

ヒトデ内臓脂質に関する研究 第2報

ヒトデ内臓の Phospholipase A 活性の検討

長谷川 洋子

札幌医科大学学生化学第一講座 (主任 大野教授)

佐々木 禎一

札幌医科大学附属病院中央検査部

Studies on Visceral Lipids of Starfish

II. Phospholipase A in Starfish *Asterina pectinifera*

Hiroko HASEGAWA

Department of Biochemistry (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief: Prof. K. Ohno)

Teiichi SASAKI

Central Clinical Laboratory (Biochemical Section),

Sapporo Medical College Hospital

Phospholipase A activity was demonstrated in the homogenates of starfish visceral organs i.e. the pyloric caeca (L), the cardiac stomach (C) and the gonads (E).

The highest activity was observed in (L) followed by (D) and the lowest activity was seen in (E).

The main reaction products in the degradation of lecithin and phosphatidylethanolamine were monoacyl-derivatives and free fatty acids. The formation of glyceryl-phosphorylcholine and ethanolamine were not observed.

The experiments with α - ^{14}C -palmitoyl labelled substrate showed the presence of both A_1 and A_2 types of phospholipase. A_2 activity was predominant, and its optimum pH was around 7.4. Lecithin was hydrolyzed to a greater extent than phosphatidylethanolamine.

緒 言

前報¹⁾において秋野らはヒトデ内臓脂質の組成分析を行ない、いく種類かのリン脂質の同定を行なった際、かなりの量の lysolecithin の存在を認めた。一方ヒトデは溶血毒を有することが知られている。この溶血現象を起す成分としてサポニンの存在もあげられるが、その他の原因として lecithin を lysolecithin に水解する phospholipase A 作用も関与しているのではないだろうか。

本報告はヒトデにおける phospholipase A (EC. 3.1.1.4) 活性の有無ならびにその性質を検討して得られた結果をまとめた。

実験方法

1. 実験材料

ヒトデの採取法、内臓部の分離は前報¹⁾のとうりである。

幽門のう (L)、直腸のう (D)、生殖腺 (E) に分け約 6 カ月間凍結保存 (-20°C) したものをを用いた。

2. 酵素標品

上記ヒトデ凍結保存臓器を 9 容の水または食塩水にてホモゲナイズし 2,500 r.p.m., 15 分間遠心分離した上澄を試料とした。更にこれを 105,000 \times g 60 分間超遠心した上澄、および沈渣についても検討した。この際上澄にはおよそ 70% の蛋白があり沈渣には 30% であった。(D), (L), (E) 共に蛋白含量はほぼ等しく約 100 mg/g wet tissue であった。蛋白の定量は Lowry 法²⁾によった。

3. 標識基質の作成

^3H -Glycerol 標識 lecithin, および phosphatidylethanolamine を作成するために体重約 100 g の幼若ラット腹腔内に 5 mCi の glycerol-2- ^3H を注入後 4 時間で肝臓を取り出し Folch³⁾ 法で脂質抽出し DEAE セルロースカラム および薄層クロマトグラフィーにより lecithin, phos-

phatidylethanolamine を単離精製した。得られた比活性は lecithin, 1.34×10^5 c.p.m./ μ mole, phosphatidylethanolamine, 8.3×10^5 c.p.m./ μ mole であった。

α -(14 C)-palmitoyl-lecithin, -phosphatidylethanolamine については palmitic acid (U)- 14 C, 0.5 mCi を体重 100 g の幼若ラットに腹腔内注射後 1 時間の肝臓を上記の要領で抽出して得た。Lecithin の比活性は 8.04×10^4 c.p.m./ μ mole であり蛇毒による分析の結果カウントの分布は α 位に 90% を占めていた。また phosphatidylethanolamine の比活性は 1.4×10^5 c.p.m./ μ mole でありカウントの分布は α 位に 96.5% を占めていた。

