



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	イトマキヒトデ幽門盲の由来ホスホリパーゼA2の構造・機能特性および大腸菌による発現に関する研究
Author(s)	岸村, 栄毅
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	乙第5861号
Issue Date	2001-09-28
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r5861
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32699
Type	doctoral thesis
File Information	5861.pdf



イトマキヒトデ幽門盲のう由来ホスホリパーゼA₂の
構造・機能特性および大腸菌による発現に関する研究

岸村 栄毅

平成13年度

目次

	頁
緒言	4
第1章 ヒトデ類幽門盲のうのホスホリパーゼA活性	
第1項 目的	10
第2項 材料および方法	10
1. 試料	10
2. 方法	11
第3項 結果	15
1. ヒトデ類幽門盲のうからのPLA粗酵素の調製	15
2. ヒトデ類幽門盲のうPLA活性	17
第4項 小括	21
第2章 イトマキヒトデ幽門盲のうホスホリパーゼAの精製と性質	
第1項 目的	23
第2項 材料および方法	23
1. 試料	23
2. 方法	24
第3項 結果	27
1. PLAの基質の精製	27
2. イトマキヒトデ幽門盲のうPLAの分離・精製	27
3. イトマキヒトデ幽門盲のうPLAの酵素化学的性質	34
第4項 小括	49
1. イトマキヒトデ幽門盲のうPLAの分離・精製	49
2. イトマキヒトデ幽門盲のうPLAの酵素化学的特性	53
第3章 イトマキヒトデ幽門盲のうホスホリパーゼA ₂ のアミノ酸配列	
第1項 目的	55
第2項 材料および方法	55
1. 酵素	55
2. 方法	56
第3項 結果	59

1. イトマキヒトデPLA ₂ のアミノ酸組成	59
2. イトマキヒトデPLA ₂ のアミノ酸配列	59
第4項 小括	68
第4章 イトマキヒトデ幽門盲のうホスホリパーゼA ₂ のcDNAクローニング	
第1項 目的	74
第2項 材料および方法	74
1. 方法	74
第3項 結果	80
1. イトマキヒトデPLA ₂ のcDNAクローニング	80
2. イトマキヒトデPLA ₂ と他種生物由来PLA ₂ のアミノ酸配列の比較	92
第4項 小括	95
1. イトマキヒトデPLA ₂ のcDNAクローニング	95
2. イトマキヒトデPLA ₂ の構造上の特徴	96
第5章 イトマキヒトデ・ホスホリパーゼA ₂ の大腸菌による発現	
第1項 目的	106
第2項 材料および方法	106
1. 方法	106
第3項 結果	108
1. イトマキヒトデPLA ₂ の大腸菌による発現	108
2. 大腸菌により発現したPLA ₂ の酵素化学的性質	121
第4項 小括	130
1. イトマキヒトデPLA ₂ の大腸菌による発現	130
総括	133
参考文献	140
謝辞	151

本論文で用いた略語を以下に記した。

ATP	adenosine 5'-triphosphate
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CM-	carboxymethyl-
ddNTP	dideoxy nucleoside 5'-triphosphate
DEPC	diethylpyrocarbonate
dNTP	deoxy nucleoside triphosphate
DEAE-	diethylaminoethyl-
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FFA	free fatty acid
GLC	gas-liquid chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
LPC	lysophosphatidylcholine
LPE	lysophosphatidylethanolamine
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PC	phosphatidylcholine
PCR	polymerase chain reaction
PE	phosphatidylethanolamine
PLA	phospholipase A
PLA ₂	phospholipase A ₂
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
SDS	sodium dodecyl sulfate
TFA	trifluoroacetic acid
TLC	thin-layer chromatography
TLC-FID	thin-layer chromatography-frame ionization detector method
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

緒 言

古来、人類は魚介類や海藻などの水産生物資源を食糧源の一つとして利用してきた。特に、四方を海に囲まれている我が国では歴史的に水産生物資源に対する依存度は高く、生鮮品、干物、練り製品、その他多様な形態で利用している。一方、近年では水産生物資源を工業原料や医薬品、微量高付加価値成分原料として利用しようという試みもなされている。例えば、魚介類の不可食残滓部分や未利用魚種から酵素・ホルモン・ビタミンや、高度不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸（EPA）・ドコサヘキサエン酸（DHA）などを分離し、高度利用が試みられている。これらの成分を有効利用するためには、近年普及した各種の高度技術、特にバイオテクノロジーを積極的に導入するとともに、水産生物資源の利用に適した新技術を開発することも必要である。バイオテクノロジーは一般に「生物体またはその機能を直接または模倣して有用物質を生産する技術」と理解され、水産化学の分野では酵素の利用、遺伝子組換え技術、細胞融合技術などが主として挙げられる¹⁾。その中でも酵素機能の利用は、その適用範囲が基礎・応用の両面で広いことから有用性が高い技術と考えられる。

酵素は特有の反応特異性をもち、温和な条件下で効率的に働くタンパク質触媒である。現在知られている酵素の種類は3,000を超えるが、このような多様性は酵素の一次構造および高次構造、特に活性中心の立体構造の相違に起因する^{2,3)}。海洋には50万種以上にもおよぶ多種多様な生物が棲息しているが、それらのもつ酵素の構造・機能も海洋環境への適応に伴い多様となったと考えられる。そのため、古くから水産生物の酵素は比較生化学的観点から活発に研究され、種々の特異な酵素の存在が明らかにされている⁴⁾。例えば、魚介類の消化液中に未変性コラーゲンを分解できる特異なプロテアーゼが存在すること、ニジマスやハマチの肝臓中にはADPを補酵素として利用可能なヘキソキナーゼが存在することなどが報告されている⁵⁾。また、幾つかの水産生物の酵素については細胞工学分野

での利用が試みられている。例えば、海産の貝類や微生物から調製した多糖類分解酵素を用いて海藻の細胞壁を分解し、プロトプラストが作成されている^{5,6)}。

ところで、酵素を工業的に利用するようになったのは1900年代の半ばからである。産業用酵素の世界市場の成長は著しく、その産額は1980年度は3億ドル、1993年度に11億ドルに達し^{7,8)}、2000年度には20億ドルを超えるものと推定されている⁹⁾。産業用酵素の利用範囲も、製糖工業、デンプン工業、洗剤工業、食品加工業、繊維加工業、製紙工業、醸造工業、畜産・乳工業などの分野に加え、医薬品工業など広範囲にわたっている。従来、産業用酵素の供給源は主に酵母、バクテリアなどの微生物、カビのような菌類、動物の臓器などであったが、多量の酵素を生物から抽出、精製することに困難が伴うことから、1980年代からは遺伝子工学的に生産されるものも増えてきた。すなわち、組換えDNA技術を用いて異種生物のタンパク質遺伝子を微生物や培養細胞によって発現させることができるようになったため、仔ウシの凝乳酵素キモシンやヒト由来のインスリン、成長ホルモン、プラスミノゲンアクティベーターといった高価な酵素やホルモンが微生物により工業規模で生産されるようになった。さらに、部位特異変異法により天然の酵素タンパク質のアミノ酸配列を改変し、より優れた機能をもつ酵素の作製が試みられている。このような遺伝子工学的技術を利用できれば、たとえ希少で、高価な水産生物の酵素であっても工業的レベルでの生産・利用が可能となると考えられる。

酵素の種類は多様であるが、その中で脂質の代謝・合成に関わる脂質関連酵素は、基質が水に不溶であるために水溶性成分を基質とする酵素に比べ酵素化学的研究は難しい。そのため、脂質関連酵素の研究は遅れていたが、最近急速に進歩したタンパク質の構造学や遺伝子工学の導入によりその作用機構や活性部位の構造などが次第に明らかにされつつある。脂質関連酵素は合成に関与するものと分解に関与するものとに大別されるが、脂質分解酵素は合成酵素に比べると古くから研究されてきた。1856年にBernardによって脾臓ホモジネート中に発見されたリパーゼ（EC 3.1.1.3）は脂質分解酵素の中で最も古くから

研究されているものである。リパーゼはトリグリセリドを脂肪酸と部分グリセリドあるいはグリセロールに加水分解する酵素であり、種々の動物臓器、植物種子および微生物に広く存在している⁹⁾。一方、リン脂質を分解するホスホリパーゼも古くから研究されている脂質分解酵素である。ホスホリパーゼはレシチン（ホスファチジルコリン）を良く分解することから当初レシチナーゼと呼ばれたが、その後、各種のグリセロリン脂質（ホスホリピッド）に作用することがわかり、現在ではホスホリパーゼと呼ばれている。グリセロリン脂質はFig. 1に示すように、2つの脂肪酸エステル結合および1つのリン酸ジエステル結合を含む化合物である。ホスホリパーゼは切断するエステル結合の位置によりA、B、CおよびDの4群に分類される。ホスホリパーゼAはグリセロリン脂質の2つの脂肪酸エステル結合のいずれか一方のみを加水分解する酵素に対する名称であり、グリセロール骨格の *sn*-1位を特異的に切断するものをホスホリパーゼA₁（EC 3.1.1.32）、*sn*-2位に特異的なものをホスホリパーゼA₂（EC 3.1.1.4）と呼ぶ。*sn*-1位と*sn*-2位の両方の脂肪酸エステル結合を加水分解する酵素をホスホリパーゼB（EC 3.1.1.5）と呼び、グリセロール側のリン酸エステル結合を加水分解するものはホスホリパーゼC（EC 3.1.4.3）、塩基側のリン酸エステル結合を加水分解するものをホスホリパーゼD（EC 3.1.4.4）と呼んでいる。これらホスホリパーゼの中で最も詳しく研究されているのはホスホリパーゼA₂（PLA₂）である（Fig. 2）。PLA₂は1932年Nikuni¹⁰⁾とBelfanti and Arnaudi¹¹⁾により独立に腭液中に発見され、その後、リパーゼと同様に種々の動植物および微生物に存在することが明らかにされた¹²⁾。最近では比較的多量の酵素が得られる哺乳動物の腭臓やヘビ毒の分泌型PLA₂を用いて、その構造と反応機構の関連が分子レベルで解析されている¹³⁻¹⁶⁾。一方、細胞内PLA₂については形質膜を介した細胞応答におけるアラキドン酸カスケードに関わる酵素として、また、炎症のケミカルメディエーターである血小板活性化因子（PAF）の産生に関与する酵素として、活性発現の調節機構が研究されている¹⁷⁻²²⁾。

一方、利用面に目を向けると、生体膜における脂質-タンパク質の相互作用や膜リン脂

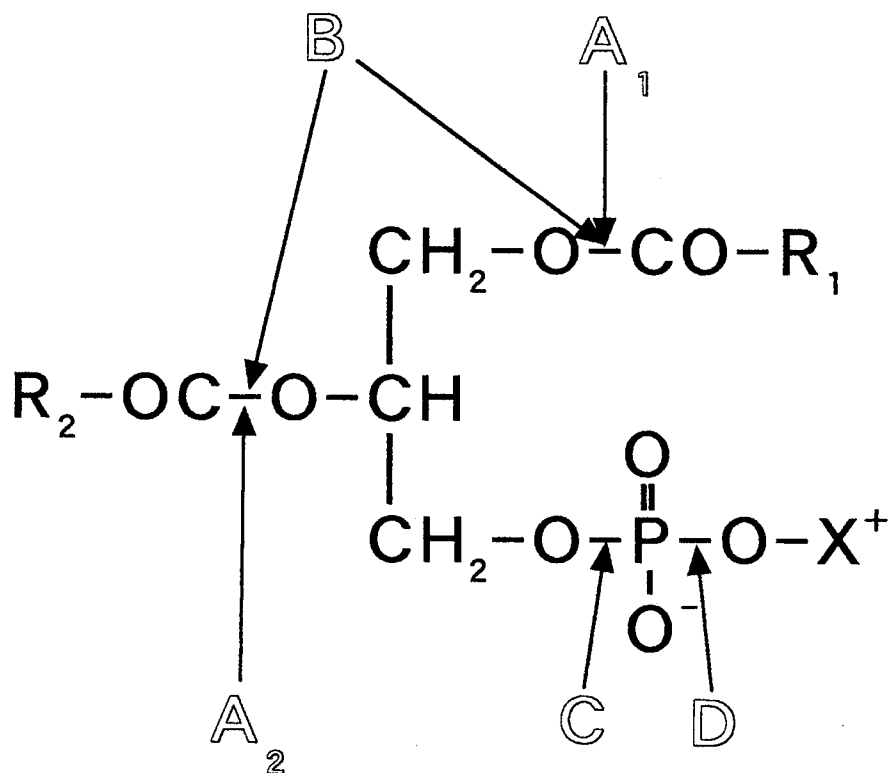


Fig. 1. Sites for action of the phospholipases.

R_1 and R_2 represent the fatty acids on the *sn*-1 and *sn*-2 positions in phospholipid, respectively. X represents the polar group: usually choline, ethanolamine, serine, inositol, or glycerol. A_1 , A_2 , B , C , and D represent the species of phospholipase and the arrowheads show the positions of enzymatic action.

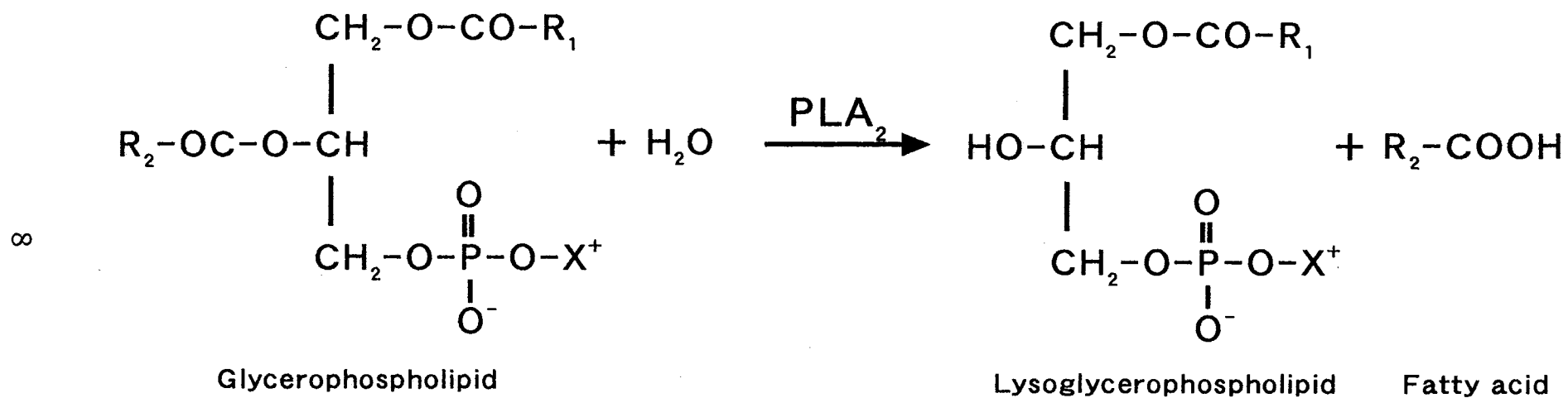


Fig. 2. Hydrolytic reaction of glycerophospholipid by phospholipase A₂.

質の動態を解析するためにPLA₂が利用され^{23, 24)}、大豆レシチンからの機能性リゾレシチンの製造や、食用乳化剤（リゾレシチン、リゾホスファチジン酸）の製造などにも利用されている²⁵⁻²⁸⁾。また、粗食用油の脱ガム工程^{29, 30)}や卵黄およびウサギ血漿低密度リポタンパク質の機能改変³¹⁾においてもPLA₂が利用されている。このように、PLA₂の応用範囲は極めて広いが、現在のところ試薬用のPLA₂としてはブタ膵臓、ウシ膵臓、ヘビ毒、ミツバチ毒および微生物（*Streptomyces violaceoruber*）由来のものがあり、工業用としてはブタ膵臓由来のものがあるのみであり、今後もさらに多様な酵素化学的特性をもつ新規PLA₂の探索と産業利用化が期待される。

Hayashi³²⁾、Hayashi and Kishimura³³⁾によれば、ヒトデ類のうち、特にイトマキヒトデ（*Asterina pectinifera*）の幽門盲のうに高濃度の遊離脂肪酸が含有されることが明らかにされ、このことからイトマキヒトデ幽門盲のうちでは脂質分解酵素活性が高い可能性が考えられた。そこで本研究では、未利用水産生物資源であるヒトデ類に着目し、PLA₂の検索・単離および酵素化学的特性、さらには産業利用を考慮して、大量生産のための大腸菌発現系を構築することを目的とした。

第1章 ヒトデ類幽門盲のうのホスホリパーゼA活性

第1項 目的

従来、産業用および研究用のPLA₂は哺乳動物膵臓・ヘビ毒・ハチ毒および微生物から得られたものが用いられているが、海産生物由来のもので利用されたものは無い。そこで本章では、北海道沿岸で採取された未利用海産生物資源であるヒトデ類がPLA₂の新規供給源として有用であるかどうかを評価するために、先ず、幽門盲のう中のPLA活性のスクリーニングを行った³⁴⁾。

第2項 材料および方法

1. 試料

イトマキヒトデ (*A. 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*) は、1993年4月から1997年2月に北海道函館沖、猿払沖および白尻海岸で採取し、生きたまま直ちにあるいは-20℃で凍結保存した後に使用した。

ブタ膵臓は、函館市近郊の畜肉店から購入し、-35℃で凍結保存した後に使用した。

ブタ膵臓由来PLA₂は、天野製薬より購入した。

2. 方法

2.1 脱脂粉末の調製

(1) アセトン粉末の調製

ヒトデ類の幽門盲のうを細切または乳鉢で摩砕した後、3倍容量 (v/w) のアセトン (0℃) を加え、ホモジナイザーで10分間攪拌して得られたホモジネートを吸引ろ過した。残渣をさらに冷アセトン (2倍容量) およびヘキサン (2倍容量) で洗浄した後、風乾してアセトン粉末とした。

(2) クロロホルム-メタノール粉末の調製

ヒトデ類の幽門盲のうを細切または乳鉢で摩砕した後、4倍容量 (v/w) のクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) を室温にて加え、ホモジナイザーで10分間ゆるやかに攪拌して得られたホモジネートを吸引ろ過した。残渣をさらに2倍容量の前述のクロロホルム-メタノールおよびアセトン (1.3倍容量) で順次洗浄した後、風乾したものをクロロホルム-メタノール粉末とした。

2.2 粗酵素の調製

(1) 酸-加熱処理による粗酵素の調製

酸-加熱処理による粗酵素の調製はde Haas *et al.*の方法³⁵⁾に従い以下のように行った。すなわち、幽門盲のうのアセトン粉末に50倍容量の50 mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加え、その溶液を4℃で3時間マグネチックスターラーで攪拌して酵素を抽出した。抽出液は10,000×gで10分間遠心分離した後、上澄みを凍結乾燥法により濃縮した。次に、この濃縮液をpH 4.0に調整し、70℃で3分間加熱した。加熱後ただちに溶液を冷却し、生じた沈澱を遠心分離 (10,000×g、10分間) により除去した。得られた上澄みをpH 8.0に戻し、これを酸-加熱処理粗酵素とした (Fig. 3)。

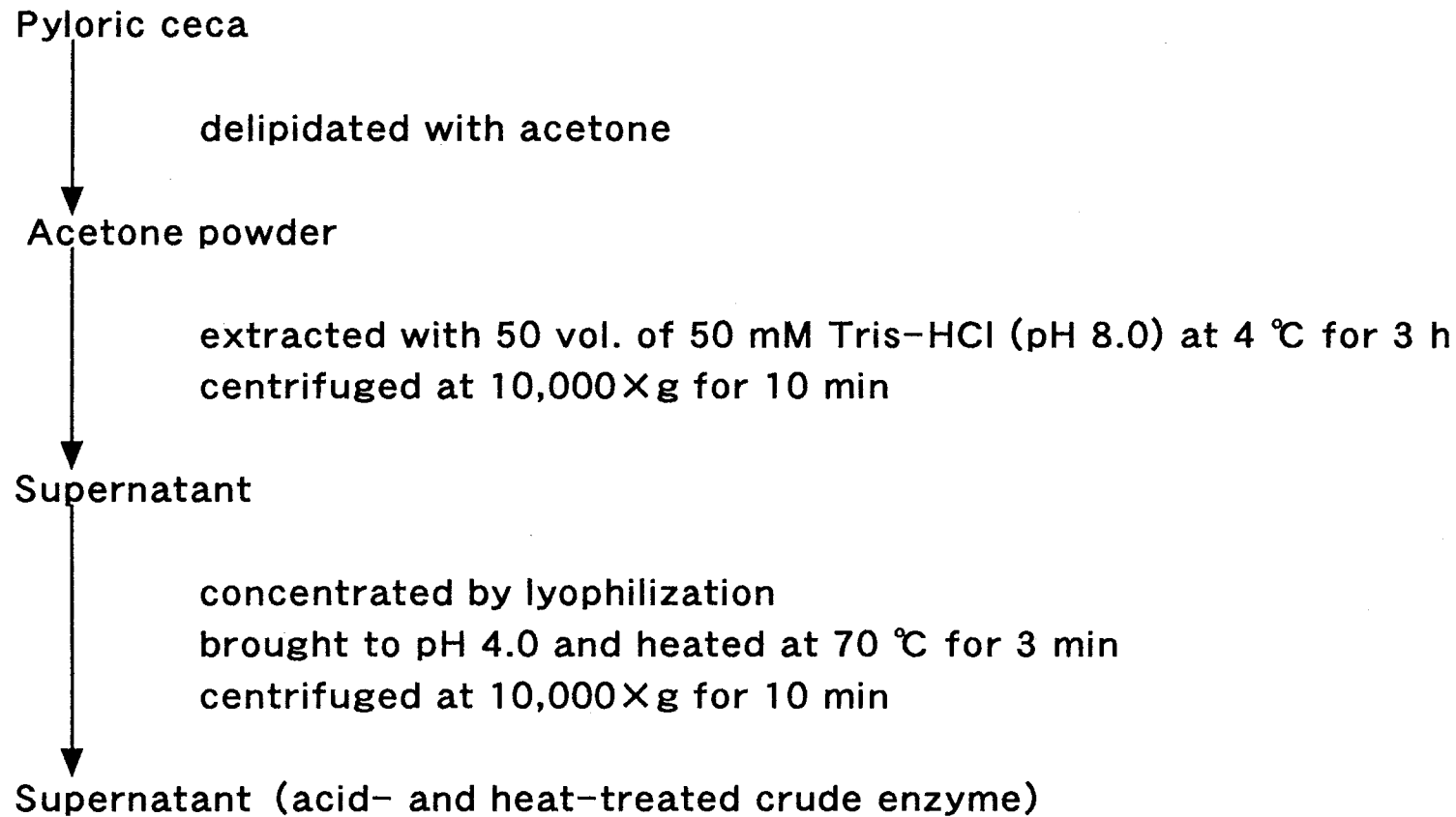


Fig. 3. Outline of preparation of acid- and heat-treated crude enzyme from the pyloric ceca of starfish.

(2) 改良法による粗酵素の調製

de Haas *et al.*の方法³⁵⁾で調製した粗酵素と比較するために、クロロホルム-メタノール粉末およびアセトン粉末から酸-加熱処理をしない改良法で粗酵素を抽出した。すなわち、幽門盲のうのクロロホルム-メタノール粉末およびアセトン粉末にそれぞれ50倍容量の50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加え、4 °C で3時間マグネチックスターラーで攪拌して酵素を抽出した。両抽出液は10,000×gで10分間遠心分離した後、上澄みを凍結乾燥法により濃縮し、それぞれ粗酵素[I]および[II]とした。比較のため、生鮮ブタ脾臓からも同様の方法で粗酵素[I]および[II]を調製した (Fig. 4)。

2.3 酵素活性の測定

ベンゼン-エタノール (1:1, v/v) に溶解した10 μ l (100 μ g) の卵黄PC (和光純薬工業) 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トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) をそれぞれ終濃度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により分析した。酵素単位は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。

2.4 タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度はBSAを標準タンパク質として用い、Lowry *et al.*の方法³⁶⁾により比色定量した。

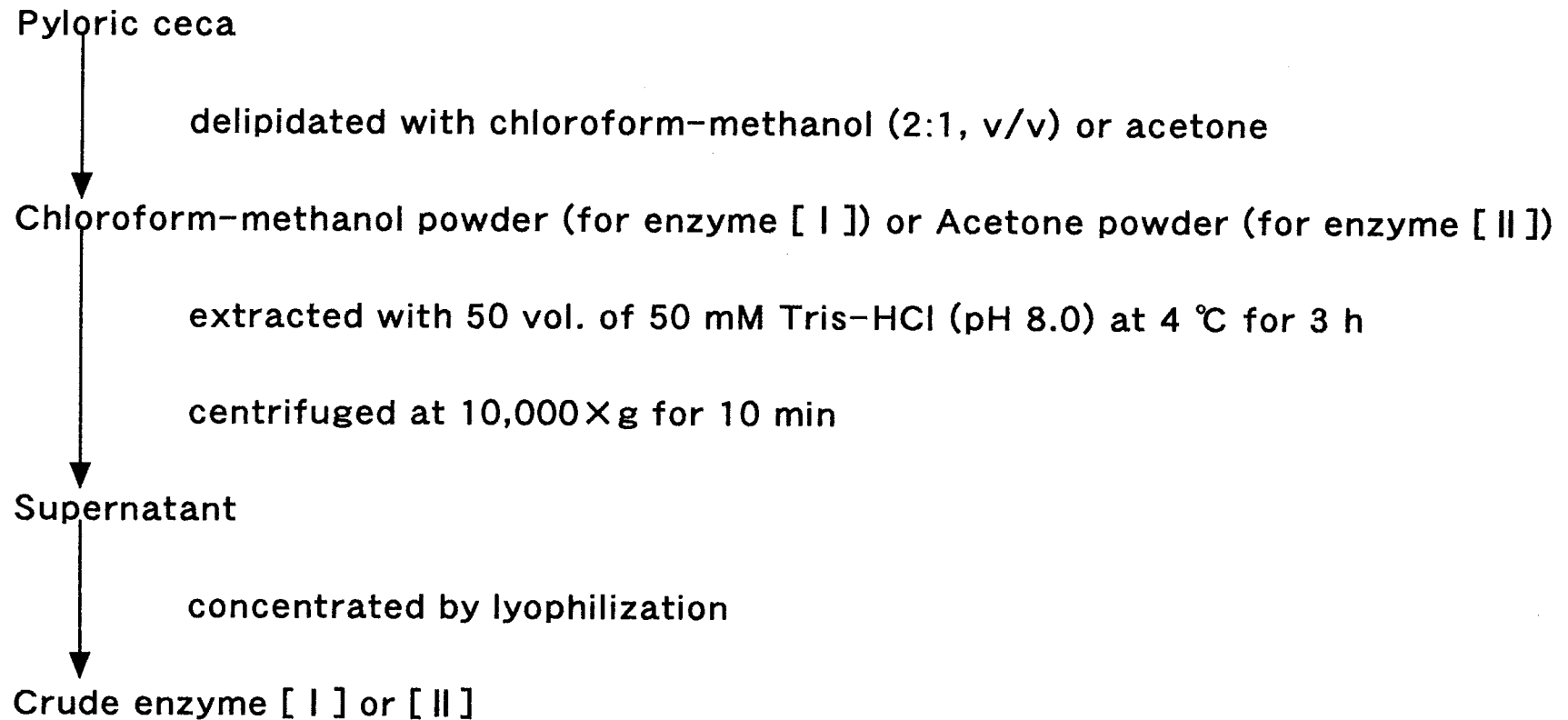


Fig. 4. Outline of preparation of crude enzymes [I] and [II] from the pyloric ceca of starfish by modified method.

2.5 脂質の分析

(1) 脂質組成の分析

脂質成分の定性分析は、吸着剤としてワコーゲルB5（和光純薬工業）を塗布したプレート（20×20 cm, 厚さ0.25 mm）を用いてTLCにより行った。展開溶媒にはクロロホルム-メタノール-酢酸-水（55 : 17 : 3 : 2, v/v/v/v）またはヘキサン-ジエチルエーテル-酢酸（85 : 15 : 1, v/v/v）を、検出試薬には50 %硫酸水溶液を用いた。

脂質成分の定量分析は、TLC-FIDにより行った。すなわち、試料をクロマロッド S-Ⅲ にスポットし、クロロホルム-メタノール-酢酸-水（55 : 17 : 6.5 : 2.5, v/v/v/v）で展開した後、イアトロスキャン TH10（ヤترون）を用いて分析し、クロマトパック R-1A（島津）を用いてクロマトグラムを記録した。運転条件は以下の通りである：水素流量 ; 160 ml/min、空気流量 ; 2,000 ml/min、スキャンスピード ; 30 s/scan。

第3項 結果

1. ヒトデ類幽門盲のうからのPLA粗酵素の調製

哺乳動物臍臓由来のPLA₂は酸および熱に安定であることから、その精製過程において酸および熱処理が用いられている³⁵⁾。そこで本研究においても、4種のヒトデの幽門盲のうから酸-加熱処理により粗酵素を調製し、それらのPLA活性を分析した。その結果、Fig. 5に示すように、いずれの酸-加熱処理粗酵素もPLAの活性を示したが、その強さはヒトデの種類によって異なっていた。すなわち、イトマキヒトデの粗酵素は37℃、3時間の反応によりほぼ完全にPCをリゾホスファチジルコリン（LPC）と脂肪酸に加水分解したが、他3種のヒトデの粗酵素は部分的にしか加水分解しなかった。このことから、4種

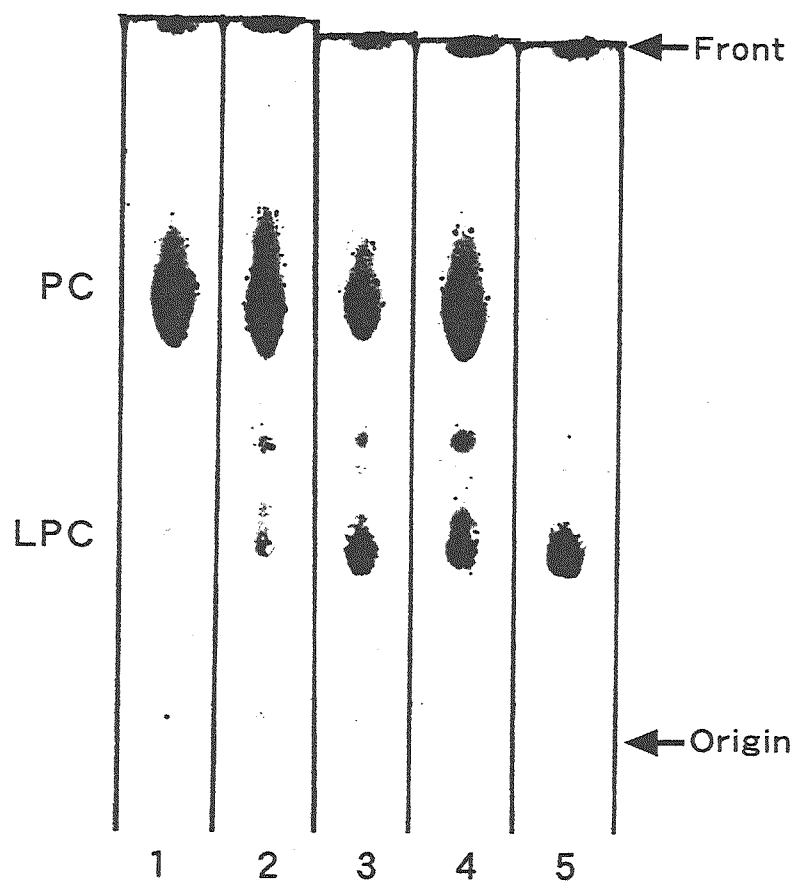


Fig. 5. Thin-layer chromatograms of reaction products of acid and heat treated-crude enzymes from the pyloric ceca of the four species of starfish.

Lane 1, control PC; Lane 2-5, reaction products of crude enzymes from *A. amurensis*, *D. nippon*, *S. paxillatus*, and *A. pectinifera*, respectively. PC, phosphatidylcholine; LPC, lysophosphatidylcholine.

のヒトデの中ではイトマキヒトデが最も高いPLA活性を持つと推定された。

次に、4種のヒトデの酸-加熱処理粗酵素についてPLA比活性の算出を試みた。しかしながら、Fig. 6,aに示すようにこれら酸-加熱処理粗酵素には遊離脂肪酸や極性脂質などの脂質が残存しており、これらの酵素標品では正確な比活性を求めることが困難であることが分かった。そこで、クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) 処理により調製した脱脂粉末から粗酵素を抽出し、その脂質残存量を調べた。その結果、Fig. 6,bに示すように、この粉末からの抽出物 (粗酵素[I]) には脂質の残存がほとんど認められないことが分かった。なお、これらの粗酵素[I]について70 °Cで3分間の加熱処理による精製を試みたが、Table 1に示すようにタンパク質量が37-45 %に減少するものの、PLA比活性値も21-66 %に減少したため、酸-加熱処理による精製の効果は低いと判断された。従って本研究では、酸-加熱処理を行わない改良法により粗酵素[I]を調製することにした。

2. ヒトデ類幽門盲のうPLA活性

Fig. 5の結果から、4種のヒトデの幽門盲のう中のPLA活性の中ではイトマキヒトデの活性が他の3種のそれらに比べて高いことが分かった。そこで次に、4種のヒトデ幽門盲のうのクロロホルム-メタノールおよびアセトン粉末から調製したそれぞれ粗酵素[I]および[II]を用いて、PLA活性の定量分析を行った。このとき、ヒトデを-20 °Cで種々の期間保存したときの活性の変化についても検討した。その結果、Table 2に示すように生鮮ヒトデから調製した粗酵素[I]のPLAの総活性および比活性値はヒトデの種類によって異なり、イトマキヒトデの総活性 (543,687 U/g乾燥粉末) および比活性 (1,427 U/mg) は非常に高く、次いでニチリンヒトデのものであったが、その比活性は1/100以下であった。さらに、-20 °Cで9-46ヶ月間凍結保存した4種のヒトデの粗酵素[I]の比活性はやや低下するものの安定性があり、長期保存が可能であることが分かった。

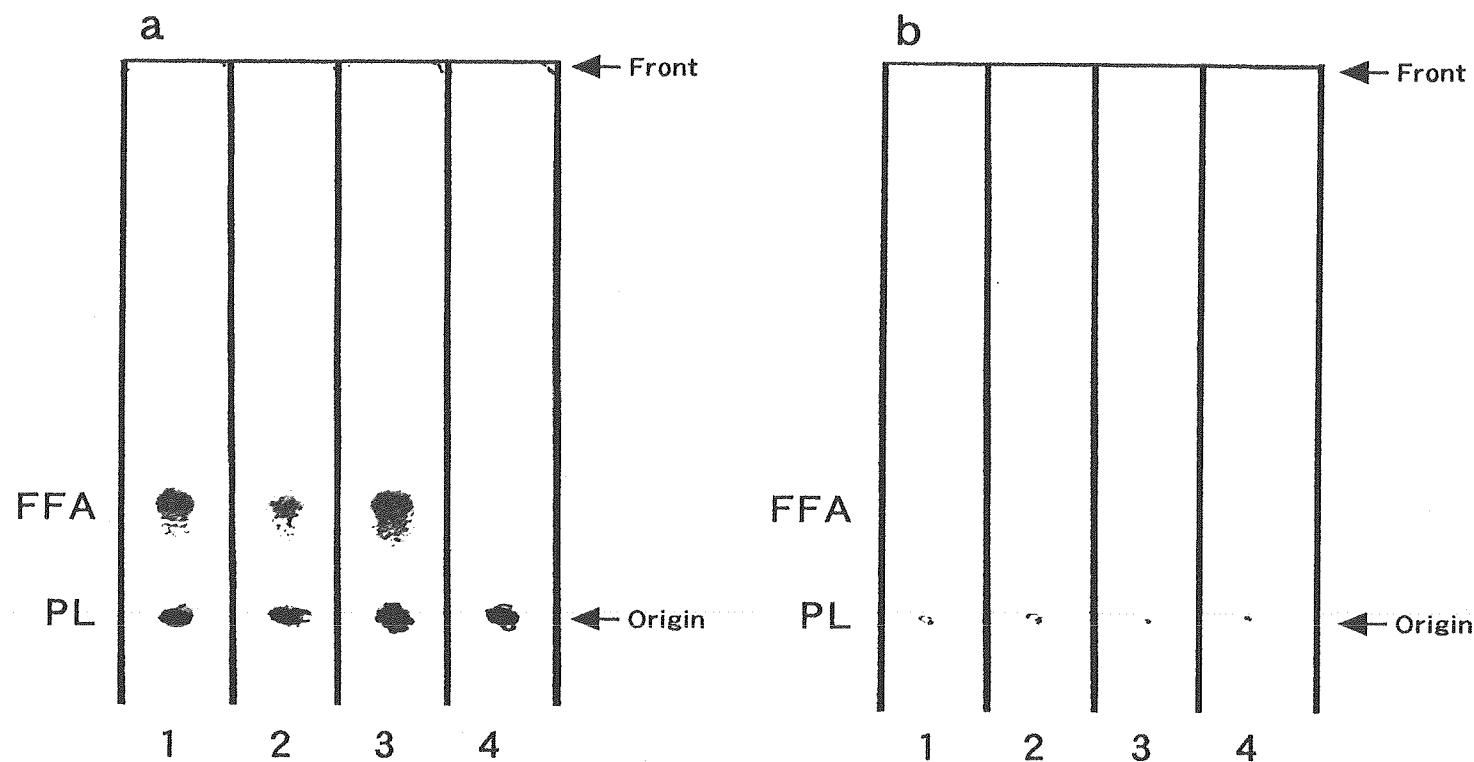


Fig. 6. Thin-layer chromatograms of chloroform-methanol (1:2, v/v) extracts from delipidated powder of the pyloric ceca of starfish.

The TLC plates were developed with hexane-diethyl ether-acetic acid (85:15:1, v/v/v), and then the spots were detected with 50 % sulfuric acid.

a, extracts from acetone powder; b, extracts from chloroform-methanol powder.

Lane 1-4, extracts of *A. amurensis*, *D. nippon*, *S. paxillatus* and *A. pectinifera*, respectively.

FFA, free fatty acid; PL, polar lipid.

Table 1. Effect of acid- and heat-treatment on protein yield and activity of crude enzyme [I] from the pyloric ceca of starfish

	After acid- and heat-treatment	
	Protein (%) [*]	PLA activity (%) [*]
<i>A. amurensis</i>	41	21
<i>D. nippon</i>	40	50
<i>S. paxillatus</i>	45	66
<i>A. pectinifera</i>	37	51

^{*} Relative values of protein amount and PLA activity before acid- and heat-treatment were expressed as hundred percent.

Table 2. PLA activity of crude enzyme from pyloric ceca of four species of starfish

Species	<i>A. pectinifera</i>		<i>S. paxillatus</i>		<i>D. nippon</i>		<i>A. amurensis</i>	
	[I] ^{*1}	[II] ^{*2}	[I]	[II]	[I]	[II]	[I]	[II]
Fresh starfish ^{*3}	(21) ^{*4}		(2)		(1)		(2)	
Activity (U) ^{*5}	543,687		1,003		70		27	
Specific activity (U/mg)	1,427		11.8		0.5		0.5	
Frozen-stored starfish for 9 months ^{*3}			(3)	(11)				
Activity (U)			2,120	736				
Specific activity (U/mg)			9.1	3.2				
Frozen-stored starfish for 35 months ^{*6}	(33)	(60)			(4)	(12)	(3)	(7)
Activity (U)	532,946	56,134			213	162	35	83
Specific activity (U/mg)	1,214	127			2.7	0.6	0.4	0.3
Frozen-stored starfish for 46 months ^{*3}	(10)		(2)		(3)		(5)	
Activity (U)	221,770		762		310		135	
Specific activity (U/mg)	1,655		6.8		1.9		1.3	

^{*1} Prepared from chloroform-methanol powder of pyloric ceca.

^{*2} Prepared from acetone powder of pyloric ceca.

^{*3} Collected off Hakodate bay in Hokkaido and stored at -20°C.

^{*4} Number of starfish used were shown in the parentheses.

^{*5} Activity units extracted from one gram of tissue powder.

^{*6} Starfish was collected Sarufutsu in Hokkaido and stored at -20°C.

