

Title	Penicillium notatumホスホリパーゼBに関する研究
Author(s)	菅谷, 純子
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33158">https://hdl.handle.net/11094/33158</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	菅 谷 純 子
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 5 4 4 1 号
学位授与の日付	昭和 56 年 10 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	<b>Penicillium notatum</b> ホスホリパーゼBに関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 青沼 繁 (副査) 教授 近藤 雅臣 教授 鎌田 皎 教授 岩田平太郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 緒 論

ホスホリパーゼはリン脂質のエステル結合を加水分解する酵素の総称である。一般によく知られている消化酵素としての役割に加えて、生体膜の機能と結びついた生理作用をもつことが知られており、脂質代謝の上で重要な酵素である。一方、試薬として用いて膜構造の解析や膜結合酵素の可溶化などその酵素作用の応用においても有用性が示唆されている。種々のホスホリパーゼのうちホスホリパーゼA<sub>2</sub>については一次構造まで決定され、構造と機能の研究が進んでいるが、ホスホリパーゼBについてはその存在すら明らかでなかった。近年、diacylglycerophospholipidの2つの脂肪酸エステル結合の両方を加水分解するホスホリパーゼB (diacylglycerophospholipid diacylhydrolase) の精製が進み、その作用が単一酵素に基づくと考えられる事実が集積されつつある。著者はこのホスホリパーゼBに関する基礎的な知見を得ることを目的として、ホスホリパーゼBを *Penicillium notatum* 菌体から単離し、まずタンパク質化学的性質(アミノ酸組成、糖組成、分子量、等電点)を検討した。次に種々の基質を半合成的に調製し、基質特異性ならびに活性阻害、促進の面から酵素化学的性質を検討した。さらに *Penicillium notatum*

菌体に存在するプロテアーゼによるホスホリパーゼBの酵素活性調節機構についても基礎的な検討を加えた。

## 本 論

### 第一章 *Penicillium notatum* ホスホリパーゼBのタンパク質化学的性質

*Penicillium notatum* 菌体からのホスホリパーゼBの単離には、水抽出液をpH 4.0で等電点分画し、さらに、硫酸アンモニウムで処理(75%飽和上清)したのち、Sephadex G-200のゲルろ過、DEAE-Sephadex A-50のイオン交換クロマトグラフィー、デンプン粒電気泳動、アンホライン等電点電気泳動を行なってディスク電気泳動的に単一の標品を得た。

次に、本酵素のタンパク質化学的性質を検討した。この際、リン脂質の脂肪酸エステル結合を加水分解するという点でホスホリパーゼBと作用が類似しているホスホリパーゼA<sub>2</sub>(diacylglycerophospholipid 2-acyl hydrolase)やリゾホスホリパーゼ(monoacylglycerophospholipid monoacyl hydrolase)とタンパク質化学的性質を比較した。その結果、アミノ酸組成には比較的親水性のものが多く、蛇毒や豚臓のホスホリパーゼA<sub>2</sub>に特徴的な高含量のシスチンは認められなかった。Table Iに示す如く、糖組成としてタンパク質重量当たり14%のマンノース、7.8%のグルコース、5.7%のグルコサ

TABLE 1. Carbohydrate composition of *Penicillium notatum* phospholipase B.

	μmol per 100mg protein
Mannose	78.3
Glucose	43.3
Glucosamine	26.3

ミンを含有する糖タンパク質であった。一方、等電点はpH 4.0であり、牛豚・肝臓のリゾホスホリパーゼや *Vibrio haemolyticus* のリゾホスホリパーゼと同様、酸性タンパク質であった。ゲルろ過法による分子量の測定では116000を示し、蛇毒や豚臓のホスホリパーゼA<sub>2</sub>の分子量が約15000であるのと比べると非常に大きな分子である。

## 第二章 *Penicillium notatum* ホスホリパーゼ B の基質特異性

ホスホリパーゼ B 活性やリゾホスホリパーゼ活性の測定は、基本的には遊離 glycerophosphocholine を King の方法あるいは Wells & Dittmer の方法で定量した。一方、化学構造の違いに基づく基質特異性を検討するために、放射活性な diacylglycerophosphocholine (D 体ならびに L 体)、1-O-alk-1'-enyl (1-O-alkyl)-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine を調製し、活性の測定には反応産物の放射活性を計測した。