4. 酵素活性の測定

Waite and Van Deenen⁴⁾ の方法に準じた。標識リン脂質をセルローズニトレートチューブにとり N_2 ガス下溶媒を乾固した後 0.25 M Tris-HCl (pH 7.4) を加えて 200 mA, 10 分間 sonication をし均一な emulsion とする。この emulsion 0.5 ml 中に lecithin 0.5 μ mole, phosphatidylethanolamine は 0.2 μ mole を含むように調製する。この基質-緩衝液 0.5 ml に酵素液 1.5 ml を加え総量 2.0 ml とし 37 °C, 30 分あるいは 1 時間 incubation を行なう。反応の停止および脂質抽出には 3 容の $CHCl_3$: MeOH (1:2, v/v) を加え攪拌し, 更に 1 容の $CHCl_3$ を加え混和後濾過し蛋白を除く。この蛋白を 1.5 容の $CHCl_3$ で洗いこの液も濾液に加える。この濾液に水 1 容を加えて遠心分離する。酵素蛋白の少ない場合には濾過の操作をせず遠心によって蛋白を分離する。遠心した上層を水溶性画分, 下層を脂質画分とする。更に除去した蛋白について 100° の水で数時間抽出後遠心分離して得た上澄をも水溶性画分に加えた。脂質画分の分析には溶媒を乾固した後少量の $CHCl_3$ に溶かしケイ酸カラムクロマトグラフィーにより, 中性脂質とリン脂質画分とに分離する。リン脂質画分は更にキーゼルゲル G 薄層クロマトグラフィーを行ない $CHCl_3$: MeOH: H_2O (65:25:4, v/v/v) で展開し lecithin と lysolecithin, phosphatidylethanolamine と lyso-phosphatidylethanolamine を分離する。

酵素量を少なく用いた場合には脂質抽出液をそのまま薄層クロマトグラフィーにかけ, 遊離脂肪酸, lecithin, phosphatidylethanolamine, lyso-derivatives とを分離した。スポットの検出には 2,7-ジクロロフルオロエッセンのアルコール溶液の噴霧あるいはニンヒドリン噴霧を行なった。各画分の溶出は Arvidson⁵⁾ の方法を採用した。カウント測定は堀場液体シンチレーションカウンター LS 500 を用い脂質のカウントに際しては PPO 4 g, POPOP 100 mg, を toluene 1 l に溶かしたシンチレーターを, 水溶性画分には上記シンチレーター 2 容に Triton X-100 1 容を

混和したものを使用した。

リンの定量は Bartlett⁶⁾ 法その他の方法は前報¹⁾ に記した通りである。盲検としてヒトデ臓器ホモジネートを 100° で 5 分間熱処理したものあるいは有機溶媒添加後にヒトデ臓器ホモジネートを加えたものについて同様の処置をしたものを同時に行なって検討したが水解はほとんど起こらず無視し得る程度であった。回収率はこの盲検のカウントを 100% として計算した。ただ酵素活性が非常に低い場合のみ盲検による補正を行なった。

実験結果

1. ヒトデ臓器のリン脂質組成

ヒトデ臓器を Folch 法³⁾ で脂質抽出した後薄層クロマトグラフィーにより $CHCl_3$: MeOH: H_2O (65:25:4, v/v/v) の展開溶媒を用いて各リン脂質を分離した。各スポットはニンヒドリン及び硫酸噴霧により検出後かき出し Bartlett 法⁶⁾ によりリン量測定を行ないリン脂質の百分率を調べた結果を Table 1 に示した。

前報¹⁾ において秋野らが示したように (E) では lecithin, phosphatidylethanolamine, が主であるのに対し (L) では lecithin, phosphatidylethanolamine 量は少なく lysolecithin, lysophosphatidylethanolamine が多い。また (D) に関しては秋野らはほとんどリン脂質を認めなかったのがあったが, 今回の標本を用いた結果では (L) とほとんど同じ組成を示した。

Table 1 Phospholipid Composition in Visceral Organs of Starfish

Lipid extract of starfish was chromatographed on Kiesel gel G thin layer plate. Individual lipids was scraped off after detection with H_2SO_4 spray and determined for lipid-P.