一方、比較のため、クロロホルム-メタノール粉末ではなくアセトン粉末から調製した粗酵素[Ⅱ]を用いて同様に分析したが、得られた標品の比活性から判断して、クロロホルム-メタノール粉末から調製した粗酵素[Ⅰ]の方が優れていた (Table 2)。

以上のように、幽門盲のうから調製した粗酵素の中ではイトマキヒトデのクロロホルム-メタノール粉末からのものが比活性が最も高いことが明らかになった。なお、イトマキヒトデ粗酵素[Ⅰ]および[Ⅱ]のPLA総活性および比活性を、同様の方法で調製したブタ膵臓粗酵素[Ⅰ] (総活性：3,298 U/g乾燥粉末、比活性：15 U/mg) および[Ⅱ] (総活性：2,207 U/g乾燥粉末、比活性：3.6 U/mg) のそれらと比較した結果、総活性で140-200倍、比活性で40-100倍高かった。さらに、市販の工業用PLA₂ (比活性：440 U/mg、天野製薬) と比較しても約3倍の比活性を示した。これらの結果より、イトマキヒトデ幽門盲のうがPLAの有用な供給源に成り得ると結論した。

第4項 小括

海産無脊椎動物の消化腺由来のPLA₂に関する研究は非常に少ないが、ヒトデ類についてはわずかながら報告されている。Vaskovsky and Suppes³⁷は、5種のヒトデ (ヒトデ、ニッポンヒトデ、エゾヒトデ*Aphelasterias japonica*、ユルヒトデ*Lysastrosoma anthosticta*および*Patiria pectinifera*) の幽門盲のう中のPLA活性を測定したが、それらの活性値の間に大きな差異は認められなかった。長谷川と佐々木³⁸は、イトマキヒトデの幽門盲のう中のPLA活性がラット肝臓のそれより高い値を示すことを報告した。また、Okabe and Noma³⁹はイトマキヒトデの幽門盲のうホモジネートのPLA₂活性値がウシ膵臓のそれとほぼ同じであることを認めた。一方、近年、Hayashi³²、Hayashi and Kishimura³³は数種のヒトデの組織について脂質を分析した結果、イトマキヒトデ幽門盲

のうに高濃度に存在する遊離脂肪酸を検出した。このことは、この組織には高い脂質分解酵素活性が存在する可能性が高いことを示唆するものである。

本研究では、北海道沿岸で捕獲されたイトマキヒトデ、ニチリンヒトデ、ニッポンヒトデ、およびヒトデの幽門盲のうから脂質分解粗酵素を調製し、それらのPLA活性を比較した。その結果、イトマキヒトデ粗酵素におけるPLAの比活性値は他の3種のヒトデ粗酵素に比べて著しく高いことが分かった。さらに、イトマキヒトデ粗酵素のPLA比活性値は、ブタ膵臓から調製した粗酵素や市販の工業用PLA₂（ブタ膵臓由来、天野製薬）のそれらと比べても著しく高いことが判明した。このことから、未利用水産生物であるイトマキヒトデが産業用PLAの供給源に成り得ると考えられた。

本研究では、2種類の有機溶媒（クロロホルム-メタノール（2:1、v/v）およびアセトン）を用いて脱脂処理を行ったが、全般的にクロロホルム-メタノール処理した方が高い活性が得られた。この処理によって得られた粗酵素[I]のタンパク質含量は粗酵素[II]のそれらより低く、また脂質の混在もほとんど認められなかった。これらのことは、クロロホルム-メタノール（2:1、v/v）処理が幽門盲のうの夾雑タンパク質をより強く変性させるとともに細胞膜のリン脂質等の極性脂質を除去して膜結合性PLAをより良く可溶化し、酵素の抽出量を増加させたことを示している。ちなみに、長谷川と佐々木³⁹⁾は、イトマキヒトデの幽門盲のうホモジネートを105,000×gで60分間超遠心分離した場合、PLA₂活性の約60 %が沈殿画分に存在することを報告している。また、Verger *et al.*⁴⁰⁾は、ブタ膵臓をアセトンおよびエーテルで数回処理しても、なお約2-3%の脂質が残存し膵臓リパーゼがそれらと強く結合していること、そしてブタ膵臓ホモジネートをクロロホルム-*n*-ブタノールで処理することによりほぼ完全に脱脂できることを報告している。

第2章 イトマキヒトデ幽門盲のうホスホリパーゼAの精製と性質

第1項 目的

前章で未利用生物であるイトマキヒトデがPLAの供給源に成り得ることが明らかとなった。そこで本章では、イトマキヒトデ幽門盲のうのクロロホルム-メタノール粉末より調製した粗酵素[I]からPLAの分離・精製を試みた^{41, 42)}。

第2項 材料および方法

1. 試料

前章で述べたものに加え、本章では新たに次の試料を使用した。

ホタテガイ (*Patinopecten yessoensis*) は、1996年1月に噴火湾で採取し、-35℃で凍結保存した後に使用した。

スルメイカ (*Todarodes pacificus*) は、1997年9月に北海道函館沖で採取し、-20℃で凍結保存した後に使用した。

ブタ膵臓由来PLA₂は、Sigmaより購入した。

2. 方法

2.1 粗酵素の調製、酵素活性の測定、およびタンパク質濃度の測定

第1章、第2項と同様の方法で行った。

2.2 脂質の分析

(1) 脂質の抽出およびリン脂質の精製

ホタテガイ貝柱筋およびスルメイカ外套筋からの脂質の抽出は、Bligh and Dyerの方法⁴³⁾で行った。すなわち、細切した試料100 gに対してクロロホルム100 mlおよびメタノール200 mlを加え、ホモジナイザーで10分間攪拌して脂質を抽出した。その抽出液にクロロホルム100 mlを加えてホモジナイザーで1分間攪拌した後、更に蒸留水100 mlを加えて1分間攪拌することにより脂質をクロロホルム層に回収した。次いで、減圧蒸留および真空蒸発によりクロロホルムを除去し、これを全脂質とした。結果の項で述べるように、全脂質から分取TLC法によりPCおよびPEを精製した。

(2) 脂質組成の分析

脂質成分の定性および定量分析は、第1章、第2項と同様の方法で行った。

(3) 脂肪酸のメチルエステル化

脂肪酸100 mgに対して2 mlの14 %三フッ化ホウ素-メタノール錯塩溶液を加え、80 °Cで10分間加熱還流した。次いで、ジエチルエーテルにより脂肪酸メチルエステルを抽出後、減圧蒸留および真空蒸発によりジエチルエーテルを除去した。調製した脂肪酸メチルエステルは2 %クロロホルム溶液としてGLCに供した。

(4) 脂肪酸メチルエステルの分析

脂肪酸メチルエステルの分析は、Ulbon-HR-20Mキャピラリーカラム（30 m×0.25 mm内径、信和化工）およびFIDを備えたGC-14Aガスクロマトグラフ（島津製作所）を用いて行った。クロマトグラムはクロマトパック R-3A（島津）を用いて記録した。運転条件は以下の通りである：キャリアーガス（ヘリウム）圧力；1.2 kg/cm、水素圧力；0.6 kg/cm、空気圧力；0.5 kg/cm、カラムオープン温度；160 °Cで5分間保持し、次いで、4 °C/minで230 °Cまで昇温後、230 °Cで30分間保持。

2.3 ゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィー

(1) ゲルろ過

ゲルろ過はセファクリルS-200（スーパーファイン：44×3.9 cm内径、Pharmacia）およびセファデックスG-50（スーパーファイン：64×3.9 cm内径、Pharmacia）のカラムを用いて行った。あらかじめ10 mM トリス-塩酸緩衝液（pH8.0）で平衡化したカラムにタンパク質を負荷した後、同緩衝液でタンパク質を溶出した。

(2) イオン交換クロマトグラフィー

イオン交換クロマトグラフィーはDEAE-セルロース（DE-52：18×1.1 cm内径、Whatman）のカラムを用いて行った。あらかじめ10 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.5）で平衡化したカラムにタンパク質を負荷した後、同緩衝液下で0-0.5 M NaClの直線濃度勾配によりタンパク質を溶出した。

2.4 ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）

SDS-PAGEはLaemmliの方法⁴⁰⁾により行った。分離用ゲルには14.0 %アクリルアミド-0.37 %ビスアクリルアミドを、濃縮ゲルには3.0 %アクリルアミド-0.08 %ビスアクリル

アミドをそれぞれ使用した。

変性剤を含まないPAGEは、分離用ゲルにpH 8.9の12.5 %アクリルアミド-0.33 %ビスアクリルアミドを、濃縮ゲルにpH 6.8の3.0 %アクリルアミド-0.08 %ビスアクリルアミドをそれぞれ使用して行った。

タンパク質の染色には0.1 % Coomassie Brilliant Blue R250の50 %メタノール-7%酢酸溶液を使用し、ゲルのタンパク質非局在部は7 %酢酸溶液で脱色した。

2.6 酵素の基質特異性の分析

(1) 基質位置特異性の分析

15 mgの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、Avanti Polar Lipids) を9 μ gの精製イトマキヒトデPLA (37 °Cで3時間) または1 mgのブタ膵臓PLA₂ (天野製薬) (37 °Cで12時間) により加水分解した後、分解物から遊離脂肪酸を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)) により分取した。得られた脂肪酸はメチルエステル化した後、GLCにより分析した。

(2) 基質脂肪酸特異性の分析

ホタテガイ貝柱筋およびスルメイカ外套筋から調製したPCとPE (それぞれ15 mg) を9 μ gのイトマキヒトデPLA₂により37 °Cで3時間または1 mgのブタ膵臓PLA₂ (天野製薬) により37 °Cで12時間それぞれ加水分解した後、分解物から遊離脂肪酸を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) により分取した。得られた脂肪酸はメチルエステル化した後、GLCにより分析した。

(3) 基質極性基特異性の分析

ホタテガイ貝柱筋、スルメイカ外套筋および大豆から調製したPCおよびPE (それぞれ

100 μg) を基質として、17 ngのイトマキヒトデPLA₂または4.5 μg のブタ膵臓PLA₂ (天野製薬) を37 $^{\circ}\text{C}$ で0-30分間作用させた後、残存した基質量を経時的にTLCおよび TLC-FIDにより分析した。その結果から分解率の経時変化を求めた。

第3項 結果

1. PLAの基質の精製

イトマキヒトデ幽門盲のうからPLAを調製する段階では基質として市販の卵黄PCを使用した。本酵素の基質特異性の検討には市販の大豆レシチン (和光純薬工業) の他に、ホタテガイ貝柱筋とスルメイカ外套筋のPCとPEを使用した。ホタテガイ貝柱筋とスルメイカ外套筋の全脂質および大豆レシチンからのPCおよびPEの精製は、分取TLCにより行った。すなわち、薄層プレートに全脂質をスポットし、クロロホルム-メタノール-酢酸-水 (55 : 17 : 3 : 2, v/v/v/v) により展開した後、プレートに0.05 % ローダミン6GO-エタノール溶液を噴霧することによりPCおよびPE画分を検出した。次いで、PCおよびPE画分をけずり取り、クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) で抽出した後、溶媒を除去し、それらを精製PCおよびPEとした (Fig. 7)。

2. イトマキヒトデ幽門盲のうPLAの分離・精製

2.1 セファクリルS-200による精製

イトマキヒトデ幽門盲のうのクロロホルム-メタノール粉末3.0 gから調製した粗酵素 [I] をセファクリルS-200のカラムに負荷し、カラム溶出液をA1-A6の6画分に分画した

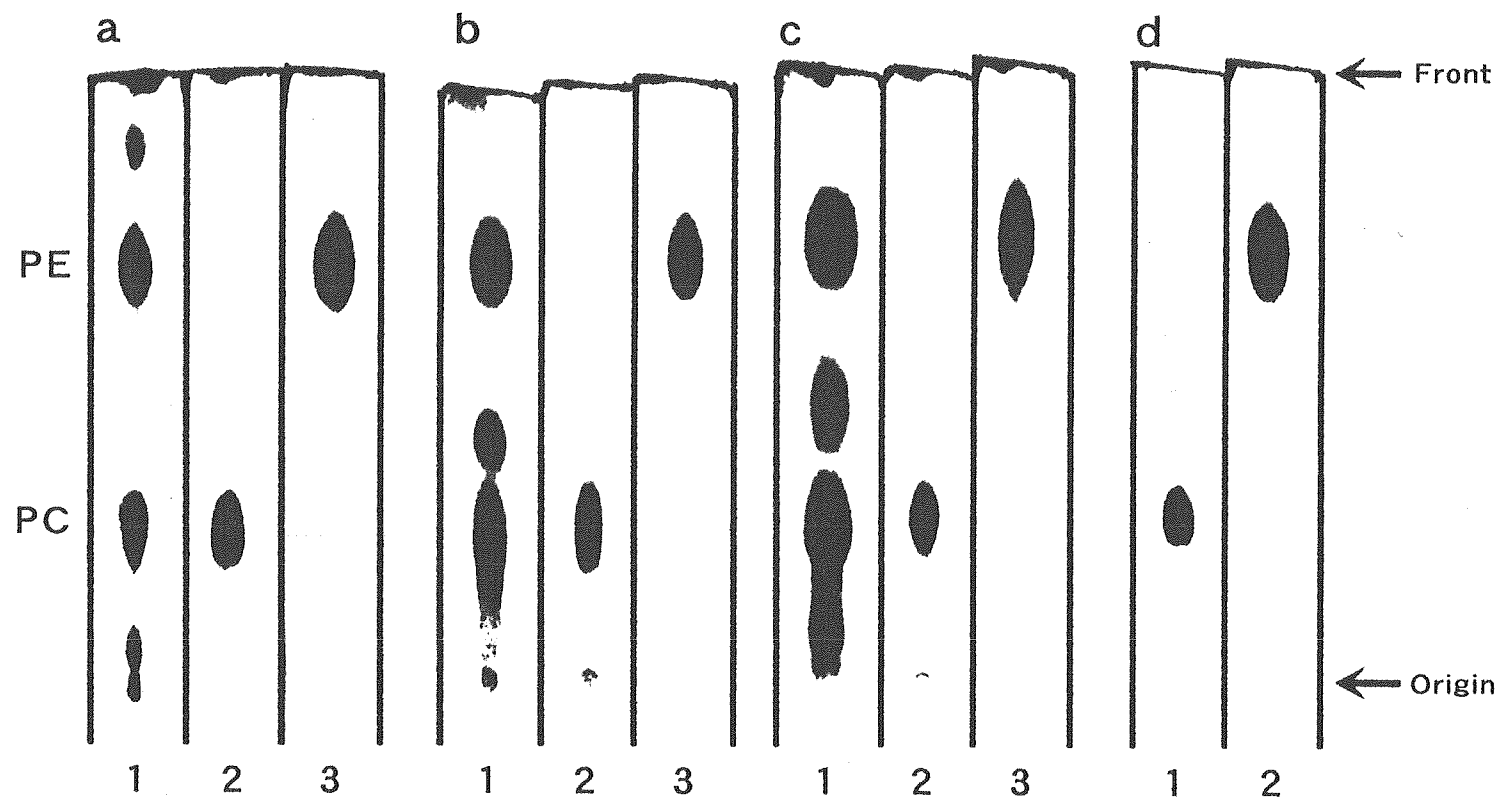


Fig. 7. Thin-layer chromatograms of purified PC and PE from soybean, scallop adductor muscle, and squid mantle muscle.

TLC plates were developed with chloroform-methanol-acetic acid-water (55:17:3:2, v/v/v/v), and then the spots were detected with 50 % sulfuric acid.

a-c, soybean, scallop adductor muscle and squid mantle muscle, respectively (Lane 1, total lipid; Lane 2, PC; Lane 3, PE); d, standards (Lane 1, PC from egg-yolk; Lane 2, PE from porcine liver). PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine.

(Fig. 8)。それぞれの画分を凍結乾燥により一定容量に濃縮した後、活性を測定した結果、主要な活性はA2-A4画分に認められ、PCからLPCが生成した (Fig. 8)。そこで、A2-A4画分を合一した。セファクリルS-200によるクロマトグラフィーで比活性は2倍上昇し、活性回収率は68 %であった。

2.2 DEAE-セルロースによる精製

前項で得たA2-A4画分を、10 mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に透析した後、DEAE-セルロースによる陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。Fig. 9に示すように、カラム溶出液をB1-B9の9画分に分画し、それぞれの画分を透析により脱塩した後、凍結乾燥により一定容量に濃縮した。B1-B9画分中の活性を測定したところ、B4-B8画分に主要な活性が認められ、B6画分に最も強い活性が認められた (Fig. 9)。このB6画分は、A2-A4画分に比べ精製度は3倍上昇したが、活性回収率は43 %であった。

2.3 セファデックスG-50による精製

上記のB6画分を、セファデックスG-50のカラムに負荷し、カラム溶出液をC1-C7の7画分に分画した (Fig. 10)。それぞれの画分中の活性を測定した結果、C5画分に最も強い活性が認められた (Fig. 10)。このC5画分は、B6画分に比べ精製度は7.7倍上昇し、活性回収率は68 %であった。C5画分は、セファデックスG-50により再度ゲルろ過に供した。その結果、Fig. 11,aに示すようにタンパク質は単一のピークとして溶出したので、この画分を集めてD1画分とした。この画分は、C5画分に比べて比活性が2.2倍上昇し、活性回収率は99 %であった。

2.4 精製PLAの純度検定

D1画分には色素がわずかに残存していたが、SDS-PAGEにより分析したところ、ほぼ

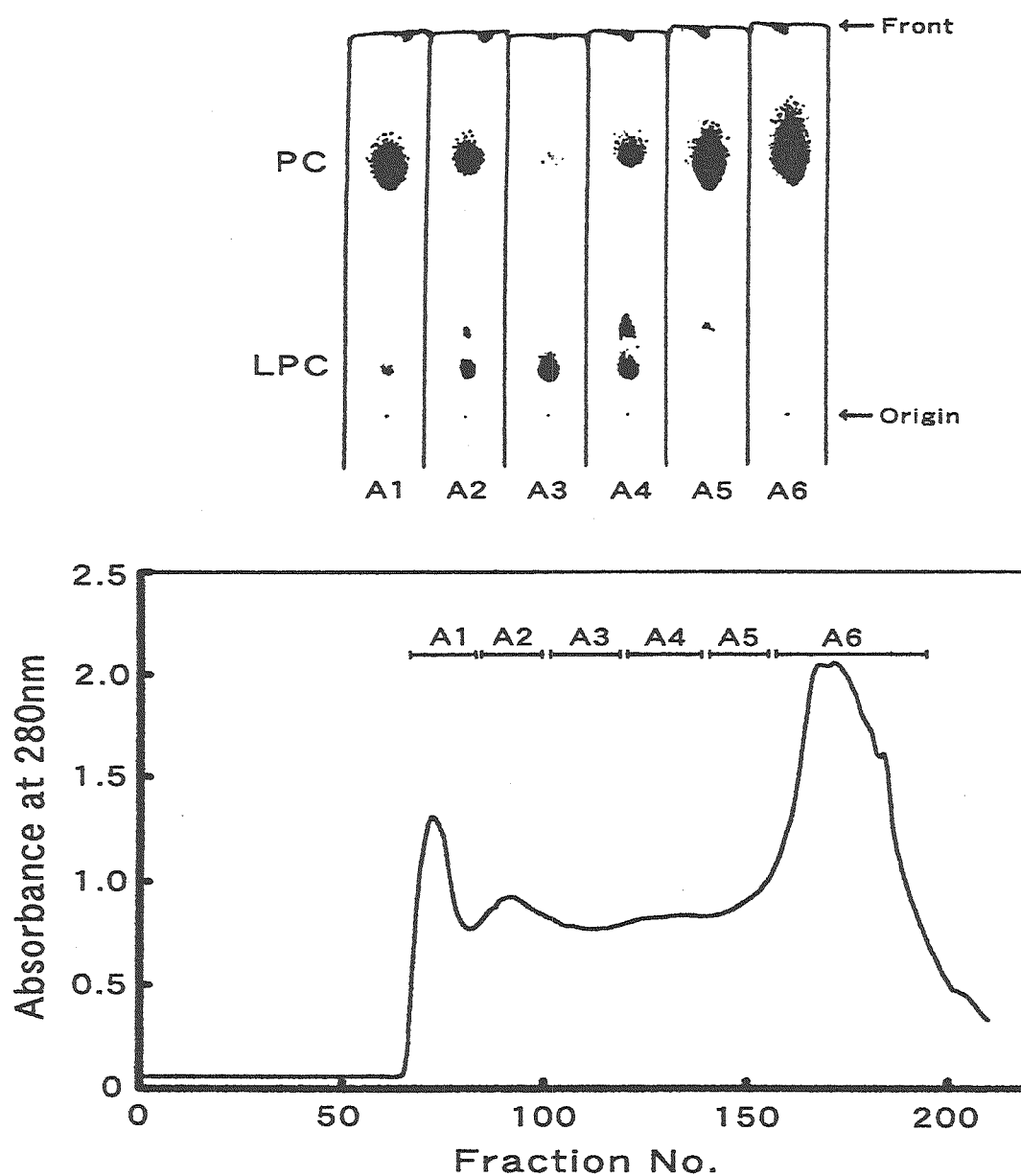


Fig. 8. Purification of the starfish PLA by gel-filtration.

Crude enzyme fraction was applied to a Sephacryl S-200 column ($44 \times \phi 3.9$ cm) equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and eluted with the same buffer at a flow rate of 29 ml/h. Each fraction contained 2.9 ml. Thin-layer chromatograms in the upper panel indicate breakdown products of egg yolk PC by A1-A6.

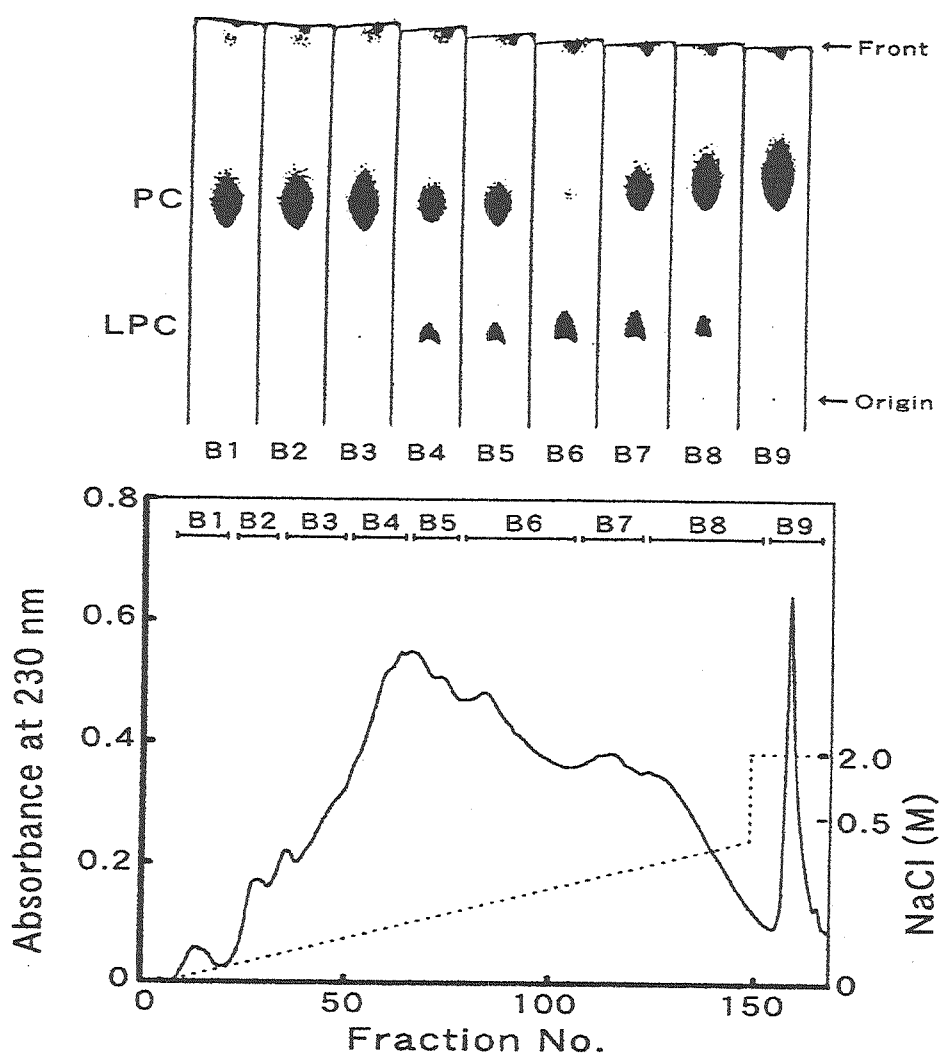


Fig. 9. Purification of the starfish PLA by DEAE-cellulose column chromatography.

A2-A4 fractions shown in Fig. 8 were pooled and applied to a column ($18 \times \phi 1.1$ cm) of DEAE-cellulose (Whatman DE-52) equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5), and then eluted with a linear gradient of 0-0.5 M NaCl followed by a stepwise increase to 2.0 M NaCl. Total volume of elution buffer was 400 ml and flow rate was 39 ml/h. Each fraction contained 2.6 ml. The solid line and dotted line indicate absorbance at 230 nm and NaCl concentration, respectively. Thin-layer chromatograms in the upper panel show the breakdown products of egg yolk PC by B1-B9 fractions.

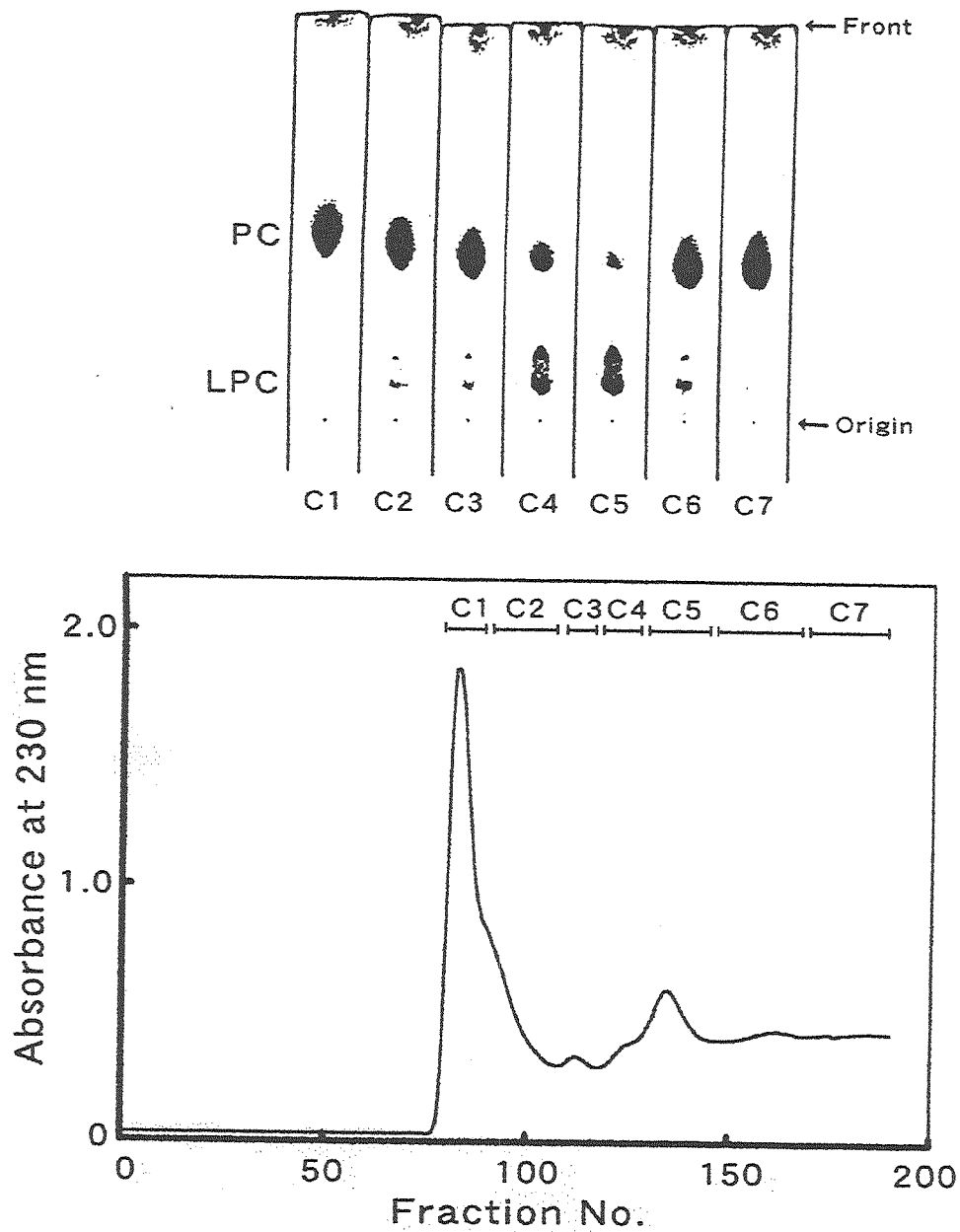


Fig. 10. Purification of the starfish PLA by gel-filtration.

B6 fraction, the major active fraction shown in Fig. 9, was concentrated by lyophilization and applied to a Sephadex G-50 column ($64 \times \phi 3.9$ cm) equilibrated with 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) and eluted with the same buffer at a flow rate of 27 ml/h. Each fraction contained 2.7 ml. Thin-layer chromatograms in the upper panel indicate breakdown products of egg yolk PC by C1-C7.

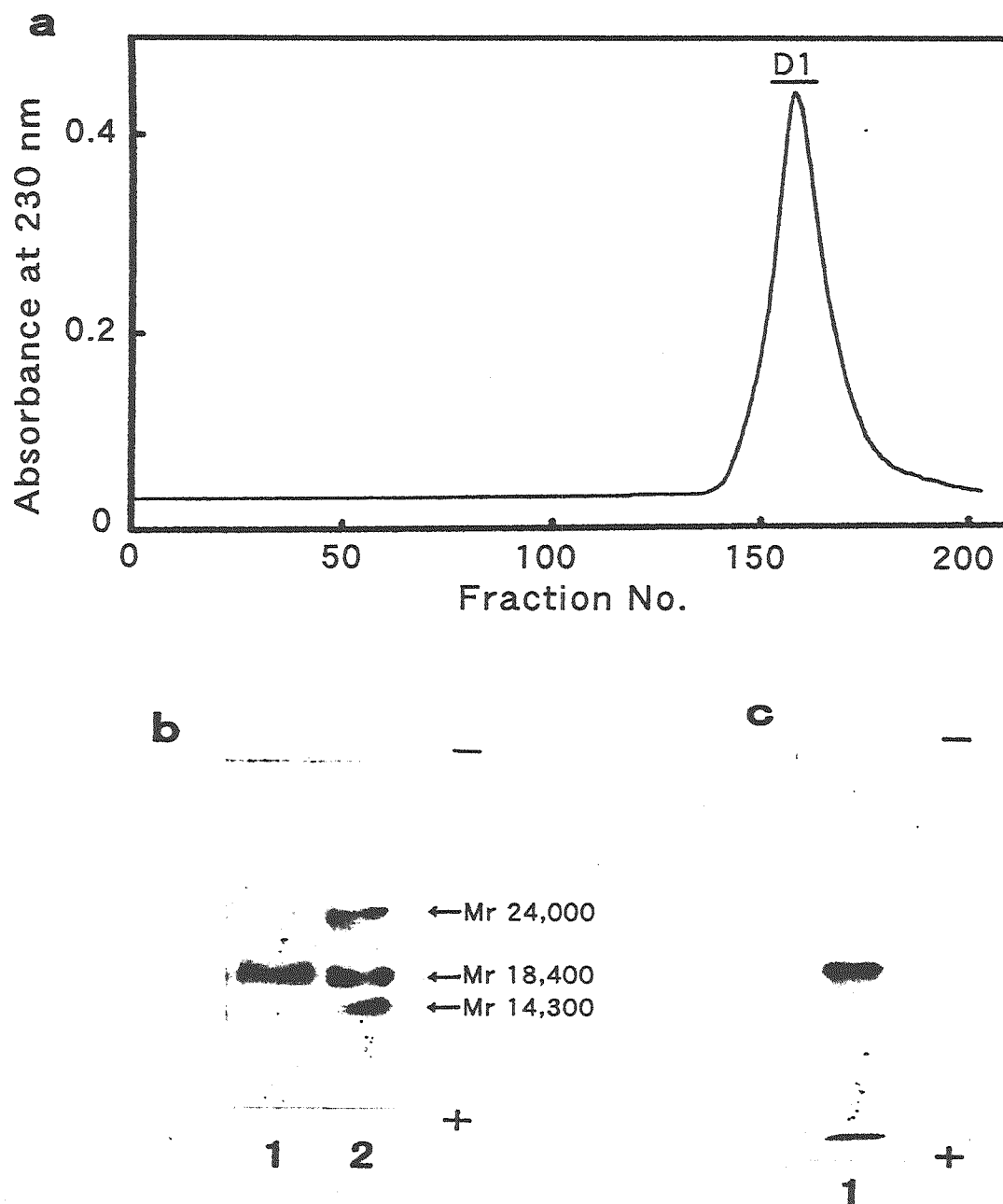


Fig. 11. Purification of the starfish PLA by gel-filtration.

a, C5 fraction, the major active fraction shown in Fig. 10, was concentrated by lyophilization and applied to a Sephadex G-50 column ($64 \times \phi 3.9$ cm) equilibrated with 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), and eluted with the same buffer at a flow rate of 22 ml/h. Each fraction contained 2.2 ml.

b, SDS-PAGE of the purified PLA was performed using a 0.1 % SDS-14 % polyacrylamide slab gel. Lane 1, D1 fraction; Lane 2, protein standards (bovine pancreatic trypsinogen (Mr 24,000), bovine milk β -lactoglobulin (Mr 18,400), and egg white lysozyme (Mr 14,300)).

c, Native PAGE of the purified PLA was performed using a 12.5 % polyacrylamide slab gel at pH 8.9. Lane 1, D1 fraction.

単一の成分が検出された (Fig. 11,b) 。また、PAGEにより分析したところ、主要成分とゲルの泳動先端に色素を含む少量の成分が検出された (Fig. 11,c) 。PAGEを行ったゲルを細切し、主要成分と少量の成分を含むゲル断片に蒸留水を加えて両成分を抽出した後、それぞれの成分の活性を測定した。その結果、活性は主要成分にのみ認められた。本研究ではこのD1画分を精製酵素とした。

イトマキヒトデPLAの精製過程をTable 3にまとめて示す。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[I]に対して、精製PLAの比活性は最終的に99倍となり、活性回収率は20 %であった。なお、このように精製したPLAはFig. 12に示すように、卵黄由来PCを加水分解してLPCと脂肪酸を生成させたが、トリグリセリドには全く作用しなかった。このことから、本精製酵素がリパーゼではなくPLAであることが確認された。

3. イトマキヒトデ幽門盲のうPLAの酵素化学的性質

前項において、イトマキヒトデ幽門盲のうの粗酵素[I]から1種類のPLAを電気泳動的にほぼ単一に精製することができた。そこで次に、本精製PLAの酵素化学的性質について検討した。

3.1 分子量

先ず初めにイトマキヒトデPLAの分子量をSDS-PAGEにより検討した。その結果、Fig. 13に示すように本酵素の分子量はSDS-PAGEの移動度から約20,000と推定された。

3.2 基質位置特異性

次いで、本酵素の種類を明確にするために基質位置特異性を分析した。その結果、

Table 3. Purification of PLA from starfish *A. pectinifera*

Purification step	Protein (mg)	Specific activity ($\times 10^3$ U/mg)	Total activity ($\times 10^3$ U)*	Purity (fold)	Yield (%)
Crude enzyme [I]	774	1.2	892	1	100
Sephacryl S-200	254	2.4	609	2	68
DEAE-cellulose	34	7.7	263	6	29
Sephadex G-50 (1st)	3.3	55	180	46	20
Sephadex G-50 (2nd)	1.5	119	178	99	20

*One unit (U) of activity was defined as the amount of enzyme hydrolyzing one microgram of PC per minute.

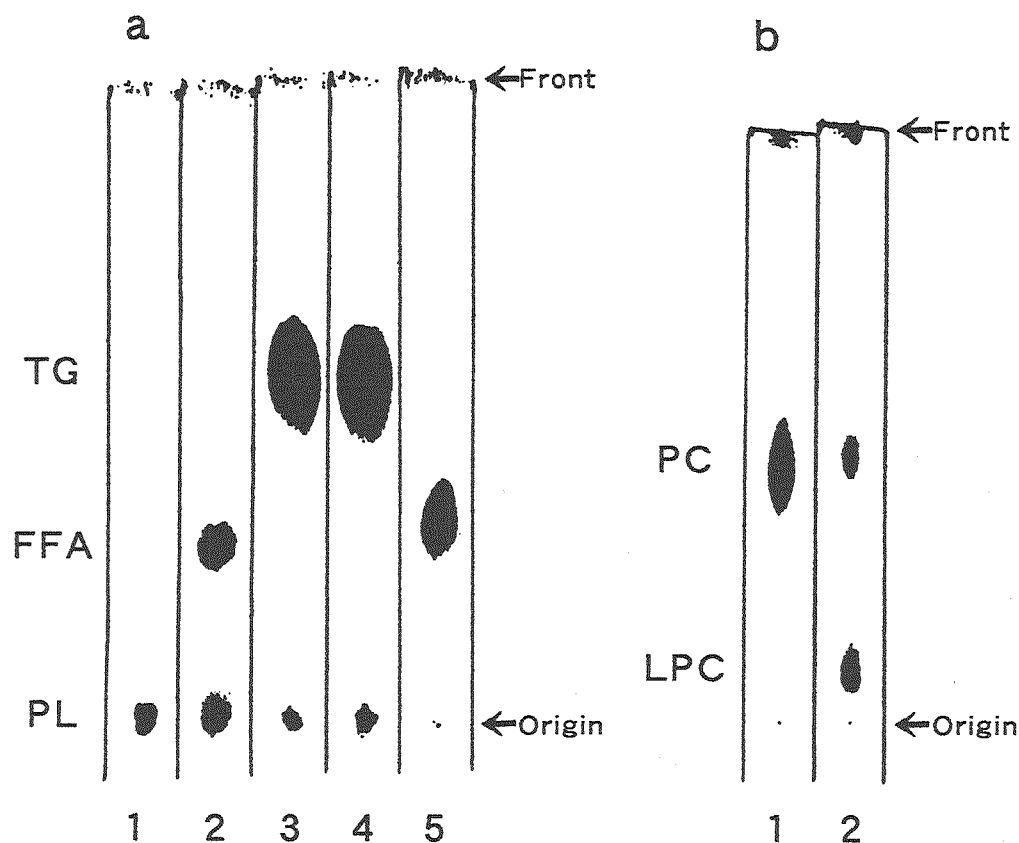


Fig. 12. Thin-layer chromatograms of breakdown products of olive oil and egg yolk PC by the starfish PLA.

a, TLC was developed with hexane-diethyl ether-acetic acid (85:15:1, v/v/v). 1, standard (egg yolk PC); 2, breakdown products of egg yolk PC; 3, standard (olive oil); 4, breakdown products of olive oil; 5, standard (free fatty acid).

b, TLC was developed with chloroform-methanol-acetic acid -water (55:17:3:2, v/v/v/v). 1, standard (egg yolk PC); 2, breakdown products of egg yolk PC.

TG, triglyceride; FFA, free fatty acid; PL, polar lipid; PC, phosphatidylcholine; LPC, lysophosphatidylcholine.

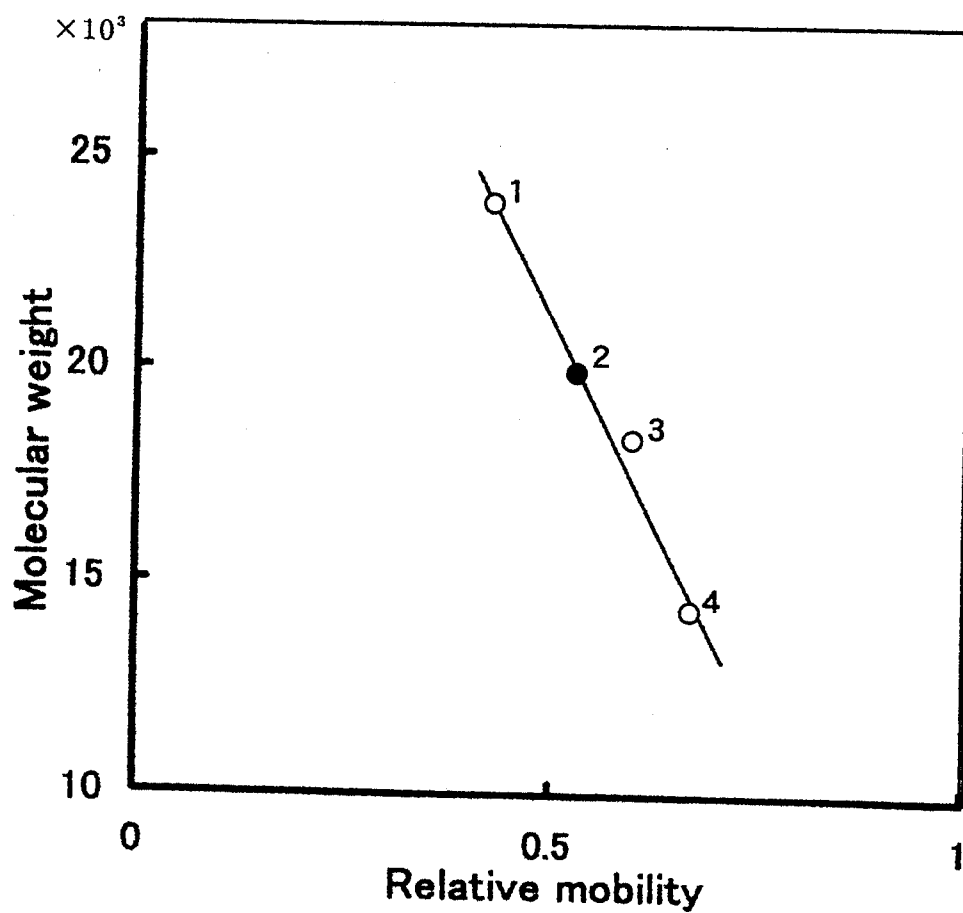


Fig. 13. Estimation of molecular weight of the starfish PLA_2 by SDS-PAGE.

1, bovine pancreatic trypsinogen (Mr 24,000);
 2, *A. pectinifera* phospholipase A_2 ; 3, bovine milk
 β -lactoglobulin (Mr 18,400); 4, egg white lysozyme
 (Mr 14,300).

Table 4に示すように、本PLAはブタ腭臓PLA₂ (84.6 %)と同様にPOPCから83.8 %のオレイン酸を遊離した。このことから、本PLAはsn-2位の脂肪酸エステル結合を特異的に切断するPLA、すなわちPLA₂であることが明かになった。

3.3 比活性

イトマキヒトデPLA₂の比活性値はTable 3に示したように119,000 U/mgであり、同様の方法を用いて測定した市販のブタ腭臓PLA₂の比活性値 (4,300 U/mg、Sigma、試薬用；440 U/mg、天野製薬、工業用) の約30および300倍であった。

3.4 活性におよぼすpHと温度の影響

次いで本PLA₂の活性におよぼすpHと温度の影響をFig. 14とFig. 15に示す。本PLA₂の卵黄PCに対する活性はpH 6-11の範囲で認められ、最適pHは9.0付近にあった (Fig. 14) 。また、本PLA₂の反応時間30分での活性は20-70 °Cの範囲で認められ、最適温度は50 °C付近にあった (Fig. 15) 。

3.5 活性におよぼす二価金属イオンの影響

イトマキヒトデPLA₂の活性を種々の濃度 (0-10 mM) のCaCl₂を添加して測定したところ、1 mM以上のCaCl₂により活性化された (Table 5) 。また、二価金属イオン無添加の場合と比較して、10 mM CaCl₂を添加した場合には活性は約15倍に増加したが、10 mM MgCl₂およびCoCl₂を添加した場合それぞれ約6倍と2倍の増加であった (Table 5) 。一方、10 mM HgCl₂、ZnCl₂およびEDTAを添加した場合にはそれぞれ約1/5、1/25、1/10に低下した (Table 5) 。

Table 4. Composition of fatty acids released from 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine by the starfish PLA

Fatty acid	(%) ^{*1}	
	Starfish PLA	Porcine PLA ₂ ^{*2}
16:0	16.2	15.4
18:1n-9	83.8	84.6

^{*1} Data are expressed as area percentage of total fatty acid.

