1999) およびヤツデヒトデ幽門盲のうの部分精製 PLA₂ (1,100 U/mg) (小山ら, 2001) の比活性値より低かったが、ニチリンヒトデ幽門盲のうの PLA₂ の比活性値 (26 U/mg) (岸村・林, 1998) とほぼ同程度であった。

水産動物の消化腺由来の PLA₂ は、これまでイトマキヒトデ (Kishimura and Hayashi, 1999), ニチリンヒトデ (岸

村・林, 1998) およびヤツデヒトデ (小山ら, 2001) の幽門盲のうとマダイ *Pagrus major* の幽門垂 (Iijima et al., 1997) および肝膵臓 (Ono and Iijima, 1998) から精製または部分精製されている。本研究のハリナガオオバフンウニ内臓の部分精製 PLA の PC を基質とした場合の最適 pH (pH 9-10) は、イトマキヒトデ幽門盲のうの PLA₂ (最適 pH 9.0) (Kishimura and Hayashi, 1999), ニチリンヒトデ幽門盲のうの PLA₂ (最適 pH 9-10) (岸村・林, 1998) およびマダイ肝膵臓の PLA₂ (最適 pH 10) (Ono and Iijima, 1998) と類似したが、ヤツデヒトデ幽門盲のうの部分精製 PLA₂ (最適 pH 10-11) (小山ら, 2001), マダイ幽門垂の PLA₂ (最適 pH 8.5) (Iijima et al., 1997) およびマダイ肝膵臓の PLA₂ (最適 pH 9) (Ono and Iijima, 1998) と相違した。一方、ハリナガオオバフンウニ内臓の部分精製 PLA は、イトマキヒトデ幽門盲のうの PLA₂ およびヤツデヒトデ幽門盲のう

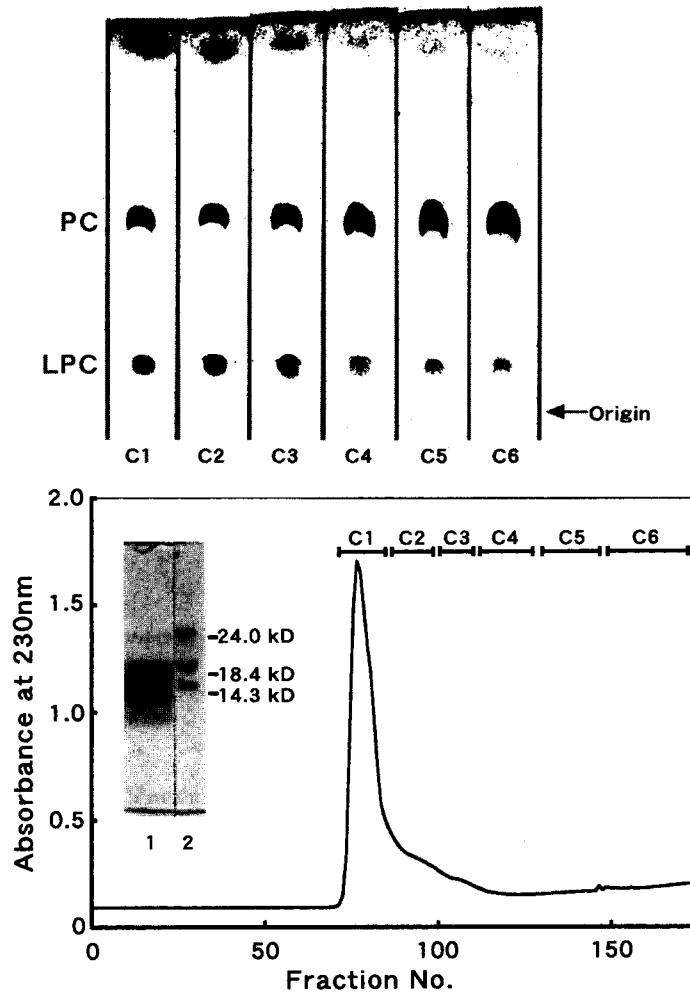


Fig. 3. Gel filtration of the active fractions (B5 and B6) obtained by anion exchange chromatography on DEAE-cellulose. The active fraction was applied on a column (3.9×70 cm) of Sephadex G-50 pre-equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and eluted with the same buffer at a flow rate of 26 ml/h. Each 3.4 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 (C2). 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-C6. PC: phosphatidylcholine, LPC: lysophosphatidylcholine.

Table 2. Purification of phospholipase A from the viscera of the sea urchin *S. franciscanus*

Purification step	Protein (mg)	Total activity (U)*	Specific activity (U/mg)	Purity (fold)	Yield (%)
Crude enzyme	1,000	1,500	1.5	1	100
Sephacryl S-200	58	750	13	9	50
DEAE-cellulose	15	170	11	7	11
Sephadex G-50	2.1	32	15	10	2

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

の部分精製 PLA₂と同様に PE よりも PC をよく加水分解した (Kishimura and Hayashi, 1999; 小山ら, 2001)。

結局, ハリナガオオバフンウニ内臓の部分精製 PLA は, ヒトデ類幽門盲のうの PLA₂と同様に, アルカリ性域に最適 pH を有し, PE よりも PC をよく加水分解する基質極性基特異性を示した。

