

氏名・（本籍）	にし 西	だ 田	しげる 滋
学位の種類	理	学	博 士
学位記番号	理博第 578 号		
学位授与年月日	昭和53年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
研究科 専攻	東北大学大学院理学研究科 （博士課程）化学第二専攻		
学位論文題目	エラブウミヘビ毒せん中のホスホリパーゼAのアミノ酸配列		
論文審査委員	（主査） 教授 田 宮 信 雄 教授 高 瀬 嘉 平 教授 瀬 戸 秀 一		

論 文 目 次

第一章	序 論
第二章	材 料 と 方 法
第三章	結 果
第一節	エラブウミヘビ (<i>Laticauda semifasciata</i>) 毒液からのホスホリパーゼAの単離と性質
第二節	ホスホリパーゼA Iのアミノ酸配列
第三節	ホスホリパーゼA IIIの部分アミノ酸配列
第四章	考 察
	参 考 文 献

論文内容要旨

第一章 序 論

ホスホリパーゼ A₂ (EC. 3. 1. 1. 4) は天然に広く存在する酵素で、1,2-ジアシル-sn-グリセロール-3-ホスファチドの C-2 部位に作用し、脂肪酸エステルを加水分解する。この酵素はヘビやハチ等の毒腺や種々の動物組織をはじめ、植物や酵母、大腸菌などから精製されている。哺乳動物の組織中では酵素の活性は弱く、すい臓では酵素的に活性の低いチモーゲンとして分泌され、トリプシンにより活性化される。これに対し、ヘビ毒やハチ毒のホスホリパーゼ A₂ は活性が非常に高く、またヘビではコブラ科、マムシ科、クサリヘビ科、ウミヘビ科を含むすべてのヘビの毒腺中に存在する。

現在までに数多くの酵素が単離されており、その中で、多くのものは無毒性ないしは弱毒性であるが、 β -ブングアロトキシン等はホスホリパーゼ A₂ 作用と共に神経筋接合部の前シナプス膜に作用する presynaptic な神経毒作用をも合わせ持つ。また、Notexin や Myotoxin 等はホスホリパーゼ A 作用の他に、presynaptic な神経毒作用及び myoglobinuria 症を惹起させる。

ホスホリパーゼ A のタンパク質の構造と基質であるリン脂質との間の相互作用、及び、酵素作用と毒性の有無との相関性を知るために、その一次構造を明らかにすることは意義のあることと考えられる。本論文では、Laticauda semifasciata の 4 種のホスホリパーゼ A のうち、3 種を単離し (A I, A III, A IV), A I については完全アミノ酸配列、A III については部分アミノ酸配列を解明した。

第二章 材料と方法

エラブウミヘビ (L. semifasciata) は奄美諸島近海で捕獲後、断頭し、頭部を冷凍保存したもの。

ホスホリパーゼ A (A I, A II, A III, A IV) は Kudo らの方法で精製した。

タンパク分解酵素、試薬等の入手先。

カラムクロマトグラフィーの条件の説明。

ホスホリパーゼ A₂ の活性測定法の説明。

ディスク電気泳動の泳動条件等の説明。

還元カルボキシメチル化の方法及び酵素によるペプチドの切断、ブロムシアンによる化学的なペプチドの切断方法の説明。シトラコニル化の方法、ペプチドの分離法、口紙電気泳動、アミノ酸分析、エドマン分解法等の説明。

第三章 結 果

第一節 L. semifasciata の毒液中のホスホリパーゼAの単離と性質

【ホスホリパーゼAの単離】 ヘビ頭部より摘出した毒腺(27.8 g)をハサミで細断後、毒液を0.1 M酢酸8 mlで抽出した。残渣は8 mlの0.1 M酢酸で2回抽出した。合一した抽出液の遠心上清を0.01 Mリン酸緩衝液pH 6.4に対し一晚透析した。その遠心上清を同じ緩衝液で平衡化したCM-セルロースカラム(1.6 cm×40 cm)により分離した。す通りのタンパク画分が溶出後、食塩濃度を0 Mから0.2 Mまで直線的に上昇させ計800 ml流した。

この条件では、ホスホリパーゼAはす通りの位置にA I, エラプトキシンaと同じ位置にA II, より塩濃度の高い溶出位置にA III及びA IVが溶出されてくる。ホスホリパーゼA Iを精製するために、CMセルロースです通りする画分を集めて濃縮脱塩後、0.01 Mリン酸緩衝液pH 5.9で平衡化したCM-52カラム(1.6 cm×30 cm)を用いて食塩濃度を0 Mから0.2 Mまで直線的に上昇させ、A I画分を単離した。A II画分はエラプトキシンaと共に溶出されるため精製はできなかった。A III, A IVはCM-52カラムを用い、pH 6.4の0.01 Mリン酸緩衝液を用いた溶出条件で再クロマトグラフィーを行ない、共に精製した。pH 4.3及びpH 9.0のディスク電気泳動で単一のバンドを示したことからA I, A III, A IVは単一に精製された。酵素の分子量はSDSディスク電気泳動によりそれぞれA I 15,500, A III 14,500と求まった。アミノ酸分析の結果より、A I, A IIIはそれぞれ118個、119個のアミノ酸から成るタンパク質である。