^{*2} PLA₂ from porcine pancreas (Amano Pharmaceutical Co.)

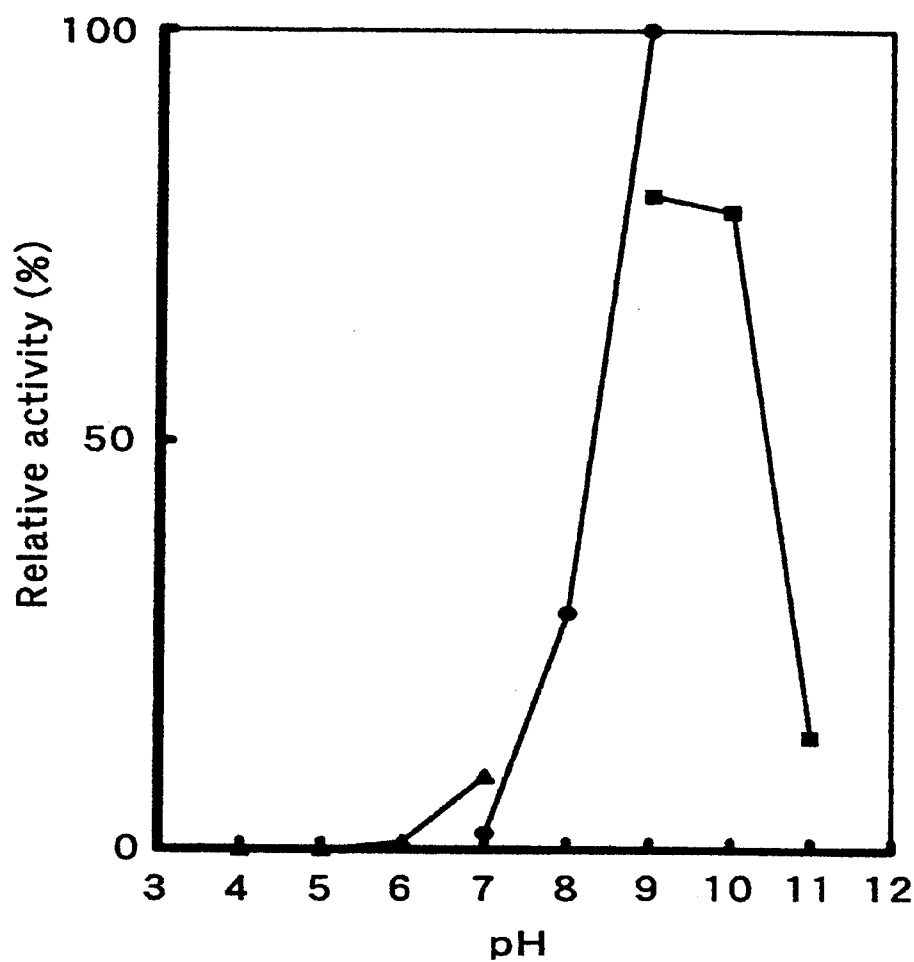


Fig. 14. Effect of pH on the starfish PLA₂ activity.

Reaction mixture containing 17 ng of the starfish PLA₂, 100 μ g of egg yolk PC, 2.7 mM sodium deoxycholate and 5 mM CaCl₂ in a total volume of 130 μ l was incubated at 37 °C for 30 min. The buffers used were 50 mM acetic acid-sodium acetate from pH 4.0 to 7.0 (▲), 50 mM Tris-HCl from pH 7.0 to 9.0 (●) and 50 mM glycine-NaOH from pH 9.0 to 11.0 (■).

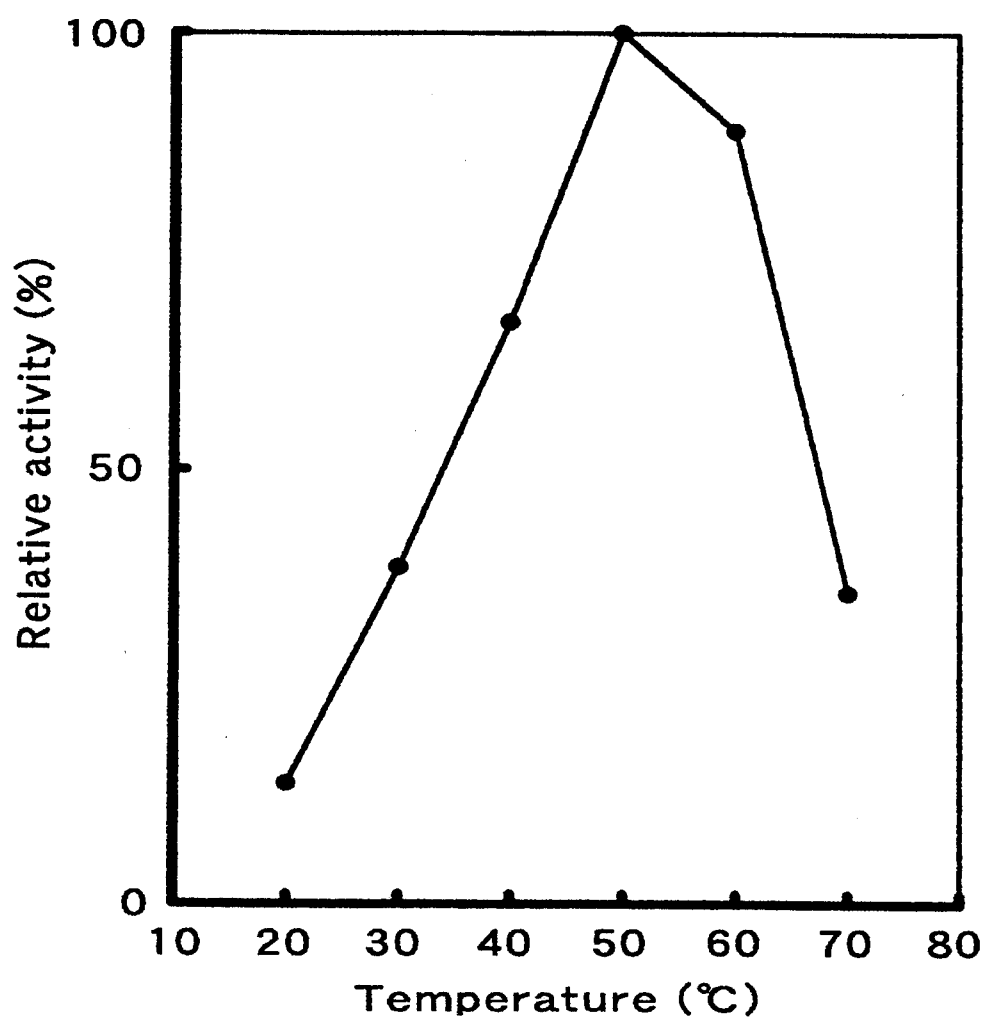


Fig. 15. Effect of temperature on the starfish PLA₂ activity.

Reaction mixture containing 17 ng of the starfish PLA₂, 100 μ g of egg yolk PC, 2.7 mM sodium deoxycholate, 5 mM CaCl₂ and 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) in a total volume of 130 μ l was incubated at various temperatures for 30 min.

Table 5. Effects of metal ions and EDTA on the activity of the starfish PLA₂

Additives	Final concentration (mM)	Relative activity (%) [*]
None	0	100
CaCl ₂	0.1	125
"	1	604
"	5	1,080
"	10	1,496
MgCl ₂	10	601
CoCl ₂	10	229
HgCl ₂	10	18
ZnCl ₂	10	4
EDTA	10	11

^{*}The activities were expressed as percentage of that in the absence of metal ion.

3.6 基質脂肪酸特異性

ホタテガイ貝柱筋およびスルメイカ外套筋から調製したPCとPEをイトマキヒトデPLA₂により加水分解し、生成した脂肪酸を分析した。その結果、Figs. 16, 17およびTable 6に示すように、遊離した脂肪酸の組成は対照として用いたブタ腓臓PLA₂により加水分解した場合のそれと近似した。また、ホタテガイ貝柱筋PEから遊離したLPCの脂肪酸組成はブタ腓臓PLA₂により加水分解した場合のそれと近似することが確認された。

3.7 活性におよぼすデオキシコール酸ナトリウムの影響

イトマキヒトデPLA₂の活性を種々の濃度 (0-6.8 mM) のデオキシコール酸ナトリウムを添加して測定した (Fig. 18,a)。先ずPCを基質とした場合、イトマキヒトデPLA₂の活性はデオキシコール酸ナトリウムにより著しく活性化され、2-4 mMにおいて最大活性を示した。しかしながら、PEを基質とした場合、活性はデオキシコール酸ナトリウムにより抑制された。一方、対照として用いたブタ腓臓PLA₂の活性はイトマキヒトデPLA₂の場合と同様に、PCを基質とした場合にはデオキシコール酸ナトリウムにより活性化され、PEを基質とした場合には抑制される傾向を示したが (Fig. 18,b)、イトマキヒトデPLA₂と異なり、PCよりもPEの方を良く分解した。

3.8 基質極性基特異性

上述したように、イトマキヒトデPLA₂の基質極性基に対する特異性がブタ腓臓PLA₂のものと異なると推定されたので、基質極性基特異性をさらに詳細に検討した。

先ず、ホタテガイ貝柱筋PCおよびPEを本PLA₂により37℃で0-30分間加水分解し、基質の分解率の経時変化をTLCにより分析した。その結果、Fig. 19,aに示すように、本PLA₂はPEに比べてPCの方を良く分解することがわかった。比較のためにブタ腓臓PLA₂で同様に分解した結果、Fig. 19,bに示すようにPCとPEを同程度分解することが分かつ

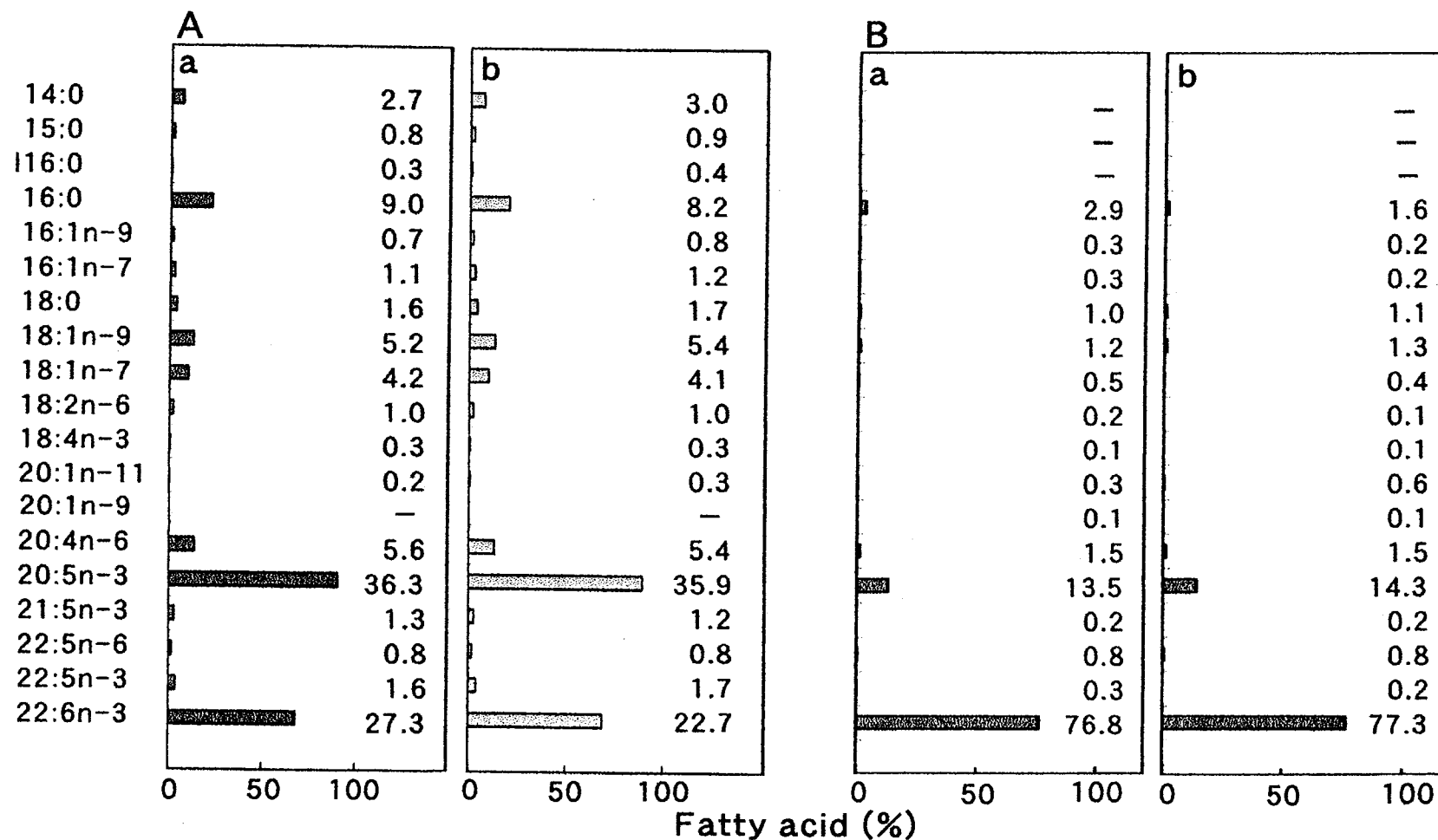


Fig. 16. Composition of fatty acids released from PCs of scallop adductor muscle and squid mantle muscle by starfish and porcine PLA_2 s.

Fifteen milligrams each of the substrates were almost completely hydrolyzed at 37 °C by either 9 μ g starfish PLA_2 for 3 h or 1 mg porcine pancreatic PLA_2 for 12 h. The released fatty acids were separated using preparative TLC with a developing solvent of hexane-diethyl ether-acetic acid (85:15:1, v/v/v), and the fatty acids were analyzed by GLC. A, Scallop adductor muscle PC; B, Squid mantle muscle PC. a, Starfish PLA_2 ; b, Porcine pancreatic PLA_2 .

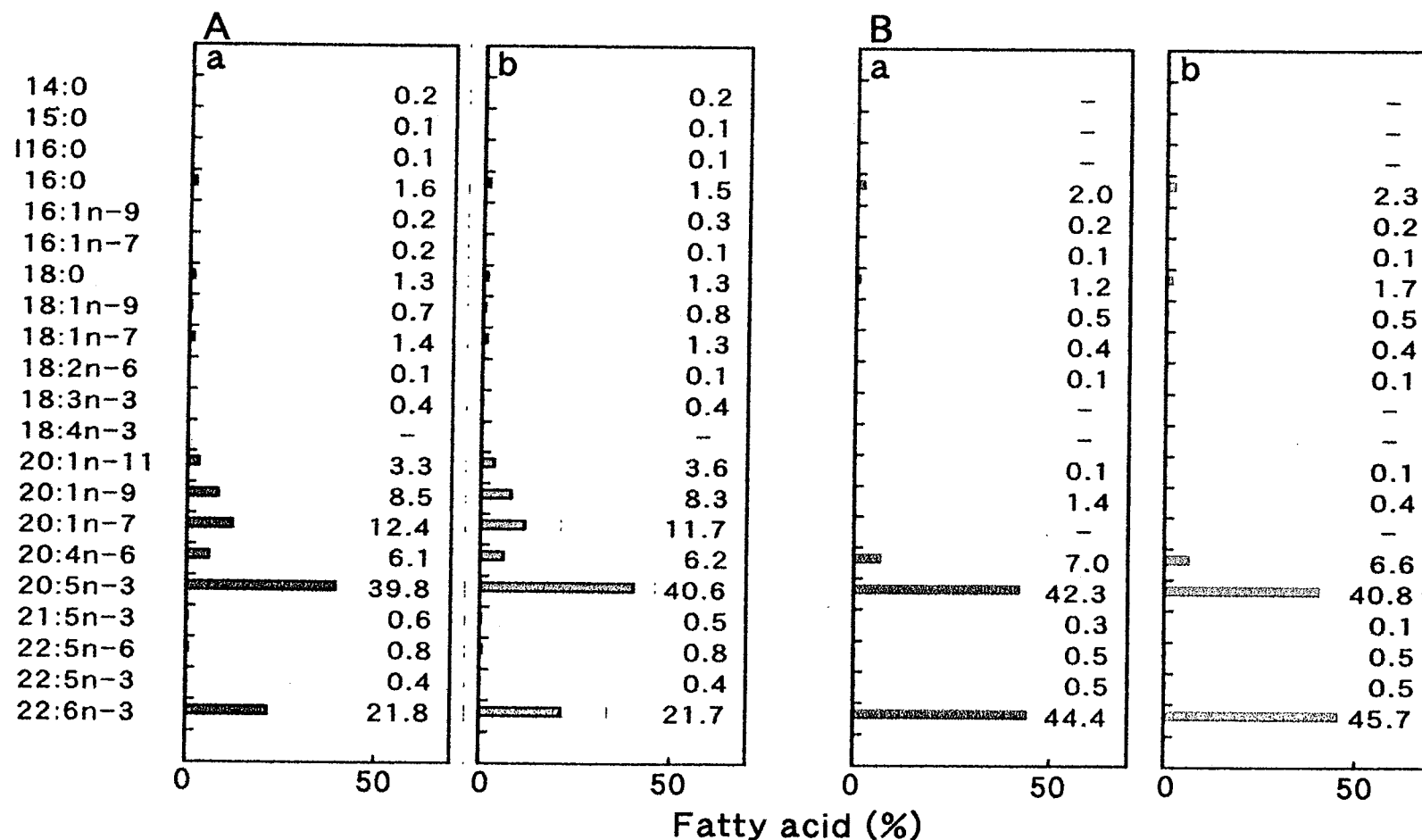


Fig. 17. Composition of fatty acids released from PEs of scallop adductor muscle and squid mantle muscle by starfish and porcine PLA₂s.

Fifteen milligrams each of the substrates were almost completely hydrolyzed at 37 °C by either 9 μ g starfish PLA₂ for 3 h or 1 mg porcine pancreatic PLA₂ for 12 h. The released fatty acids were separated using preparative TLC with a developing solvent of hexane-diethyl ether-acetic acid (85:15:1, v/v/v), and the fatty acids were analyzed by GLC. A, Scallop adductor muscle PE; B, Squid mantle muscle PE. a, Starfish PLA₂; b, Porcine pancreatic PLA₂.

Table 6. Composition of fatty acids released from scallop adductor muscle PE by PLA₂

(%)^{*1}

Fatty acid	Starfish PLA ₂		Porcine PLA ₂		Composition of FFA of scallop PE ^{*2}
	Composition of FFA at position 1 ^{*2}	position 2 ^{*3}	Composition of FFA at position 1 ^{*2}	position 2 ^{*3}	
14:0	1.5	0.2	1.6	0.2	0.5
15:0	0.8	0.1	0.8	0.1	0.2
I16:0	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2
16:0	28.2	1.6	28.2	1.5	11.2
16:1n-9	1.8	0.2	2.5	0.3	0.4
16:1n-7	0.4	0.2	0.5	0.1	0.6
17:0	1.5	0.1	1.4	0.1	0.6
17:1n-8	2.2	tr	4.0	tr	2.6
18:0	14.4	1.2	13.2	1.2	5.7
18:1n-9	5.0	0.7	4.2	0.9	2.4
18:1n-7	3.1	1.4	3.0	1.3	2.0
18:2n-6	1.9	0.1	1.5	0.1	1.0
18:3n-3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5
18:4n-3	2.8	tr	4.9	tr	3.3
20:1n-11	2.9	3.3	2.1	3.5	3.3
20:1n-9	5.2	8.5	5.7	8.1	7.8
20:1n-7	6.8	10.5	8.0	11.4	11.1
20:2n-6	1.1	0.7	1.1	0.6	0.9
20:4n-6	1.5	6.1	1.4	6.0	4.4
20:5n-3	9.4	39.6	8.5	39.7	26.7
21:5n-3	0.3	0.6	0.2	0.5	0.3
22:5n-6	0.8	0.7	1.2	0.8	0.3
22:5n-3	tr	0.5	tr	0.4	0.2
22:6n-3	5.3	21.8	5.0	21.3	12.5
24:1n-9	2.0	tr	0.1	tr	tr
Others	0.5	1.4	0.3	1.4	1.3

^{*1} Data are expressed as area percentage of total fatty acids.

^{*2} FFA at position 1 of LPE and FFA of PE were liberated by chemical method.

^{*3} FFA at position 2 were liberated by PLA₂.

PE, phosphatidylethanolamine; LPE, lysophosphatidylethanolamine; FFA, free fatty acid; I, iso; tr, trace (less than 0.05 %).

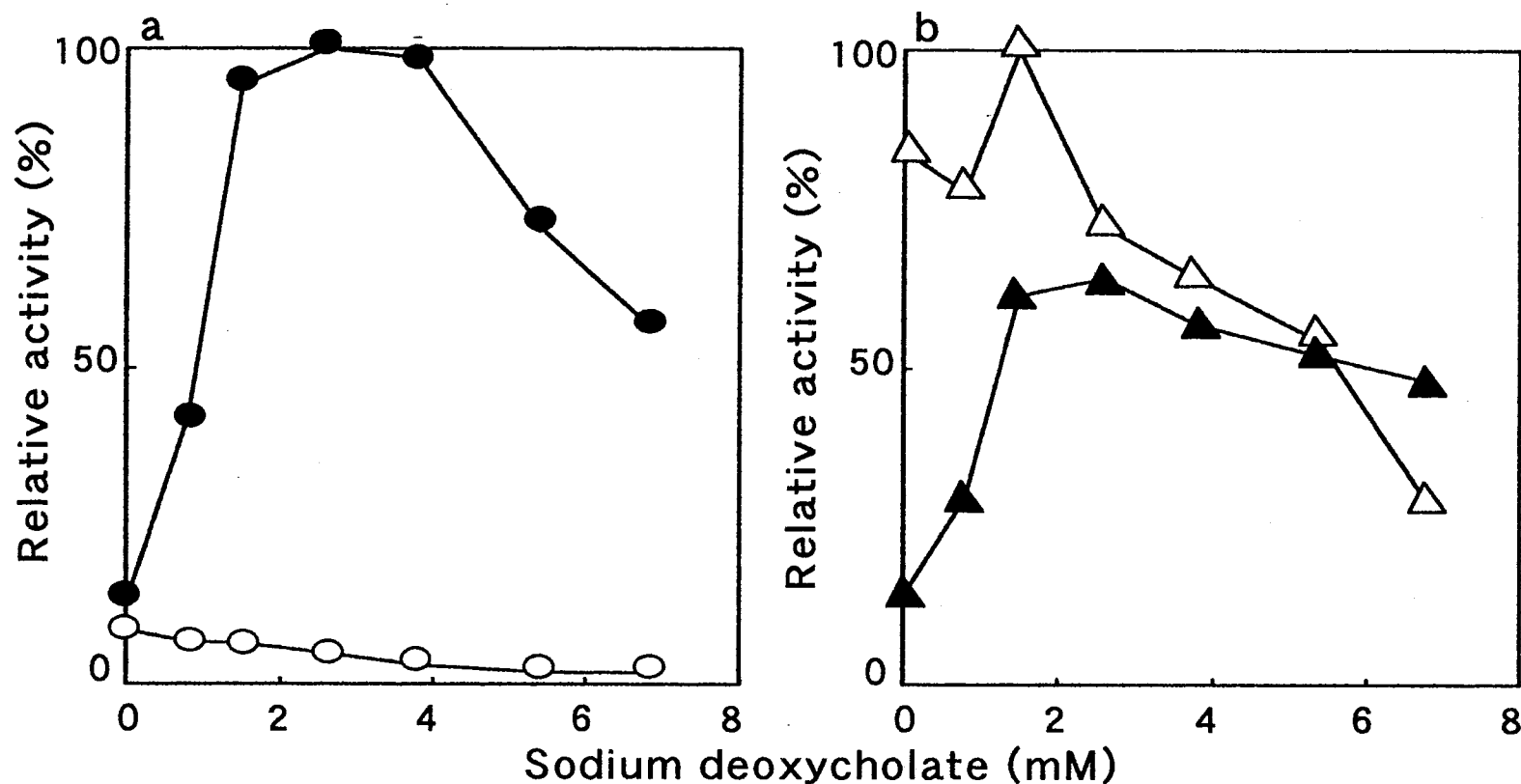


Fig. 18. Effect of sodium deoxycholate on the activity of PLA₂.

a, Activity was measured in a reaction mixture containing 17 ng starfish PLA₂, 100 μ g scallop adductor muscle PC (●) or PE (○), 5mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl (pH8.5), and various concentrations of sodium deoxycholate in a total volume of 130 μ l at 37 °C for 30 min.

b, Activity was measured in a reaction mixture containing 4.5 μ g porcine pancreatic PLA₂, 100 μ g scallop adductor muscle PC (▲) or PE (△), 5mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl (pH8.5), and various concentration of sodium deoxycholate in a total volume of 130 μ l at 37 °C for 30 min.

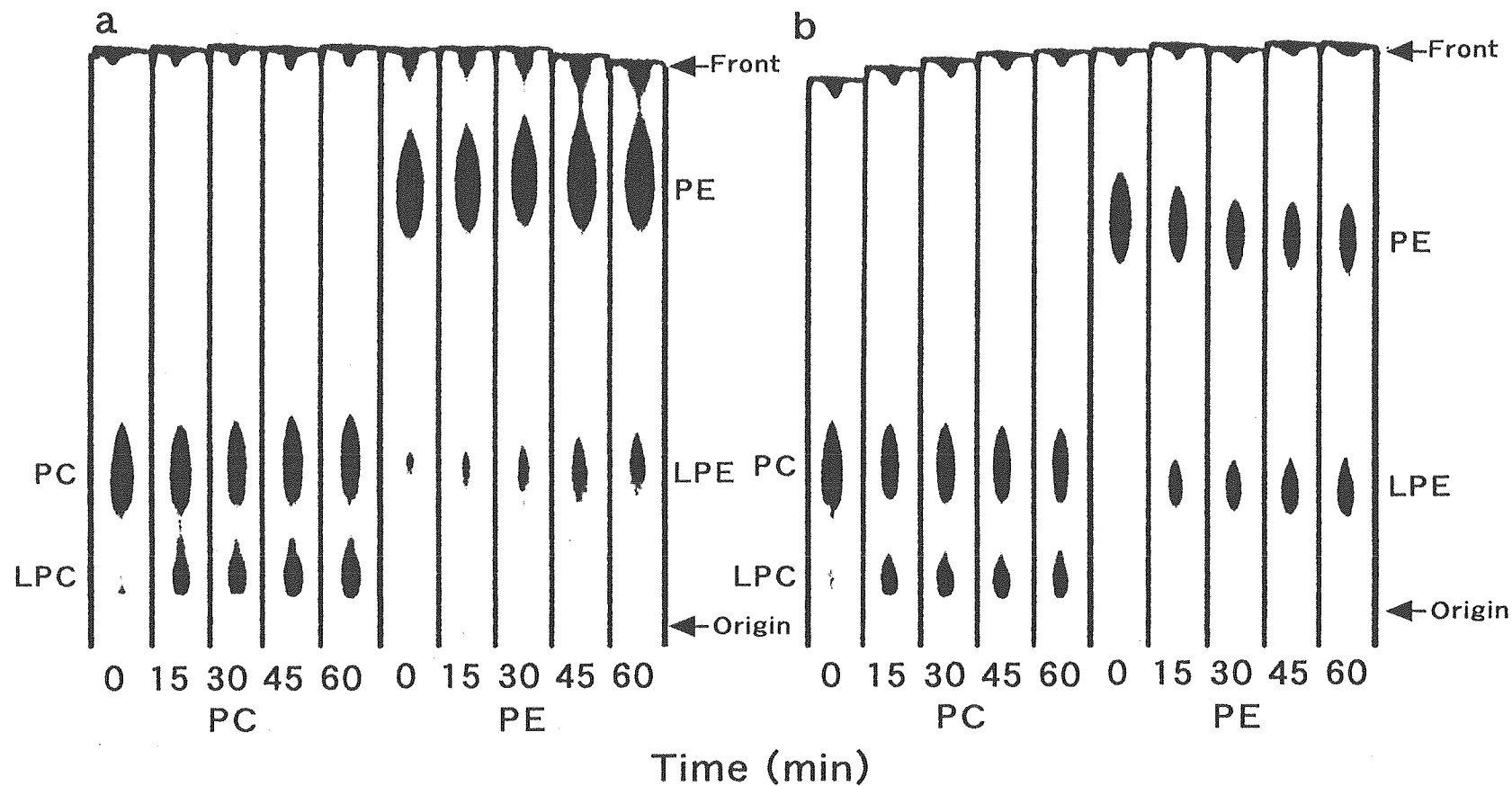


Fig. 19. Thin-layer chromatograms of breakdown products of scallop adductor muscle PC and PE by the starfish PLA₂.

Reaction mixture containing 17 ng starfish PLA₂ (a) or 4.5 μ g porcine pancreatic PLA₂ (b), 100 μ g scallop adductor muscle PC or PE, 5 mM CaCl₂, 2.7 mM sodium deoxycholate, and 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) in a total volume of 130 μ l was incubated at 37 °C for various times (0-60 min). TLC plates were developed with chloroform-methanol-acetic acid-water (55:17:3:2, v/v/v/v).

た。そこで、イトマキヒトデ PLA_2 とブタ膵臓 PLA_2 によりホタテガイ貝柱筋、スルメイカ外套筋および大豆から調製したPCおよびPEを加水分解し、分解率の経時変化をTLC-FIDにより分析した。その結果をFig. 20、Fig. 21、およびFig. 22に示すが、いずれの場合に於いてもブタ膵臓 PLA_2 はPCとPEを同様に分解したが、イトマキヒトデ PLA_2 はPEに比べてPCを良く分解した。

以上のように、イトマキヒトデ PLA_2 はpH 9.0付近に最適pHを有し、1 mM以上の濃度の Ca^{2+} および2-4 mMのデオキシコール酸ナトリウムにより強く活性化され、また、基質sn-2位の脂肪酸エステル結合を脂肪酸の鎖長や二重結合数によらず加水分解した。本 PLA_2 のこれらの性質は哺乳動物膵臓 PLA_2 のものと同様であった。しかしながら、イトマキヒトデ PLA_2 の分子量はSDS-PAGEにより約20,000と推定され、哺乳動物膵臓 PLA_2 の分子量（約14,000）よりも大きい値を示した。さらに、イトマキヒトデ PLA_2 は市販のブタ膵臓 PLA_2 に比較して比活性高く、また、PEに比べてPCをよく分解し、ブタ膵臓 PLA_2 と異なる極性基特異性を示すことが明らかになった。

第4項 小活

1. イトマキヒトデ幽門盲のう PLA の分離・精製

従来、海産無脊椎動物の消化腺由来の PLA_2 に関する研究は少なく、僅かにイトマキヒトデおよびニチリンヒトデのものについて報告されているにすぎない。すなわち、Okabe and Noma⁴⁵⁾はイトマキヒトデ幽門盲のうホモジネートを超遠心分離し、その上澄みから PLA_2 を部分精製した。また、岸村と林⁴⁶⁾はニチリンヒトデ幽門盲のうアセトン粉末の抽出液から PLA_2 様酵素を精製した。

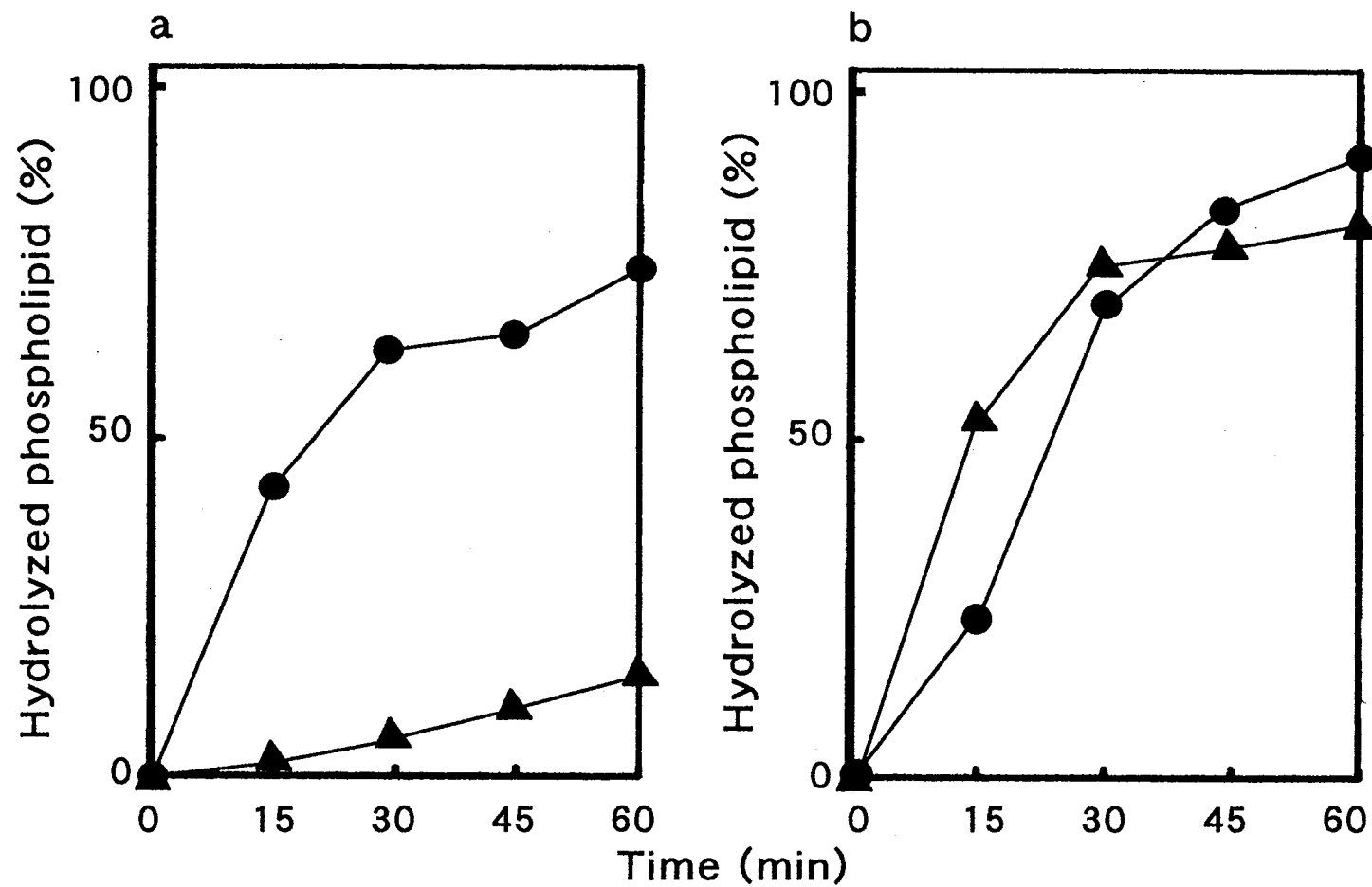


Fig. 20. Time-course of hydrolysis of scallop adductor muscle PC and PE by the starfish PLA₂.
 Substrate: scallop adductor muscle PC (●), PE(▲). Enzyme: starfish PLA₂(a), porcine pancreatic PLA₂ (b).

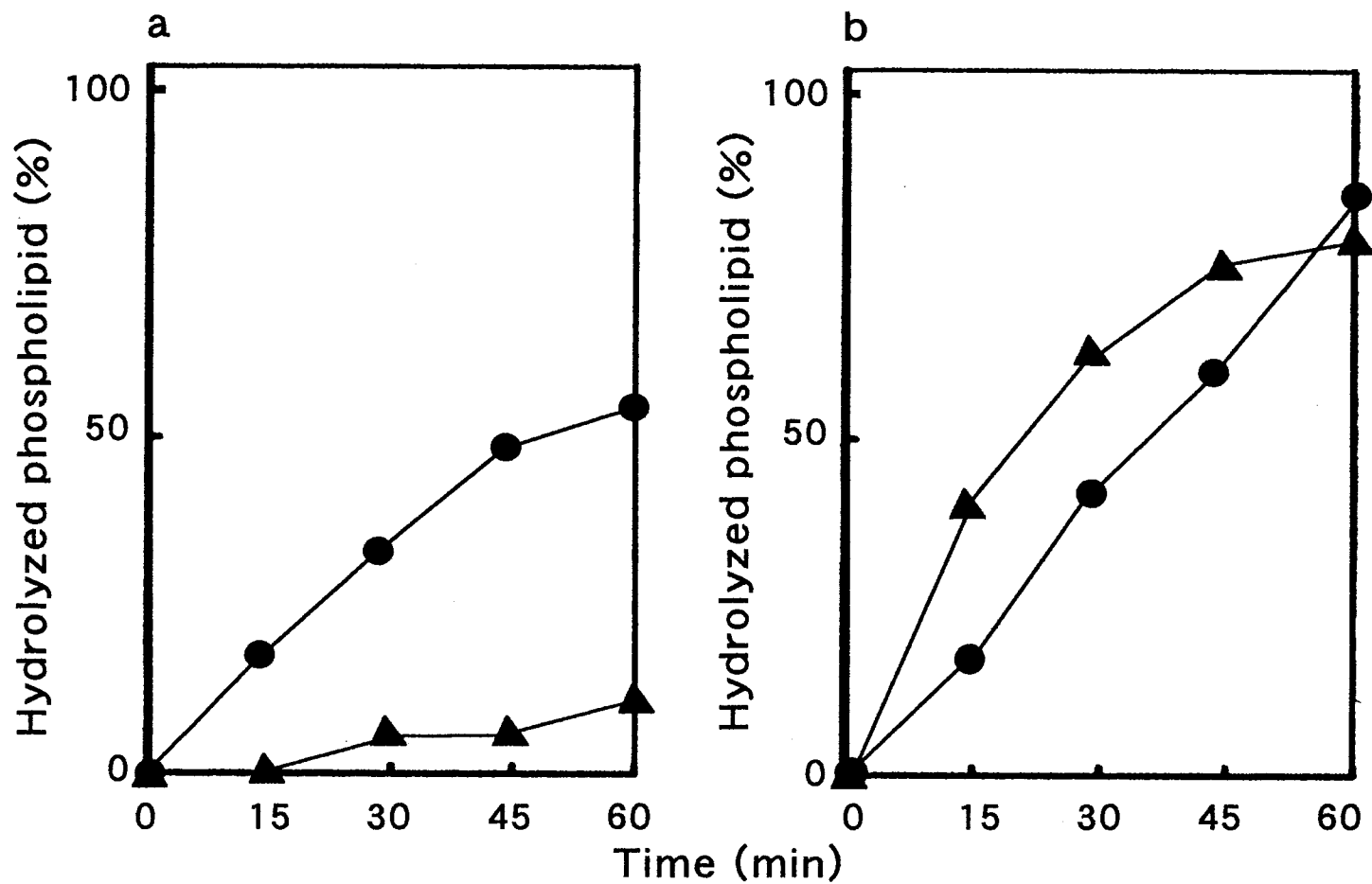


Fig. 21. Time-course of hydrolysis of squid mantle muscle PC and PE by the starfish PLA_2 .

Substrate: squid mantle muscle PC (●), PE(▲). Enzyme: starfish PLA_2 (a), porcine pancreatic PLA_2 (b).

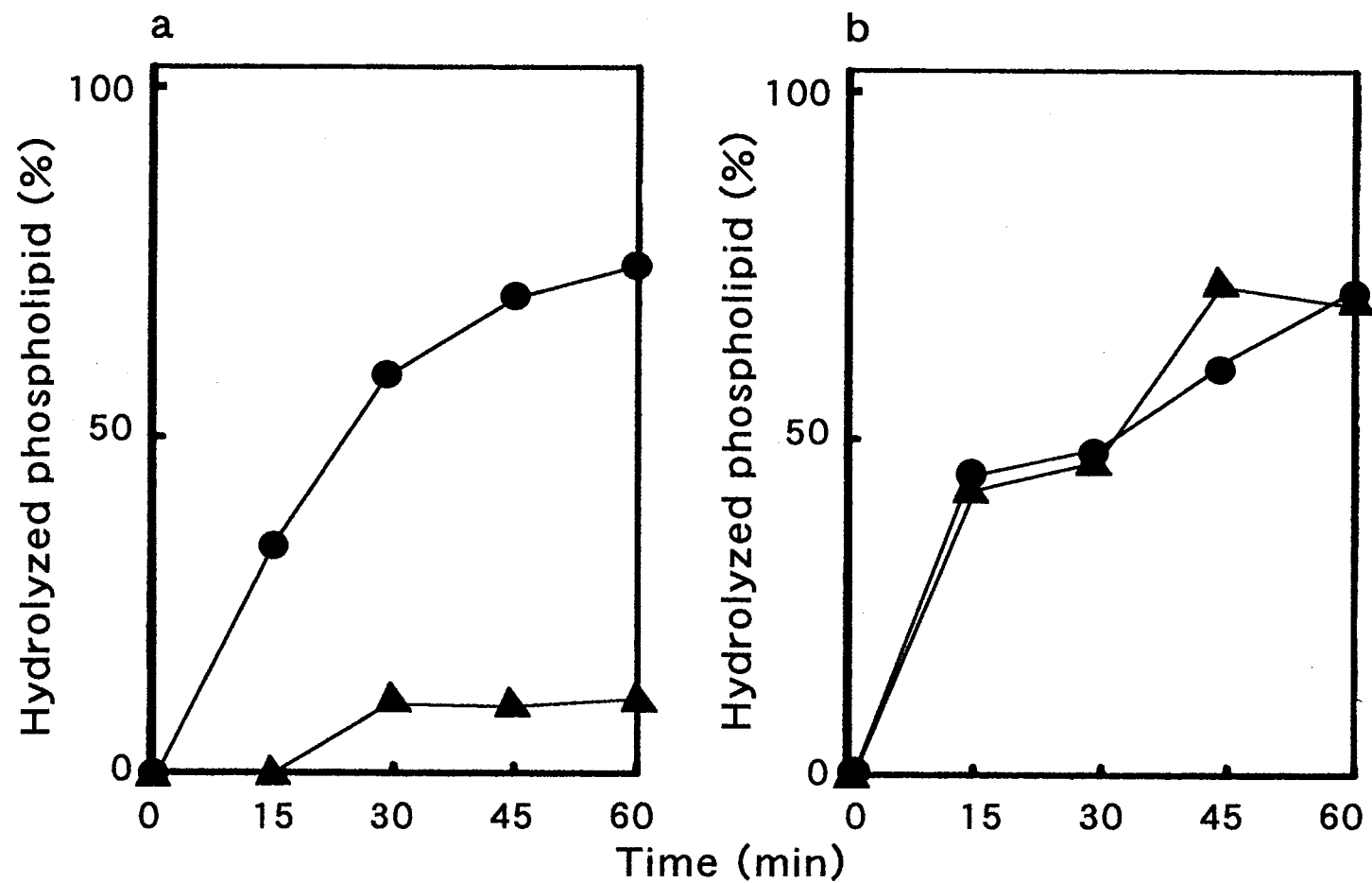


Fig. 22. Time-course of hydrolysis of soybean PC and PE by the starfish PLA₂.
 Substrate: soybean PC (●), PE(▲). Enzyme: starfish PLA₂(a), porcine pancreatic PLA₂ (b).