	(D)	(L)	(E)
	lipid-P mole (%)		
Phosphatidylethanolamine	14.0	16.0	27.6
Lyso-phosphatidylethanolamine	24.8	22.0	8.8
Lecithin	10.9	10.7	43.1
Lyso-lecithin	41.7	42.0	11.6
Others	8.5	9.3	8.8
(D) Cardial stomach	(L) Pyloric caeca		
(E) Gonad			

2. ヒトデ臓器における Phospholipase A 活性分布

(3H)-Glycerol 標識 lecithin, phosphatidylethanolamine を基質としてヒトデ臓器の phospholipase A 活

Table 2 Recovery of Isotope After Incubation

The mixture contained 125 μ moles of tris (pH 7.4), 0.54 μ mole of (3 H)-glycerol labelled lecithin or 0.29 μ mole of (3 H)-glycerol labelled phosphatidylethanolamine and enzyme protein; 16.6 mg of (D), 15.5 mg of (L) or 15.7 mg of (E). Incubation was carried out at 37° for 60 min.

Substrate	Lecithin			Phosphatidylethanolamine		
	(D)	(L)	(E)	(D)	(L)	(E)
	recovery %					
Water soluble fraction	4.3	4.8	3.7	3.4	3.3	0.4
Neutral lipids	2.3	0.6	0.4	1.7	2.1	1.7
Phospholipids	87.4	87.7	90.5	89.0	90.0	89.5
	recovery % in phospholipids					
Lyso-derivatives	93.1	98.3	2.9	71.7	85.8	59.3
Substrate	6.4	1.7	97.1	25.4	12.6	40.7

性を測定した結果を Table 2 に示した. まず incubation に用いた radioactivity の回収率を調べると Table 2 上段に示すごとくになり, 使用した radioactivity のほぼ 90% 以上がリン脂質画分に回収されたことが判る. 各画分の分離については実験方法に記載した通りである.

水溶性画分および中性脂質画分への radioactivity の移行が非常に低いことからみて, ヒトデにおいて lysophospholipase 活性は存在しないか, 存在してもこの条件下ではその活性を示さないものと考えられる. またリン脂質から diglyceride を生ずる CDP-choline: diglyceride choline phosphotransferase の逆反応も起らないと考えられる.

リン脂質に回収された radioactivity の分布状態を調べる為, 薄層クロマトグラフィーを行ない検出される各画分について count の測定を行なった結果 Table 2 下段に示されるように (D), (L) においてはほとんど全ての lecithin が lysolecithin となり phosphatidylethanolamine においても lysophosphatidylethanolamine 生成が著しかった. これはヒトデ臓器 (D), (L) が非常に高い phospholipase A 活性を有することを示している. なお (E) では phospholipase A 活性は非常に低いが phosphatidylethanolamine を基質にした場合にはかなりの活性が認められる.

盲検として酵素液を沸騰浴中 5 分間加熱変性後基質を加えて incubation を行なった場合の基質の分解を調べたが分解はほとんど起らず lecithin への radioactivity の回収は 98.9%, phosphatidylethanolamine では 94.9% であった. また加熱操作を行わず酵素液に有機溶媒を加えて

変性させた後基質を加えて抽出操作を行なったものについても回収率は lecithin に 98.2%, phosphatidylethanolamine に 96.1% という値であり, 操作中の基質の分解は考慮しなくて良いことが判る.

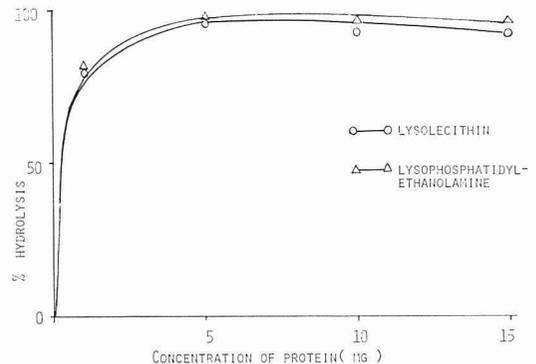


Fig. 1 Effect of protein concentration on hydrolyses of lecithin and phosphatidylethanolamine

3. 酵素活性測定における諸条件の検討

前実験において最も高い酵素活性を示した (L) を用いてその酵素蛋白量を減少させて検討した (Fig. 1).

この結果蛋白量 1 mg を用いた場合でも lecithin, phosphatidylethanolamine の 80~90% が水解されることが判った. 従って以下の実験において使用する蛋白量は 1 mg 以下となるよう調製した.