牛臍・肝臓のリゾホスホリパーゼがいわゆるリパーゼ作用やカルボキシエステラーゼ作用を併せもつ基質特異性の広い酵素であることから、本酵素についても種々の条件下で triacylglycerol や diacylglycerol に対するリパーゼ作用ならびにカルボキシエステラーゼ作用を検討した。その結果、これらの作用は認められず、基質特異性の狭いホスホリパーゼであることが明らかとなった。本酵素の至適 pH 3.8-4.0 において、水溶液中で diacylglycerophospholipid に近い物理化学的性質を示す monoacylglycerol に対して加水分解触媒作用が認められた。しかしながら、その水解活性は非常に弱く、陰イオン性界面活性剤の taurocholate を添加すると約 100 倍に増大してホスホリパーゼ B 活性と同程度になることから、活性の発現に phosphate あるいは sulfate といった酸性の極性基を必要としていることが示唆された。立体特異性として、Table II に示したように、diacylglycerophosphocholine の

TABLE II. Stereo-specific hydrolyses of dipalmitoyl-sn-glycero-1 and 3-phosphocholines by *Penicillium notatum* phospholipase B.

Substrate	CHCl <sub>3</sub> phase		H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> OH phase
	Phosphorus (nmol)	Free fatty acid (nmol)	Glycerophosphocholine (nmol)
1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	50	6690	3450
rac-1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	1700	4740	1700
2,3-Dipalmitoyl-sn-glycero-1-phosphocholine	3420	2830	30

L体に対しては2つの脂肪酸エステル結合の両方を加水分解するが、D体に作用させると1モルの脂肪酸と1モルのmonoacyl-sn-glycerol-1-phosphocholineに分解することを認めた。D体の加水分解産物をホスホリパーゼCを用いて加水分解して、得られたmonoacylglycerolをトリメチルシリル誘導体とし、GC-MS分析を行なったところ2-acyl体であったことから、D体にはC-1位の脂肪酸エステル結合にのみ作用しC-2位には作用しないことが明らかになった。次に、C-1位とC-2位のacyl基の鎖長が同じリゾリン脂質を用いてリゾホスホリパーゼ活性の位置特異性を検討したところ、1-acyl体に特異的に作用することを認めた。一方、非イオン性ならびに陰イオン性の界面活性剤はホスホリパーゼB活性に促進的に作用したが、リゾホスホリパーゼ活性には阻害的に作用し、基質の物理化学的性状が変化すると基質特異性も変化することを認めた。

基質特異性として、Fig. 1に示したように、L体のdiacylglycerophospholipidのC-1位とC-2位、D体のdiacylglycerophospholipidのC-1位、1-O-alkyl-2-acylglycerophospholipidのC-2位の脂肪酸エステル結合ならびにmonoacylglycerophospholipidの脂肪酸エステル結合を加水

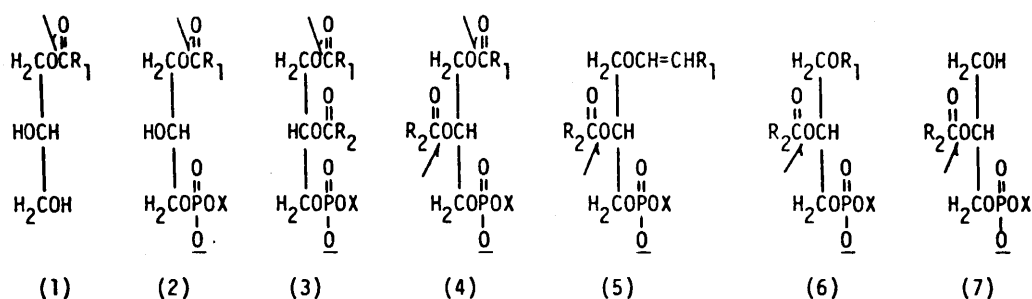


Fig. 1. Hydrolyses of various lipids by *Penicillium notatum* phospholipase B.

(I) Insoluble swelling amphiphiles

Monoacylglycerol(1), 2,3-Diacylglycerophospholipid(D-isomer)(3), 1,2-Diacylglycerophospholipid(L-isomer)(4), 1-O-Alk-1'-enyl-2-acylglycerophospholipid(5), 1-O-Alkyl-2-acylglycerophospholipid(6)

(II) Soluble amphiphiles with lyotropic mesomorphism

1-Monoacylglycerophospholipid(2), 2-Monoacylglycerophospholipid(7)