本研究の第1章において、イトマキヒトデ幽門盲のうのPLA活性値が他3種のヒトデ類やブタ膵臓のそれらに比べて著しく高く、また、その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[Ⅰ]のPLA比活性値がアセトン粉末より調製した粗酵素[Ⅱ]のそれよりも高いことが明らかになった。本章では、このイトマキヒトデ粗酵素[Ⅰ]からPLAの分離・精製を試み、電気泳動的に単一に精製できることを明らかにした。一方、同様の手順で粗酵素[Ⅱ]からの分離・精製を試みたが成功しなかった。従って、クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) 処理はアセトン処理に比べてPLAの抽出性を良くするだけでなく、その分離・精製に対しても有効であると考えられた。

2. イトマキヒトデPLAの酵素化学的特性

イトマキヒトデの粗酵素[Ⅰ]から精製されたPLAは、トリグリセリドを加水分解せず、また、POPCから主にsn-2位のオレイン酸を特異的に遊離したことから、PLA₂と同定された。この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はニチリンヒトデ幽門盲のう⁴⁶⁾のPLA₂と類似していた。一方、マダイ幽門垂PLA₂⁴⁷⁾、マダイ肝膵臓DE-1 PLA₂およびDE-2 PLA₂⁴⁸⁾はPCを基質とした場合にはそれぞれ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たと報告されており、本イトマキヒトデ精製PLA₂はそれらとCa濃度依存性が異なった。本研究のイトマキヒトデPLA₂の最適pH (pH 9.0付近) は、既報のイトマキヒトデ部分精製PLA₂ (最適pH 9.0)⁴⁵⁾、ニチリンヒトデPLA₂様酵素 (最適pH 9-10)⁴⁶⁾、マダイ幽門垂PLA₂ (最適pH 8.5)⁴⁷⁾ およびマダイ肝膵臓DE-2 PLA₂ (最適pH 9)⁴⁸⁾の最適pHとほぼ同様であったが、マダイ肝膵臓DE-1 PLA₂ (最適pH 10)⁴⁸⁾のそれとは相違した。一方、本PLA₂の最適温度 (50℃付近) は、既報のイトマキヒトデ部分精製PLA₂ (最適温度37℃)⁴⁵⁾ およびニチリンヒ

トデPLA₂様酵素（最適温度30-40℃）⁴⁶⁾のそれらと相違した。本イトマキヒトデ精製PLA₂の比活性値（119,000 U/mg）は、部分精製PLA₂（26 U/mg：本研究で用いた活性の定義により換算）⁴⁵⁾、ニチリンヒトデ幽門盲のうのアセトン粉末から精製されたPLA₂様酵素（26 U/mg）⁴⁶⁾の比活性値と比べて著しく高かった。本研究のイトマキヒトデPLA₂は、既報のイトマキヒトデ部分精製PLA₂⁴⁵⁾と比較して、分子量、比活性および最適温度が異なったが、これは組織の脱脂処理、酵素の精製法および酵素の純度の違いによるものと推察された。

本研究で精製したイトマキヒトデPLA₂は哺乳動物膵臓PLA₂¹³⁻¹⁵⁾と同様にホタテガイ貝柱筋およびスルメイカ外套筋から調製したPCとPEのsn-2位の脂肪酸エステルをその鎖長や二重結合数によらず加水分解した。また、卵黄のPCを分解する比活性（119,000 U/mg）は市販のブタ膵臓PLA₂の比活性（4,300 U/mg、Sigma、試薬用）と比べて約30倍高かった。さらに、大豆およびホタテガイ貝柱筋から調製したPEに比べてPCを良く分解し、ブタ膵臓PLA₂¹⁵⁾とは異なる極性基特異性を有することが明らかになった。

先に述べたように、水産生物由来のPLA₂で産業的に利用されているものは無いが、イトマキヒトデPLA₂は比活性が極めて高く、PEよりもPCを良く分解するという極性基特異性を持つことから、新規特性を有するものとして基礎・応用の両面で有用なPLA₂であると考えられる。

第3章 イトマキヒトデ幽門盲のうホスホリパーゼA₂のアミノ酸配列

第1項 目的

イトマキヒトデPLA₂がブタ膵臓PLA₂と異なる機能特性を有することから、両者は一次構造および高次構造を異にするものと考えられた。そこで本章では、イトマキヒトデPLA₂のアミノ酸配列を決定することとした⁴⁹⁾。

第2項 材料および方法

1. 酵素

イトマキヒトデPLA₂は、第2章と同様の方法で分離・精製した。

なお、標品中にはわずかながら色素成分が残存しており、それがプロテアーゼ消化断片のHPLCを行う際に断片の検出を妨害するので、色素除去を行った。すなわち、イトマキヒトデPLA₂溶液に硫酸アンモニウムを加えて50 %飽和とし、生成した酵素の沈澱を10,000×gで5分間遠心分離して集めた。この操作により大部分の色素は除去されたが、さらに完全除去を期するために以下の操作を行った。沈澱酵素画分は少量の蒸留水に溶解した後、蒸留水に対して透析して硫酸アンモニウムを除去した。次に、酵素画分に終濃度1 %になるように50 %トリクロロ酢酸を添加し、酵素タンパク質を沈澱させた。この酵素

懸濁液を1.5 mlのマイクロチューブに分注し、12,000 ×rpmで5分間遠心分離し酵素を沈澱させた。沈澱した酵素は少量の50 mMトリス-塩酸 (pH 8.0) に溶解した後、カルボキシメチル化した。

2. 方法

イトマキヒトデPLA₂のアミノ酸配列分析はFig. 23に示す手法により行った。

2.1 カルボキシメチル化

PLA₂ (約2 mg) は2-メルカプトエタノールで還元した後、モノヨード酢酸を反応させてカルボキシメチル (CM) 化⁵⁰⁾した。

2.2 プロテアーゼ消化

(1) リシルエンドペプチダーゼ消化

CM-PLA₂ (約0.5 mg) を0.1 mlの50 mM炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH 8.0) に溶解した後、リシルエンドペプチダーゼ (和光純薬工業) をタンパク質に対して1/500重量加え、37 °Cで20分間消化した。凍結により反応停止した後、消化物を凍結乾燥した。

(2) *Staphylococcus aureus* V8プロテアーゼ消化

CM-PLA₂ (約1 mg) を0.5 mlの50 mM炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH 8.0) に溶解した後、*S. aureus* V8プロテアーゼ (Sigma) をタンパク質に対して1/50重量加え、37 °Cで2時間消化した。凍結により反応停止した後、消化物を凍結乾燥した。

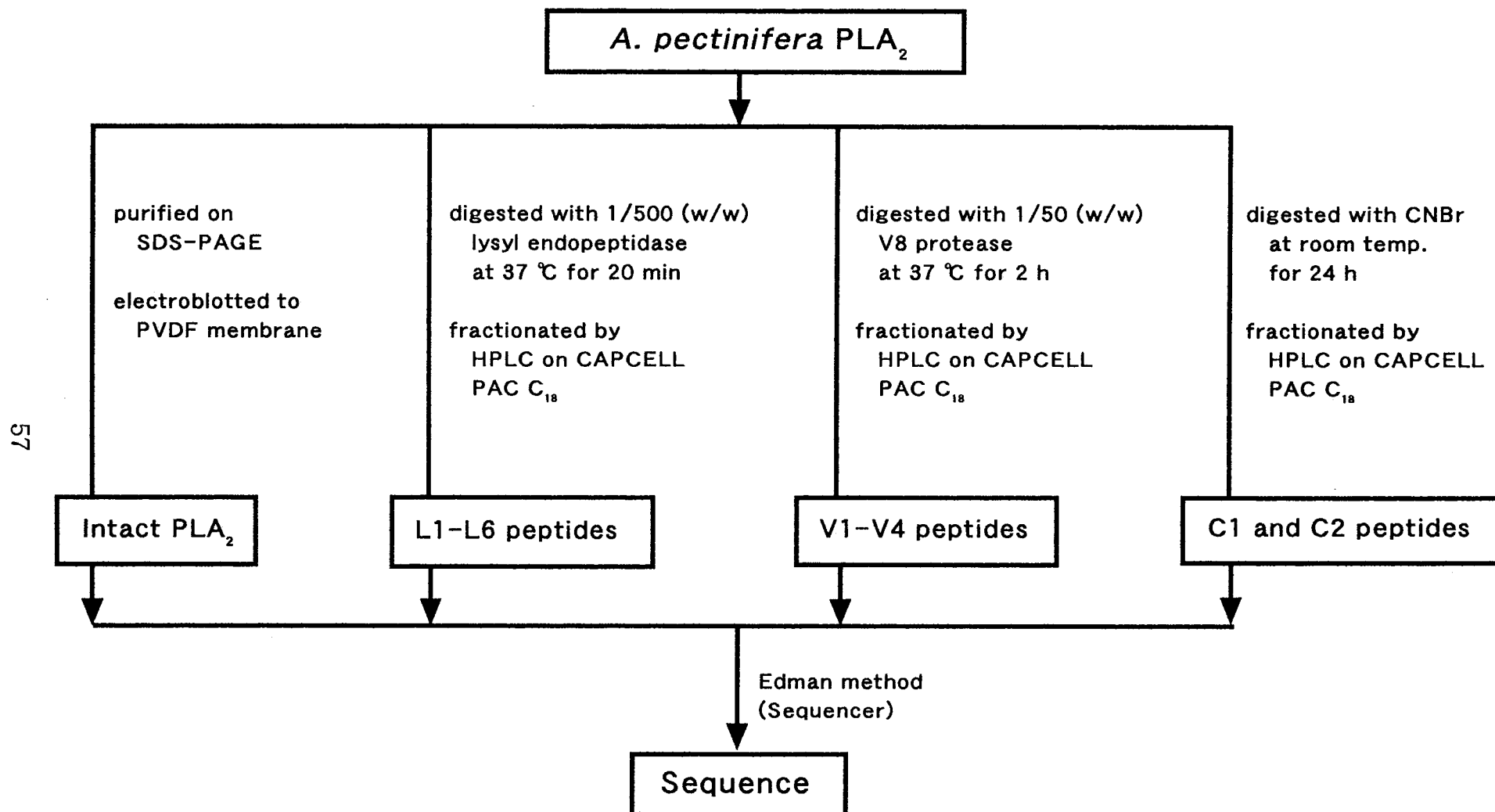


Fig. 23. Outline of amino acid sequence analysis of the starfish PLA₂

2.3 臭化シアン分解

CM-PLA₂ (約0.5 mg) を0.5 mlの70 %ギ酸に溶解し、終濃度13 mg/mlの臭化シアンを加えた後、窒素置換して20 °Cで24時間分解した。反応液は9倍容量の蒸留水で希釈し、凍結乾燥した。

2.4 ペプチドの分離

臭化シアン分解およびプロテアーゼ消化により生じたペプチドは、CAPCELL PAK C₁₈ カラム (250×4.6 mm内径、資生堂) を用いた逆相HPLCにより分離した。ペプチドはTFAを含む0-60 %アセトニトリルの直線濃度勾配により溶出・分離した。なお、流速は1.0 ml/minとし、タンパク質は214 nmでの吸光度測定により検出した。

2.5 アミノ酸組成の分析

タンパク質およびペプチドを凍結乾燥し、6 N塩酸中で110 °Cで24時間加水分解した後、PICO-TAGTMワークステーション (Waters) を用いて分析した。

2.6 アミノ酸配列の分析

PLA₂のN末端領域のアミノ酸配列分析はPLA₂をSDS-PAGEに供した後、ゲル中のタンパク質をPVDF膜に電気泳動的に転写した。PVDF膜上の目的の酵素のバンドを切り取り、そのN末端アミノ酸配列をABI 473Aプロテインシーケンサー (Applied Biosystems) により分析した。また、タンパク質およびペプチドの配列分析は、試料を凍結乾燥後、0.1 % TFAに溶解した約100 pmol相当のタンパク質およびペプチドをプロテインシーケンサーに供することにより行った。

第3項 結果

1. イトマキヒトデPLA₂のアミノ酸組成

イトマキヒトデPLA₂のアミノ酸配列分析に先立ち、アミノ酸組成の分析を行った (Table 7)。本方法ではCysおよびTrpは定量できないが、イトマキヒトデPLA₂はAsx、Gly、Tyr、Ala、Glxなどのアミノ酸を多く含んでいることが分かった。そこで、この結果を星状図化し、哺乳動物膵臓由来のPLA₂のものと比較した。Fig. 24に示すように、イトマキヒトデPLA₂は哺乳動物のPLA₂と比較して、Tyr、Gly、AlaおよびGlxの含量が高いことが特徴的であった。イトマキヒトデPLA₂はアミノ酸組成において哺乳動物のPLA₂とは異なる他に、分子量も若干大きいことから、イトマキヒトデPLA₂の一次構造もまた哺乳動物膵臓PLA₂とは異なることが示唆された。

2. イトマキヒトデPLA₂のアミノ酸配列

2.1 N末端領域のアミノ酸配列分析

PLA₂をSDS-PAGEにより分離した後、ゲル上の酵素タンパク質をPVDF膜に転写した。次いで、そのN末端アミノ酸配列を分析した。その結果、20残基のアミノ酸配列が決定できた (Table 8)。この結果から、イトマキヒトデPLA₂のN末端α-アミノ基がアセチル基などでブロックされていないことも分かった。

2.2 リシルエンドペプチダーゼによる消化断片のアミノ酸配列分析

アミノ酸組成分析により、イトマキヒトデPLA₂は8残基のLysを含むことが推測された (Table 7) ので、分子内部のアミノ酸配列を分析するにあたって、先ずリシルエンドペ

Table 7. Amino acid composition of the starfish PLA₂

Amino acid	Starfish PLA ₂
Asx	19.9(20) ^{*1}
Glx	11.6(11)
Cys ^{*2}	+ (-)
Ser	6.9(7)
Gly	16.1(16)
His	0.8(1)
Arg	3.3(3)
Thr	7.2(7)
Ala	12.3(12)
Pro	4.4(4)
Tyr	14.8(15)
Val	4.0(4)
Met	0.8(1)
Ile	4.3(4)
Leu	2.9(3)
Phe	5.6(6)
Trp ^{*3}	- (-)
Lys	7.7(8)
Total	(122)

^{*1} The values in the parentheses are to the nearest integer.

^{*2} Detected as carboxymethylcysteine and estimated qualitatively.

^{*3} Decomposed during hydrolysis with 6 N HCl.

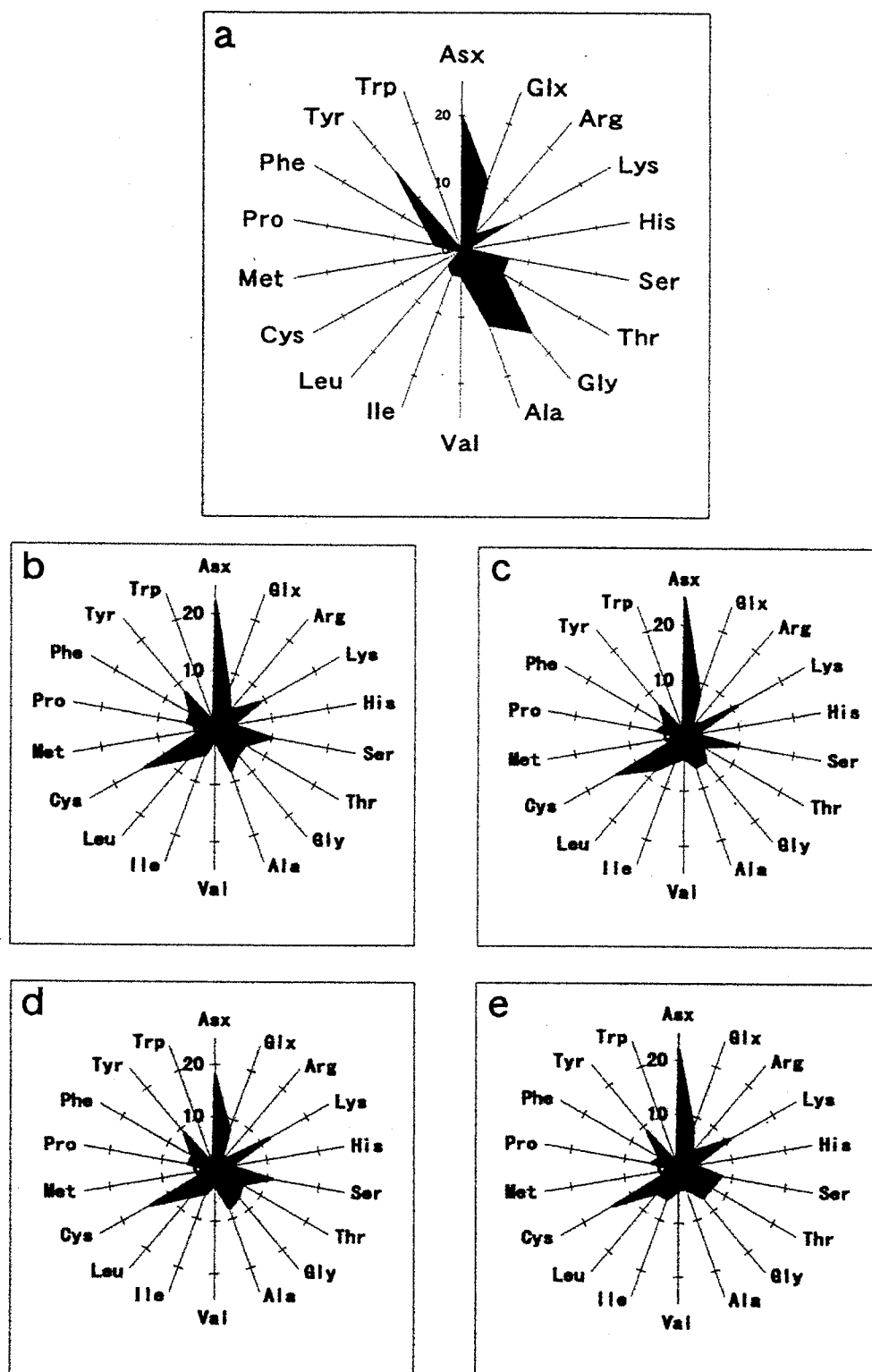


Fig. 24. Star diagrams of amino acid compositions of PLA₂s.
a, *A. pectinifera* PLA₂; b, porcine pancreatic PLA₂; c, bovine pancreatic PLA₂; d, human pancreatic PLA₂; e, rat pancreatic PLA₂.

Table 8. N-terminal amino acid sequence of the starfish PLA₂

Sequence	
Starfish PLA ₂	Ser-Val-Tyr-Gln-Phe-Gly-Lys-Phe-Ile-Ser-Cys-Tyr-Gly-Gly-Ala-Gly- -Phe-Phe-Asp-Gly---

プチダーゼで断片化することとした。

CM-PLA₂はリシルエンドペプチダーゼで消化した後、逆相HPLCに供した (Fig. 25)。溶出したL1-L6のペプチド画分を分取し、それぞれを凍結乾燥した後、アミノ酸配列分析を行った。その結果、L4は25残基の配列を決定することが出来たが、C末端までの決定には至らなかった。それ以外のペプチドについては、Table 9に示すようにC末端までの配列が決定された。前述したN末端アミノ酸配列と照合した結果、L2が酵素のN末端ペプチドであり、次にL5が配置することがわかった。そこで次に、残りのペプチドの配置とL4ペプチドの全アミノ酸配列分析のために、他の消化法により得られた断片を用いて分子内部アミノ酸配列分析を試みた。

2.3 V8プロテアーゼ消化ペプチドのアミノ酸配列分析

CM-PLA₂を*S. aureus* V8プロテアーゼにより消化し、生じたペプチドを逆相HPLCで分離・精製した。Fig. 26に示すように、溶出したV1-V4のペプチド画分を分取し、それぞれ凍結乾燥した後、アミノ酸配列分析に供した。その結果、Table 10に示すように各ペプチドの配列はすべてC末端まで分析された。ペプチドV1はC末端がGluではなくCysであったことから、PLA₂のC末端に位置するペプチドと考えられた。また、ペプチドV1はペプチドL1のC末端部分、V2はペプチドL1のN末端部分と重複するアミノ酸配列を有したことから、ペプチドV2の後にペプチドV1が配置することがわかった (Fig. 28参照)。次に、ペプチドV3はペプチドL6のC末端部分およびペプチドL4のN末端部分と重複するアミノ酸配列を有したことから、ペプチドL6の後にCys-Lys-Lysの配列を挟んでペプチドL4が配置することがわかった。しかしながら、以上の結果からではL3の配置場所とL4のC末端部分のアミノ酸配列を決定することができなかった。そこで、L4内部にMet残基が存在することに着目し、この残基を臭化シアンで分解することによってペプチド断片を得て、それにより分子内部のアミノ酸配列を分析することとした。

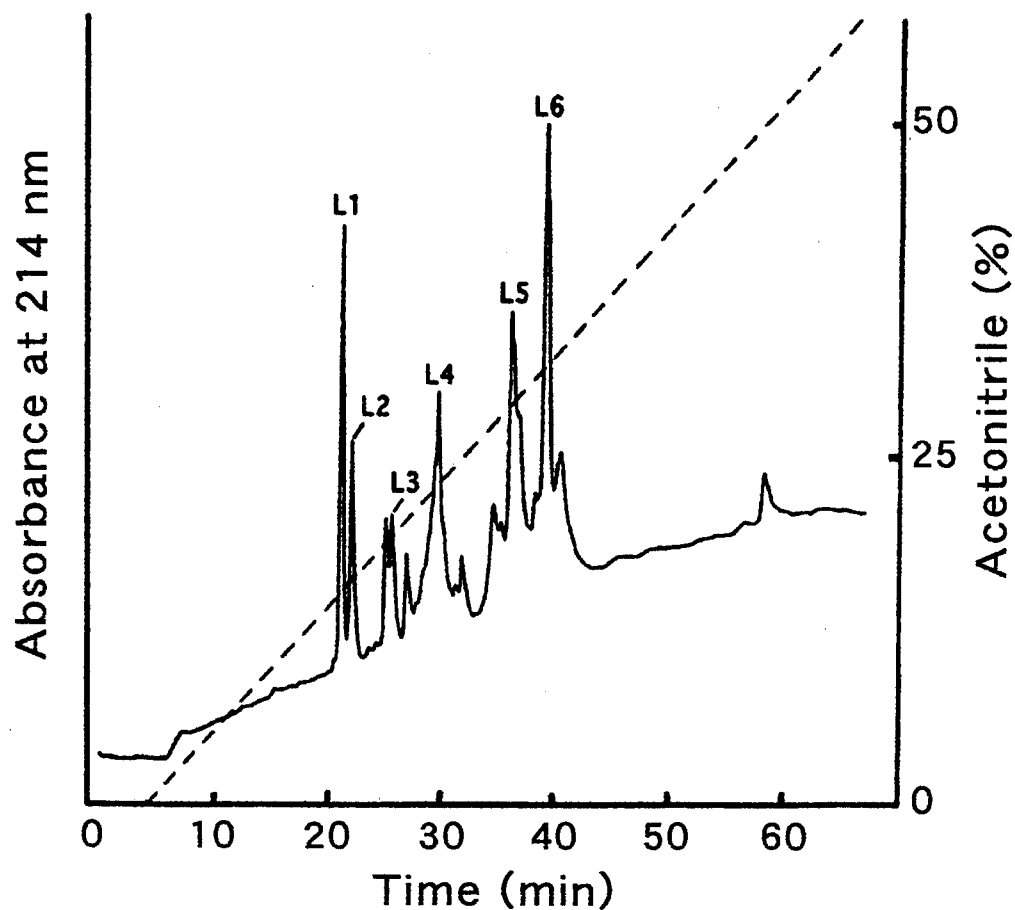


Fig. 25. Separation of lysyl endopeptidase digests of the starfish CM-PLA₂.

Fragments produced by lysyl endopeptidase digestion were separated by reverse-phase HPLC on a CAPCELL PAK C₁₈ column (250 × ϕ 4.6 mm) with a linear gradient of acetonitrile (-----) from 0 to 60 % in 0.1 % trifluoroacetic acid in a total volume of 60 ml at a flow rate of 1.0 ml/min. The absorbance at 214 nm was monitored.

Table 9. Amino acid sequence of lysyl endopeptidase peptides

Peptide	Sequence
L1	Arg-Pro-Thr-Tyr-Asn-Gln-Ala-Tyr-Glu-Ser-Tyr-Asp-Lys
L2	Ser-Val-Tyr-Gln-Phe-Gly-Lys
L3	Gly-Thr-Pro-Leu-Asp-Asp-Thr-Asp-Arg-Cys-Cys-Leu-Val-His-Asp-Asn-Cys-Tyr-Gly-Lys
L4	Ala-Ala-Asp-Tyr-Ser-Trp-Tyr-Ser-Thr-Asn-Pro-Glu-Cys-Arg-Glu-Phe-Met-Cys-Glu-Cys-Asp-Arg- -Ala-Gly-Ala---
L5	Phe-Ile-Ser-Cys-Tyr-Gly-Gly-Ala-Gly-Phe-Phe-Asp-Gly-Leu-Asp-Tyr-Asn-Gly-Tyr-Gly-Cys-Tyr- -Cys-Gly-Tyr-Gly-Gly-Lys
L6	Ala-Thr-Ala-Glu-Ala-Asp-Cys-Gly-Ser-Trp-Asp-Pro-Tyr-Ile-Ile-Val-Tyr-Asp-Tyr-Glu-Gln-Thr- -Thr-Asp-Ala-Ser-Gly-Asn-Cys-Val-Ile-Lys

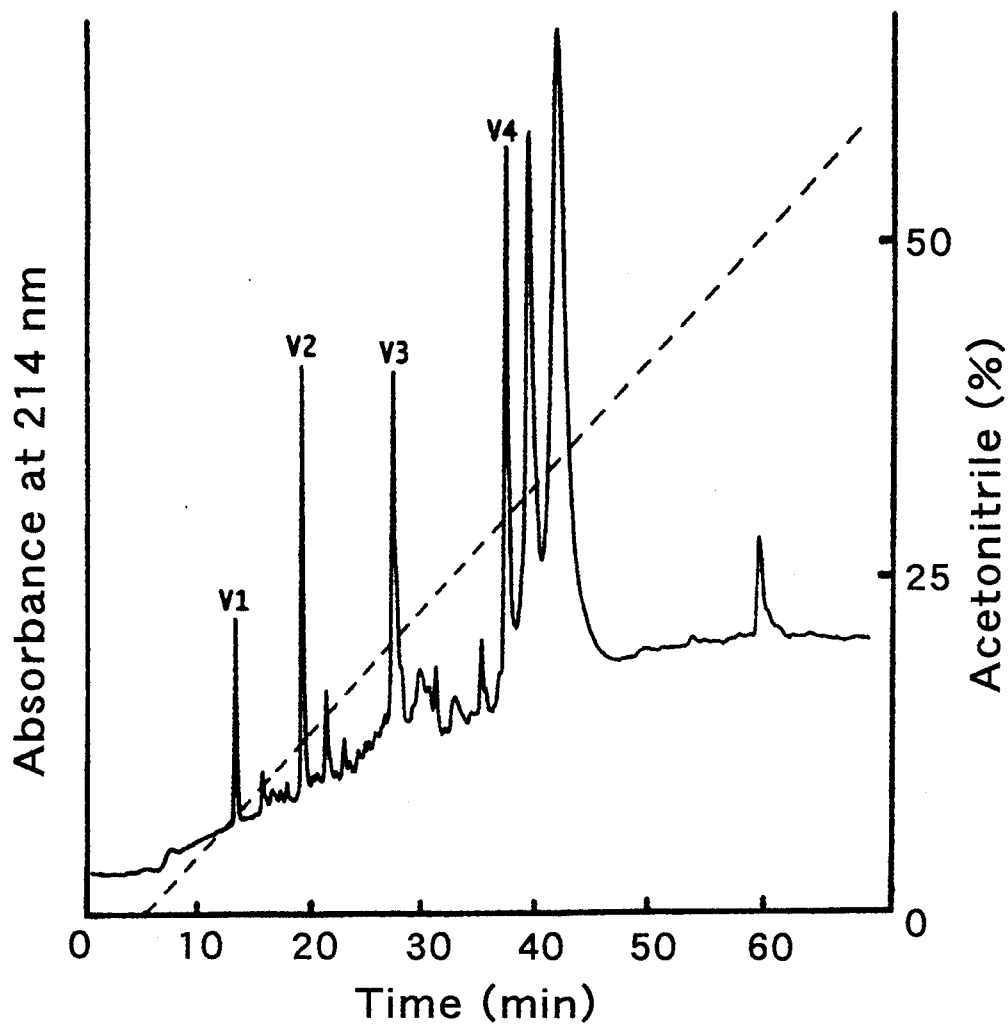


Fig. 26. Separation of *S. aureus* V8 protease digests of the starfish CM-PLA₂.

Fragments produced by *S. aureus* V8 protease digestion were separated by reverse-phase HPLC on a CAPCELL PAK C₁₈ column (250 × ϕ 4.6 mm) with a linear gradient of acetonitrile (----) from 0 to 60 % in 0.1 % trifluoroacetic acid in a total volume of 60 ml at a flow rate of 1.0 ml/min. The absorbance at 214 nm was monitored.

Table 10. Amino acid sequence of *S. aureus* V8 protease peptides

Peptide	Sequence
V1	Ser-Tyr-Asp-Lys-Asp-Ser-Cys
V2	Arg-Pro-Thr-Tyr-Asn-Gln-Ala-Tyr-Glu
V3	Gln-Thr-Thr-Asp-Ala-Ser-Gly-Asn-Cys-Val-Ile-Lys-Cys-Lys-Lys-Ala-Ala-Asp-Tyr-Ser-Trp-Tyr-Ser-Thr-Asn-Pro-Glu
V4	Ala-Asp-Cys-Gly-Ser-Trp-Asp-Pro-Tyr-Ile-Ile-Val-Tyr-Asp-Tyr-Glu

2.4 臭化シアン分解による分子内部アミノ酸配列の分析

CM-PLA₂を臭化シアンにより消化し、生じたペプチドを逆相HPLCで分離した。この操作によりPLA₂はN末端側の断片（C1）とC末端側の断片（C2）に分画されることが期待される。しかしながら、Fig. 27に示すように、C1とC2は逆相HPLCにより分離できなかった。そこで、C2のN末端アミノ酸配列は、C1とC2混合物のアミノ酸配列と既に決定したイトマキヒトデPLA₂のN末端配列を比較することにより解析した。その結果、Table 11に示すようにペプチドC1はPLA₂のN末端に位置するペプチドL2、L5の全アミノ酸配列に引き続きペプチドL3のN末端アミノ酸配列を有した。このことから、ペプチドL5の後にペプチドL3が配置することがわかった。一方、ペプチドC2はペプチドL4のC末端アミノ酸配列に続いて、L1の全アミノ酸配列を有したことから、ペプチドL4の後にペプチドL1が配置することが分かった。

分析したすべてのペプチドのアミノ酸組成をTable 12に示した。また、L3とL6を連結するペプチドを得ることはできなかったため、その部分の配列を推定して予想全配列をFig. 28に示した。その結果、イトマキヒトデPLA₂の消化断片はN末端から順にL2、L5、L3、L6、L4、およびL1が配置し、L6とL4の間にCys-Lys-Lysの3残基が存在すると考えられた。

第4項 小括

本章において、イトマキヒトデ幽門盲のうPLA₂とリシルエンドペプチダーゼ、V8プロテアーゼ、および臭化シアン分解により生じたペプチドのアミノ酸配列を自動エドマン法により解析した結果、L3とL6の間の1箇所を除く137残基のアミノ配列を決定することが

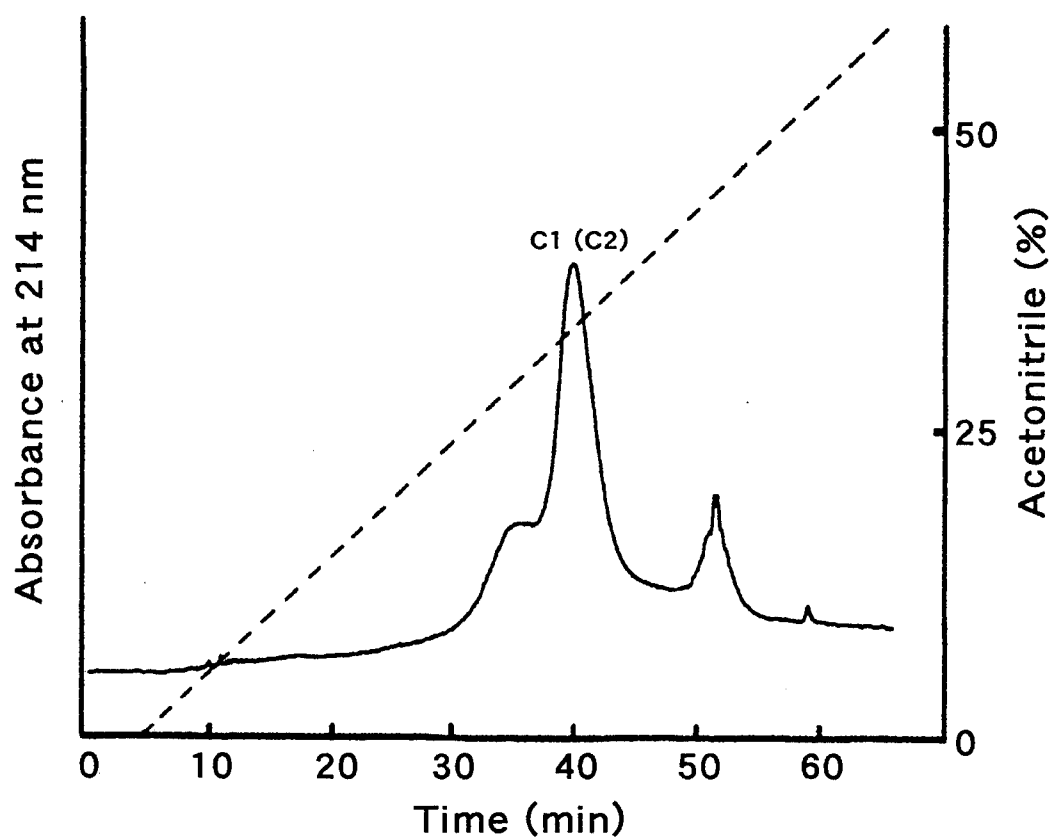


Fig. 27. Separation of cyanogen bromide digests of the starfish CM-PLA₂.

Cyanogen bromide fragments were separated by reverse-phase HPLC on a CAPCELL PAK C₁₈ column (250 × ϕ 4.6 mm) with a linear gradient of acetonitrile (-----) from 0 to 60 % in 0.1 % trifluoroacetic acid in a total volume of 60 ml at a flow rate of 1.0 ml/min. The absorbance at 214 nm was monitored.

Table 11. Amino acid sequence of cyanogen bromide peptides

Peptide	Sequence
C1	Ser-Val-Tyr-Gln-Phe-Gly-Lys-Phe-Ile-Ser-Cys-Tyr-Gly-Gly-Ala-Gly-Phe-Phe-Asp-Gly-Leu-Asp- -Tyr-Asn-Gly-Tyr-Gly-Cys-Tyr-Cys-Gly-Tyr-Gly-Gly-Lys-Gly-Thr-Pro-Leu-Asp---
C2	Cys-Glu-Cys-Asp-Arg-Ala-Gly-Ala-Gln-Cys-Phe-Ala-Glu-Lys-Arg-Pro-Thr-Tyr-Asn-Gln-Ala-Tyr- -Glu-Ser-Tyr-Asp-Lys-Asp-Ser---

Table 12. Amino acid compositions of the starfish PLA₂ and its fragments

Amino acid	PLA ₂	V1	V2	V3	V4	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Asx	19.9(19) ^{*1}	2.0(2)	0.8(1)	4.7(4)	2.3(3)	2.1(2)		4.1(5)	2.6(3)	2.7(3)	4.6(5)
Glx	11.6(11)		1.8(2)	2.4(2)	1.5(1)	2.3(2)	0.9(1)		5.1(5)		3.0(3)
Cys ^{*2}	+ ^{*3} (14)	+ (1)		+ (2)	+ (1)			+ (3)	+ (4)	+ (3)	+ (2)
Ser	6.9(8)	1.5(2)		2.9(3)	1.3(1)	1.1(1)	0.9(1)		1.8(2)	1.9(1)	1.7(2)
Gly	16.1(15)			1.4(1)	1.8(1)		1.0(1)	2.0(2)	1.6(1)	8.4(9)	3.3(2)
His	0.8(1)						0.6(1)				
Arg	3.3(4)		0.8(1)			0.7(1)		0.7(1)	2.2(2)		
Thr	7.2(7)		1.1(1)	3.9(3)		0.6(1)		2.2(2)	0.9(1)		2.3(3)
Ala	12.3(11)		0.9(1)	3.2(3)	1.3(1)	1.3(1)			5.5(5)	1.4(1)	3.8(4)
Pro	4.4(4)		1.0(1)	0.8(1)	1.1(1)	1.2(1)		0.7(1)	1.1(1)		1.2(1)
Tyr	14.8(15)	0.9(1)	1.6(2)	1.7(2)	2.3(3)	2.7(3)	1.1(1)	0.7(1)	1.7(2)	4.0(5)	3.0(3)
Val	4.0(4)			1.1(1)	1.0(1)		0.9(1)	1.1(1)			1.8(2)
Met	0.8(1)								0.4(1)		
Ile	4.3(4)			0.8(1)	1.3(2)					0.9(1)	2.5(3)
Leu	2.9(3)							1.7(2)		1.2(1)	
Phe	5.6(6)						0.6(1)		1.9(2)	1.6(3)	
Trp ^{*4}	(2)			(1)	(1)				(1)		(1)
Lys	7.7(8)	0.8(1)	0.8(1)	2.6(3)		1.1(1)	0.8(1)	1.1(1)	1.0(1)	1.1(1)	1.2(1)
Total	(137)	(7)	(10)	(27)	(16)	(13)	(7)	(20)	(31)	(28)	(32)
Position	1-137	131-137	121-130	76-102	60-75	122-134	1-7	36-55	91-121	8-35	56-87

^{*1} The values in the parentheses are the numbers of residues determined by sequencing, respectively.

^{*2} Detected as carboxymethylcysteine.

^{*3} Detected qualitatively.

^{*4} Decomposed during hydrolysis with 6 N HCl.

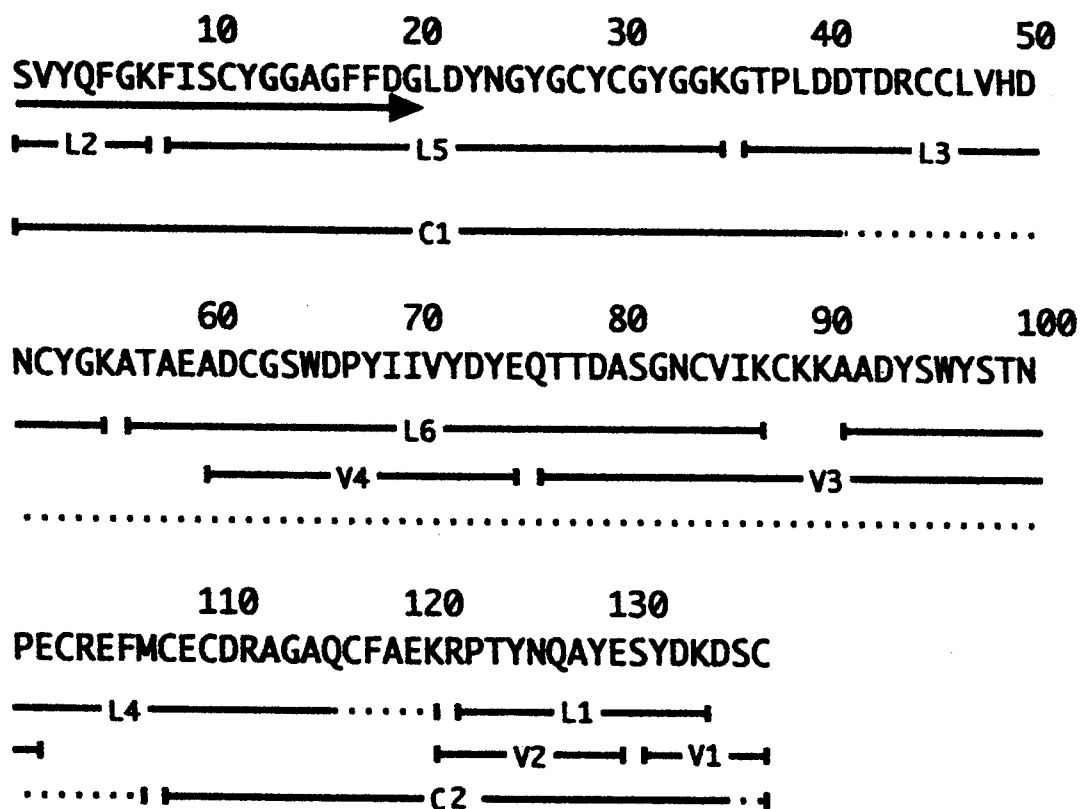


Fig. 28. Summary of sequencing data of the starfish PLA₂.
L1-L6, V1-V4, and C1 and C2 indicate peptides obtained by
lysyl endopeptidase, *S. aureus* V8 protease and cyanogen
bromide digestion of the starfish CM-PLA₂, respectively. The
single-letter amino acid code is used. The N-terminal sequence
determined with intact starfish PLA₂ electroblotted toPVDF
membrane was shown by a solid arrow. —, regions with
undetermined sequence.

