

学 位 論 文 題 名

イトマキヒトデ幽門盲の由来ホスホリパーゼ A_2 の
構造・機能特性および大腸菌による発現に関する研究

学位論文内容の要旨

ホスホリパーゼ A_2 (PLA_2) 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。 PLA_2 は大豆レシチンから食用乳化剤（リゾレシチン）の製造に利用される有用な産業用酵素の1つである。また、海産生物由来のリン脂質を PLA_2 で分解することにより、医薬用原料のエICOSAPENTAENOIC 酸やドコサヘキサエン酸の製造も可能である。しかしながら、現在、試薬用としてブタ・ウシ膵臓、ヘビ・ハチ毒および微生物由来、産業用としてブタ膵臓由来の PLA_2 があるのみであり、今後さらに多様な酵素化学的特性をもつ新たな PLA_2 の探索と産業利用化が期待される。そこで本研究では、未利用海産無脊椎動物であるヒトデ類に着目し、 PLA_2 の検索・単離を行い、さらには産業的利用を考慮して、大量生産を目的とした大腸菌発現系の構築を検討した。

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）の幽門盲の由来ホスホリパーゼ A (PLA) 活性を調べた。幽門盲の由来をクロロホルム-メタノール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] の比活性値は、他の3種の比活性値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] および市販の工業用 PLA_2

の比活性より高く、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、イトマキヒトデの粗酵素[Ⅰ]のPLA比活性値は、粗酵素[Ⅱ]の比活性より高かったが、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。精製PLAは、トリグリセリドを加水分解せず、また、1-パルミトイル-2-オレオイル-*sn*-3-グリセロホスホコリンから*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の性質と同様であった。しかしながら、イトマキヒトデPLA₂は市販のブタ膵臓PLA₂と比べて約30倍高い比活性値を示し、また、ホスファチジルエタノールアミン (PE) よりもホスファチジルコリン (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は新たな特性を有するPLA₂として有用であると考えられた。

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、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。しかしながら、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、2残基および12残基が置換しており、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。

イトマキヒトデPLA₂はCa²⁺結合に関与するアミノ酸残基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、ブタ膵臓PLA₂のアミノ酸配列と比較して、pancreaticループに相当する部位に2残基のアミノ酸の欠損および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か、あるいは欠損していた。イトマキヒトデPLA₂は市販のブタ膵臓PLA₂と比べて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が、これらの性質は本酵素の有する特異な構造特性によるものと推察された。

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cDNAクローン1を組み込んだ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PLA₂が得られた。発現PLA₂はN末端アミノ酸が本来のSerからAlaに置換されたが、比活性値は市販のブタ膵臓PLA₂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、トマキヒトデ幽門盲のうから調製した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。

このことにより、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。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 林 賢 治
副 査 教 授 西 田 清 義
副 査 助 教 授 尾 島 孝 男

学 位 論 文 題 名

イトマキヒトデ幽門盲の由来ホスホリパーゼ A_2 の 構造・機能特性および大腸菌による発現に関する研究

ホスホリパーゼ A_2 (PLA_2) は、ホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンなどのグリセロリン脂質の 2 位結合の脂肪酸を選択的に加水分解する酵素であり、哺乳動物膵臓およびヘビ毒由来のものが古くから研究されている。 PLA_2 の産業上の供給源は、工業用としてブタ膵臓の PLA_2 があり、また、試薬用としてブタ膵臓・ウシ膵臓・ミツバチ毒・ヘビ毒・微生物の PLA_2 が利用されている。工業用のブタ膵臓 PLA_2 は、大豆レシチンに反応させて、消化吸収のよい機能性リゾレシチンの製造や食用乳化剤の製造等に利用される。また、海産生物由来のグリセロリン脂質を PLA_2 で加水分解することにより、医薬用原料のエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸の製造が可能である。水産動物の消化腺由来の PLA_2 は、これまでニチリンヒトデの幽門盲のうおよびマダイの幽門垂と肝膵臓から精製されているが、それらの PLA_2 の酵素的性質や構造に関する研究は少ない。本論文は、ヒトデ類の PLA_2 の検索を行い、粗酵素の PLA 活性値の高いイトマキヒトデ幽門盲のうより PLA_2 を精製・分離し、その酵素化学的特性および一次構造を明らかにし、さらに産業上の利用の観点から、イトマキヒトデ幽門盲のう PLA_2 の機能を活用するため、その PLA_2 を大量生産させる大腸菌発現系の構築を目的としたもので、審査員一同が評価した点は以下の通りである。

(1) 4 種のヒトデ類のうち、イトマキヒトデ幽門盲のうの PLA 比活性値が著しく高いことを明らかにした。イトマキヒトデ幽門盲のうの粗酵素から PLA の精製・分離を行い、クロロホルム-メタノール系の新規の脱脂法および Sephacryl S-200・DEAE-cellulose・Sephadex G-50 を用いた 4 段階のクロマトグラフィーの併用により PLA が電気泳動的に単一成分として分離さ

れた。精製 PLA₂ は、トリグリセリドを加水分解せず、1-パルミトイル-2-オレオイル-*sn*-3-グリセロホスホコリンから *sn*-2 位のオレイン酸を遊離させ、また、リン脂質の *sn*-2 位の脂肪酸をその鎖長や二重結合数によらず選択的に加水分解することから、PLA₂ であることを明らかにした。(2)本酵素の性質は、1 mM 以上の Ca²⁺により賦活され、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、また、最適 pH および最適温度は、それぞれ pH9.0 付近と 50 °C 付近であることを示した。さらに、本酵素はブタ膵臓 PLA₂ に比較して、比活性値が約 30 倍高く、また、ホスファチジルエタノールアミンよりホスファチジルコリンをよく加水分解する極性基特異性を有することを明らかにした。(3)イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ の全アミノ酸配列を解明し、本酵素の一次構造が、ブタ膵臓・ヘビ毒などの PLA₂ の一次構造と異なることを明らかにした。(4)イトマキヒトデの PLA₂ の cDNA をクローニングを行い、9 クローンが得られ、cDNA クローン 1 から演繹されたアミノ酸配列が、タンパク質から決定したアミノ酸配列と完全に一致することを示した。(5)イトマキヒトデ幽門盲のうの PLA₂ は、ブタ膵臓の PLA₂ のアミノ酸配列と比較して、pancreatic ループ部位に 2 残基のアミノ酸の欠損および β -ウイング部位に 16 残基の挿入と 3 残基の欠損が認められことより、新たな型の PLA₂ であることを明らかにした。また、イトマキヒトデ PLA₂ の酵素化学的特性と構造特性の相関性について論述した。(6)組換え DNA 法により、イトマキヒトデ PLA₂ の cDNA クローン 1 を用いた大腸菌発現系の構築を試みた。その結果、1,000 mL の大腸菌培養液から調製した粗 PLA₂ を 2 段階のクロマトグラフィーに供して、2.3 mg の精製 PLA₂ を製取した。その発現 PLA₂ は、イトマキヒトデ幽門盲のうから調製した PLA₂ と同様に、ブタ膵臓 PLA₂ よりも比活性値が高く、また、ホスファチジルエタノールアミンよりホスファチジルコリンをよく加水分解する極性基特異性を有することを明らかにした。(7)イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ の遺伝子を組込んだプラスミドを導入した大腸菌により、本 PLA₂ の量産化が可能であることを示した。

以上の結果は、ヒトデ類の有用物質の機能特性の解明とその高付加価値化の可能性を示しており、今後の海産生物素材の有効利用に寄与するものであることから、審査員一同は本論文が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。