分解することから、本酵素はホスホリパーゼA<sub>1</sub>(diacylglycerophospholipid 1-acyl hydrolase)活性、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>活性ならびにリゾホスホリパーゼ活性を同一酵素タンパク質中に有していることが明らかとなった。この際、L体のdiacylglycerophospholipid、D体のdiacylglycerophospholipid、1-O-alkyl-2-acylglycerophospholipidを用いてホスホリパーゼB、そのA<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>活性をそれぞれ単独に測定する方法を確立した。

第三章 *Penicillium notatum* ホスホリパーゼBに対する活性阻害作用ならびに活性促進作用

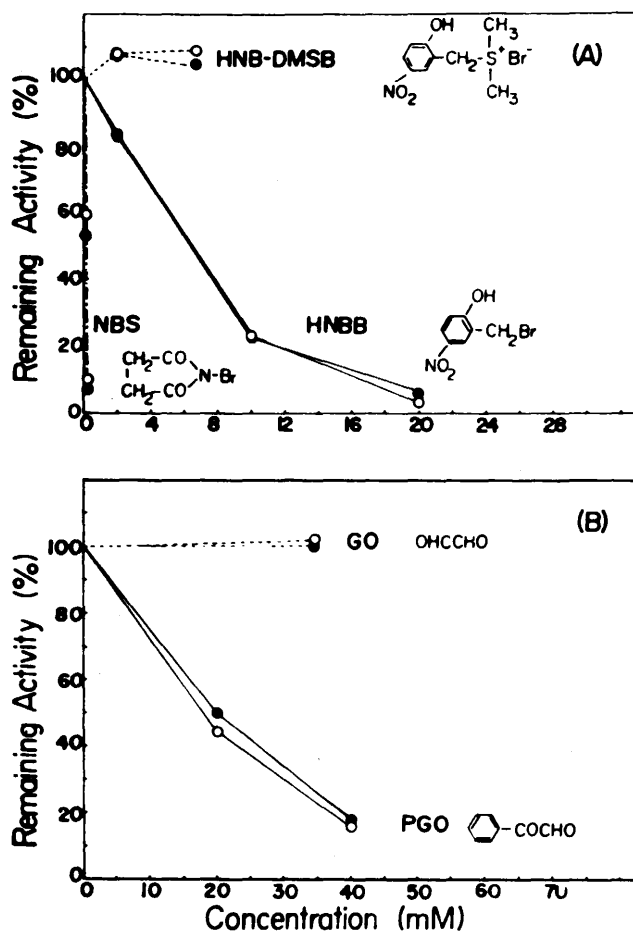


Fig. 2. Effects of various reagents on phospholipase B and lysophospholipase activities of *Penicillium notatum* phospholipase B.

●, phospholipase B activity; ○, lysophospholipase activity.

本酵素はホスホリパーゼ B 活性とリゾホスホリパーゼ活性を同一のタンパク質中に含有しており、この両活性を支配している活性部位の性質を明らかにするために化学修飾試薬と処理した。その結果、Fig. 2 に示したように、トリブトファン修飾試薬の N-bromosuccinimide や 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide、アルギニン修飾試薬の phenylglyoxal が両活性を常に同程度に不活性化したことから、同一の活性部位が両活性を支配している可能性が強く示唆された。一方、上記試薬と同様の反応性を有しかつより親水性の修飾試薬は両活性に影響をおよぼさなかったことから、修飾試薬の疎水性（部分）が両活性の不活性化に重要な役割を果たしていると推察された。

次に酵素活性に影響をおよぼす臨床上の薬物についてであるが、疎水性部分と親水性部分からなる両親媒性でかつ塩基性の薬物が phospholipidosis の原因となり得ることが明らかにされ、一方、抗生物質には疎水性の強い両親媒性のものが多く、さらに chlorpromazine や dibucaine など向精神薬や局所麻酔剤はホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の阻害剤として知られていることから、これら薬物がホスホリパーゼ A<sub>2</sub>、B、C の活性にどのような影響をおよぼすかを検討した。その結果、Table III に示したように、塩基性で両親媒性の chlorpromazine や dibucaine が *Penicillium notatum* ホスホリパーゼ B ならびに *Bacillus cereus* ホスホリパーゼ C に阻害的に作用することを認めた。しかしながら、

TABLE III. Effects of various drugs (5 mM) on the hydrolyses of egg yolk 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine by *Crotalus adamanteus* phospholipase A<sub>2</sub>, *Penicillium notatum* phospholipase B and *Bacillus cereus* phospholipase C.