酵素活性の経時変化を Fig. 2a, b に示す. 使用したこれらの蛋白量は (D) 0.73 mg, (L) 0.76 mg である.

酵素活性は最初の 15 分間で急速に上昇し, その後も暫時上昇を示した. (D) の活性は (L) のそれに比して低い.

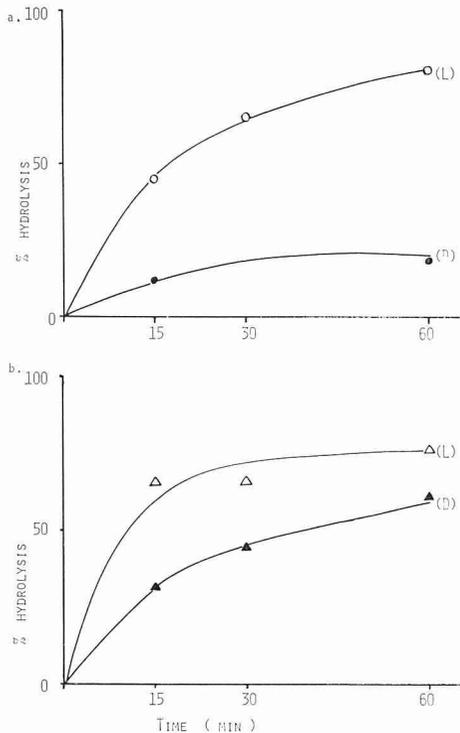


Fig. 2 Time course of hydrolysis

- a. Hydrolysis of lecithin
- b. Hydrolysis of phosphatidylethanolamine

次に α - ^{14}C -palmitoyl lecithin および α - ^{14}C -palmitoyl phosphatidylethanolamine を基質として用い、この酵素活性に対する pH の影響を観察した。この際、水解されて出来る脂肪酸に回収される count は phospholipase A_1 を、lysolecithin, lysophosphatidylethanolamine に回収される count は phospholipase A_2 活性を示すものとみなされる。

Fig. 3 a, b において pH 4~6 では 0.05 M アセテート緩衝液を用い pH 7~9 では 0.05 M Tris-HCl 緩衝液を使用した。

phospholipase A_2 に関して至適 pH は 7.4 であった。phospholipase A_1 に関しては phosphatidylethanolamine を基質とした場合にのみ酸性側 pH 5.7 にピークを示したが lecithin では著明なピークは観られなかった。

4. ヒトデ各臓器における phospholipase A_1 , A_2 活性の検討

Table 3 にはヒトデ各臓器を酵素材料として α - ^{14}C -palmitoyl lecithin および α - ^{14}C -palmitoyl phosphatidylethanolamine を基質として Tris-HCl buffer (pH 7.4) で incubate 後、脂肪酸および lyso-derivatives に

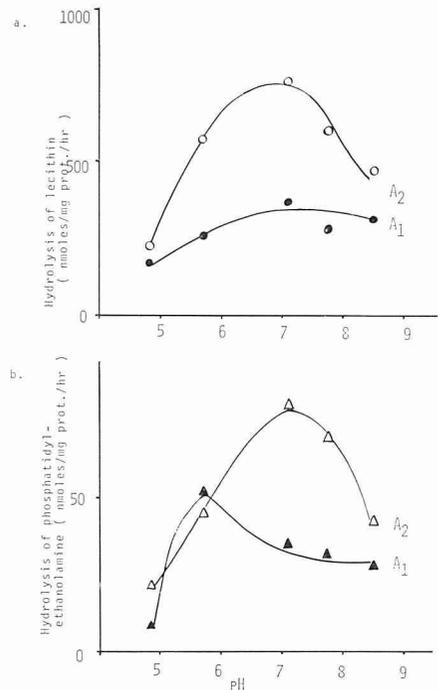


Fig. 3 Effect of pH on Hydrolysis

- a. Hydrolysis of lecithin
- b. Hydrolysis of phosphatidylethanolamine

回収された radioactivity を測定しこれを基質の specific activity で割ることによって求めた水解速度を示した。なお参考までに同一条件下で rat liver が示す水解速度をも記載した。この表からヒトデ臓器においては、rat liver に比べて非常に高い phospholipase A_1 , A_2 活性の存在することが判る。Rat liver では lysophospholipase が存在する為に水解された脂肪酸は phospholipase A_1 のみによるものとは考えることは出来ないが、ヒトデ臓器においては前述のごとく lysophospholipase 活性は無視し得るので脂肪酸への count は A_1 作用により、lyso-derivatives への count は A_2 作用によるものと考えてさしつかえない。