第二節 ホスホリパーゼA Iのアミノ酸配列

ホスホリパーゼA IのN末端アミノ酸配列はエドマン法を還元カルボキシメチル化ホスホリパーゼA I (RCM-PLase A Iと略す)に適用し図1の様に求めた。

RCM化PLase A I (6 μ mole)を1/100量のトリプシンで37°C 2時間消化し、生じたトリプシンペプチドを0.02 M炭酸水素アンモニウムpH 7.8で平衡化したDE-52カラムを用いて分離した。溶出は炭酸水素アンモニウム濃度を0.6 Mまで直線的に上昇させることにより行った。この操作によりペプチドT-1, T-4, T-5, T-6, T-8が精製され、残りのペプチドはアミネックスA-4, セファデックスG-50又はG-25のいずれかのカラムクロマトグラフィーで単離できた。以上のペプチドのうちT-3 aをのぞく12個のトリプシンペプチドのアミノ酸組成はRCM-PLase A Iのアミノ酸組成を説明できた。

トリプシンペプチド(0.3 μ mole~0.5 μ mole)のアミノ酸配列をエドマン法により求めた。また比較的大きなペプチドT-3及びT-7については消去法をも併用して配列を確認した。この方法でT-2, T-4, T-5, T-6, T-8, T-9, T-10, T-12の8個のペプチドのアミノ酸配列が決定された。ペプチドT-3の構造解析は α -キモトリプシン消化によりT-3をT-3 a~T-3 eまでの5個の小フラグメントに細分し、アミノ酸15個から成るT-3 eを精製し、これを更にスタフィロコカスプロテアーゼで切断し、2個のペ

ペプチド T-3eI, T-3eII を得、これを基に T-3 の全構造を決定した。のこりの T-1, T-7, T-11 の三種のペプチドは後に述べる α -キモトリプシン消化により生ずるキモトリプシンペプチドを利用してアミノ酸配列を決定した。

トリプシンペプチド間の配列を明らかにし、又構造の決定されていないトリプシンペプチドのアミノ酸配列を知るために RCM-PLase A I を α -キモトリプシンで切断し、生じたペプチドを DE-52 カラムを用いて精製した。ペプチドの分離条件はトリプシンペプチドの分離と同じ条件で行った。

ペプチドの精製はセフデックス G-50, G-25, G-15 を用いたゲル濾過によって行った。C-1 から C-16 までの 16 種のペプチドのアミノ酸配列により、ホスホリパーゼ A-I のアミノ酸配列が明らかにされた。アミドの位置の決定は、ペプチドの濾紙電気泳動における移動度に基づく電荷により、又は、酵素によるアミノ酸への分解物を直接アミノ酸分析にかけることによって行った。

第三節 ホスホリパーゼ A III の部分アミノ酸配列

RCM-PLase A III の N 末端アミノ酸配列をエドマン法を用い、13 個のアミノ酸を決定した。

次に、PLase A III 中に存在する 2 個のメチオニン残基に着目し、メチオニン残基当り 250 当量のプロムシアンを加え、ペプチドを断片化した。生じた分解ペプチドはセフデックス G-50 を用いたゲル濾過により分離し、それぞれアミノ酸残基 59 個、8 個、52 個から成る 3 種のペプチドを得た。この 3 種のペプチドのアミノ酸組成から、PLase A III のアミノ酸組成は説明できた。CN-1, CN-2 の中にはメチオニン残基由来のホモセリン+ホモセリンラクトンが含まれること、また CN-1, CN-2, CN-3 の N 末端アミノ酸配列から、これら 3 種のペプチドが PLase A III 中では N 末端から順に CN-1, CN-2, CN-3 の順に並んでいることが判明した。CN-1 のリジン残基を可逆的修飾試薬である無水シトラコニル酸で保護した後、トリプシン消化により生じたペプチドをセフデックス G-50 を用いたゲル濾過により分離した。CN-1 a, CN-1 b, CN-1 c の三種のペプチドのアミノ酸組成が CN-1 のアミノ酸組成を説明できた。CN-1 a 中には CN-1 に 1 個しか含まれないフェニルアラニン残基があること、CN-1 c 中にはホモセリンが存在することから、この 3 種のペプチドの配列は CN-1 a, CN-1 b, CN-1 c の順である。