できた。それによれば、イトマキヒトデPLA₂はCys11およびpancreaticループ様配列を有することからグループI PLA₂に属し、また、Ca²⁺結合および触媒作用に関与するアミノ酸残基を完全に保存していた。しかしながら、本PLA₂は62番目と66番目の部位に2残基のアミノ酸の欠損と76番目から96番目の部位に16残基の挿入および3残基の欠損を有しており、哺乳動物およびヘビ毒由来PLA₂とは異なる特異な配列を示し、全体的に配列相同性はあまり高いものではないと思われた。

第4章 イトマキヒトデ幽門盲のうホスホリパーゼA₂のcDNA クローニング

第1項 目的

前章において、イトマキヒトデPLA₂のアミノ酸配列を自動エドマン法で解析した。それにより137残基の配列をほぼ決定することができたが、なお、重複断片が得られないために一部の箇所の配列が不明であった。そこで、本章では、cDNAクローニングと塩基配列分析法によって全配列を解明するとともに、組換えDNA技術を用いたイトマキヒトデPLA₂の大量生産や機能的改変および構造-機能相関の解析を目的として、本PLA₂のcDNAクローニングを行った⁵¹⁾。

第2項 材料および方法

1. 方法

イトマキヒトデ幽門盲のうPLA₂のcDNAクローニングの概略はFig. 29に示す⁵²⁾。

1.1 ベクターDNAおよび宿主大腸菌

(1) ベクターDNA

クローニングを行うためのベクターDNAとしては、pBluescript II KS(+)

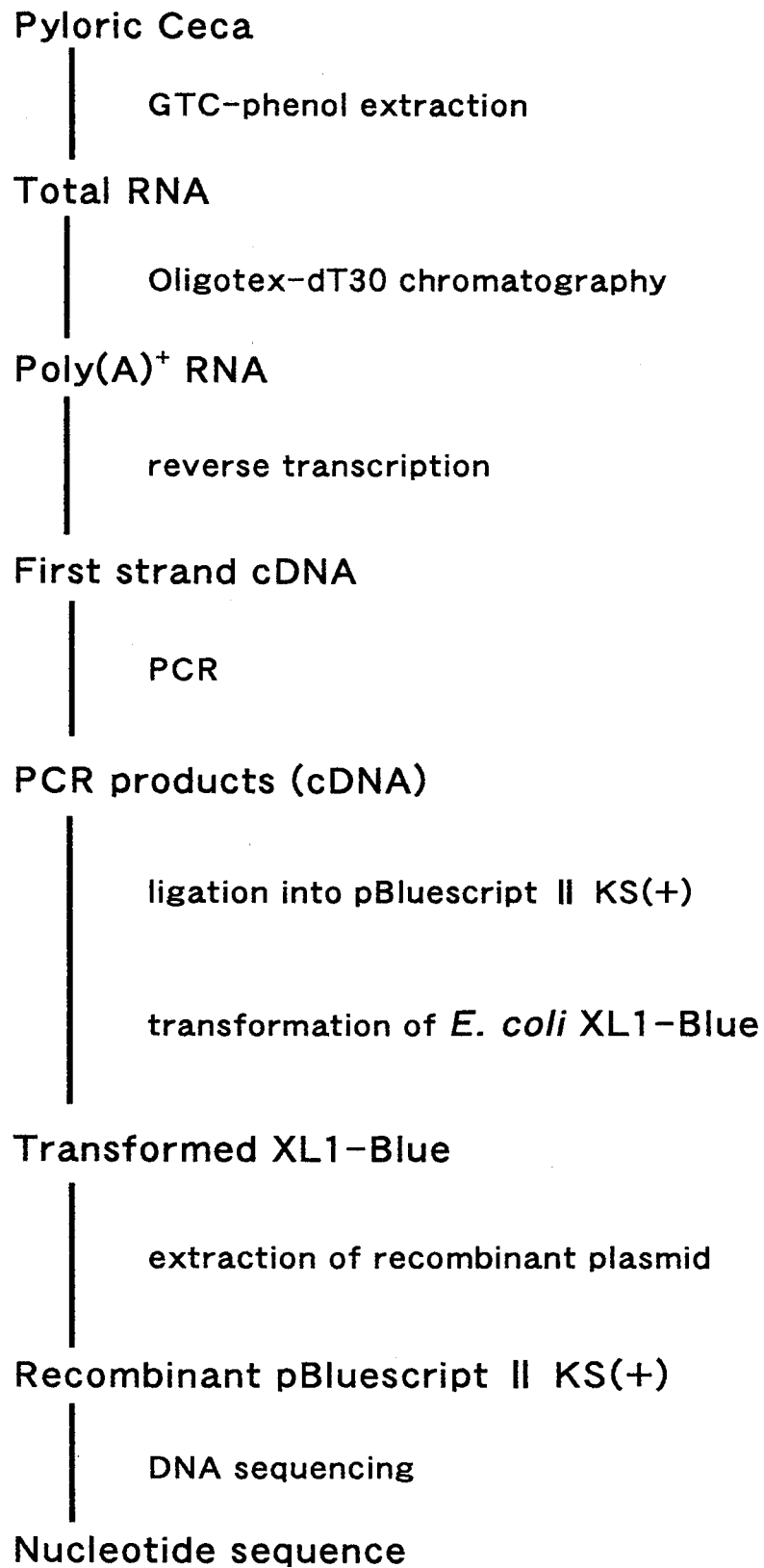


Fig. 29. Outline of cDNA cloning of the starfish PLA₂

(Stratagene) を使用した。pBluescript II KS(+)は2,961 bpから成るプラスミドベクターであり、アンピシリン耐性遺伝子および β -ガラクトシダーゼのN末端部位をコードし、その内部に21個の制限酵素部位から成るマルチ・クローニング部位を持つ遺伝子を有している (Fig. 30) 。そのためリプレッサー遺伝子 *lac I^q* および β -ガラクトシダーゼのC末端をコードしている遺伝子 (*lac Z Δ M15*) を持つ宿主菌を使用すると、IPTGにより β -ガラクトシダーゼの両末端部位が発現誘導される。

(2) 宿主大腸菌

クローニング用の宿主大腸菌としては、XL1-Blue (Stratagene) を使用した。この菌株は、*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac/F'* [*proAB*, *lac I^q*, *lac Z Δ M15:Tn10(tet^r)*] の遺伝子型を持ち、さらにプラスミドF'を含んでいて、この上にテトラサイクリン耐性遺伝子を持っている。また、*lac I^q*を持つのでIPTGによる β -ガラクトシダーゼの発現コントロールが可能である。さらに、*lac Z Δ M15*を持つので、前述したようにX-galの存在下で組換え体と非組換え体の識別が可能である。

(3) 大腸菌のコンピテント化

宿主大腸菌のコンピテント化はCaCl₂法により行った。すなわち、大腸菌XL1-Blueを画線培養した後、シングルコロニーを釣菌して3 mlのLB培地に植菌し、37℃で一夜振とう培養した。この培養液を同組成の新しいLB培地に対して1/10容量加えて、37℃で3時間振とう培養した。培養液はマイクロチューブに分注した後、4,000×rpmで3分間遠心分離した。得られた沈澱はCPG溶液に懸濁した後、氷中で30分間静置した。次いで、この懸濁液を4,000×rpmで3分間遠心分離した後、沈澱を0.4 mlのCPG溶液に穏やかに懸濁し、これをコンピテントセルとした。

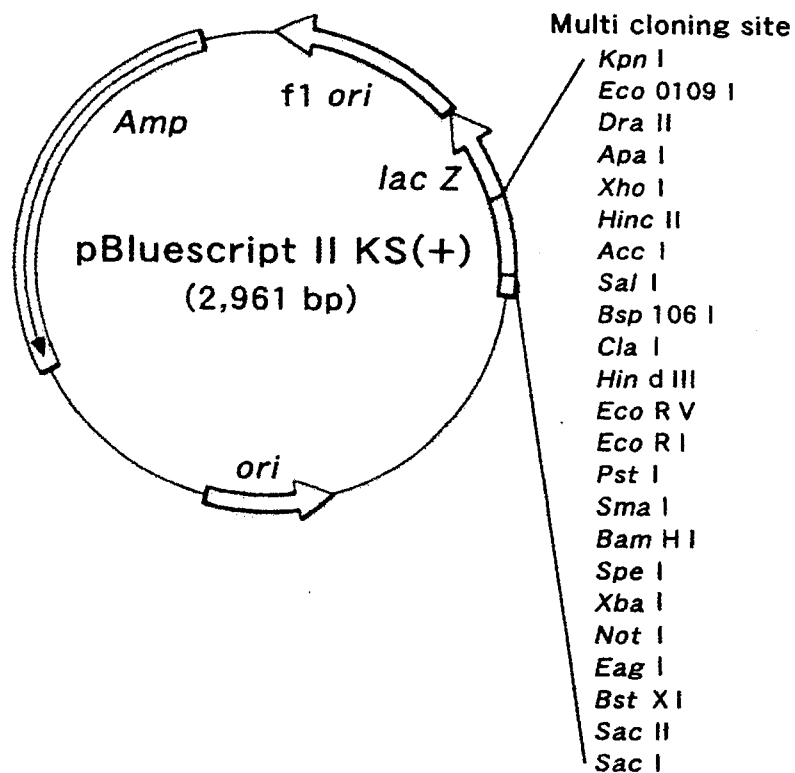


Fig. 30. Circle map of pBluescript II KS(+) DNA.

ori, origin of plasmid replication; *Amp*, ampicillin resistance gene for antibiotic selection of bacteria; *lac Z*, gene for β -galactosidase; *f1 ori*, origin of f1 filamentous phage replication, which allows recovery of the sense strand of the *lac Z* gene by the co-infection with helper phage.

1.2 アガロースゲル電気泳動

(1) 50×TAE緩衝液の調製

トリス (242 g)、酢酸ナトリウム (57.1 ml)、およびEDTA・2ナトリウム (39.4 g) を蒸留水に溶解し、酢酸でpH 7.8に調整し、1000 mlにメスアップした後、オートクレーブ処理し、調製した。

(2) 1.5 %アガロースゲルの調製

電気泳動用高融点タイプのアガロース (フナコシ) 0.75 g、50×TAE緩衝液1 ml、および蒸留水48.5 mlを混合し、加熱して完全に溶解した。次いで、この溶液をゲルホルダー (5.5×6.0 cm) に流し込み、ゲル化させた。

(3) 泳動用緩衝液の調製

泳動用緩衝液は50×TAE緩衝液20 ml、エチジウムブロマイド溶液50 μ l、および蒸留水1000 mlを混合し、調製した。

(4) アガロースゲル電気泳動

電気泳動は、ミューピッド型の電気泳動装置 (コスモバイオ) により行った。核酸試料溶液は1/10容量の色素マーカー液 (40 mMトリス-酢酸緩衝液 (pH 7.8)、1 mM EDTA、40 %グリセロール、0.1 %プロモフェノールブルー、および0.1 %キシレンシアノール) を加えて混合した後、アガロースゲルの試料溝に注入し、50 Vの定電圧で泳動を行った。泳動終了後、紫外線 (波長312 nm) 照射により核酸のバンドを検出し、ポラロイド667フィルムを用いて撮影した。

(5) 核酸の分子量および濃度の測定

核酸の分子量は、アガロースゲル電気泳動における移動度から算出した。なお、分子量マーカーとして λ HindIII 消化物または Hi-Lo DNA マーカー（アベテック）を用いた。アガロースゲル上の核酸の濃度は、そのバンドの濃さを既知の濃度の DNA バンドの濃さと比較することにより見積もった。

(6) アガロースゲルからの核酸の回収

アガロースゲルからの核酸の回収は、SUPREC™-01 を用いて行った。

1.3 全RNAの調製

全RNAは、Chomiczynski and Sacchi⁵³⁾の方法に従い調製した。

すなわち、生きたイトマキヒトデから幽門盲のうを切り出し、約10倍量のグアニジンチオシアン酸溶液を加えて、ホモジナイズした。ホモジネートに同量のフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール溶液を加え、12,000×rpmで10分間遠心分離した。この上層に1/10量の3 M酢酸ナトリウム緩衝液を加え、さらに2倍量の冷水飽和フェノール溶液を加えて攪拌した。次いで、この溶液に約1/2量のクロロホルム-イソアミルアルコール溶液を加えて攪拌し、氷中で15分間静置した後、12,000×rpmで10分間、遠心分離を行った。得られた上層に冷100% エタノールを加えて、12,000×rpmで10分間遠心分離を行った。得られた沈澱は少量のDEPC処理水に溶解し、同様にエタノール沈澱を行った。沈澱した全RNAは70 %エタノールで洗浄した後、真空下で乾燥させた。

1.4 核酸の精製

核酸溶液に混在するタンパク質の除去は、フェノール-クロロホルム処理の後、常法に従って酢酸ナトリウム存在下でエタノールを加えて核酸を沈澱として回収した。沈澱は

70 %エタノールで洗浄した後、真空乾燥した。

1.5 塩基配列の分析

DNAの塩基配列は、ジデオキシチェーントーミネーション法により解析した。すなわち、ABI PRISM™ Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction キット (Perkin Elmer-ABI) またはABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction キット (Perkin Elmer-ABI) を使用して反応を行った。反応は、96 °Cで30秒間、50 °Cで15秒間、60 °Cで4分間を1サイクルとして、合計25サイクル行った。生成したDNAはエタノール沈澱により集めた後、50 mM EDTA-ホルムアミド (1:5, v/v) に溶解し、DNAシーケンサー (Perkin Elmer-ABI) により塩基配列を分析した。

第3項 結果

1. イトマキヒトデPLA₂のcDNAクローニング

1.1 mRNAの調製

イトマキヒトデ幽門盲のうから第4章第2項の方法で調製した全RNAは、同容量 (w/v) のTE溶液と終濃度0.1 %SDS を加えて溶解した。次いでこの溶液をOligotex™-dT30 (スーパー : TaKaRa) によるアフィニティークロマトグラフィーに供し、mRNAを精製した。得られたmRNAは、あらかじめ3 M酢酸ナトリウム緩衝液を入れたマイクロチューブに移し、エタノール沈澱させた。

1.2 イトマキヒトデPLA₂をコードするcDNAの合成

(1) 第一鎖cDNAの合成

第一鎖cDNAの合成は、cDNA合成システムプラスキット (Amersham) を用いて行った。すなわち、mRNAを10 μ lのDEPC処理水に溶解し、12,000×rpmで3分間遠心分離した。mRNAに相補的な第一鎖cDNAを合成するため、AMV逆転写酵素XL (40 U、TaKaRa) を使用して、40 °Cで1時間インキュベートした後、氷冷により反応を停止した。

(2) PCRによるcDNAの増幅

cDNAの合成および増幅は、イトマキヒトデPLA₂のN末端およびC末端のアミノ酸配列をもとに作製したプライマー (Fig. 31) を用いてPCR法により行った。すなわち、フォワードプライマF1およびF2はイトマキヒトデPLA₂のN末端1番目から6番目のアミノ酸配列をもとに作製した。このとき、イトマキヒトデPLA₂を成熟酵素として大腸菌により発現することを目的とし、5'末端に翻訳開始コドン「ATG」を付加した。フォワードプライマF3およびF4は比較的縮重の少ないN末端7番目から13番目のアミノ酸配列をもとに作製した。一方、リバースプライマーR1およびR2はイトマキヒトデPLA₂のC末端132番目から137番目のアミノ酸配列をもとに作製し、R3およびR4は比較的縮重の少ないC末端125番目から130番目および105番目から112番目のアミノ酸配列をもとに作製した。これらのプライマーを使用してPCR反応を行った。反応終了後、反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供した。その結果をFig. 32に示すが、F1-R1、F1-R2、F2-R1、F2-R2、F3-R1、F3-R2、F4-R1およびF4-R2のプライマーの組合わせにおいて約400 bp付近にcDNAの増幅が確認された。増幅されたcDNAはフェノールクロロホルム処理およびエタノール沈澱を行い、精製した。得られたcDNAはT4 DNAポリメラーゼ (4 U、TaKaRa) を用いて末端の平滑化を行った。そのcDNAはフェノールクロロホルム処理

F1: 5'-ATG-TCT(CAG)-GTT(CAG)-TAT(C)-CAA(G)-TTT(C)-GG-3'
 F2: 5'-ATG-AGT(C)-GTT(CAG)-TAT(C)-CAA(G)-TTT(C)-GG-3'
 F3: 5'-AAA(G)-TTT(C)-ATT(CA)-TCT(CAG)-TGT(C)-TAT(C)-GG-3'
 F4: 5'-AAA(G)-TTT(C)-ATT(CA)-TGT(CAG)-TGT(C)-TAT(C)-GG-3'

 R1: 5'-AA(G)C-AT(CAG)G-AA(G)T-CT(C)T-TA(G)T-CA(G)T-A-3'
 R2: 5'-AA(G)C-AA(G)C-TA(G)T-CT(C)T-TA(G)T-CA(G)T-A-3'
 R3: 5'-T-CA(G)T-AT(CAG)G-CT(C)T-GA(G)T-TA(G)T-A-3'
 R4: 5'-CG(T)A(G)-CAT(C)-TCA(G)-CAC-ATT(C)-TC-3'

Fig. 31. Oligonucleotide primers used for the amplification of DNAs by PCR.
 The primers were designed based on the amino acid sequence of the starfish PLA₂ protein. F1-4, forward primers synthesized based on N-terminal amino acid sequence of the starfish PLA₂ protein; R1-4, reverse primers synthesized based on C-terminal amino acid sequence of the starfish PLA₂ protein.

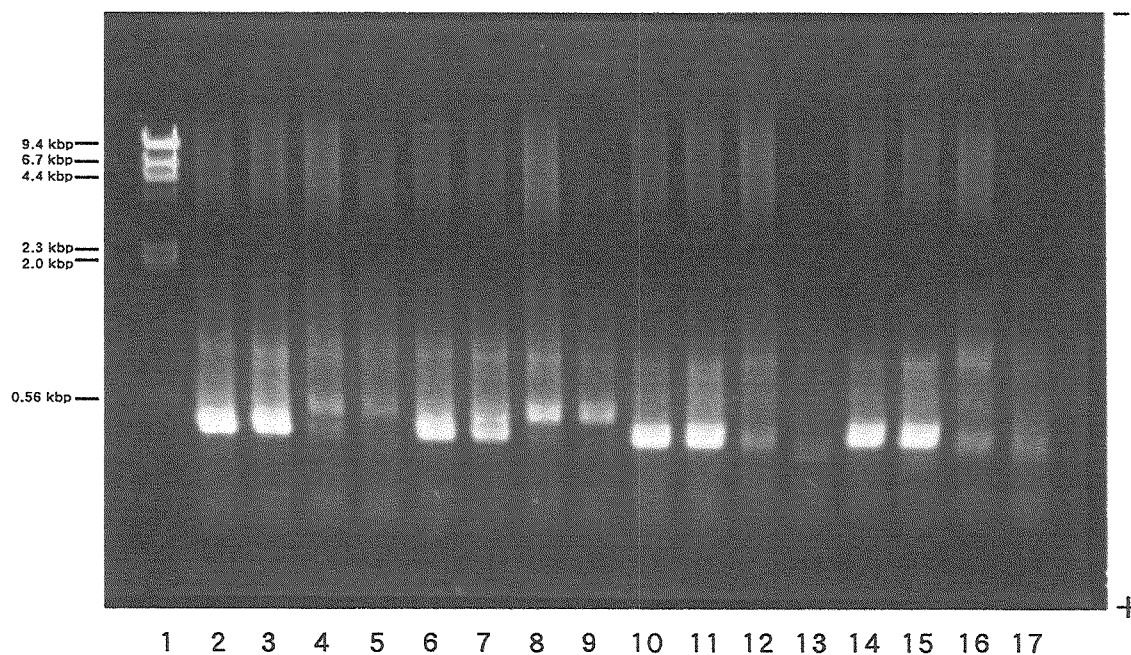


Fig. 32. Agarose gel electrophoresis of PCR products.

PCR products were amplified with various sets of mixed oligonucleotide primers (Fig. 31).

Lane 1, marker (λ Hind III digests); Lane 2, F1-R1; Lane 3, F1-R2; Lane 4, F1-R3; Lane 5, F1-R4; Lane 6, F2-R1; Lane 7, F2-R2; Lane 8, F2-R3; Lane 9, F2-R4; Lane 10, F3-R1; Lane 11, F3-R2; Lane 12, F3-R3; Lane 13, F3-R4; Lane 14, F4-R1; Lane 15, F4-R2; Lane 16, F4-R3; Lane 17, F4-R4.

とエタノール沈澱により精製した。次いで、cDNAの5'末端をT4キナーゼ（3 U、TaKaRa）を用いて37℃で20分間リン酸化させた後、生成物はアガロースゲル電気泳動に供した（Fig. 33）。泳動後のゲルから目的のcDNAを切り取ってゲル断片から回収し、エタノール沈澱を行なった（Fig. 34）。

1.3 ベクターDNAへの目的cDNAのライゲーション

ベクターDNAとして用いるpBluescript II KS(+)を制限酵素Sma Iで消化した後、その5'末端をアルカリホスファターゼ（20 U/molベクターDNA、TaKaRa）で脱リン酸化した。脱リン酸化pBluescript II KS(+)は、フェノール-クロロホルム処理およびエタノール沈澱により精製した後、5'末端リン酸化cDNAとライゲーション反応を行った。

1.4 大腸菌の形質転換およびベクターDNAの回収

このライゲーション反応液をコンピテントセル100 μ lに加えて形質転換した後、これをアンピシリンを含むL-agar培地にスプレッターで塗布した。37℃で一夜培養した結果、約50コロニーが認められ、それらのうち約8割が白色であった。次いで、組換えプラスミドDNAはアルカリ法により大腸菌から回収した。すなわち、白色のコロニー13個を釣菌してアンピシリンを含む3 mlのLB培地に植菌し、37℃で一夜振とう培養した。培養液を遠心分離して、得られた菌体をTE緩衝液に懸濁した。懸濁液に1% SDS-0.2 N NaOH溶液を加えて溶菌し、3 M酢酸-20%フェノール溶液を加えて攪拌した後、遠心分離した。得られた上澄みにイソプロパノールを加え、生じたDNAの沈澱をのTE緩衝液に溶解し、RNase A処理を行った。次いで、フェノール-クロロホルム処理およびエタノール沈澱を行い、痕跡程度の組換えDNAを得たので、TE緩衝液に溶解した。このプラスミドDNAのサイズをBam HI制限消化とアガロースゲル電気泳動により分析した。その結果、Fig. 35に示すように2つのcDNAを除き、プラスミドとcDNA塩基長の和であ

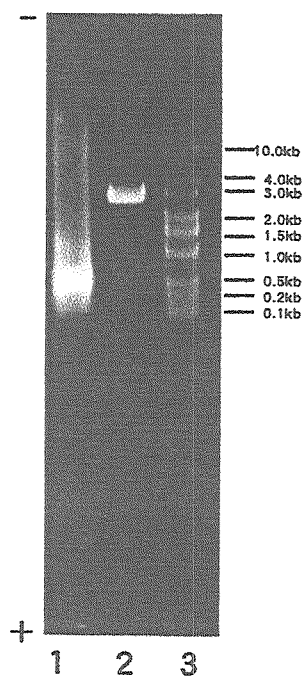


Fig. 33. Agarose gel electrophoresis of blunted and phospholylated PCR product.

PCR product amplified with a set of primers (F1-R1) was blunted using T4-DNA polymerase and phospholylated at the 5'-end using T4-polynucleotide kinase. Lane 1, blunted and phospholylated PCR product; Lane 2, pBluescript II KS (+); Lane 3, marker (Hi-Lo DNA Marker).

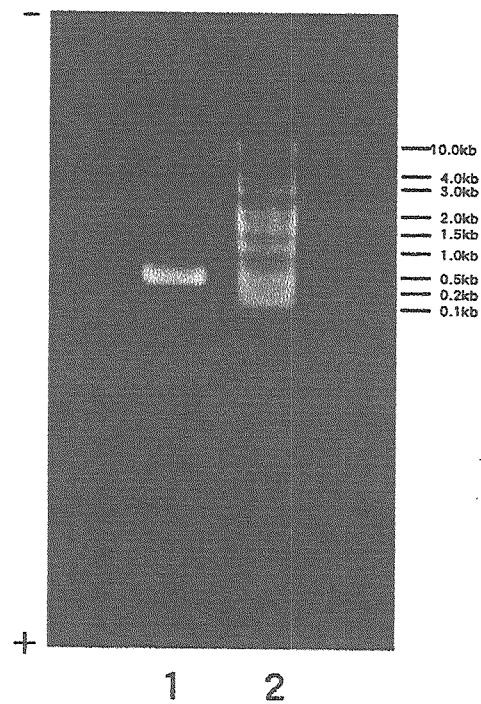


Fig. 34. Agarose gel electrophoresis of purified PCR product.
Blunted and phospholigated PCR product was purified by dessecting and extracting from the agarose gel (Fig. 33). Lane 1, purified PCR product; Lane 2, marker (Hi-Lo DNA Marker).

る約3,400 bp付近に濃いバンドが検出された。

1.5 組換えベクターDNAの塩基配列分析

上述のクローンのcDNAの塩基配列をDNAシーケンサーにより分析した。その結果、Fig. 36に示すように9つのcDNAクローン（これらDNAをcDNAクローン1-9とする）について塩基配列が得られた。cDNAクローン1-9はいずれも415 bpから構成されており、1-414番目の塩基配列部分が翻訳領域であった。翻訳領域からは、プライマーにより付加された翻訳開始コドン「ATG」に由来するN末端のMetを含めて、138アミノ酸残基が演繹された。演繹されたアミノ酸配列をFig. 37に示すが、cDNAクローン1から演繹されたアミノ酸配列は、イトマキヒトデPLA₂のタンパク質から決定したアミノ酸配列と完全に一致し、先の未決定部分が明確になった。しかし、cDNAクローン2-4およびcDNAクローン5から演繹されたアミノ酸配列は、PLA₂ タンパク質のアミノ酸配列と比較して、それぞれ1残基（N末端から35番目）および2残基（N末端から35番目および43番目）の置換が認められた。そこで、タンパク質で明らかにされた配列を持つクローンをPLA₂ アイソフォーム1、1残基置換されたクローンをPLA₂ アイソフォーム2、2残基置換されたクローンをPLA₂ アイソフォーム3とした。また、cDNAクローン6-9から演繹されたアミノ酸配列（それぞれ、PLA₂ アイソフォーム4とする）は、PLA₂ 1のアミノ酸配列と比較して12残基（N末端から32、35、55、57、65、71、80、81、87、113、116および120番目）の置換が認められた。

以上のように、本章においてイトマキヒトデPLA₂のcDNAクローニングを試みた結果、9つのクローンを得ることができ、それらから4種類のアミノ酸配列が演繹された。そのうちcDNAクローン1から演繹されたアミノ酸配列は、タンパク質の分析から検討したアミノ酸配列と一致した。

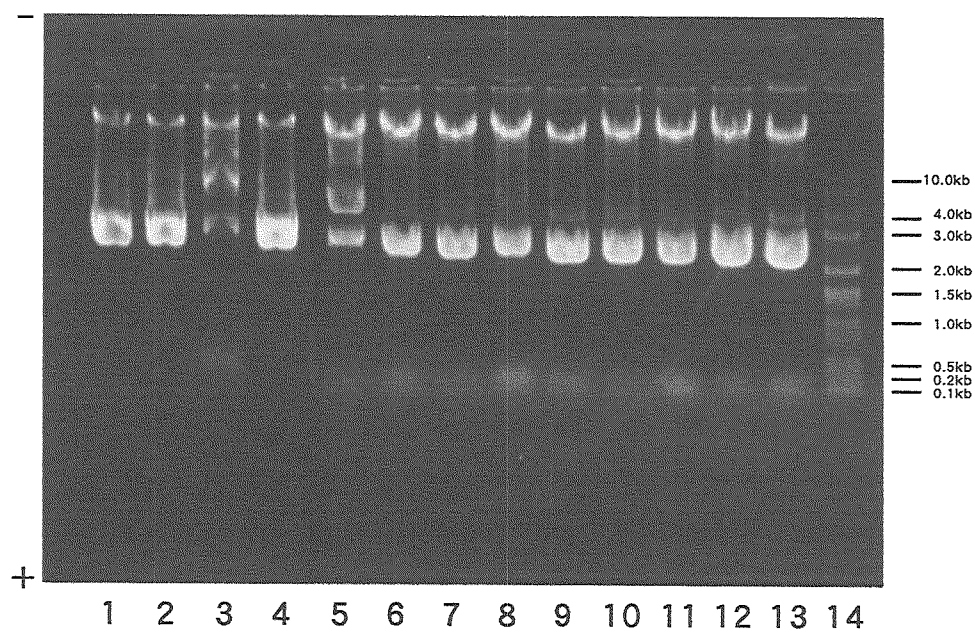


Fig. 35. Agarose gel electrophoresis of recombinant vector plasmids.
Lane 1-13, recombinant vector plasmids; Lane 14, marker (Hi-Lo DNA Marker).

	10	20	30	40	50	60	70
cDNA clone 1	ATGTCAGTTTACCAGTTCGGCAAGTTCATTTCTGTGCTATGGTGGTGCTGGGTTTTTCGATGGGTGGACTACAACGGC						
cDNA clone 2	ATGTCAGTTTACCAGTTCGGCAAGTTCATTTCTGTGCTATGGGCGGTGCGGGTTTTTCGATGGGTGGACTACAACGGC						
cDNA clone 3	ATGTCAGTTTACCAGTTCGGCAAGTTCATTTCTGTGCTATGGGCGGTGCGGGTTTTTCGATGGGTGGACTACAACGGC						
cDNA clone 4	ATGTCAGTTTACCAGTTCGGCAAGTTCATTTCTGTGCTATGGGCGGTGCGGGTTTTTCGATGGGTGGACTACAACGGC						
cDNA clone 5	ATGTCAGTTTACCAGTTCGGCAAGTTCATTTCTGTGCTATGGGCGGTGCGGGTTTTTCGATGGGTGGACTACAACGGC						
cDNA clone 6	ATGTCAGTTTACCAGTTCGGCAAGTTCATTTCTGTGCTATGGTGGTGCTGGGTTTTTCGATGGGTGGACTACAACGGC						
cDNA clone 7	ATGTCAGTTTACCAGTTCGGCAAGTTCATTTCTGTGCTATGGTGGTGCTGGGTTTTTCGATGGGTGGACTACAACGGC						
cDNA clone 8	ATGTCAGTTTACCAGTTCGGCAAGTTCATTTCTGTGCTATGGTGGTGCTGGGTTTTTCGATGGGTGGACTACAACGGC						
cDNA clone 9	ATGTCAGTTTACCAGTTCGGCAAGTTCATTTCTGTGCTATGGTGGTGCTGGGTTTTTCGATGGGTGGACTACAACGGC						

80	90	100	110	120	130	140	150	160
TATGGGTGTTACTGCGGCTACGGAGGCCAAGGAACACCGTTGGATGACACCGACAGATGCTGTCTAGTGACGATAACTGTTAC								
TATGGGTGTTACTGCGGCTACGGAGGCCAAGGAACACCGTTGGATGACACCGACAGATGCTGTCTAGTGACGATAACTGTTAC								
TATGGGTGTTACTGCGGCTACGGAGGCCAAGGAACACCGTTGGATGACACCGACAGATGCTGTCTAGTGACGATAACTGTTAC								
TATGGGTGTTACTGCGGCTACGGAGGCCAAGGAACACCGTTGGATGACACCGACAGATGCTGTCTAGTGACGATAACTGTTAC								
TATGGGTGTTACTGCGGCTACGGAGGCCAAGGAACACCGTTGGATGACACCGACAGATGCTGTCTAGTGACGATAACTGTTAC								
TATGGGTGTTACTGCGGCTACGGAGGCCAAGGAACACCGTTGGATGACACCGACAGATGCTGTCTAGTGACGATAACTGTTAC								
TATGGGTGTTACTGCGGCTACGGAGGCCAAGGAACACCGTTGGATGACACCGACAGATGCTGTCTAGTGACGATAACTGTTAC								
TATGGGTGTTACTGCGGCTACGGAGGCCAAGGAACACCGTTGGATGACACCGACAGATGCTGTCTAGTGACGATAACTGTTAC								

170	180	190	200	210	220	230	240
GGCAAAGCTACCGCGGAGGCCGACTGCGGTTCTTGGGACCCCTACATCATAGTTTACGACTATGAACAAACCACTGATGCGTCT							
GGCAAAGCTACCGCGGAGGCCGACTGCGGTTCTTGGGACCCCTACATCATAGTTTACGACTATGAACAAACCACTGATGCGTCT							
GGCAAAGCTACCGCGGAGGCCGACTGCGGTTCTTGGGACCCCTACATCATAGTTTACGACTATGAACAAACCACTGATGCGTCT							
GGCAAAGCTACCGCGGAGGCCGACTGCGGTTCTTGGGACCCCTACATCATAGTTTACGACTATGAACAAACCACTGATGCGTCT							
GGCAAAGCTACCGCGGAGGCCGACTGCGGTTCTTGGGACCCCTACATCATAGTTTACGACTATGAACAAACCACTGATGCGTCT							
GGCAGAGCTGCCGCGGAGGCCGACTGCGGTTCTTGGGACCCCTACATCATAGTTTACGACTATGAACAAACCACTGATGCGTCT							
GGCAGAGCTGCCGCGGAGGCCGACTGCGGTTCTTGGGACCCCTACATCATAGTTTACGACTATGAACAAACCACTGATGCGTCT							
GGCAGAGCTGCCGCGGAGGCCGACTGCGGTTCTTGGGACCCCTACATCATAGTTTACGACTATGAACAAACCACTGATGCGTCT							
GGCAGAGCTGCCGCGGAGGCCGACTGCGGTTCTTGGGACCCCTACATCATAGTTTACGACTATGAACAAACCACTGATGCGTCT							

250 260 270 280 290 300 310 320 330
 GGAAACTGTGTCATCAAATGCAAGAAAGCGGCCGACTATTCTTGGTATTCTACCAATCCCGAATGCAGAGAGTTCATGTGCGAA
 GGAAACTGTGTCATCAAATGCAAGAAAGCGGCCGACTATTCTTGGTATTCTACCAATCCCGAATGCAGAGAGTTCATGTGCGAA
 GGAAACTGTGTCATCAAATGCAAGAAAGCGGCCGACTATTCTTGGTATTCTACCAATCCCGAATGCAGAGAGTTCATGTGCGAA
 GGAAACTGTGTCATCAAATGCAAGAAAGCGGCCGACTATTCTTGGTATTCTACCAATCCCGAATGCAGAGAGTTCATGTGCGAA
 GGAAACTGTGTCATCAAATGCAAGAAAGCGGCCGACTATTCTTGGTATTCTACCAATCCCGAATGCAGAGAGTTCATGTGCGAA
 GGAAACTGTGTCATCAAATGCAAGAAAGCGGCCGACTATTCTTGGTATTCTACCAATCCCGAATGCAGAGAGTTCATGTGCGAA
 GGAAACTGTGTCATCAAATGCAAGAAAGCGGCCGACTATTCTTGGTATTCTACCAATCCCGAATGCAGAGAGTTCATGTGCGAA
 GGAAACTGTGTCATCAAATGCAAGAAAGCGGCCGACTATTCTTGGTATTCTACCAATCCCGAATGCAGAGAGTTCATGTGCGAA
 GGAAACTGTGTCATCAAATGCAAGAAAGCGGCCGACTATTCTTGGTATTCTACCAATCCCGAATGCAGAGAGTTCATGTGCGAA

340 350 360 370 380 390 400 410
 TGTGACCGCGCGGGGGCGCAGTGCTTCGCTGAAAAGCGCCCAACGTACAACCAAGCTTACGAGTCATACGACAAGGATTTCATGCT
 TGTGACCGCGCGGGGGCGCAGTGCTTCGCTGAAAAGCGCCCAACGTACAACCAAGCTTACGAGTCCTATGACAAAGATTTCCTGCT
 TGTGACCGCGCGGGGGCGCAGTGCTTCGCTGAAAAGCGCCCAACGTACAACCAAGCTTACGAGTCCTATGACAAAGATTTCCTGCT
 TGTGACCGCGCGGGGGCGCAGTGCTTCGCTGAAAAGCGCCCAACGTACAACCAAGCTTACGAGTCATACGACAAGGATTTCATGCT
 TGTGACCGCGCGGGGGCGCAGTGCTTCGCTGAAAAGCGCCCAACGTACAACCAAGCTTACGAGTCCTATGACAAAGATTTCCTGCT
 TGTGACCGCGAGGGGGCGAAGTGCTTCGCTGACAAGCGCCCAACGTACAACCAAGCTTACGAGTCCTACGACAAGATTTCCTGCT
 TGTGACCGCGAGGGGGCGAAGTGCTTCGCTGACAAGCGCCCAACGTACAACCAAGCTTACGAGTCCTACGACAAGATTTCATGCT
 TGTGACCGCGAGGGGGCGAAGTGCTTCGCTGACAAGCGCCCAACGTACAACCAAGCTTACGAGTCCTATGACAAAGATTTCCTGCT
 TGTGACCGCGAGGGGGCGAAGTGCTTCGCTGACAAGCGCCCAACGTACAACCAAGCTTACGAGTCCTACGACAAGATTTCATGCT

Fig. 36. Nucleotide sequences of the starfish PLA₂s (cDNA clone 1-9).

Annealing sites of PCR-primers are underlined. Nucleotides different from those of the cDNA clone 1 are shaded.

	10	20	30	40	50	60
APLA ₂ (protein)	SVYQFGKFISCYGGAGFFDGLDYNGYGCYCGYGGKGTPLDDTDRCCLVHDNCYGKATAEADC					
PLA ₂ isoform 1	MSVYQFGKFISCYGGAGFFDGLDYNGYGCYCGYGGKGTPLDDTDRCCLVHDNCYGKATAEADC					
PLA ₂ isoform 2	MSVYQFGKFISCYGGAGFFDGLDYNGYGCYCGYGGGOGTPLDDTDRCCLVHDNCYGKATAEADC					
PLA ₂ isoform 3	MSVYQFGKFISCYGGAGFFDGLDYNGYGCYCGYGGGOGTPLDDTNRCCLVHDNCYGKATAEADC					
PLA ₂ isoform 4	MSVYQFGKFISCYGGAGFFDGLDYNGYGCYCGLGGOGTPLDDTDRCCLVHDNCYGRAAAEADC					

70	80	90	100	110	120	130
GSWDPYIIIVDYEQTTDASGNCVIKCKKAADYSWYSTNPECFMCECDRAGAQCFAEKRPTYNQAYESYDKDSC						
GSWDPYIIIVDYEQTTDASGNCVIKCKKAADYSWYSTNPECFMCECDRAGAQCFAEKRPTYNQAYESYDKDSC						
GSWDPYIIIVDYEQTTDASGNCVIKCKKAADYSWYSTNPECFMCECDRAGAQCFAEKRPTYNQAYESYDKDSC						
GSWDPYIIIVDYEQTTDASGNCVIKCKKAADYSWYSTNPECFMCECDREGAKCFADKRPTYNQAYESYDKDSC						

Fig. 37. Deduced amino acid sequences of the starfish PLA₂ cDNAs (cDNA1-9).

The single-letter amino acid code is used. Amino acid residues different from those of the starfish PLA₂ protein (APLA₂) are shaded.