ヒトデ臓器において一般に A_2 活性は A_1 活性より高く (L) > (D) > (E) の順序にその活性は低い。

A_1 活性は phosphatidylethanolamine 基質の場合 (D) > (L) > (E) の順序になっているが、(D), (L) 共に lecithin の方が phosphatidylethanolamine の水解よりも速い。これと逆に (E) ではどちらかといえば phosphatidylethanolamine を水解しやすいという性質は前述の結果と一致する。

A_1 活性と A_2 活性の分離を試みる為にまずヒトデ (L) を超遠心分離し上清と沈渣とに分け、酵素活性の分布を観察

Table 3 Activity of Phospholipase A in Visceral Organs of Starfish
Incubation conditions were the same as for Table 2 except that α - ^{14}C -palmitoyl labelled substrate was used and enzyme protein was 0.73 mg (D), 0.76 mg (L) or 0.71 mg (E).
The isotopic distribution in α -position of lecithin was 90% and 96.5% in phosphatidylethanolamine checked by venom hydrolysis.

Substrate	Lecithin				Phosphatidylethanolamine			
	(D)	(L)	(E)	rat liver	(D)	(L)	(E)	rat liver
	m μ moles/mg portein/hr							
Free fatty acids formed	92.2	177.4	11.2	1.70	68.8	47.4	13.6	4.60
Lyso-derivatives formed	271.2	439.4	34.6	0.35	163.0	236.4	55.4	1.47

Table 4 Distributions of Phospholipase A₁ and A₂ Activities in Subfractions of Pyloric Caeca

Pyloric caeca (L) of starfish was homogenized with 9 vol. of water. Soluble fraction was the supernatant obtained after centrifugation of homogenate at 105,000 \times g for 60 min. Incubation conditions were the same as for Table 3.

	Soluble fraction	Precipitate	Homogenate	Homogenate with EDTA (2.5 \times 10 ⁻³ M)
	hydrolysis m μ moles/mg protein/hr			
Phospholipase A ₁	68.6	29.4	35.4	10.8
Phospholipase A ₂	37.0	117.2	80.8	0

した。Table 4 に phosphatidylethanolamine を基質として検討した値を示した。A₁ 活性は上清において比活性が高く、沈渣でやや低い。

A₂ 活性は沈渣部分で高く、上清では homogenate のそれのおよそ 1/2 になっている。

なおこの phospholipase A の活性に対する Ca²⁺ イオンの影響について Waite and Van Deenen⁴⁾ は rat liver を用いて EDTA が A₂ 活性を全く抑え、逆に A₁ 活性を促進するという報告をしている。Table 4 に (L) homogenate に 2.5 mM EDTA を添加した場合の phospholipase A 活性を示したがヒトデ臓器においてもその A₂ 活性は EDTA により完全に抑制された。また A₂ 活性についても 30% にまで抑制された。

考 按

凍結保存したヒトデ臓器は非常に高い phospholipase A 活性を有することが判明した。特に (L), (D) において酵素活性が高く phosphatidylethanolamine よりも lecithin をよりよく分解する能力を持つようである。しかし (E) では活性が非常に低く、lecithin よりもむしろ phosphatidylethanolamine 基質の場合の方が分解がよかった。