Drug	Enzyme activity (μmol per min per mg protein) <sup>a)</sup>		
	Phospholipase A <sub>2</sub>	Phospholipase B	Phospholipase C
No addition	34.0 ± 0.3 (100) <sup>b)</sup>	446.4 ± 3.4 (100) <sup>b)</sup>	114.0 ± 3.1 (100) <sup>b)</sup>
Chloramphenicol	28.7 ± 0.1 (84)	631.1 ± 7.2 (141)	87.7 ± 6.9 (77)
Disodium carbenicillin	33.8 ± 0.3 (99)	575.6 ± 9.3 (129)	121.8 ± 3.7 (107)
Erythromycin	37.5 ± 0.1 (110)	420.7 ± 8.4 (94)	109.5 ± 2.3 (96)
Oleandomycin phosphate	27.7 ± 0.3 (81)	461.2 ± 12.0 (103)	69.5 ± 1.4 (61)
Bleomycin hydrochloride (-Cu)	33.9 ± 0.2 (100)	340.8 ± 8.4 (76)	52.4 ± 0.4 (46)
Polymyxin B sulfate	33.2 ± 0.4 (98)	392.5 ± 6.3 (88)	121.5 ± 1.7 (107)
Chlorpromazine hydrochloride	21.7 ± 0.3 (64)	265.3 ± 4.8 (59)	72.1 ± 1.6 (63)
Dibucaine hydrochloride	37.4 ± 0.4 (110)	335.5 ± 1.9 (75)	77.9 ± 3.4 (68)

a) Mean ± SD (n=3).

b) Figures in parentheses were expressed as a percent of control taken as 100%.

chlorpromazine や dibucaine など三級アミンを含有する向精神薬や局所麻酔剤は用いる濃度によってホスホリパーゼA<sub>2</sub>に促進的にも働くことが知られており、本酵素に対しても用いる濃度によって促進作用が認められた。疎水性の強い両親媒性の抗生物質である chloramphenicol や oleandomycin はホスホリパーゼA<sub>2</sub>やCに阻害的に作用したが、本酵素のホスホリパーゼB活性には chloramphenicol は逆に促進的に作用した。塩基性で両親媒性の薬物ならびに疎水性の強い薬物がホスホリパーゼの活性に促進的にも阻害的にも作用することから、これら薬物の臨床上的の使用において生体膜ならびにその機能におよぼす影響に注意が必要と考えられる。

#### 第四章 *Penicillium notatum* 菌体に存在するプロテアーゼによるホスホリパーゼBの酵素活性調節機構に関する検討

*Penicillium notatum* の内在性プロテアーゼがホスホリパーゼBタンパク質を限定分解する際、分子量・糖組成は変化しないが、卵黄1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine に対する水解活性が低下することから、内在性プロテアーゼがホスホリパーゼB活性を *in vivo* に調節している可能性が示唆されている。本章では、この内在性プロテアーゼによる限定分解をうけて酵素作用がどのように変化したかを基質特異性の面から検討した。その結果、Table IV に示したように、内在性プロテアーゼによる限定分解をうけた

TABLE IV. Kinetic parameters of purified native and modified phospholipase B with various 1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphocholines.

Substrate	Vmax (μmol per min per mg protein)			Km(mM)	
	Native phospholipase B	Modified phospholipase B	Ratio	Native phospholipase B	Modified phospholipase B
1,2-Dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (C <sub>8:0</sub> PC)	2480	1950	0.79	2.9	4.8
1,2-Didecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (C <sub>10:0</sub> PC)	1290	455	0.35	1.0	2.4
1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (C <sub>16:0</sub> PC)	578	123	0.21	0.82	0.82

Vmax and Km values were obtained from Lineweaver-Burk plots.

modifiedタイプでは長鎖 diacylglycerophospholipid (閉鎖二重膜リポソームを形成する基質) に対する反応性が著しく低下していたが、短鎖



diacylglycerophospholipid (ミセルを形成する基質)ならびに monoacylglycerophospholipid (ミセルを形成する基質) に対する水解活性はほとんど変化しないことを認めた。このように、ミセルを形成する基質に対しては最大反応速度がほとんど変化しないことから、ホスホリパーゼ B の反応部位自体は内在性プロテアーゼの作用をうけたのちにも機能していることが示唆された。Triton X-100 と混合ミセルを形成した長鎖 diacylglycerophospholipid (dipalmitoylglycerophosphocholine) を基質として用いて両タイプの酵素作用を比較したときも、最大反応速度にほとんど差が認められず、先の考えを支持する結果が得られた。さらに、第二章で開発した測定法を用いてホスホリパーゼ B 活性、その A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 活性をそれぞれ単独に測定し、内在性プロテアーゼの作用をうけてこれらの活性がどのように変化したかを検討した。その結果、Table V に示す如く、ホスホリパーゼ B に含まれるホスホリパーゼ A<sub>1</sub> 活性ならびにホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 活性はホスホリパーゼ B 活性と同様の挙動を示し、いずれも同程度に低下したことから、ホスホリパーゼ A<sub>1</sub> 活性あるいはホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 活性のいずれか一方の活性部位が損なわれたためにホスホリパーゼ B 活性の低下を来したのではないことが明らかとなった。