2. イトマキヒトデPLA₂と他生物由来PLA₂のアミノ酸配列の比較

イトマキヒトデPLA₂のアミノ酸配列を、すでに配列が明らかにされているブタ膵臓由来PLA₂ (グループ I B) ⁵⁶⁾、コブラ科ヘビ (*Naja naja atra*) 毒由来PLA₂ (グループ I A) ⁵⁵⁾、マムシ科ヘビ (*Crotalus atrox*) 毒由来PLA₂ (グループ II A) ⁵⁸⁾、クサリヘビ科ヘビ (*Bitis gabonica*) 毒由来PLA₂ (グループ II B) ⁵⁸⁾およびラット脳由来PLA₂ (グループ II C) ⁵⁹⁾と同一アミノ酸残基の位置が最も良く合うように配列した (Fig. 38)。ブタ、コブラ、マムシ、クサリヘビおよびラットPLA₂はそれぞれ124、120、122、118および130アミノ酸残基から構成されている。一方、イトマキヒトデPLA₂は137アミノ酸残基から成り、その分子量 (15,300) は他5種のPLA₂のそれら (13,000-14,500) と比べてわずかに大きかった。また、イトマキヒトデと他種のPLA₂間で重複する部分について同一アミノ酸残基の数から配列相同性を算出した。その結果、イトマキヒトデPLA₂とブタ、コブラ、マムシ、クサリヘビおよびラットのPLA₂との配列相同性は、それぞれ47 %、48 %、47 %、47 %および36 %であった。

Fig. 38に示したように、イトマキヒトデPLA₂はCys11およびpancreaticループ様配列を有することからグループ I PLA₂に分類され、また、Ca²⁺結合および触媒作用に参与するアミノ酸残基を完全に保存していた。しかしながら、イトマキヒトデPLA₂はpancreaticループに相当する部位に2残基のアミノ酸の欠損とβ-ウィングに相当する部位に16残基の挿入および3残基の欠損を有しており、哺乳動物膵臓およびヘビ毒PLA₂とは明らかに異なる特異な配列を有することが明らかになった。

また、イトマキヒトデPLA₂のアミノ酸組成から算出された等電点は4.25であった。この値は同様に算出した哺乳動物膵臓由来PLA₂の等電点 (ブタ : pI=5.84、ウシ : pI=4.91、イヌ : pI=6.80、ラット : pI=6.80、ヒト : pI=7.25) と比較して低かった (Fig. 39)。

	1	10	20	30	40	50	
Starfish	SVYQ	F	GKFIS	CGGAGFFDGLDYNGY	GCYCGYGGKGTPLDD	TDRCCLVHD	-NCY
Snake(I A)	NLYQ	F	KNMIQ	C-TVP-SRSWDFADY	GCYCGRGGSGTPVDD	LDRCCQVHD	-NCY
Porcine(I B)	ALWQ	F	FRSMIK	C-AIPGSHPLMDFNNY	GCYCGLGSGTPVDEL	DRCCETHD	-NCY
Snake(II A)	SLVQ	F	ETLIM	-KIAGRSGLLW-YSAY	GCYCGWGGHGLPQDAT	DRCCFVHDC	-CY
Snake(II B)	DLTQ	F	GNMIN	--KMGQS--VFDYIYY	GCYCGWGGKGPIDAT	DRCCFVHDC	-CY
Rat(II C)	SFWQ	F	QRMVK	-HITGRSAFFS-YYGY	GCYCGLGGRGIPVDAT	DRCCWAHDC	-CY
				Ca ²⁺ -binding loop		active site	

	60	62 +1	66 +1	70	80	84 +1	84 +2	84 +3	90	100
Starfish	GKATAEADC	-GSWD	-PYIIVYDYEQT	TDASGNC	---	VIKCKKAADYSW	-YSTN			
Snake(I A)	NEAEKISGC	---	W	-PYFKTYSYE	-----	CSQGLTLC	-----	KGGN		
Porcine(I B)	RDAKNLD	SCKFLVDN	PYTESYSYS	-----	CSNTEITC	-----	NSKN			
Snake(II A)	GKAT	---	DC	-----	NPKTVSYTYSE	-----	ENGEIIC	-----	GGDD	
Snake(II B)	GKMG	T-----	YD	-TKWTSYNYEI	-----	QNGGIDC	-----	DED		
Rat(II C)	HKLKEYG	-C-----	Q	PILNAYQFAI	-----	VNGTVTC	-----	GCTMGG		
	elapid and pancreatic loop				β-wing					

	110	120	130	
Starfish	P-ECREFMCECDRAGAQCF	AEKRPTYNQAYESYD	--KDSC	
Snake(I A)	N-ACAAVCDCLRAAICFA	-GAP-YNNNNYNIDL	-KARCQ	
Porcine(I B)	N-ACEAFICNCDRNAAICFS	-KAP-YNKEHKNLDT	-KKYC	
Snake(II A)	P--CGTQICECDKAAAICFRD	NIPSYDNKYWLFPP	-KD-CREEPEPC	
Snake(II B)	P-Q-KKELCECDRVAAICFANN	RNTYNSNYFGHSSSK	--CTGTEQ-C	
Rat(II C)	GCLCGQKACECDKLSVYCF	KENLATYEKTFKQLFP	TRPQGRDKLHC	

Fig. 38. Comparison of amino acid sequences of PLA₂s.

Residues identical in all the PLA₂s are boxed. The single-letter amino acid code is used. Dashes indicate deletions introduced for maximizing the sequence similarity. The location of the active site, Ca²⁺-binding loop, elapid and pancreatic loop, and β -wing region are shown with solid bars based on the crystallographic studies of bovine pancreatic and *Crotalus atrox* venom PLA₂s^{16, 54}. The positions of deleted amino acids in pancreatic loop and β -wing regions of the starfish PLA₂s are represented as 62(+1), 66(+1), 84(+1), 84(+2), and 84(+3). Starfish, *A. pectinifera* PLA₂ (present paper); Snake (I A), *Naja naja atra* venom PLA₂⁵⁴; Porcine (I B), porcine pancreatic PLA₂⁵⁵; Snake (II A), *C. atrox* venom PLA₂⁵⁶; Snake (II B), *Bitis gabonica* venom PLA₂⁵⁷; Rat (II C), Rat brain PLA₂⁵⁸.

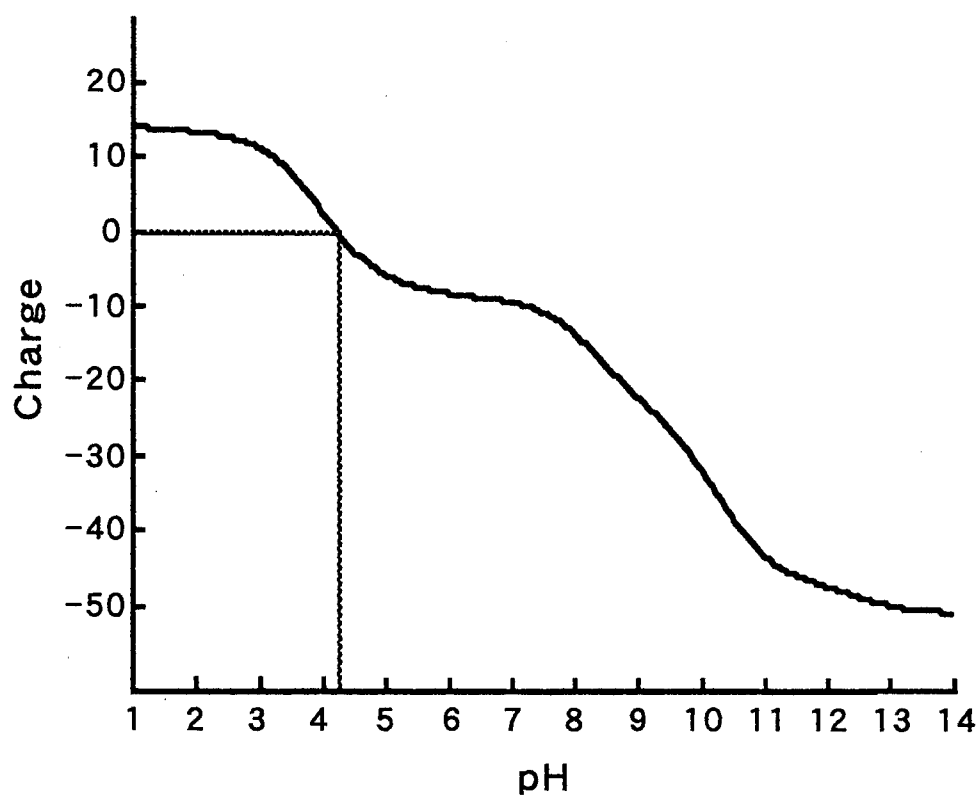


Fig. 39. Isoelectric point of the starfish PLA₂.
Isoelectric point was calculated by using DNASIS program.

第4項 小括

1. イトマキヒトデPLA₂のcDNAクローニング

本章においてイトマキヒトデPLA₂のcDNAクローニングを行った。その結果、9つのクローン、すなわちcDNAクローン1-9を得ることができた。それらのうちのcDNAクローン1の演繹配列から第3章においてタンパク質から分析したアミノ酸配列の不明部分が明らかになるとともに、その全配列がcDNAクローン1と同一の配列であることが分かった。PLA₂をコードしているcDNAとして、cDNAクローン1の配列から1〜数塩基置換されたクローン（cDNAクローン2-9）も検出されたが、それらから演繹されるアミノ酸配列は3種であった。このことは本PLA₂にアイソザイムが存在することを強く示唆するものである。哺乳動物膵臓PLA₂は膵臓の腺房細胞で前駆体として生合成され、膵液中に分泌された後、トリプシンなどのプロテアーゼによってN末端7残基のペプチド断片が分解除去されることにより活性型となる¹³⁻¹⁶⁾。また、哺乳動物のグループⅠPLA₂は前駆体のN末端に分泌タンパク質に特有のシグナル配列を有するが、グループⅡPLA₂はシグナル配列の直後に成熟タンパク質が位置しており、現在のところ、その活性制御の機構は不明である¹⁵⁾。なお、本研究においては、イトマキヒトデPLA₂の成熟酵素を大腸菌により発現することを目的としているため、クローニングの際にイトマキヒトデPLA₂をコードするcDNAの5'末端に翻訳開始コドンである「ATG」を付加した。そのため、このPLA₂をコードする遺伝子がプレ・プロ配列を有するかどうかは明らかでない。

以上のように、本章においてイトマキヒトデPLA₂タンパク質から決定したアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列をコードするcDNAクローン1が得られた。この成果により、組換えDNA技術を用いたイトマキヒトデPLA₂の大量生産や機能的により優れた変異体の作製および本PLA₂の構造-機能解析が可能となった。

2. イトマキヒトデPLA₂の構造上の特徴

哺乳動物膵臓およびヘビ毒由来PLA₂は活性発現にmMオーダーの濃度のCa²⁺を必要とする¹³⁻¹⁶。これらPLA₂においてCa²⁺はTyr28、Gly30およびGly32の主鎖カルボニル酸素、負電荷を有するAsp49の側鎖そして2分子の水の酸素原子と配位すると考えられている¹⁶。Fig. 40にウシ膵臓由来PLA₂の三次構造図を示すが、Ca²⁺はほぼ直角に配置する2つの α -ヘリックス（ヘリックスBおよびC）をつなぐループ部分に結合する。ループと2つのヘリックス間の立体配置はトロポニンやカルモデュリンなどのCa²⁺結合タンパク質で知られている構造モチーフすなわちEF-ハンド構造と類似の6配位八面体構造をとる（Fig. 41）。ループ内にはCysが2個あり、それぞれがS-S結合を形成しループの配向を安定化している。Ca²⁺結合部位の近傍には触媒基であるHis48がある。Asp99のカルボキシル基は、His48のN-3原子とTyr52およびTyr73の水酸基と水素結合して活性中心水素結合網を形成する。PLA₂の触媒機構については、結晶解析および化学修飾の結果に基づいて、セリンプロテアーゼの触媒機構に似た電荷リレー系による機構が提案されている¹⁴（Fig. 42）。この場合、活性Ser残基の役割を、His48に結合した水分子が演じることになる。触媒機構におけるCa²⁺の役割は正確にはわかっていないが、基質リン酸基の酸素原子に結合して酵素-基質複合体を安定化すると同時に、sn-2位のカルボニル酸素と相互作用してカルボニル基の分極を増大させて求核攻撃を受けやすくすると考えられている。本研究において、イトマキヒトデPLA₂のN末端から26-53番目のアミノ酸残基は、他種PLA₂の対応する領域と高い配列相同性（75 %）を示した（Fig. 38）。哺乳動物膵臓およびヘビ毒PLA₂ではこの領域にCa²⁺結合ループおよび触媒部位含んでいる¹³⁻¹⁶。哺乳動物膵臓およびヘビ毒PLA₂のCa²⁺結合に関与するアミノ酸残基はイトマキヒトデPLA₂において完全に保存されており（Tyr29、Gly31、Gly33およびAsp50）、また、触媒作用に関与するアミノ酸残基も完全に保存されていた（His49、Tyr53、Tyr72およびAsp111）（Fig.

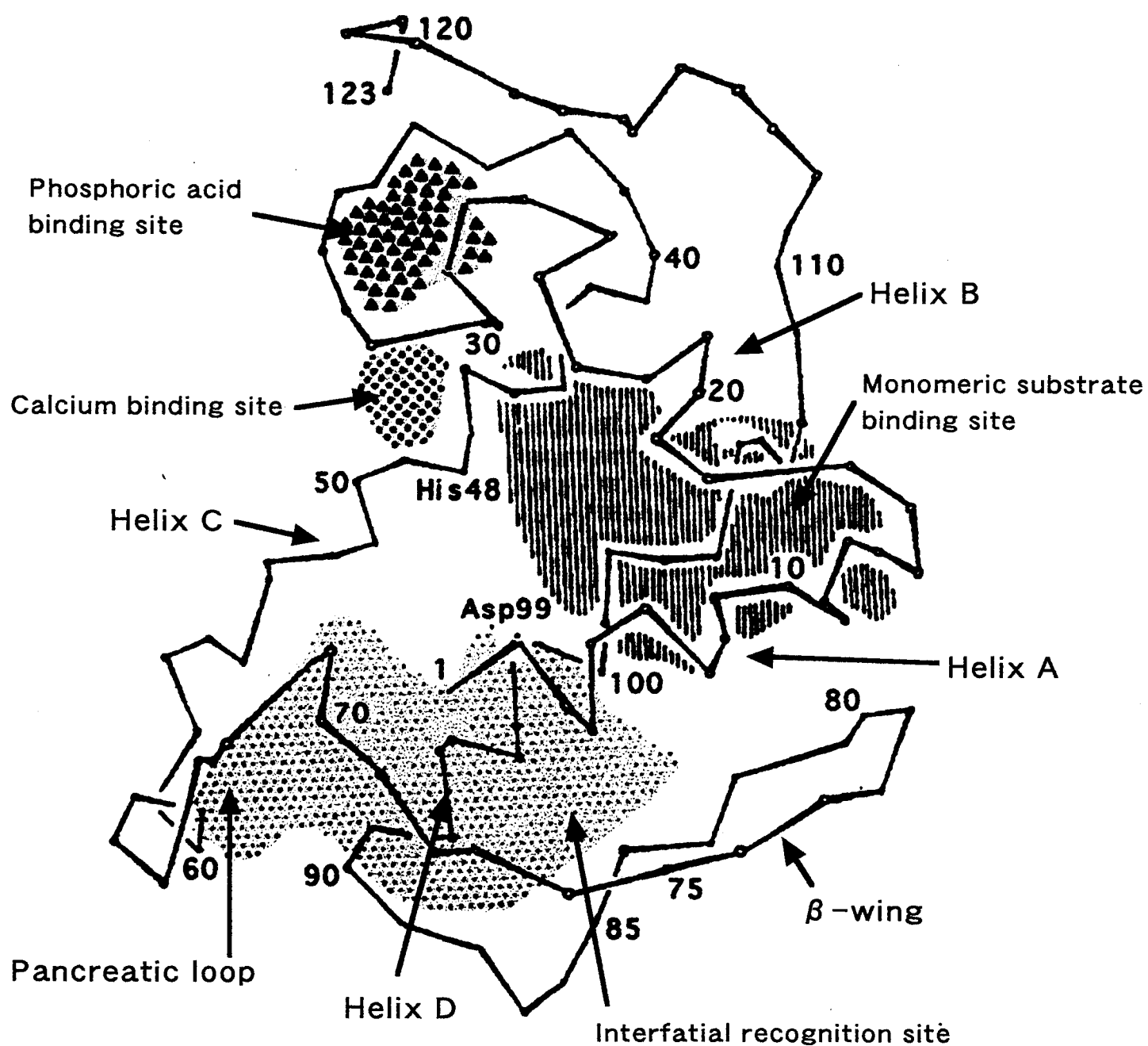


Fig. 40. Ball and stick representation of bovine pancreatic PLA_2^{14} .

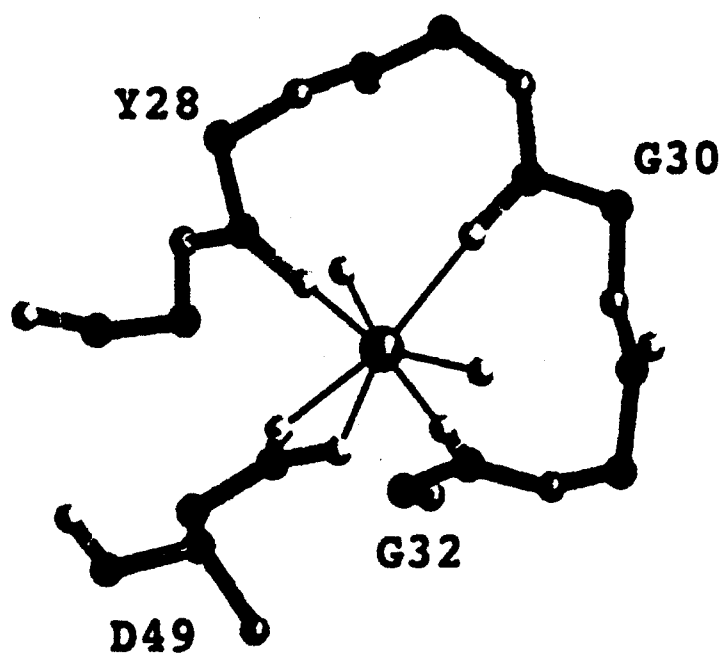


Fig. 41. Ball and stick representation of the calcium binding loop from *N. naja naja* PLA₂¹⁶.
 The hepta coordinated calcium ion at the central position is presented as a larger sphere forming bonds with the carbonyl oxygen atoms of Asp-49, three backbone oxygen atoms and two solvent water molecules.

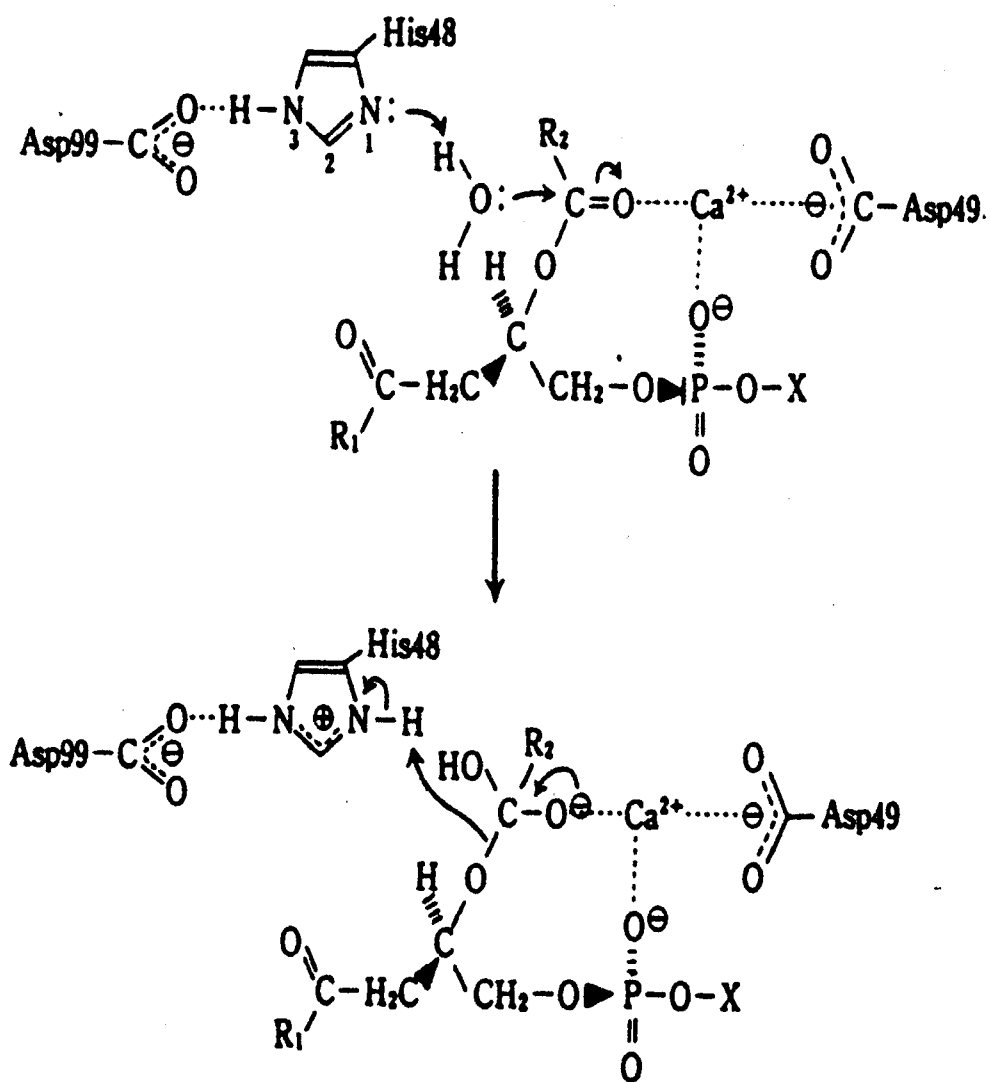


Fig. 42. A proposed catalytic mechanism for PLA_2 ¹³⁾.

38)。これらのことから、イトマキヒトデ PLA_2 の触媒機構は、哺乳動物膵臓およびヘビ毒 PLA_2 のそれらと同様であると考えられた。

哺乳動物膵臓・非膵臓組織およびヘビ毒由来の分泌型 PLA_2 は、S-S結合の様式に基づきグループ I および II に分類される^{16, 21)}。グループ I PLA_2 は、哺乳動物膵臓やコブラ科およびウミヘビ科ヘビ毒中に見い出されており、Cys11を有する。一方、グループ II PLA_2 は、哺乳動物の非膵臓組織やマムシ科およびクサリヘビ科のヘビ毒由来で、グループ I PLA_2 と比較してC末端が数残基長く、Cys11を持たない。また、グループ II PLA_2 と比較して、グループ I PLA_2 ではN末端から53-61番目の領域 (elapidループ) に2-3残基のアミノ酸が挿入されている。さらに、グループ I B PLA_2 (哺乳動物膵臓由来) ではこのelapidループが5残基延長されており、この延長部分は「pancreaticループ」と呼ばれている。本研究のイトマキヒトデ PLA_2 は、Cys11およびpancreaticループ様配列を有することからグループ I PLA_2 に属すると考えられた (Fig. 38)。しかしながら、そのpancreaticループ部位は2残基のアミノ酸が欠損していた。

哺乳動物の膵臓 PLA_2 は、三次構造において約50 %の α -ヘリックスと約10 %の β -シート構造を有し、N末端の74から84番目に存在する短い逆並行の β -シートは一般に「 β -ウィング」と呼ばれている¹⁶⁾ (Fig. 40)。Fig. 38に示したように、イトマキヒトデ PLA_2 は、ブタ膵臓 PLA_2 とのアミノ酸配列の比較において、 β -ウィングに相当する部位に16残基の挿入 (N末端から76-83番目および89-96番目) と3残基の欠損 (N末端から84

(+1) -84 (+3) 番目) を有した。イトマキヒトデ PLA_2 の β -ウィング部位におけるこのような特異な配列は、他のグループ I および II の PLA_2 においても認められなかった。そこで、CLUSTAL Wプログラム⁶⁰⁾を用いて、イトマキヒトデ PLA_2 とグループ I および II PLA_2 のアミノ酸配列より分子系統樹を作成した。Fig. 43に示すように、イトマキヒトデ PLA_2 は、分子系統樹において他のグループ I および II PLA_2 とは別の独立した場所に位置した。また、グループ I および II PLA_2 のN末端から約10残基のアミノ酸は、両親媒性

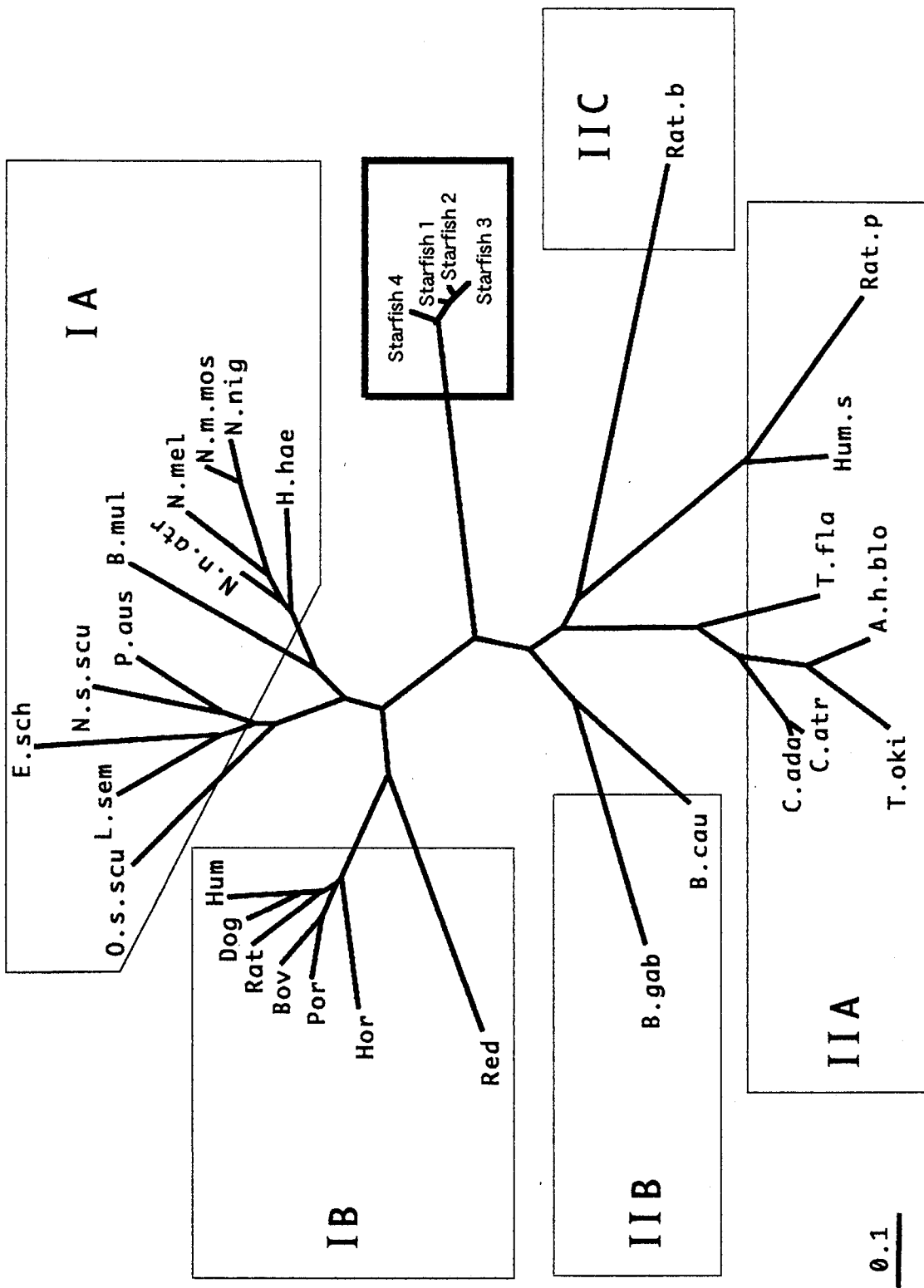


Fig. 43. Radial rootless phylogenetic tree of PLA₂s.

The phylogenetic tree was made using the programs of CLUSTAL W⁶⁰⁾ and TreeView⁶¹⁾. The branch length represents the evolutionary distance between the proteins. PLA₂s belonging to the same group are boxed: group I A (O.s.scu, *Oxyuranus s. scutellatus* venom⁶²⁾; L.sem, *Laticauda semifasciata* venom⁶³⁾; E.sch, *Enhydrina schistosa* venom⁶⁴⁾; N.s.scu, *Notechis scutatus scutatus* venom⁶⁵⁾; P.aus, *Pseudechis australis* venom⁶⁶⁾; B.mul, *Bungarus multicinctus* venom⁶⁷⁾; N.n.atr, *Naja naja atra* venom⁶⁸⁾; N.mel, *Naja melanoleuca* venom⁶⁹⁾; N.m.mos, *Naja mossanbica mossanbica* venom⁷⁰⁾; N.nig, *Naja nigricollis* venom⁷¹⁾; H.hae, *Hemachatus haemachatus* venom⁷²⁾), group I B (Por, porcine pancreas⁷³⁾; Bov, bovine pancreas⁷⁴⁾; Hor, horse pancreas⁷⁵⁾; Hum, human pancreas⁷⁶⁾; Dog, dog pancreas⁷⁷⁾; Rat, rat pancreas⁷⁸⁾; Red, red sea bream hepatopancreas (Accession No. AB009286 in DDBJ)), group II A (C.ada, *Crotalus adamanteus* venom⁷⁹⁾; C.atr, *Crotalus atrox* venom⁸⁰⁾; T.oki, *Trimeresurus okinavensis* venom⁸¹⁾; T.fla, *Trimeresurus flavoviridis* venom⁸²⁾; A.h.blo, *Agkistrodon halys blomhoffii* venom⁸³⁾; Hum.s, human synovial fluid⁸⁴⁾; Rat.p, rat platelet⁸⁵⁾), group II B (B.gab, *Bitis gabonica* venom⁸⁶⁾; B.cau, *Bitis caudalis* venom⁸⁷⁾), and group II C (Rat.b, rat brain⁸⁸⁾). Starfish 1-4, Starfish PLA₂ isoform 1-4 (present study).

の α -ヘリックス構造をとることが報告されている。しかしながら、Fig. 44に示すように、イトマキヒトデPLA₂の二次構造をSOPMAプログラム⁸³⁾によって解析したところ、そのN末端部位は β -構造と予測された。さらに、イトマキヒトデPLA₂の β -ウィング部位は長い α -ヘリックス構造をとることが予測された。これらのことから、イトマキヒトデPLA₂は新たな型のグループ I に属するPLA₂であると考えられた。他の水産動物では、マダイ肝臓PLA₂のcDNAがクローニングされている (Accession No. AB009286 in DDBJ)。そのcDNAから演繹されたアミノ酸配列によると、マダイPLA₂はシグナルおよびプロ配列を有し、またCys11およびpancreaticループを有していることから、グループ I B PLA₂に分類される。マダイPLA₂の一次構造は哺乳動物膵臓PLA₂と類似し、Fig. 43の分子系統樹においても哺乳動物膵臓PLA₂と同じグループに属した。一方、McIntosh et al.⁸⁴⁾は海産の巻貝*Conus magus*の毒からPLA₂を単離した。そのPLA₂は2本のポリペプチド鎖から成り、他種PLA₂との配列相同性が非常に低いことから、グループ IX 型に分類されている。また、Shiomi et al.⁸⁵⁾はオニヒトデ*Acanthaster planci*の毒から2種類のPLA₂を精製し、それらのN末端から62番目までのアミノ酸配列を決定した。オニヒトデPLA₂はCys11およびelapidループを有し、かつ、Cys51を欠くことから、グループ I PLA₂と同定された。しかしながら、pancreaticループおよび β -ウィング部位の配列は決定されていない。従って現在のところ、イトマキヒトデPLA₂は、ヒトデ類や他の海産無脊椎動物の中で唯一の新たな型のグループ I PLA₂である。

ブタ膵臓PLA₂はPCとPEを同様に加水分解するが、イトマキヒトデPLA₂はPEよりもPCを良く加水分解した。哺乳動物膵臓PLA₂の変異体を用いた研究⁸⁶⁻⁸⁸⁾により、ブタ膵臓PLA₂のArg53およびLys62とウシ膵臓PLA₂のLys53およびLys56が、おそらく両イオン性リン脂質の陽イオン性極性基に対して電氣的に反発することにより、PLA₂の極性基特性に影響をおよぼすことが示唆されている。Fig. 38に示したように、本研究のイトマキヒトデPLA₂においては、これらの正に荷電したアミノ酸残基は中性の残基に置換また

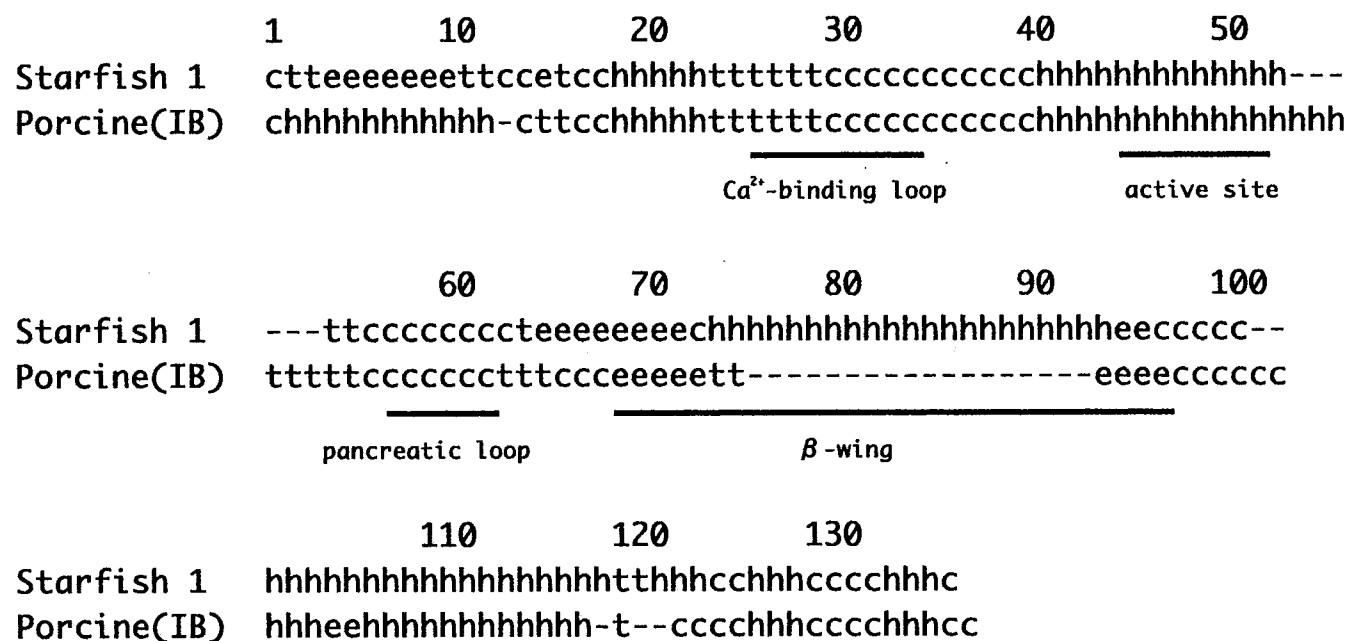


Fig. 44. Predicted secondary structure of the starfish PLA₂.

Secondary structures of the starfish PLA₂ and porcine pancreatic PLA₂ were predicted using SOPMA program⁸³. Dashes indicate deletions introduced for maximizing the structure similarity. The location of the active site, Ca²⁺-binding loop, elapid and pancreatic loop, and β-wing are shown with solid bars based on the crystallographic studies of bovine pancreatic and *Crotalus atrox* venom PLA₂s^{16,54}. Starfish 1, predicted secondary structure of the starfish PLA₂ 1 (present paper); Porcine (I B), predicted secondary structure of porcine pancreatic PLA₂⁵⁰; h, α-helix; e, extended strand; t, β-turn; c, random coil.

は欠損していた (Gly54、Thr57および62 (+1) 番目の欠損)。それゆえ、PEよりもPCをよく加水分解するというイトマキヒトデPLA₂の極性基特異性は、本PLA₂のelapidおよびpancreaticループ領域におけるこのような配列特性に起因する可能性がある。

哺乳動物膵臓およびヘビ毒PLA₂は単分子分散状基質に対しては低い活性しか示さないが、ミセル状や脂質二重層状のような凝集した基質に対しては著しく高い活性を示す¹³⁻¹⁶⁾。この現象は、PLA₂分子が基質-水の界面に吸着することにより活性化されるためと考えられており、PLA₂分子が触媒反応を行う活性部位に加えて、水層と基質凝集体との界面を認識する部位 (界面認識部位) を有することが推測されている (Fig. 40)。同じような現象はリパーゼでも認められており、脂質分解酵素に特有の現象と考えられている⁹⁾。以前のウシ膵臓PLA₂の結晶構造解析⁸⁹⁾から、この界面認識部位はPLA₂分子のN末端およびC末端部分のアミノ酸残基と他の領域のいくつかのアミノ酸残基から成ることが予測された。近年、哺乳動物膵臓PLA₂の変異体を用いた研究により、ブタ膵臓PLA₂のArg6、Lys10およびLys116、ウシ膵臓PLA₂のLys10、Lys56およびLys116およびヒト膵臓PLA₂のArg6、Lys7、Lys10およびLys116が、陰イオン性界面との静電的相互作用に関与することが示唆された⁸⁵⁻⁸⁸⁾。本研究のイトマキヒトデPLA₂では、これらの正に荷電したアミノ酸残基のほとんどは中性または負に荷電した残基に置換していた (Gly6、Ser10、Thr57およびGlu130)。それゆえ、イトマキヒトデPLA₂の界面結合様式は哺乳動物膵臓PLA₂のものとは異なることが推測された。

以上のことから、第2章で明らかになったようなイトマキヒトデPLA₂の極性基特異性は、本PLA₂のpancreaticループ、β-ウィング、および界面認識部位における特異な構造特性に起因することが強く示唆された。

第5章 イトマキヒトデ・ホスホリパーゼA₂の大腸菌による発現

第1項 目的

前章において、イトマキヒトデ幽門盲のうPLA₂のアミノ酸配列をコードするcDNA (cDNAクローン1) を得ることができた。そこで本章では、このcDNAクローン1を用いてイトマキヒトデPLA₂の大腸菌発現系の構築および発現を目的とするとともに、発現酵素の精製と性質の検討を行う。これに成功すれば、今後はイトマキヒトデPLA₂の大量生産や機能的を改変した変異体の作製、PLA₂の構造-機能相関などのタンパク質工学的研究が可能となる⁹¹⁾。

第2項 材料および方法

1. 方法

イトマキヒトデPLA₂の大腸菌による発現の手順の概略はFig. 45に示す。

1.1 発現ベクターおよび宿主大腸菌

(1) 発現ベクター

発現を行うためのベクターDNAとしては、pET-16b (Stratagene) を使用した。

Recombinant pBluescript II KS(+)

PCR

PCR products (cDNA)

digest with *Nco* I and *Bam* H I

ligation into pET-16b

transformation of *E. coli* XL1-Blue

Transformed XL1-Blue

extraction of recombinant plasmid

Recombinant pET-16b

transformation of *E. coli* BL21(DE3)

Transformed BL21(DE3)

induction of expression

Recombinant PLA₂

Fig. 45. Outline of bacterial expression of the starfish PLA₂

pET-16bは5,711 bpから成り、T7プロモーターとT7ターミネーターの間に存在するNco I 部位をクローニング部位としている (Fig. 46)。

(2) 宿主大腸菌

発現用の宿主大腸菌としては、BL21 (DE3) (Stratagene) を使用した。

1.2 大腸菌により発現した酵素の精製およびその性質の分析

大腸菌により発現した酵素の精製およびその性質の分析は、第2章と同様の方法で行った。

第3項 結果

1. イトマキヒトデPLA₂の大腸菌による発現

1.1 発現系の構築

cDNAクローン1の5'末端に翻訳開始コドン"ATG"を含むNco I 部位を、そして、3'末端に翻訳終止コドン"TGA"とBam H I 部位を導入するため、Fig. 47に示すフォワードプライマーおよびリバースプライマーを作製し、それらを用いてPCRを行った。なお、Fig. 48に示すように、cDNA 1の5'末端を翻訳開始コドン「ATG」を含むNco I 部位とするため、「ATG」に続く「T」を「G」に置換した。それに伴い、発現されるPLA₂のN末端アミノ酸は、SerからAlaに置換されると予測される。PCR反応によるcDNAの増幅はアガロースゲル電気泳動により確認した (Fig. 49) 後、増幅cDNAはフェノールクロロホルム処理およびエタノール沈澱により回収した。増幅したcDNAの制限酵素消化はNco I

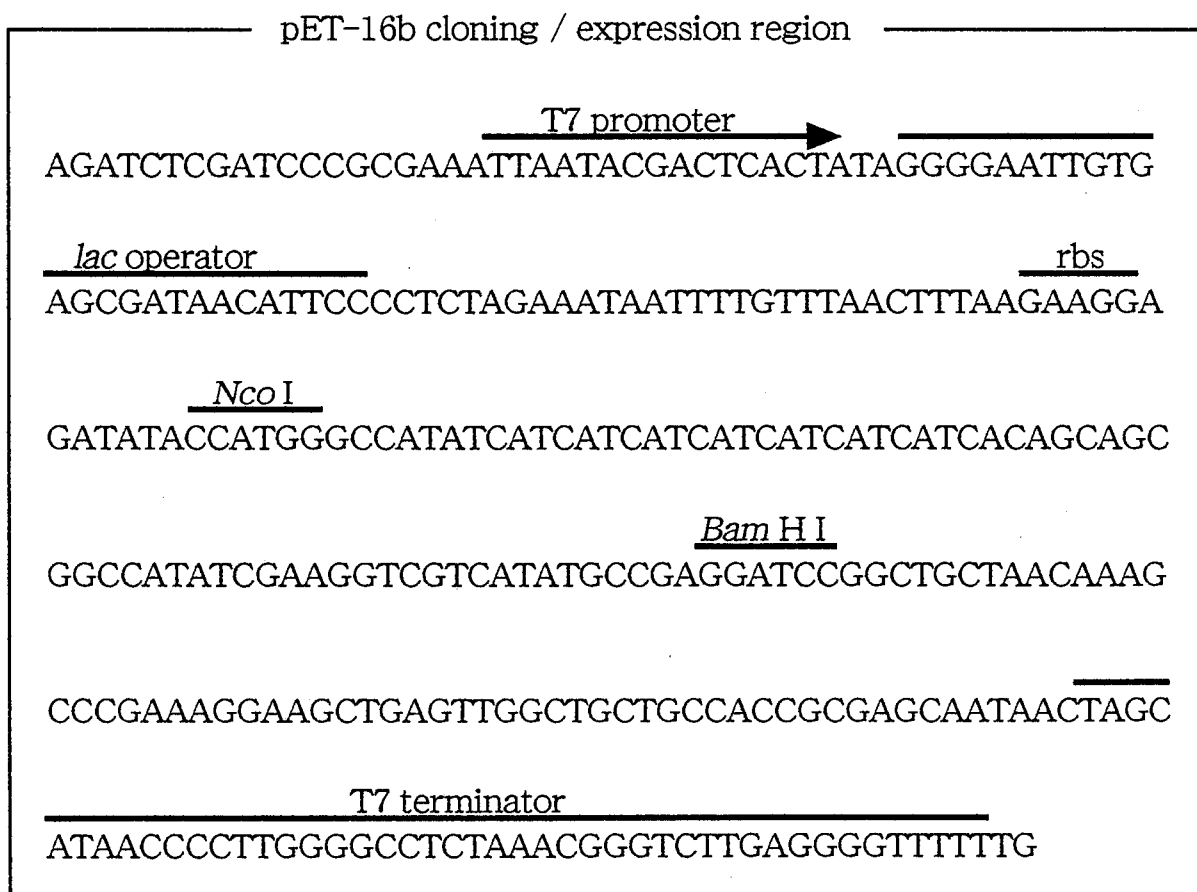
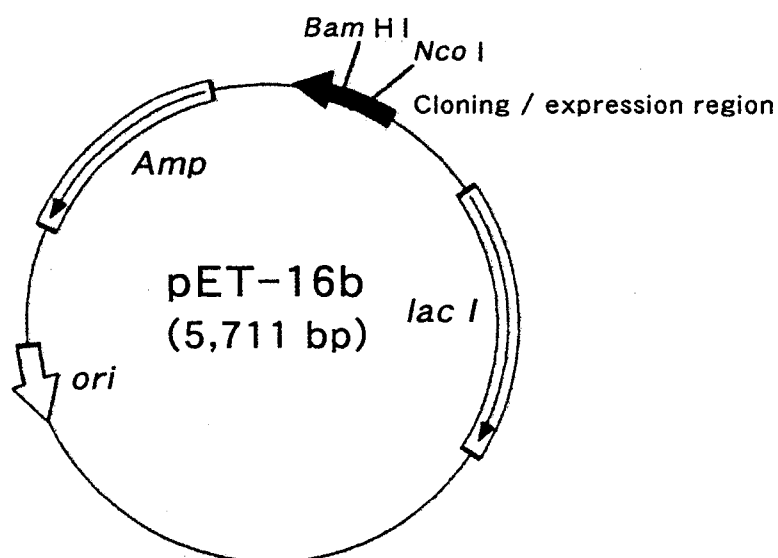


Fig. 46. Circle map of pET-16b DNA.

ori, origin of plasmid replication; *Amp*, ampicillin resistance gene for antibiotic selection of bacteria; *lac I*, gene for repressor protein of *lac* operon; rbs, ribosome binding site.