この傾向は rat liver の phospholipase A 活性と類似している^{7,8)}。またヒトデ臓器において lysophospholipase 活性は非常に低いことが示唆された (Table 2)。この事実はリン脂質組成の分析結果からも裏づけされる。(E) におけるリン脂質主成分は lecithin, phosphatidylethanolamine であったが (L), (D) においては lysolecithin, lysophosphatidylethanolamine が圧倒的に多く存在した。これは凍結保存あるいは凍結融解をくり返し行なうことによって元来組成として存在していた lecithin, phosphatidylethanolamine が組織中の phospholipase A により水解されて lyso-derivatives となり、かつ lysophospholipase 活性が低いあるいは保存に対して不安定な為に lyso-derivatives の蓄積となって現われるのではないかと考えられる。(E) では phospholipase A 活性が低い為に lecithin, phosphatidylethanolamine がほとんど水解されずにそのまま残っていると考えると都合よく理解出来る。

De Haas *et al.*⁹⁾ および Ottolenghi¹⁰⁾ らは膵臓および腸の phospholipase A の研究において trypsin が phospholipase A を活性化することを報告している。また Rimon and Shapiro¹¹⁾ からも -12° で少なくとも 2 週間保存しなければ活性の高い phospholipase A を得られない

と云う。一方 Camacho *et al.*¹²⁾ および Winter and Neurath¹³⁾ はヒトデの pyloric caeca に trypsin-like protease の存在を報告している

以上の諸事実を考え合せると、ヒトデ臓器とくに (L) (D) 中には凍結保存に対して安定な phospholipase A 活性が存在し、これが長期保存によってその活性を暫時増強したことが考えられるがその確証を得る為には新鮮なヒトデ臓器を用いた実験を待たねばならない。

総 括

ヒトデ臓器 pyloric caeca (L), cardial stomach (D), gonad (E) について phospholipase A 活性を測定し、その性質を検討した。

(L), (D) が非常に高い phospholipase A 活性を示したが (E) ではその活性が低かった。水解産物は lysolecithin, lysophosphatidylethanolamine および free fatty acids であり、水溶性画分には水解物を認めないことから lysophospholipase 活性はほとんど存在しないものと思われる。

(L), (D) の高い活性は主として phospholipase A₂ によるものであるが A₁ 活性も存在する。この phospholipase A₂ はその至適 pH を中性にもち、phosphatidylethanolamine よりも lecithin をより良く分解する。

ヒトデ臓器の Homogenate を 105,000×g 60 min 超遠心して得られた上清には A₁ 活性の 84% が回収されたが A₂ 活性は precipitate に高く約 60% が回収された。

(昭和 46. 7. 3 受付)

文 献

- 1) 秋野豊明, 下条 貞, 佐々木禎一: ヒトデ内臓脂質に関する研究 第一報. ヒトデ内臓各臓器の脂質成分について. 札幌医誌 **37**, 182-192 (1970).
- 2) Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr and R. J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem **193**, 265-275 (1951).
- 3) Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem. **226**, 497-509 (1957).
- 4) Waite, M. and L. L. M. Van Deenen: Hydrolysis of phospholipids and glycerides by rat liver preparations. Biochim. Biophys. Acta **137**, 498-517 (1967).
- 5) Arvidson, G. A.: Structural and metabolic heterogeneity of rat liver glycerophosphatides. Europ. J. Biochem. **4**, 478-486 (1968).
- 6) Bartlett, G. R.: Phosphorous assay in column chromatography. J. Biol. Chem. **234**, 466-468 (1959).
- 7) Scherphof, G. L. and L. L. M. Van Deenen: Phospholipase A activity of rat-liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta **98**, 204-206 (1965).
- 8) Bjørnstad, P.: Phospholipase activity in rat-liver microsomes studied by the use of endogenous substrate. Biochim. Biophys. Acta **116**, 500-510 (1966).
- 9) De Haas, G. H., 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).
- 10) Ottolenghi, A.: Phospholipase activity of rat tissues and its modification by trypsin. Lipids **2**, 303-307 (1959).
- 11) Rimon, A. and B. Shapiro: Properties and specificity of pancreatic phospholipase A. Biochem. J. **71**, 620-623 (1959).
- 12) Camacho, Z., J. R. Brown and G. B. Kitto: Purification and properties of trypsin-like proteases from the starfish *Dermasterias imbricata*. J. Biol. Chem. **245**, 3964-3972 (1970).
- 13) Winter, W. P. and H. Neurath: Purification and properties of a trypsin-like enzyme from the starfish *Evasterias trochelii*. Biochemistry **9**, 4673-4679 (1970).