TABLE V. Hydrolyses of various glycerophospholipids by purified native and modified phospholipase B.

Substrate	Native phospholipase B ( $\mu\text{mol per min per mg protein}$ )	Modified phospholipase B	Ratio
<u>Phospholipase B activity</u>			
Egg yolk 1,2-diacyl-sn-glycerol-3-phosphocholine	602	155	0.26
1,2-Dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine	364	92	0.25
<u>Phospholipase A<sub>1</sub> activity</u>			
2,3-[1- <sup>14</sup> C]Dipalmitoyl-sn-glycerol-1-phosphocholine	164	38	0.23
<u>Phospholipase A<sub>2</sub> activity</u>			
1-O-Alkyl-2-[1- <sup>14</sup> C]palmitoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine	161	45	0.28

以上の結果から、内在性プロテアーゼによる限定分解をうけて本酵素の酵素活性が低下しても触媒作用の位置特異性は変化しないこと、内在性プロテアーゼによる限定分解をうけた "modified" 酵素と本来の "native" 酵素の酵素作用の違いが水溶液中で種々の物理化学的状态を呈する基質に対する反応性の違いに起因していることが示唆された。

- 1) *Penicillium notatum* 菌体の水抽出物から単離したホスホリパーゼ B は、等電点 pH 4.0、分子量 116000、タンパク質重量当たり約 30% の糖を含む糖タンパク質であった。
- 2) 至適 pH は 3.8-4.0 で酸性側にあり、diacylglycerophosphocholine の脂肪酸エステル結合の加水分解を、L 体に対しては C-1 位と C-2 位の両方で、D 体に対しては C-1 位でのみ触媒する立体特異性を有していた。さらに位置特異性を検討した結果、ホスホリパーゼ A<sub>1</sub> 活性、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 活性ならびにリゾホスホリパーゼ活性を同一酵素タンパク質中に有していることが明らかとなった。
- 3) ホスホリパーゼ B に含まれるホスホリパーゼ A<sub>1</sub> 活性ならびにホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 活性をそれぞれ単独に測定する方法を確立した。
- 4) 化学修飾試薬の N-bromosuccinimide、2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide、phenylglyoxal はホスホリパーゼ B 活性とリゾホスホリパーゼ活性を常に同程度に不活性化した。
- 5) 界面活性剤の Triton X-100 や taurocholate、抗生物質の chloramphenicol はホスホリパーゼ B 活性に促進的に作用した。一方、向精神薬の chlorpromazine や局所麻酔剤の dibucaine は阻害的に作用することを認めた。
- 6) *Penicillium notatum* の内在性プロテアーゼによる限定分解をうけて、長鎖 diacylglycerophosphocholine に対する水解活性が著しく低下したが、短鎖 diacylglycerophosphocholine や monoacylglycerophosphocholine に対する水解活性はほとんど変化しなかった。この際、ホスホリパーゼ B 活性とホスホリパーゼ B に含まれるホスホリパーゼ A<sub>1</sub> 活性ならびにホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 活性は同様の挙動を示し、いずれも同程度に低下した。従って、内在性プロテアーゼにより限定分解されたのちも、ホスホリパーゼ B の反応部位自体は機能しており、酵素分子の立体構造の変化が閉鎖二重膜構造のリン脂質凝集体-水界面での反応性の低下を来したものと推察された。

## 論文の審査結果の要旨

ホスホリパーゼBを*Penicillium notatum*菌体から単離し、タンパク質化学的性質（アミノ酸組成、糖組成、分子量、等電点）を確認し、さらに種々の基質を半合成的に調製し、基質特異性ならびに活性阻害、促進の面から酵素化学的性質を明らかにした、加えて、菌体に存在するプロテアーゼによるホスホリパーゼBの酵素活性調節機構についても論述した。

よって学位論文として認める。