F: 5'-GCA-GCC-CAT-GGC-AGT-TTA-CCA-G-3'

R: 5'-AGT-GGA-TCC-CTC-AGC-ATG-AAT-C-3'

Fig. 47. Oligonucleotide primers used for the amplification of DNAs by PCR.

F, forward primer synthesized based on 5'-terminal sequence of cDNA clone 1; R, reverse primer synthesized based on 3'-terminal sequence of cDNA clone 1.

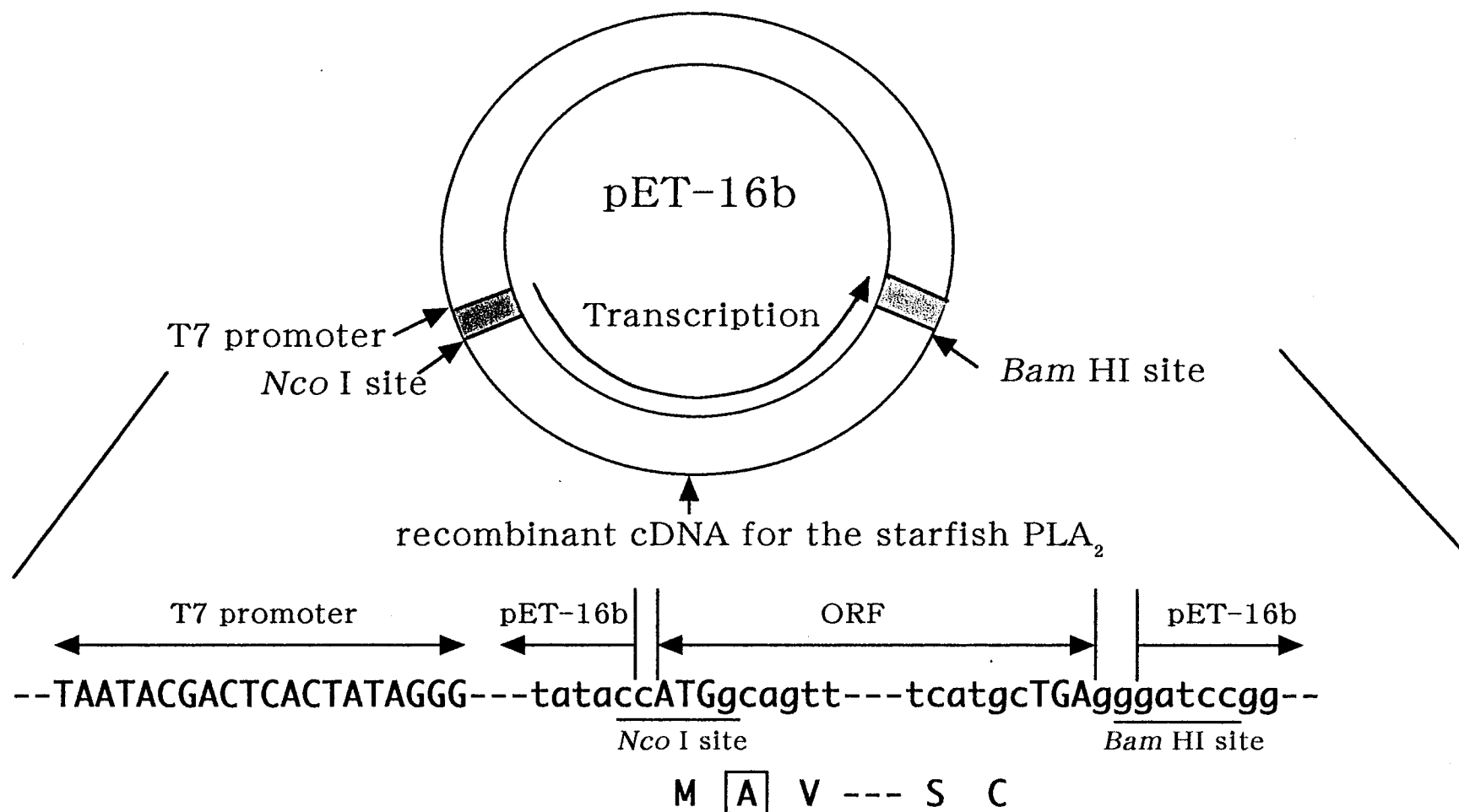


Fig. 48. Structure of recombinant plasmid constructed from AcDNA1 and pET-16b.

Shaded region shows the cloning site of pET-16b. The 5'- and 3'-termini of AcDNA1 are modified and the cDNA was ligated between the *Nco* I and *Bam* HI sites of pET-16b in frame. Transcriptional direction is indicated with a curved arrow. At the bottom of the figure, the nucleotide and deduced amino acid sequences at terminal portions of ORF are shown. Substituted amino acid at the N-terminus of the starfish PLA₂ is boxed.

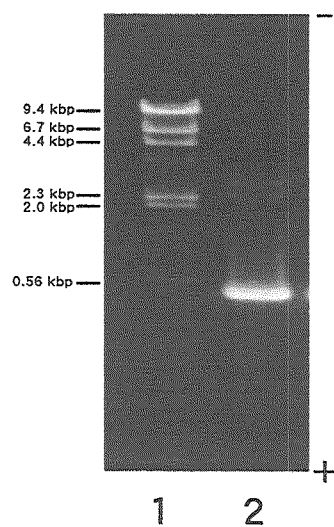


Fig. 49. Agarose gel electrophoresis of PCR product.

PCR product was amplified with a set of primers indicated in Fig. 46. Lane 1, marker (λ Hind III digests); Lane 2, PCR product.

(TaKaRa) および *Bam* H I (TaKaRa) を用いて行った。反応物はアガロースゲル電気泳動に供した。泳動後のゲルから目的の制限酵素消化cDNA部分を切り取り、次いで、cDNAをゲルから抽出し、エタノール沈澱を行った後、アガロースゲル電気泳動で分析し、単一バンドを示すことを確認した (Fig. 50) 。あらかじめ *Nco* I と *Bam* H I で消化しておいたcDNAとpET-16bをDNAライゲーションキット Ver. 2 (TaKaRa) を用いてライゲーションした。これを大腸菌XL1-Blueのコンピテントセルに導入した後、アンピシリンを含むL-agar培地に塗布した。37℃で一夜培養した結果、6つのコロニーが認められた。それらのうち3つのコロニーを釣菌してアンピシリンを含むLB培地にそれぞれ植菌し、培養後、遠心分離により集菌し、プラスミドDNAを抽出した。ベクターDNAにcDNAクローン1が組み込まれていることの確認は *Nco* I および *Bam* H I による消化とアガロースゲル電気泳動により行った。その結果、Fig. 51に示すように約5,700 bp付近にベクターDNA由来のバンドと約500 bp付近にAcDNA1由来のバンドが検出され、このプラスミドがpET-16bとcDNAクローン1の組換え体であることが確認された。

1.2 酵素の発現

大腸菌BL21 (DE3) のコンピテントセルに組換えプラスミドを導入した後、LB培地で培養した。これをアンピシリンを含むL-agar培地にスプレッダーで塗布した。37℃で一夜培養した結果、多くのコロニーが認められた。組換えpET-16bを導入したBL21

(DE3) のシングルコロニーを釣菌してアンピシリンを含むLB培地に植菌し、37℃で4時間振とう培養した。この培養液に終濃度1 mMのIPTGを添加して、さらに培養した。この間、1時間ごとに培養液の一部を分取し、遠心分離して集めた菌体ペレットをSDS-PAGEの試料緩衝液で溶解した後、SDS-PAGEに供した。その結果Fig. 52に示すように、イトマキヒトデPLA₂と同じ移動度を有するタンパク質が発現されていた。その発現量は、IPTG誘導開始2時間後に最大となった (Fig. 52) 。次に、この発現タンパク質が

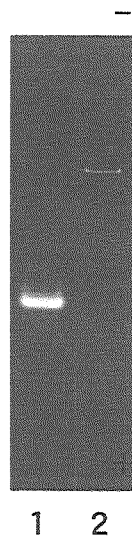


Fig. 50. Agarose gel electrophoresis of purified PCR product.
Digested PCR product purified by dessecting and extracting from the agarose gel (Fig. 49). Lane 1, purified PCR product; Lane 2, pET-16b.

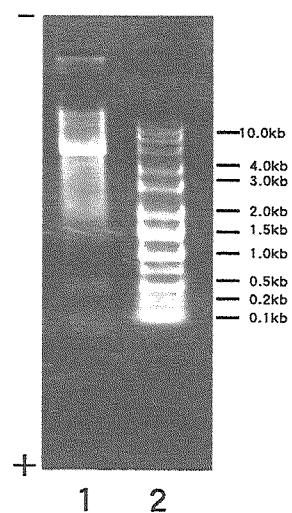


Fig. 51. Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids.
 Lane 1, digests of recombinant pET-16b with *Nco* I and *Bam* H I ;
 Lane 2, marker (Hi-Lo DNA Marker).

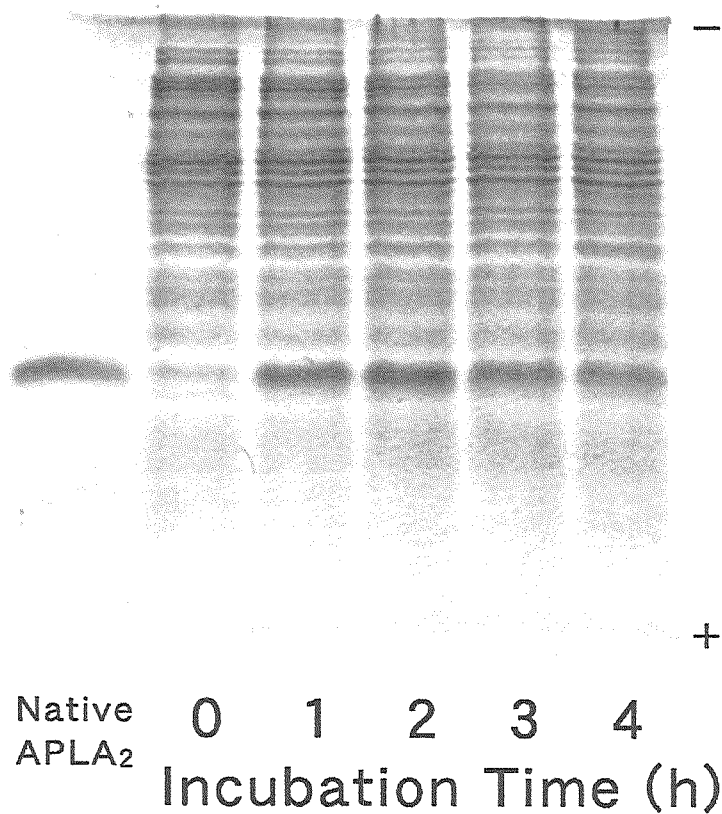


Fig. 52. Overexpression of the starfish recombinant PLA₂ by IPTG-induction. Expression of PLA₂ in *E. coli* BL21 (DE3) containing recombinant pET-16b was induced by 1 mM IPTG. Aliquots of the culture (200 μ l) were pipetted off at 1-4 h after induction and the protein composition was analyzed by SDS-PAGE. Native APLA₂, the native starfish PLA₂ prepared from the pyloric ceca of *A. pectinifera* (Mr 15,300).

cDNAクローン1から翻訳されたものであることを確認するために、SDS-PAGEゲル上のタンパク質をPVDF膜にブロッティングした後、プロテインシーケンサーでN末端アミノ酸配列を分析した。その結果、N末端から20残基の配列、AVYQFGKFISCYGGAGFDG、が決定され、N末端がSerからAlaに置換されていること以外は、イトマキヒトデPLA₂のものと同一であることが分かった。このことにより、PLA₂が大腸菌により発現されたことが確認された。

1.3 大腸菌によるPLA₂の大量発現

そこで次に、PLA₂を大量に発現させるために、組換えpET-16bを導入したBL21 (DE3) のシングルコロニーを釣菌して1,000 mlの新しいLB培地（アンピシリン含有）で一週間振とう培養した後、終濃度1 mMのIPTGを添加して発現誘導し、さらに2週間振とう培養した。次いで、菌体ペレットを回収し、-40℃で凍結・融解を繰り返して溶菌させた後、インクルージョンボディとして沈澱画分を得た（Fig. 53）。そこで、得られた沈澱を終濃度8 M、50 mMおよび10 mMの尿素、トリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）および2-メルカプトエタノールをそれぞれ添加し、室温で3時間静置してPLA₂を可溶化した。次いで、10,000×gで10分間遠心分離した上澄みを6 M、4 M、2 Mおよび0 Mの尿素を含む10 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）に順次3時間ずつ透析してPLA₂を再生した。これにより1,000 mlの大腸菌培養液からFig. 54に示したようなPC分解活性を有する184 mgの粗発現PLA₂が得られた。

1.4 大腸菌により発現したPLA₂の分離・精製

粗発現PLA₂は10 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）に透析した後、先ずDEAE-セルロースによる陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。Fig. 55に示すように、カラム溶出液をA1-A6の6画分に分画し、それぞれの画分を透析により脱塩した後、凍結乾燥によ

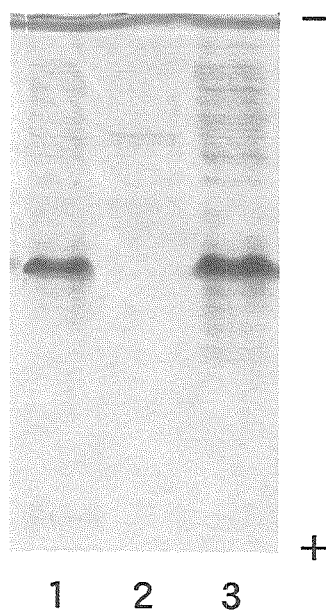


Fig. 53. SDS-PAGE of the starfish recombinant PLA₂.

The bacteria were lysed by repeating freeze and thaw in 40 ml of STET buffer containing 0.5 mM PMSF, and the lysates were centrifuged at $10,000\times g$ for 5 min. Lane 1, whole culture; Lane 2, supernatant; Lane 3, precipitates.

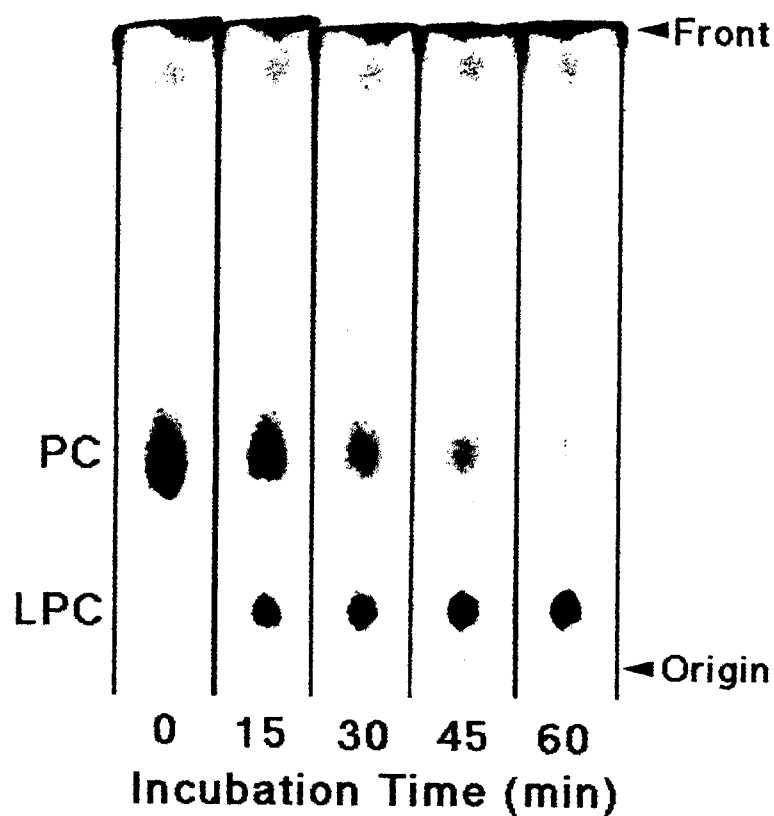


Fig. 54. Thin-layer chromatograms of breakdown products by the starfish crude recombinant PLA₂.
 Reaction mixture containing 30 μ l of the starfish crude recombinant PLA₂, 100 μ g egg yolk PC, 2.7 mM sodium deoxycholate and 5 mM CaCl₂ in a total volume of 130 μ l was incubated at 30 °C for various times. PC, phosphatidylcholine; LPC, lysophosphatidylcholine.

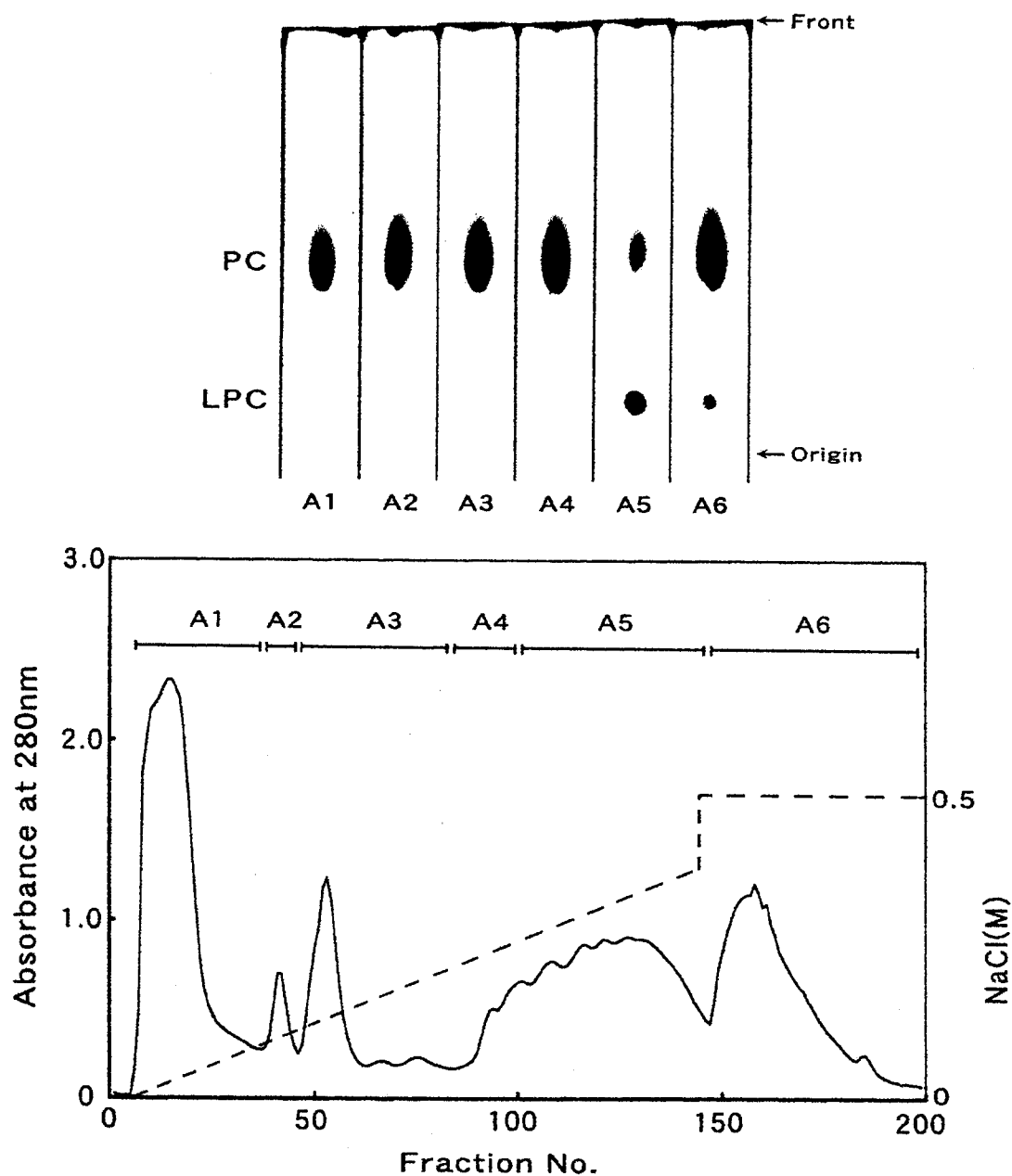


Fig. 55. Purification of the starfish recombinant PLA₂ by DEAE-cellulose column chromatography.

Crude enzyme fraction was applied to a column ($21 \times \phi 1.1$ cm) of DEAE-cellulose equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) and eluted with a linear gradient of 0-0.4 M NaCl followed by a stepwise increase to 0.5 M NaCl. Total volume of elution buffer was 500 ml and flow rate was 40 ml/h. Each fraction contained 3.0 ml. The solid line and dotted line in the lower panel indicate absorbance at 280 nm and NaCl concentration, respectively. Thin-layer chromatograms in the upper panel show the breakdown products of egg yolk PC by A1-A6 fractions. PC, phosphatidylcholine; LPC, lysophosphatidylcholine.

り一定容量に濃縮した。A1-A6画分中の活性を測定したところ、A5画分に主要な活性が認められた (Fig. 55)。DEAE-セルロースによる陰イオン交換クロマトグラフィーで酵素は12倍に精製され、活性回収率は111 %であった。次に、A5画分をセファデックスG-50のカラムに負荷し、カラム溶出液をB1-B5の5画分に分画した後、それぞれの画分中の活性を測定した結果、B4画分に活性が認められた (Fig. 56)。このB4画分は、A5画分に比べ精製度は7.9倍上昇し、活性回収率は104 %であった。

以上の発現PLA₂の精製過程をTable 13にまとめた。1,000 mlの大腸菌培養液から調製した184 mgの粗発現PLA₂をもとに、2段階のクロイマトグラフィーにより最終的に2.3 mgの精製発現PLA₂を得ることができた。得られたB4画分のタンパク質組成をSDS-PAGEおよびPAGEにより分析した結果、いずれの場合もほぼ単一の成分が検出された。そこで、このB4画分を精製発現PLA₂とした。

2 大腸菌により発現したPLA₂の酵素化学的性質

本研究ではイトマキヒトデPLA₂を成熟型酵素として発現するため、そのcDNAの翻訳領域の5'-末端にNco I 部位を導入した。その結果、発現したPLA₂のN末端は本来のSerからAlaに置換された。そこで、精製発現PLA₂の基本的な性質が幽門盲のうから調製したPLA₂ (イトマキヒトデ天然PLA₂) のそれらと同様であるかどうかを比較検討した。

2.1 発現PLA₂の基質位置特異性

発現PLA₂の基質位置特異性を分析した。その結果、Table 14に示すように発現PLA₂はイトマキヒトデ天然PLA₂およびブタ膵臓PLA₂と同様に、POPCから主にオレイン酸を遊離した。このことから、発現PLA₂は天然のPLA₂と同様sn-2位の脂肪酸を特異的に切断することが確認された。

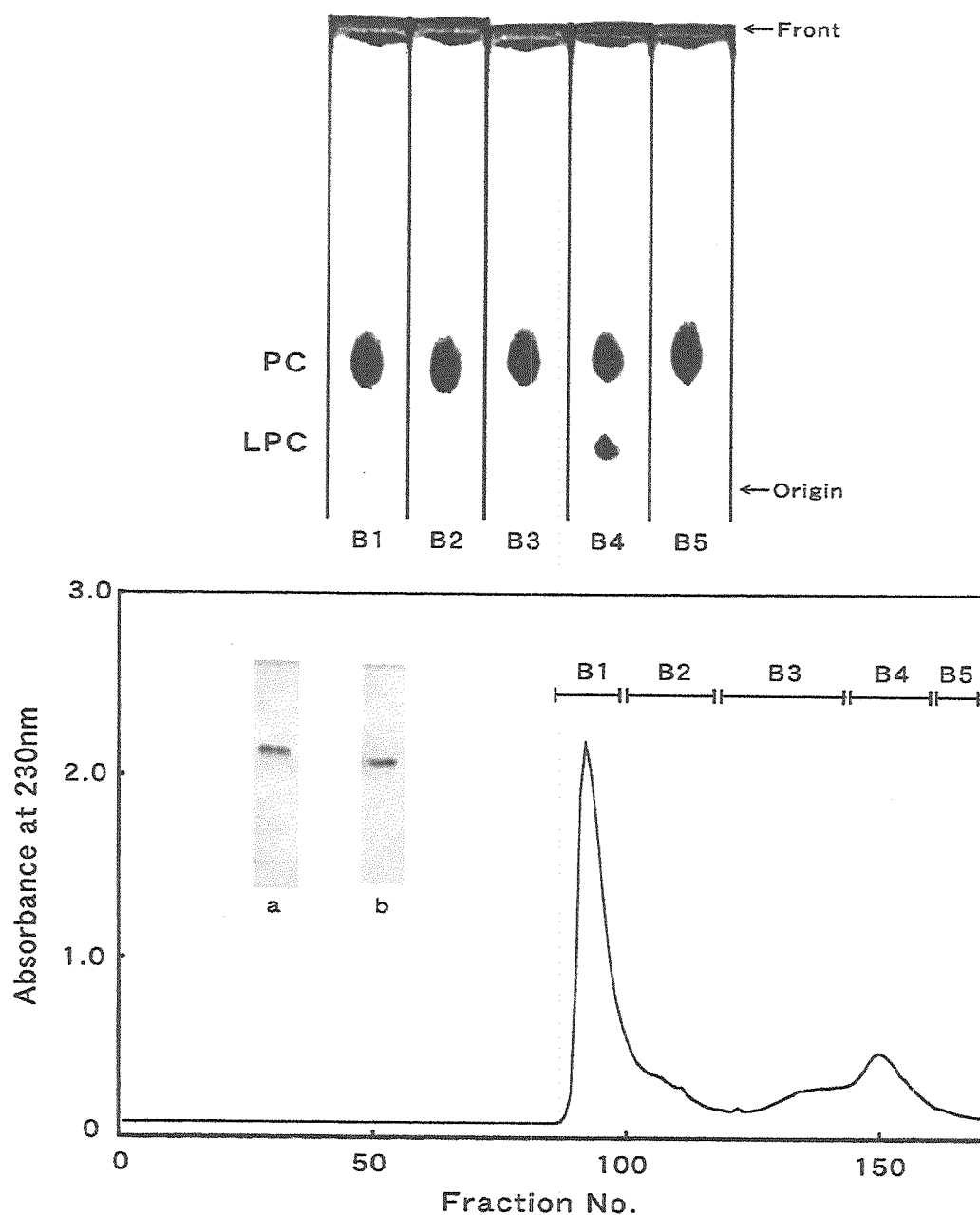


Fig. 56. Purification of the starfish recombinant PLA₂ by gel-filtration.

A5 fraction, the major active fraction shown in Fig. 65, was concentrated by lyophilization and applied to a Sephadex G-50 column ($64 \times \phi 3.9$ cm) equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH8.0) and eluted with the same buffer at a flow rate of 25 ml/h. Each fraction contained 2.5 ml. Inset photos "a" and "b" indicate electrophoretic patterns of B4 fraction on SDS-PAGE and native PAGE, respectively. Thin-layer chromatograms in the upper panel indicate breakdown products of egg yolk PC by B1-B5 fraction. PC, phosphatidylcholine; LPC, lysophosphatidylcholine.

Table 13. Purification of the starfish recombinant PLA₂

Purification step	Protein (mg)	Total activity ($\times 10^3$ U)*	Specific activity ($\times 10^3$ U/mg)	Purity (fold)	Yield (%)
Crude enzyme	184	174	0.9	1	100
DEAE-cellulose	17	193	11	12	111
Sephadex G-50	2.3	200	87	97	115

* One unit of activity was defined as the amount of enzyme hydrolyzing one microgram of PC per minute.

Table 14. Composition of fatty acids released from 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine by the starfish recombinant PLA₂

(%)^{*1}

Fatty acid	Starfish recombinant PLA ₂	Starfish native PLA ₂ ^{*2}	Porcine pancreatic PLA ₂ ^{*3}
16:0	15.5	16.2	15.4
18:1n-9	84.5	83.8	84.6

^{*1} Data are expressed as area percentage of total fatty acid.

^{*2} PLA₂ from the pyloric ceca of the starfish *A. pectinifera*.

^{*3} PLA₂ from porcine pancreas (Amano Pharmaceutical Co.).

2.2 発現PLA₂の比活性

Table 13に示したように、発現PLA₂の比活性値は87,000 U/mgであり、イトマキヒトデ天然PLA₂の比活性値 (119,000 U/mg) の73 %であったが、市販のブタ膵臓PLA₂ (4,300 U/mg、Sigma) の比活性値の20倍であり、比活性が著しく高いというイトマキヒトデ天然PLA₂の特徴を保持していた。

2.3 発現PLA₂の活性におよぼすpHと温度の影響

発現PLA₂の活性におよぼすpHと温度の影響をFig. 57とFig. 58に示す。それらによると、発現PLA₂の卵黄PCに対する活性はpH 5-11の範囲で認められ、最適pHはpH 9.0付近にあった。また、発現PLA₂の反応時間30分での活性は20-70 °Cの範囲で認められ、最適温度は50 °C付近にあった。発現PLA₂のこれらの性質はイトマキヒトデ天然PLA₂のものと同様であった。

2.4 発現PLA₂の活性におよぼすカルシウムイオンの影響

発現PLA₂の活性は種々の濃度 (0-10 mM) のCaCl₂を添加して測定したところ、イトマキヒトデ天然PLA₂と同様に1 mM以上のCaCl₂により活性化された (Fig. 59)。

2.5 発現PLA₂の基質極性基特異性

発現PLA₂によりスルメイカ外套筋から調製したPCとPE加水分解し、基質の極性基特異性を分析した。その結果をFig. 60に示すが、発現PLA₂はイトマキヒトデ天然PLA₂と同様、PEに比べてPCを良く分解した。

以上のように、発現PLA₂はN末端アミノ酸が本来のSerからAlaに置換されているが、

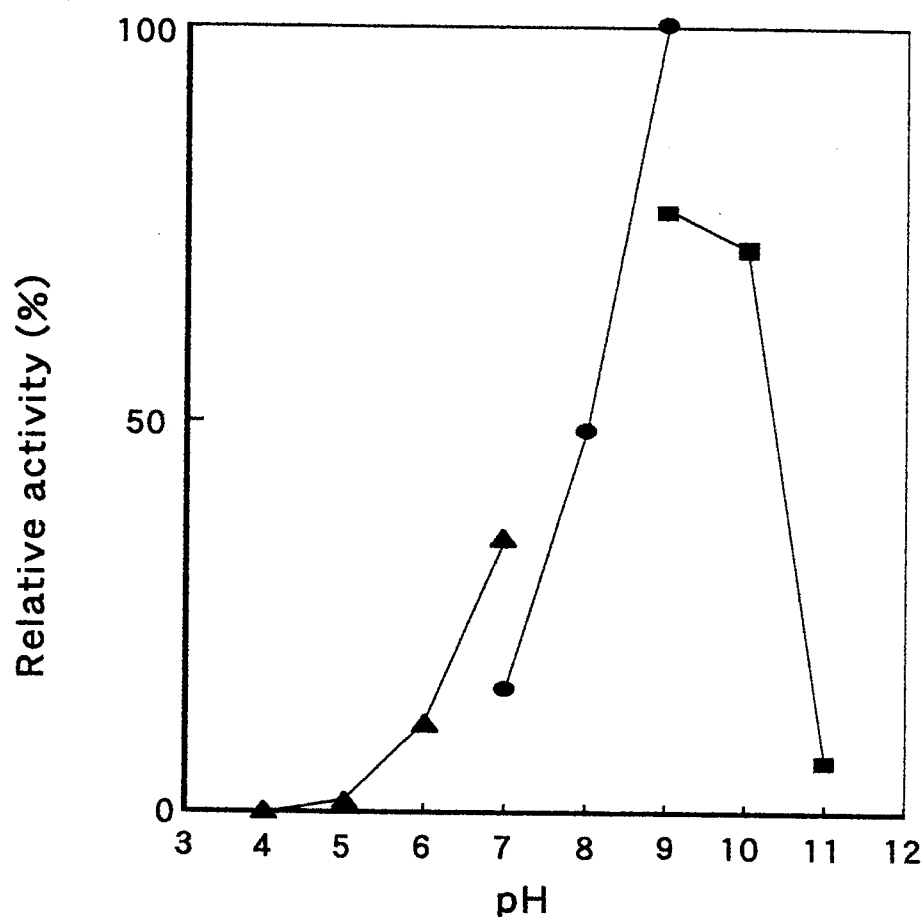


Fig. 57. Effect of pH on the activity of the starfish recombinant PLA₂. Reaction mixture containing 24 ng of the starfish recombinant PLA₂, 100 μ g egg yolk PC, 2.7 mM sodium deoxycholate and 5 mM CaCl₂ in a total volume of 130 μ l was incubated at 37 °C for 30 min. The buffers used were 50 mM acetic acid-sodium acetate from pH 4.0 to 7.0 ($\blacktriangle$), 50 mM Tris-HCl from pH 7.0 to 9.0 ($\bullet$) and 50 mM glycine-NaOH from 9.0 to 11.0 ($\blacksquare$).

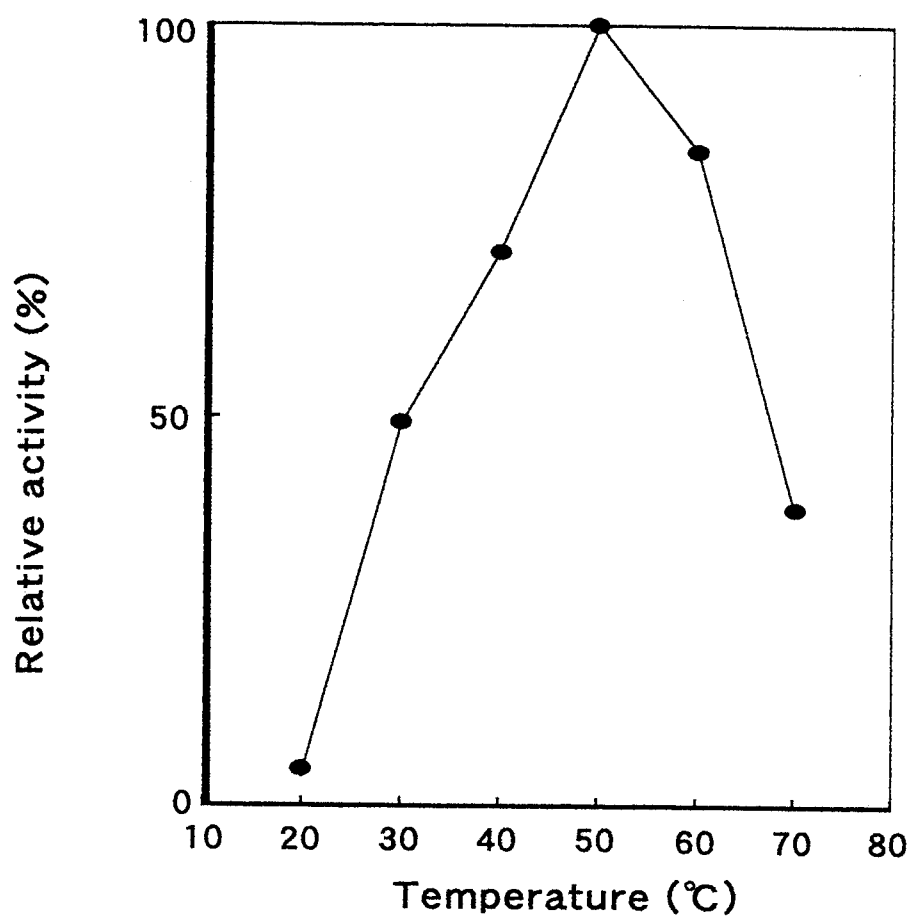


Fig. 58. Effect of temperature on the activity of the starfish recombinant PLA₂.
Reaction mixture containing 24 ng of the starfish recombinant PLA₂, 100 μ g egg yolk PC, 2.7 mM sodium deoxycholate and 5 mM CaCl₂ in a total volume of 130 μ l was incubated at various temperatures for 30 min.

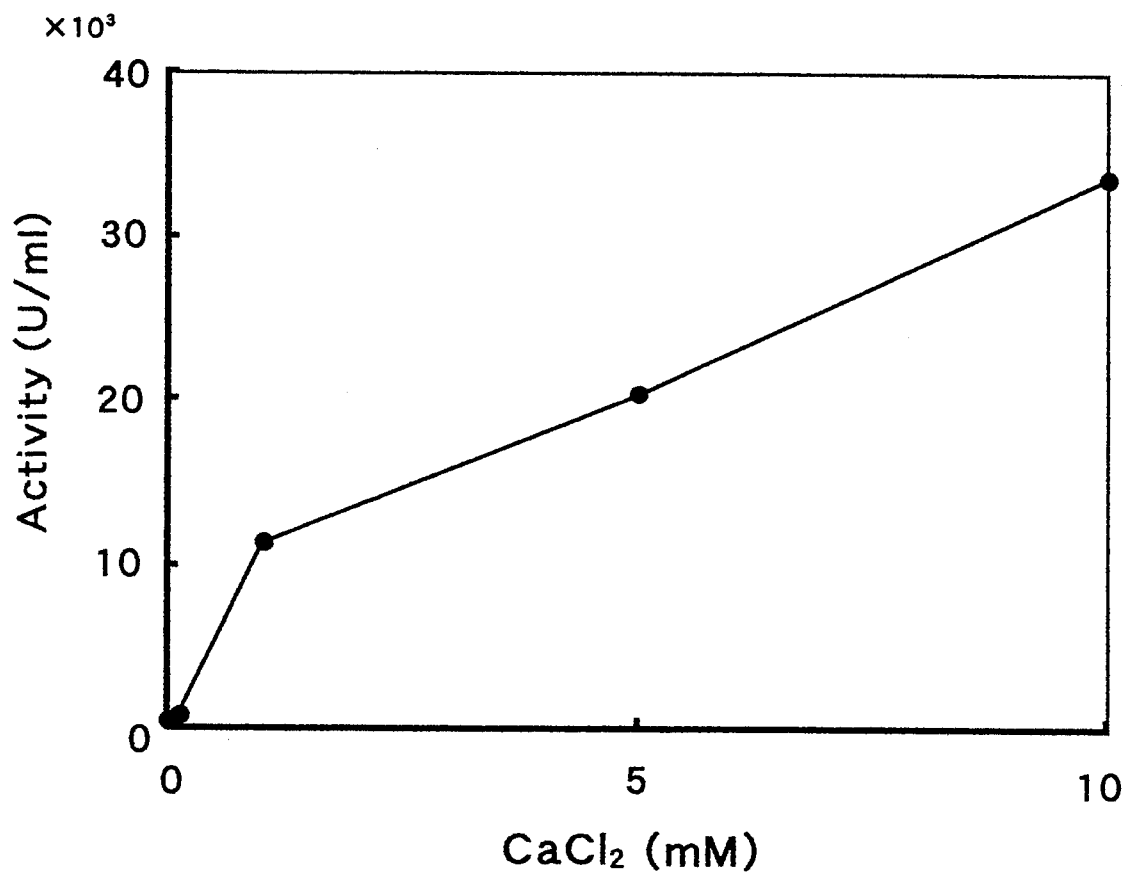


Fig. 59. Effect of Ca^{2+} on the activity of the starfish recombinant PLA_2 . Reaction mixture containing 24 ng of the starfish recombinant PLA_2 , 100 μg egg yolk PC, 2.7 mM sodium deoxycholate, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) and various concentrations of CaCl_2 was incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 30 min in a total volume of 130 μl .