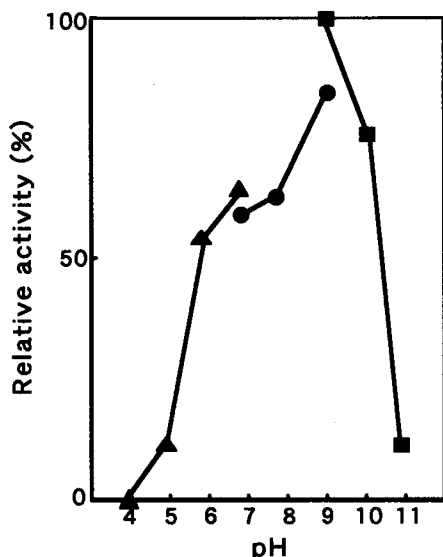


Fig. 4. Effect of pH on the activity of partially purified phospholipase A from the viscera of the sea urchin *S. franciscanus*. The activities were determined in 50 mM buffer solutions [acetic acid-sodium acetate (pH 4.0-7.0) (▲), Tris-HCl (pH 7.0-9.0) (●), and glycine-NaOH (pH 9.0-11.0) (■)] at 37°C.

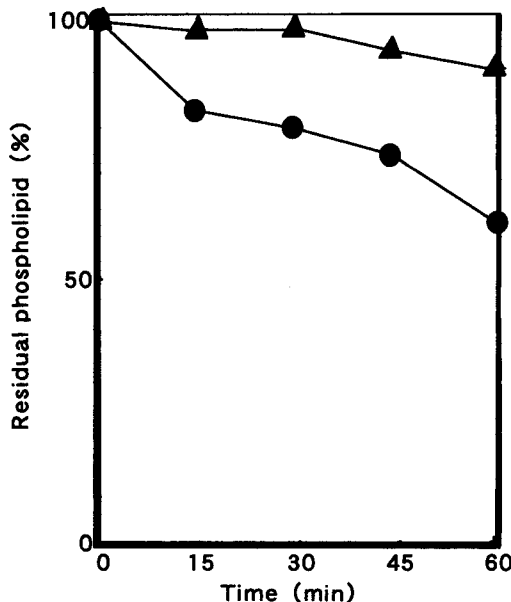


Fig. 5. Time-course of hydrolysis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine with partially purified phospholipase A from the viscera of the sea urchin *S. franciscanus*. Hydrolysis of squid muscle phosphatidylcholine (●) and phosphatidylethanolamine (▲) with partially purified phospholipase A from the sea urchin *S. franciscanus*. The proportion of residual substrate was determined by measurement of the amounts of phosphatidylcholine or phosphatidylethanolamine using TLC-FID.

文 献

Arni, R.K. and Ward, R.J. (1996) Phospholipase A₂-a structural review. *Toxicon*, **34**, 827-841.

Dutilh, C.E., van Doren, P.J., Verheul, F.E.A.M. and de Haas, G.H. (1975) Isolation and properties of phospholipase A₂ from ox and sheep pancreas. *Eur. J. Biochem.*, **53**, 91-97.

Evenberg, A., Meyer, H., Verheij, H.M. and de Haas, G.H. (1977) Isolation and properties of pro-phospholipase A₂ and phospholipase A₂ from horse pancreas and horse pancreatic juice. *Biochim. Biophys. Acta*, **491**, 265-274.

Hayashi, K. (1989) Occurrence of diacyl glyceryl ethers in liver lipids of gonatid squid *Gonatopsis borealis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 1383-1387.

Hayashi, K. and Kishimura, H. (1996) Preparation and purification of DHA-enriched triacylglycerols from fish oils by column chromatography. *Fisheries Sci.*, **62**, 842-843.

Iijima, N., Chosa, S., Uematsu, K., Goto, T., Hoshita, T. and Kayama, M. (1997) Purification and characterization of phospholipase A₂ from the pyloric ceca of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.*, **16**, 487-498.

岸村栄毅・林 賢治 (1998) ニチリンヒトデ類類門盲のうホスホリパーゼ A₂ 様酵素の精製と性質. 日水誌, **64**, 264-269.

岸村栄毅・林 賢治 (1999) ヒトデ類類門盲のうのホスホリパーゼ A 活性. 日水誌, **65**, 110-111.

Kishimura, H. and Hayashi, K. (1999) Isolation and characteristics of phospholipase A₂ from the pyloric ceca of

the starfish *Asterina pectinifera*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **124B**, 483-488.

小山法希・岸村栄毅・林 賢治 (2001) ヤツデヒトデ類門盲のうホスホリパーゼ A₂ の部分精製と性質. 日水誌, **67**, 728-734.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

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**, 265-273.

Nieuwenhuizen, W., Kunze, H. and de Haas, G.H. (1974) Phospholipase A₂ (phosphatide acylhydrolase, EC 3.1.1.4) from porcine pancreas. *Methods Enzymol.*, **32B**, 147-154.

Ono, T., Tojo, H., Inoue, K., Kagamiyama, H., Yamano, T. and Okamoto, M. (1984) Rat pancreatic phospholipase A₂: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J. Biochem.*, **96**, 785-792.

Ono, H. and Iijima, N. (1998) Purification and characterization of phospholipase A₂ isoforms from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.*, **18**, 135-148.