ペプチド CN-2 を更にトリプシンで消化した後、DE-52 カラムを用いてペプチドを分離し、CN-2 a, CN-2 b の 2 個のペプチドを得た。CN-2 a は CN-2 の N 末端ペプチドである。CN-2 及び CN-2 b へのエドマン法の適用により CN-2 の全配列が決定できた。CN-3 の N 末端アミノ酸 4 個をエドマン法で決定した。

以上により、PLase A III の 28 個のアミノ酸の配列が決定され、約 50 残基が A-I との相同性をもとに配列の推定が可能である。

第四章 考 察

Laticauda semifasciata 毒腺中から3種のホスホリパーゼAを単離精製した。

ホスホリパーゼA I は118個のアミノ酸から成る一本鎖のタンパク質で分子量は約15,500であり、1/2 Cysを14個持つ。

ホスホリパーゼA I は他のホスホリパーゼAとアミノ酸配列が酷似しており、特に、Notechis scutacus scutacus の毒腺中のNotexin, Notechis 5との相同性が高い。

1/2 Cys 残基も他のElapidae 科のへびやすい臓由来の酵素と同一位置にある。

他の酵素と同様48位にHis 残基があり、A I においてもこのHis 残基が活性中心をなすものと考えられる。

Bitis gabonica のホスホリパーゼA中のTrp-31が活性に必須と言われているが(Botesら,) A I ではAlaに置換しているため必須かどうか疑わしい。

ホスホリパーゼA I のTrp残基をN-Bromosuccinimideで酸化すると活性が減少し、反応速度にlog timeが現われることがKudoらによって示されたが、酸化されるTrp-65近傍は疎水領域であることから(Trp-62, Pro-63, Trp-65, Leu-67, Tyr-68, Tyr-70), Trp-65近傍はリン脂質の脂肪酸の疎水性部分との結合部位かも知れない。

ブタすい臓のホスホリパーゼA₂のX線解析から、活性に必須なHis-48残基の近傍にはTyr-28, Asp-96が存在するが、これらは全てのホスホリパーゼAに共通であることから、活性発現に何らかの関与をしているものと考えられる。

ホスホリパーゼA₂は活性発現にCa²⁺イオンが必須である。Ca²⁺イオンはAsp-96, Arg-43の残基の近傍に存在している事がX線解析から明らかにされている。Ca²⁺イオンはHis-48残基からも遠くない位置にある。おそらく基質のリン酸部分はCa²⁺イオン及びArg-43に結合するものと考えられる。

〔 図-1 〕 ホスホリパーゼA I のアミノ酸配列

N L V Q ⁵F S N V I ¹⁰Q C N L K ¹⁵G S R A S ²⁰Y
H Y A D ²⁵Y G C Y C ³⁰G A G G S G T P V D ⁴⁰E
L D R C ⁴⁵C K I H D ⁵⁰N C Y G E ⁵⁵A E K M G ⁶⁰C
Y P K W ⁶⁵T L Y T Y ⁷⁰E S C T D ⁷⁵T S P C D ⁸⁰E
K T G C ⁸⁵Q G F V C ⁹⁰A C D L E ⁹⁵A A K C F ¹⁰⁰A
R S P Y ¹⁰⁵N N K N Y ¹¹⁰N I D T S ¹¹⁵K R C ¹¹⁸K

論文審査の結果の要旨

西田滋提出の論文はエラブウミヘビ毒腺中に存在する4種のホスホリパーゼAのうち2種についてアミノ酸配列を明らかにしたものである。

蛇毒毒液にはホスホリパーゼ活性を有するものが多い。最近、presynapticに作用するある種の神経毒のアミノ酸配列が明らかにされ、それがホスホリパーゼと類似の構造をもつことが示された。又そのような毒に弱いながらホスホリパーゼ作用があることも明らかになった。

ホスホリパーゼの活性と毒性の関係は現在不明であるが、西田はその解明に寄与すべく、蛇毒中のホスホリパーゼの構造研究を行った。

ここに選んだ2種のホスホリパーゼは、一方は活性が強く他方は活性が弱い。弱い方のもの(ホスホリパーゼAⅢ)は脂肪酸を加えると活性化される。しかし両者とも毒性は持たない。

研究の結果、ホスホリパーゼAⅠ(活性の強い方)はアミノ酸118ケから成り、他のホスホリパーゼ及びNotexin及びNotechis 5と呼ぶ有毒タンパクと構造が類似している。そして活性中心と考えられるHis-48, Tyr-28, Asp-96, Arg-43等をもつ。しかしこれまで活性に必要と云われて来たTrp-31はAlaに置換している。

ホスホリパーゼAⅢはアミノ酸119ケから成りAⅠとよく似ている。しかし65位にTrp(AⅠでは64に相当)がない。この近傍は疎水性に富み、基質の結合に関与すると思われる。

以上、西田提出の論文は2種のホスホリパーゼのアミノ酸配列を明らかにし、その酵素作用と構造の関係に新たな知見を加えたものである。よって西田滋提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。