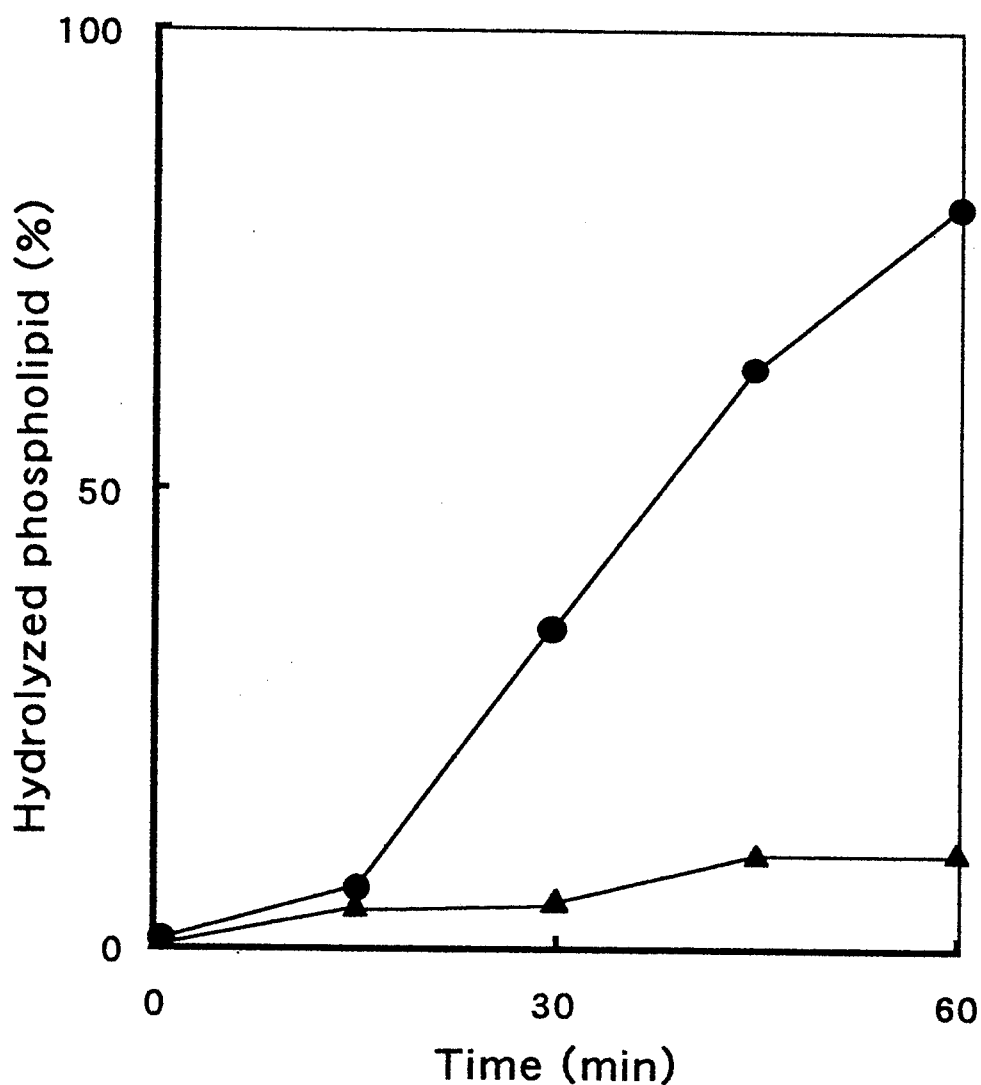


Fig. 60. Time-course of hydrolysis of PC and PE by the starfish recombinant PLA₂.

Reaction mixture containing 24 ng of the starfish recombinant PLA₂, 100 μ g PC (●) or PE (▲) prepared from squid mantle muscle, 2.7 mM sodium deoxycholate, 5 mM CaCl₂ and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) in a total volume of 130 μ l was incubated at 37 °C for various time.

その基本的な酵素化学的性質は幽門盲のうから調製したイトマキヒトデ天然PLA₂の性質と同様であった。すなわち、本研究においてイトマキヒトデPLA₂をコードするcDNAクローン1を組み込んだプラスミドベクターpET-16bと宿主大腸菌BL21 (DE3)を用いた発現系により、市販のブタ膵臓PLA₂よりPCに対する比活性が高く、また、PEよりPCを良く分解するPLA₂の大量生産が可能となった。

第4項 小括

1. イトマキヒトデPLA₂の大腸菌による発現

第2章で明らかになったように、イトマキヒトデPLA₂は市販のブタ膵臓PLA₂に比べてPCに対する活性が約30倍高く、PEよりPCを良く分解し、ブタ膵臓PLA₂と異なる極性基特異性を示したことから、新しい産業用PLA₂としての価値を有すると考えられた。一方、第3章で明らかになったように、イトマキヒトデPLA₂はpancreaticループおよびβ-ウィングに相当する部位にブタ膵臓PLA₂やヘビ毒PLA₂とは異なる特異な構造を有する新たなタイプのグループI PLA₂であった。また、哺乳動物膵臓由来PLA₂において界面認識に関与すると推定されている正に荷電したアミノ酸残基のほとんどがイトマキヒトデPLA₂では中性または負に荷電した残基に置換していることが明らかになった。それゆえ、イトマキヒトデPLA₂の上記のような機能特性は、本PLA₂のpancreaticループ、β-ウィングおよび界面認識部位における特異な構造特性に起因するのではないかと考えられた。そこで本章では、第4章でクローニングしたイトマキヒトデPLA₂・cDNA (cDNAクローン1)を用いてこのPLA₂の大腸菌による発現系を構築した。また、このイトマキヒトデPLA₂の構造-機能関係は本PLA₂の変異体を作製することによっても研究できると考え

られ、このような観点からも大腸菌発現系の構築が望まれた。

哺乳動物膵臓由来 PLA_2 の場合、既にブタ膵臓 PLA_2 ⁹²⁾が大腸菌により発現されているが、それは前駆体として発現され、活性化にはトリプシン消化が必要である。しかしながら、このトリプシン消化の調節は困難であり、しばしば活性の低下を生ずる。近年では、ヒト膵臓 PLA_2 が化学合成したDNAを用いて大腸菌により成熟型酵素として発現されている⁹³⁾。一方、第4章で述べたように、本研究ではイトマキヒトデ PLA_2 の発現系を構築するにあたり、cDNAの5'末端に翻訳開始コドンである「ATG」を付加した。その結果、イトマキヒトデ PLA_2 のタンパク質から決定したアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列をコードするcDNAクローン1を得ることができ、このcDNAクローン1を組み込んだプラスミドベクターpET-16bと宿主大腸菌BL21 (DE3)を用いた発現系によりイトマキヒトデ PLA_2 を成熟型酵素として発現させることが可能となった。さらに、大腸菌培養液から2段階のクロイマトグラフィーにより発現 PLA_2 を精製することができた。イトマキヒトデ PLA_2 の発現にあたって酵素のN末端アミノ酸は本来のSerからAlaに置換されたが、精製発現 PLA_2 は市販のブタ膵臓 PLA_2 よりPCに対する比活性が約20倍高く、また、PEよりPCを良く分解する PLA_2 であり、イトマキヒトデ天然 PLA_2 と同様の酵素化学的性質を有していることが明らかになった。

水産生物を起源とする市販の酵素⁹⁾としては、タラ由来のトリプシン、マス筋肉由来のアルドラーゼ・L-乳酸脱水素酵素、ロブスター筋肉由来のアルギニンキナーゼ・L-乳酸脱水素酵素、アワビ内蔵由来のスルファターゼ・ β -グルクロニダーゼ、ホラガイ由来 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ・ β -N-アセチルグルコサミニダーゼ・ α -L-フコシダーゼ・ β -ガラクトシダーゼ、サザエ由来の β -N-アセチルグルコサミニダーゼ・ α -マンノシダーゼ、ホタテガイ由来の β -グルクロニダーゼ・オクトピン脱水素酵素などがあるが、それらはいずれも組織から抽出されたものと思われる。本研究においては、組換えDNA技術を用いてイトマキヒトデ PLA_2 を大腸菌により大量発現できた。このことから、

このPLA₂の産業用酵素としての利用が可能となった。さらに、本発現系が構築されたことにより、イトマキヒトデPLA₂の変異体作製による構造-機能解析の研究も可能となった。

総 括

ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂, EC3.1.1.4) はグリセロリン脂質の *sn*-2 位にエステル結合している脂肪酸の加水分解反応を触媒する酵素である。PLA₂ は大豆レシチンから消化吸収の良い機能性リゾレシチンを製造したり、食用乳化剤 (リゾレシチン、リゾホスファチジン酸) を製造するのに利用される有用な工業用酵素の 1 つである。PLA₂ による海産生物由来のリン脂質を分解することにより医薬用のエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) の製造も可能と考えられる。本研究では、未利用海産生物資源の高度利用を目的として、海産無脊椎動物であるヒトデ類由来の PLA₂ の産業用酵素としての利用の可能性を検討した。

第 1 章では、北海道沿岸で採取された 4 種のヒトデ (イトマキヒトデ、ニチリンヒトデ、ニッポンヒトデおよびヒトデ) の幽門盲のうの PLA 活性のスクリーニングを行った。幽門盲のうをクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) またはアセトンで脱脂して得られた粉末からそれぞれ粗酵素 [I] と [II] を調製し、それらの PLA 活性を測定した。その結果、イトマキヒトデの粗酵素 [I] および [II] の比活性値 ([I]: 1,427 U/mg, [II]: 127 U/mg) は、他の 3 種の比活性値 ([I]: 0.5-11.8 U/mg, [II]: 0.3-3.2 U/mg) に比べて著しく高かった。このイトマキヒトデ粗酵素 [I] の PLA 比活性値は、同様の方法で調製したブタ膵臓粗酵素 [I] (比活性値: 15 U/mg) および市販の工業用 PLA₂ (比活性値: 440 U/mg, 天野製薬) のそれらと比べても高く、未利用生物であるイトマキヒトデが PLA の供給源に成り得ると考えられた。また、イトマキヒトデとニチリンヒトデの粗酵素 [I] の PLA 総活性および比活性値は、粗酵素 [II] のそれらより高かったが、このことは、幽門盲のうのクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) 処理が幽門盲のうの夾雑タンパク質をより強く変性させるとともに細胞膜のリン脂質等の極性脂質を除去して膜結合性 PLA をより良く可溶化し、酵素の抽出量を増加させたためと推察された。

第2章では、PLA活性の著しく高かったイトマキヒトデの粗酵素[I]からPLAの分離・精製を試みた。その結果、4段階のクロマトグラフィーにより1種類のPLAが電気泳動的に単一に精製された。一方、同様の手順でイトマキヒトデの粗酵素[II]からもPLAの分離・精製を試みたが成功しなかった。従って、クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) による脱脂処理はアセトンによる脱脂処理に比べPLAの抽出性を良くするだけでなく、PLAの分離・精製に対しても有効であると考えられた。

精製PLAは、トリグリセリドを加水分解せず、また、POPCから主にsn-2位のオレイン酸を遊離させたことから、PLA₂と同定された。イトマキヒトデPLA₂は最適pHおよび最適温度をそれぞれpH 9.0、50℃付近に有し、1 mM以上のCa²⁺および2-4 mMのデオキシコール酸ナトリウムにより強く活性化され、また、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た。イトマキヒトデPLA₂のこれらの性質は哺乳動物膵臓PLA₂のものと同様であった。しかしながら、イトマキヒトデPLA₂

(119,000 U/mg) は市販のブタ膵臓PLA₂ (4,300 U/mg, Sigma, 試薬用) と比べて約30倍高い比活性値を示し、また、PEよりもPCをよく分解し、ブタ膵臓PLA₂と異なる極性基特異性を示した。これらのことから、イトマキヒトデPLA₂は新規特性を有する産業用PLA₂として有用であると考えられた。

一方、イトマキヒトデPLA₂の分子量はSDS-PAGEの移動度から約20,000と推定され、哺乳動物膵臓PLA₂のそれら (約14,000) よりも大きかった。これらのことから、イトマキヒトデPLA₂がブタ膵臓PLA₂と異なる機能特性を有する原因は、イトマキヒトデPLA₂がブタ膵臓PLA₂と異なる一次構造ひいては高次構造の特性を有するためではないかと推察された。

第3章では、イトマキヒトデPLA₂の自動エドマン法による一次構造の決定を試みた。その結果、イトマキヒトデPLA₂の137アミノ酸残基の配列は明らかにできたが、1箇所の重複配列が得られなかったため、完全な配列解明には至らなかった。しかし、イトマキヒト

デPLA₂はCys11を含む14Cys残基およびpancreaticループ様配列を有することからグループ I PLA₂に属することが分かった。

第4章では、イトマキヒトデPLA₂の全アミノ酸配列の解明および産業用酵素としての利用とその変異体を用いた構造-機能解析を目的として、cDNAクローニングを行った。その結果、イトマキヒトデ幽門盲のうから9つのクローンが得られ、いずれも415 bpから成り、翻訳領域からはプライマーにより付加された翻訳開始コドン「ATG」に由来するN末端のMetを含めて、138アミノ酸残基が演繹された。これらのクローンのうち、イトマキヒトデPLA₂と同一の配列をコードするcDNAクローン1から演繹されたアミノ酸配列は、タンパク質から決定したアミノ酸配列と完全に一致した。一方、cDNAクローン2-4、cDNAクローン5およびcDNAクローン6-9から演繹されたアミノ酸配列は、cDNAクローン1からの配列と比較して、それぞれ1残基（N末端から35番目）、2残基（N末端から35および43番目）および12残基（N末端から32、35、55、57、65、71、80、81、87、113、116、および120番目）が置換しており、これらはPLA₂のアイソザイムをコードするcDNAであると考えられた。

また、PLA₂アイソフォーム1-4とグループ I および II PLA₂のアミノ酸配列より分子系統樹を作成した。その結果、PLA₂アイソフォーム1-4は分子系統樹においてグループ I および II PLA₂とは別の独立したグループを形成した。この原因はイトマキヒトデPLA₂がpancreaticループやβ-ウィングに相当する部位に特異な配列を有するためと考えられた。

イトマキヒトデPLA₂はCa²⁺結合に関与するアミノ酸残基（Tyr29、Gly31、Gly33およびAsp50）および触媒作用に関与するアミノ酸残基（His49、Tyr53、Tyr72およびAsp111）を完全に保存していた。しかしながら、ブタ膵臓PLA₂と配列比較して、pancreaticループに相当する部位に2残基のアミノ酸の欠損（N末端から62（+1）番目および66（+1）番目）が認められ、また、β-ウィングに相当する部位に16残基の挿入（N

末端から76-83番目および89-96番目)と3残基の欠損(N末端から84(+1)-84(+3)番目)が認められた。さらに、哺乳動物膵臓由来PLA₂において界面認識に関与すると推定されている正に荷電したアミノ酸残基のほとんどがイトマキヒトデPLA₂では中性または負に荷電した残基に置換していることが明らかになった。そこで、イトマキヒトデPLA₂の一次構造をもとに分子系統樹を作製したところ、他のグループIおよびII PLA₂とは別の独立したグループを形成した。また、二次構造予測において、イトマキヒトデPLA₂のN末端部位はβ-構造を、β-ウィング部位は長いα-ヘリックス構造をとることが予測された。さらに、イトマキヒトデPLA₂の三次構造予測をCPH modelsプログラム⁹⁴⁾を用いて行い、ウシ膵臓由来PLA₂のもの⁹⁵⁾と比較を試みた。その結果予測されたイトマキヒトデPLA₂の三次構造は、全体的にはウシ膵臓PLA₂のものと類似していたが、pancreaticループとβ-ウィングに相当する部位が異なる構造を示した(Fig. 61)。以上のことから、イトマキヒトデPLA₂は新たなタイプのグループIであるPLA₂に分類されと考えられた。

ヘビ毒由来のPLA₂は本来の触媒機能の他に、神経毒性、筋肉毒性、心臓毒性、溶血および抗凝血活性などの薬理活性を有する¹⁶⁾。それらのうちのいくつかの薬理活性部位が、ヘビ毒由来のPLA₂のアミノ酸配列の比較研究により推測されている。Dufton and Hider⁹⁶⁾は、神経毒性部位がそれぞれN末端から60-100番目の領域にあることを示唆し、Kini and Evans⁹⁷⁾は、抗凝血性および筋肉毒性部位がN末端から54-77および89-97番目の領域にあることを示唆した(Fig. 62)。これらの領域は、いずれもβ-ウィングとその周辺の部位に相当する。本研究において、イトマキヒトデとブタ膵臓のPLA₂のアミノ酸配列の比較すると、前者は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、このβ-ウィング部位における特異な配列は他のグループIおよびII PLA₂においても認められなかった(Fig. 38)。現在のところ、イトマキヒトデPLA₂のβ-ウィング部位の機能的な役割は不明であるが、それがイトマキヒトデPLA₂の特異な基質特性や高い

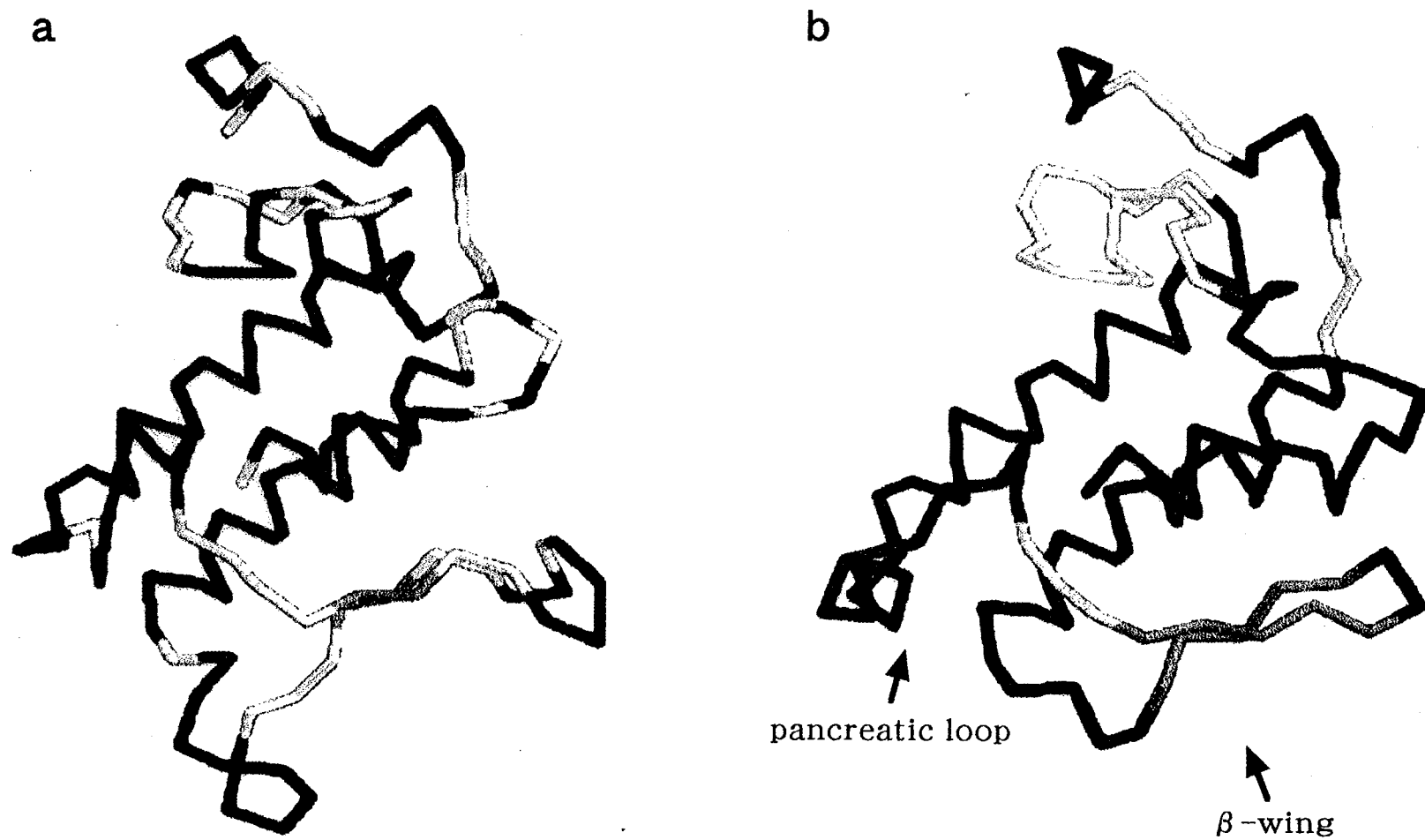


Fig. 61. Predicted tertiary structure of the starfish PLA₂.

Tertiary structure of the starfish PLA₂ was predicted using CPH models⁹⁴.

a: starfish PLA₂, b: bovine PLA₂⁹⁵.

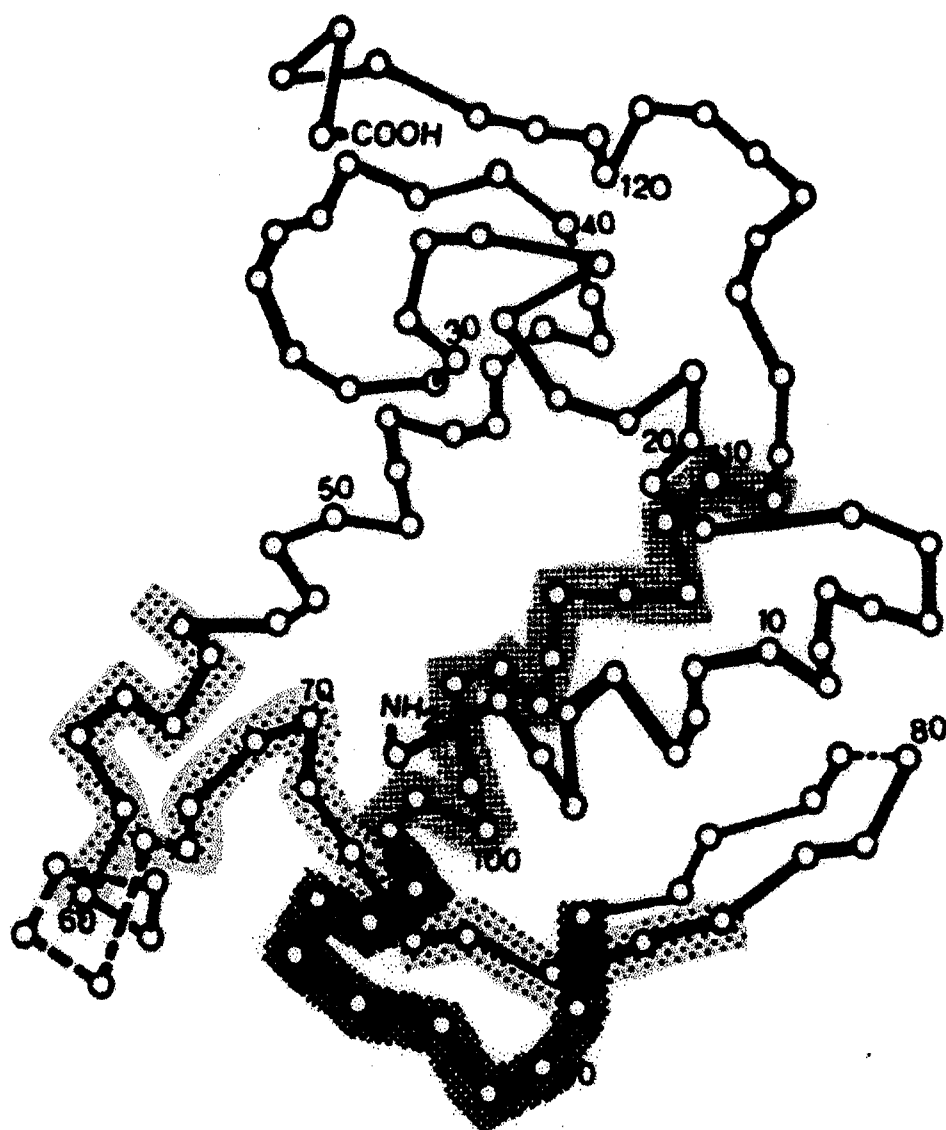


Fig. 62. Relative locations of the predicted neurotoxic, myotoxic and anticoagulant sites of PLA₂⁹⁷.

- hydrophobic neurotoxic site.
- cationic myotoxic site.
- ▨ anticoagulant site.

比活性の原因である可能性が考えられるし、また、何らかの新規機能を担っている可能性も考えられる。

第5章では、イトマキヒトデPLA₂のタンパク質から決定したアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列をコードするAcDNA1を組込んだpET-16bを導入したBL21 (DE3) を用いて、イトマキヒトデPLA₂の発現を試みた。その結果、1,000 mlの大腸菌培養液から184 mgの粗発現PLA₂が調製され、さらに、2段階のクロマトグラフィーにより2.3 mgの精製発現PLA₂が得られた。粗発現PLA₂に対する精製発現PLA₂の収率が低かったが、これはインクルージョンボディとして発現されたPLA₂の再生率が低かったためと推察された。今後、PLA₂の可溶化および再生過程を改善することで、より高い収率で酵素を得ることができると考えられる。発現PLA₂はN末端アミノ酸が本来のSerではなくAlaに置換されたが、PCに対する比活性値 (87,000 U/mg) は市販のブタ膵臓PLA₂のそれ (4,300 U/mg, Sigma) よりも高く、また、PEよりPCを良く分解し、ブタ膵臓PLA₂と異なる極性基特異性を示した。このように、幽門盲のうから調製したトマキヒトデPLA₂と同様の性質を有するPLA₂を大腸菌により発現することが可能となった。

以上のように、本研究においてイトマキヒトデ幽門盲のうには市販のブタ膵臓PLA₂よりPCに対する比活性が高く、またPEよりPCを良く分解するPLA₂が存在することを明らかにした。さらに、イトマキヒトデPLA₂のcDNAのクローニングに成功し、それを用いた大腸菌大量生産系の構築にも成功した。本発現系が構築されたことにより、イトマキヒトデPLA₂の産業用酵素としての利用用途が開かれ、さらに機能的により優れた変異体の作製および変異体を用いた本PLA₂の構造-機能解析も可能となった。

参考文献

- 1) 宮地重遠（監修）：ラボマニュアル マリンバイオテクノロジー. 幸書房 (1991).
- 2) 一島栄治：酵素は生きている-産業用酵素へのいざない. 裳華房 (1995).
- 3) 相阪和夫：酵素サイエンス. 幸書房 (1999).
- 4) 鶴 大典, 船津 勝（編）：生化学実験法31 蛋白質分解酵素Ⅱ. 学会出版センター (1993).
- 5) 隆島史夫（編）：東京水産大学第15回公開講座 水産のバイオテクとハイテク - 利用実例と開発指針-. 成山堂書店 (1990).
- 6) 澤辺智雄：アルギン酸分解性海洋細菌とその応用に関する研究. 平成12年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 218 (2000).
- 7) 野本正雄：酵素工学. 学会出版センター (1993).
- 8) 上島孝之：産業用酵素. 丸善 (1995).
- 9) 杉原耿雄, 島田裕司, 富永嘉男：リパーゼの構造と活性. 蛋白質 核酸 酵素, **37**, 1394-1402 (1992).
- 10) J. Nikuni : The formation of lysolecithin from egg-yolk lecithin by pancreas extract. *Proc. Imp. Acad. (Tokyo)*, **8**, 300-303 (1932).
- 11) S. Belfanti and C. Arnaudi : A lecithinase of pancreas producing lysolecithin. *Bull. Soc. Intern. Microbiol. Sez. Ital.*, **4**, 399-406 (1932).
- 12) 鹿山 光編：総合脂質科学. 恒星社厚生閣 (1989).
- 13) E.A. Dennis : Phospholipases. "The enzymes, Vol. XVI, 3rd edn.", Academic Press, 307-353 (1983).
- 14) 池田 潔, 手島圭三：ホスホリパーゼA₂の触媒機能の分子論. 蛋白質 核酸 酵素,

- 32, 1422-1441 (1987).
- 15) 東城博雅, 岡本光弘: ホスホリパーゼA₂の酵素化学. 代謝, **26**, 691-703 (1989).
 - 16) R.K. Arni and R.J. Ward : Phospholipase A₂, a structural review. *Toxicon*, **34**, 827-841 (1996).
 - 17) 工藤一郎: 高等動物由来非膵臓型ホスホリパーゼA₂の構造と機能. 蛋白質 核酸 酵素, **36**, 325-332 (1991).
 - 18) 諏訪頼正: ホスホリパーゼA₂の活性制御. 蛋白質 核酸 酵素, **36**, 333-341 (1991).
 - 19) 工藤一郎, 井上圭三: ホスホリパーゼA₂経路. 代謝, **27**, 81-86 (1991).
 - 20) 小原 収, 有田 斉: アラキドン酸遊離にかかわるホスホリパーゼA₂. 蛋白質 核酸 酵素, **37**, 898-905 (1992).
 - 21) E.A. Dennis : The growing Phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 1-2 (1997).
 - 22) 工藤一郎, 村上 誠: ホスホリパーゼA₂. 蛋白質 核酸 酵素, **44**, 1013-1024 (1999).
 - 23) 新井洋由, 名取有美子, 野島庄七: 生体成分の酵素的分析法. 講談社, 49-83 (1985).
 - 24) U. Stoll : The analysis of plasmalogen-containing phospholipids from cardiac membranes by phospholipase A₂. *Fett/Lipid*, **98**, 26-30 (1996).
 - 25) 青井のぶ之: 大豆リソレシチン. 油化学, **39**, 10-15 (1990).
 - 26) 菰田衛: レシチン その基礎と応用. 幸書房 (1991).
 - 27) 鈴木哲夫: 炒めと大豆レシチン. 食品工業, **6**, 57-62 (1998).
 - 28) 高 行植: 高純度レシチンの生理活性と利用. *New Food Industry*, **41**, 7-14 (1999).
 - 29) 山下道大, 小山文裕: 大豆油 (その1) . 油脂, **50**, 60-68 (1997).

- 30) B. H. Winter, K. Titze, and V. Marschner : Application of phospholipases in edible oil industry. *Fett/Lipid*, **100**, 152-156 (1998).
- 31) R. Labeque, C. J. P. Mullon, J. P. M. Ferreira, R. S. Lees, and R. Langer : Enzymatic modification of plasma low density lipoproteins in rabbits, a potential treatment for hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3476-3480 (1993).
- 32) K. Hayashi : Content and composition of glyceryl ethers in the pyloric ceca and ovaries of the starfish *Distolasterias nippon*, *Asterina pectinifera*, and *Lysastrosoma anthosticta*. *Fisheries Sci.*, **64**, 852-853 (1998).
- 33) K. Hayashi and H. Kishimura : Content and composition of glyceryl ethers in the pyloric ceca and ovaries of the asteroids *Solaster paxillatus* and *Asterias amurensis*. *Fisheries Sci.*, **63**, 945-949 (1997).
- 34) 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. 日水誌, **65**, 110-111 (1999).
- 35) G. H. de Haas, N. M. Postema, W. Nieuwenhuizen, and L. L. M. van Deenen : Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 103-117 (1968).
- 36) 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).
- 37) V.E. Vaskovsky and Z.S. Suppes : Phospholipases of marine invertebrates-I ; distribution of phospholipase A. *Comp.Biochem.Physiol.*, **43B**, 601-609 (1972).
- 38) 長谷川洋子, 佐々木禎一. ヒトデ内蔵脂質に関する研究. 第2報. ヒトデ内蔵

Phospholipase A₂活性の検討. 札幌医誌, **40**, 1-6 (1971).

- 39) 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).
- 40) R. Verger, G.H. de Haas, L. Sarda, and P. Desnulle : Purification from porcine pancreas of two molecular species with lipase activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **188**, 272-282 (1969).
- 41) 岸村栄毅, 林 賢治. イトマキヒトデ幽門盲のうホスホリパーゼA₂の精製と性質 : 日水誌, **65**, 739-746 (1999).
- 42) H. Kishimura and K. Hayashi : Isolation and characteristics of phospholipase A₂ from the pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **124B**, 483-488 (1999).
- 43) E.G. Bligh and W.J. Dyer : A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917 (1959).
- 44) U.K. Laemmli : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 45) 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).
- 46) 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, **64**, 262-267 (1998).
- 47) N. Iijima, S. Chosa, K. Uematsu, T. Goto, T. Hoshita, and M. Kayama : Purification and characterization of phospholipase A₂ from the pyloric ceca of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.*, **16**, 487-498 (1997).
- 48) H. Ono, N. Iijima : Purification and characterization of phospholipase A₂ from

- the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.*, **18**, 135–148 (1998).
- 49) H. Kishimura, T. Ojima, H. Tanaka, K. Hayashi and K. Nishita : Amino acid sequence of phospholipase A₂ from the pyloric ceca of starfish *Asterina pectinifera*. *Fisheries Sci.*, **66**, 104–109 (2000).
 - 50) A.M. Crestfield, S. Moore, and W.H. Stein : The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *J. Biol. Chem.*, **238**, 622–627 (1963).
 - 51) H. Kishimura, T. Ojima, K. Hayashi and K. Nishita : cDNA cloning and sequencing of phospholipase A₂ from the pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **126B**, 579–586 (2000).
 - 52) T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook : Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY, (1982).
 - 53) P. Chomiczynski and N. Sacchi : Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate–phenol –chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156–159 (1987).
 - 54) R. Renetseder, S. Brunie, B.W. Dijkstra, J. Drenth, and P.B. Sigler : A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J. Biol. Chem.*, **260**, 11627–11634 (1985).
 - 55) L. Chang, S. Lin, and C. Chang : The structural variations of ϵ – amino groups in phospholipase A₂ enzymes from *Naja naja atra* and *Bungarus multicinctus* venoms. *J. Protein Chem.*, **16**, 133–137 (1997).
 - 56) W.C. Puijk, H.M. Verheij, and G.H. de Haas : The primary structure of

- phospholipase A₂ from porcine pancreas: a reinvestigation. *Biochim. Biophys. Acta*, **492**, 254–259 (1977).
- 57) A. Randolph and R.L. Heinrikson : *Crotalus atrox* phospholipase A₂: amino acid sequence and studies on the function of the NH₂-terminal region. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2155–2161 (1982).
- 58) D.P. Botes and C.C. Viljoen : *Bitis gabonica* venom: the amino acid sequence of phospholipase A. *J. Biol. Chem.*, **249**, 3827–3835 (1974).
- 59) J. Chen, S.J. Engle, J.J. Seilhamer, and J.A. Tischfield : Cloning and characterization of novel rat and mouse low molecular weight Ca²⁺-dependent phospholipase A₂s containing 16 cysteines. *J. Biol. Chem.*, **269**, 23018–23024 (1994).
- 60) J.D. Thompson, D.G. Higgins, and T.J. Gibson : CLUSTAL W, improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673–4680 (1994).
- 61) R.D.M. Page : TreeView, an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, **12**, 357–358 (1996).
- 62) P. Lind and D. Eaker : Amino-acid sequence of the α -subunit of taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the Australian snake taipan *Oxyuranus s.scutellatus*). *Eur. J. Biochem.*, **124**, 441–447 (1982).
- 63) C. Takasaki, H. Kuramochi, T. Shimazu, and N. Tamiya : Correction of amino acid sequence of phospholipase A₂ I from the venom of *Laticauda semifasciata* (erabu sea snake). *Toxicon*, **26**, 747–749 (1988).

- 64) P. Lind and D. Eaker : Amino acid sequence of a lethal myotoxic phospholipase A₂ from the venom of common sea snake (*Enhydrina schistosa*). *Toxicon*, **19**, 11-24 (1981).
- 65) P. Lind and D. Eaker : Complete amino-acid sequence of a non neurotoxic, non-enzymatic phospholipase A₂ homolog from the venom of the Australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*. *Eur. J. Biochem.*, **111**, 403-409 (1980).
- 66) S. Nishida, M. Terashima, and N. Tamiya : Amino acid sequences of phospholipases A₂ from the venom fo an Australian elapid snake (king brown snake, *Pseudechis australis*). *Toxicon*, **23**, 87-104 (1985).
- 67) K. Kondo, H. Toda, and K. Narita : Amino acid sequence of phospholipase A from *Bungarus multicinctus* venom. *J. Biochem.*, **89**, 37-47 (1981).
- 68) F.J. Joubert : *Naja melanoleuca* (forest cobra) venom, the amino acid sequence of phospholipase A, fraction DE-III. *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 329-344 (1975).
- 69) F.J. Joubert : *Naja mossambica mossambica* venom: purification, some properties and the amino acid sequences of three phospholipases A (CM- I , CM- II and CM-III). *Biochim. Biophys. Acta*, **493**, 216-227 (1977).
- 70) S. Chwetzoff, S. Tsunasawa, F. Sakiyama, and A. Menez : Nigexine, a phospholipase A₂ from cobra venom with cytotoxic properties not related to esterase activity: purification, amino acid sequence, and biological properties. *J. Biol. Chem.*, **264**, 13289-13297 (1989).
- 71) F.J. Joubert : *Hemachatus haemachatus* (ringhals) venom, purification, some properties and amino-acid sequence of phospholipase A (Fraction DE- I).

- Eur. J. Biochem.*, **52**, 539–554 (1975).
- 72) E.A.M. Fleer, H.M. Verheij, and G.H. de Haas : The primary structure of bovine pancreatic phospholipase A₂. *Eur. J. Biochem.*, **82**, 261–269 (1978).
- 73) A. Evenberg, H. Meyer, W. Gaastra, H.M. Verheij, and G.H. de Haas : Amino acid sequence of phospholipase A₂ from horse pancreas. *J. Biol. Chem.*, **252**, 1189–1196 (1977).
- 74) H.M. Verheij, J. Westerman, B. Sternby, and G.H. de Haas : The complete primary structure of phospholipase A₂ from human pancreas. *Biochim. Biophys. Acta*, **747**, 93–99 (1983).
- 75) O. Ohara, M. Tamaki, E. Nakamura, Y. Tsuruta, Y. Fujii, M. Shin, H. Teraoka, and M. Okamoto : Dog and rat pancreatic phospholipase A₂: complete amino acid sequences deduced from complementary DNAs. *J. Biochem.*, **99**, 733–739 (1986).
- 76) R.L. Heinrikson, E.T. Krueger, and P.S. Keim : Amino acid sequence of phospholipase A₂-α from the venom of *Crotalus adamanteus*. *J. Biol. Chem.*, **252**, 4913–4921 (1977).
- 77) F.J. Joubert and T. Haylett : Snake venoms – purification, some properties and amino acid sequence of phospholipase A₂ (DE- I) from *Trimeresurus okinavensis* (hime-habu) venom. *Hoppe Seyers Z. Physiol.*, **362**, 997–1006 (1981).
- 78) N. Oda, T. Ogawa, M. Ohno, H. Sasaki, Y. Sakaki, and H. Kihara : Cloning and sequence analysis of cDNA for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A₂, and consequent revision of the amino acid sequence. *J. Biochem.*, **108**, 816–821 (1990).

- 79) K. Tomoo, H. Ohishi, T. Ishida, M. Inoue, K. Ikeda, Y. Aoki, and Y. Samejima : Revised amino acid sequence, crystallization, and preliminary x-ray diffraction analysis of acidic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. *J. Biol. Chem.*, **264**, 3636–3638 (1989).
- 80) R.M. Kramer, C. Hession, B. Johansen, G. Hayes, P. McGray, E.P. Chow, R. Tizard, and R.B. Pepinsky : Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.*, **264**, 5768–5775 (1989).
- 81) M. Hayakawa, I. Kudo, M. Tomita, S. Nojima, and K. Inoue : The primary structure of rat platelet phospholipase A₂. *J. Biochem.*, **104**, 767–772 (1988).
- 82) C.C. Viljoen, D.P. Botes, and H. Kruger : Isolation and amino acid sequence of caudoxin, a presynaptic acting toxic phospholipase A₂ from the venom of the horned puff adder (*Bitis caudalis*). *Toxicon*, **20**, 715–737 (1982).
- 83) C. Geourjon and G. Deleage : SOPMA, significant improvement in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignment. *Cabios*, **11**, 681–684 (1995).
- 84) J.M. McIntosh, F. Ghomashchi, M.H. Gelb, D.J. Dooley, S.J. Stoeck, A.B. Giordani, S.R. Naisbitt, and B.M. Olivera : Conodipine-M, a novel phospholipase A₂ isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 3518–3526 (1995).
- 85) K. Shiomi, A. Kazama, K. Shimakura, and Y. Nagashima : Purification and properties of phospholipases A₂ from the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) venom. *Toxicon*, **36**, 589–599 (1998).
- 86) O.P. Kuipers, M.M.G.M. Thunnissen, P. de Geus, B.W. Dijkstra, J. Drenth, H.M. Vrhelij, and G.H. de Haas : Enhanced activity and altered specificity of

- phospholipase A₂ by deletion of a surface loop. *Science*, **244**, 82-85 (1989).
- 87) R. Dua, S.-K. Wu, and W. Cho : A structure-function study of bovine pancreatic phospholipase A₂ using polymerized mixed liposomes. *J. Biol. Chem.*, **270**, 263-268 (1995).
 - 88) Y. Snitk, S.K. Han, B.I. Lee, and W. Cho : Differential interfacial and substrate binding modes of mammalian pancreatic phospholipase A₂ - a comparison among human, bovine, and porcine enzymes. *Biochemistry*, **38**, 7803-7810 (1999).
 - 89) B.W. Dijkstra, J. Drenth, and K.H. Kalk : Active site and catalytic mechanism of phospholipase A₂. *Nature*, **289**, 604-606 (1981).
 - 90) 岡本光弘, 東城博雅 : 膵臓、その他の消化器および脾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).
 - 91) H. Kishimura, T. Ojima, K. Hayashi and K. Nishita : Bacterial expression and characterization of starfish phospholipase A₂. *Comp. Biochem. Physiol.*, **128B**, 565-573 (2001).
 - 92) P. de Geus, C.J. van den Bergh, O. Kuipers, H.M. Verheij, W.P.M. Hoekstra, and G.H. de Haas : Expression of porcine pancreatic phospholipase A₂- generation of active enzyme by sequence-specific cleavage of a hybrid protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 3733-3759 (1987).
 - 93) S.K. Han, B.-I. Lee and W. Cho : Bacterial expression and characterization of human pancreatic phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta*, **1346**, 185-192 (1997).
 - 94) O. Lund, K. Frimand, J. Gorodkin, H. Bohr, J. Bohr, J. Hansen and S. Brunak : Protein distance constraints predicted by neural networks and

- probability density functions. *Protein Engineering*, **11**, 1241-1248 (1997).
- 95) B.W. Dijkstra, K.H. Kalk, W.G.J. Hol and J. Drenth : Structure of bovine pancreatic phospholipase A₂ at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **147**, 97-123 (1981).
- 96) M.J. Dufton and R.C. Hider : Classification of phospholipase A₂ according to sequence - evolutionary and pharmacological implications. *Eur. J. Biochem.*, **137**, 545-551 (1983).
- 97) R.M. Kini and H.J. Evans : Structure-function relationships of phospholipases : the anticoagulant region of phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.*, **262**, 14402-14407 (1987).

謝 辞

稿を終えるに当り、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜り、厳密なる御稿閲を頂いた北海道大学大学院水産科学研究科 林 賢治教授に心甚なる謝意を表する。さらに、本研究遂行上適切な御指導と本論文の御稿閲を頂いた北海道大学大学院水産科学研究科 西田清義教授、尾島孝男助教授に心から感謝申し上げる。

また、本研究の遂行に当り御協力頂いた北海道大学大学院水産科学研究科 田中啓之助手、マサチューセッツ大学医学部 井上 晶博士に謝意を表する。さらに、本研究の試料供給に御協力頂いた宗谷郡猿払村 佐々木茂勝氏に感謝申し上げる。

また、御協力頂いた生物素材利用学研究室ならびに応用生化学研究室諸兄に感謝の意を表する。