

琉球大学学術リポジトリ

ハブ毒ホスホリパーゼ A のニワトリ血清への作用(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 知念, 功, Chinen, Isao メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4460

ハブ毒ホスホリパーゼAのニワトリ血清への作用

知 念 功*

Isao CHINEN : Phospholipase A activity of Habu snake
venom by using chicken serum as a substrate

I 緒 論

沖縄および奄美群島には、*Crotalidae* 科に属するハブが棲息しており、この蛇は、蛇毒を有し毎年人畜に対し著しい被害と恐怖を与えている。そのためこの毒蛇および蛇毒に関する研究に対しては、大きな期待と興味を持たれている。

この毒蛇は、顎の毒腺より毒牙を通して毒液つまり蛇毒を分泌するが(1)、この液は粘稠な乳白色であり、固形物は20~30%(2)であるがその90~92%は蛋白質であり(3)、その他に少量の有機物、無機物等を含有する。つまりこの蛇毒では、蛋白質が主成分であり、これらが主体となって毒作用を示し、種々の酵素作用を示すようである。

本研究では、生化学的見地からこの蛇毒の酵素作用を究明していくことにし、今回は、この一環として、この蛇毒中のホスホリパーゼAの酵素活性の測定法を検索することにした。この酵素は、リン脂質(特にホスファチジルコリン)等に作用し、不飽和脂肪酸とリゾレシチンを生成する(4)ことが知られているところから本研究では、本酵素の活性を測定するに際しては、この酵素の作用によって生成してくる単位時間当りの脂肪酸を定量した。また先述のように本酵素は、リン脂質等に作用するため、本研究では、これらのリン脂質等が水溶性の状態が存在しているニワトリ血清を本酵素反応の基質として用いることをこころみた。その結果、このニワトリ血清は十分に基質としての役割をすることを認めた。以下にその結果を報告する。

II 実験材料および方法

1. 使用ニワトリおよび血清分離法 ニワトリは、白色レグホン種の雄鶏(体重1.00~1.5kg)を用い、血液は頸動脈より採取し、これをただちに氷中に放置して凝固させたのち、注意深く細片にし、8,000rpmで20分間冷凍遠心を行い、その上清を血清として用いた。また以下の酵素反応で基質として用いるまでは冷凍庫内に保存した。

2. ハブ毒酵素液の調製 ハブ毒は、凍結乾燥によって得られた粉末を用い、これを0.1%溶液に調製し原液として冷凍庫内に保存し、これを実際に酵素として用いる場合は、さらに50倍に希釈して用いた。

3. 酵素活性の測定法 ニワトリ血清1mlにハブ毒酵素液を0.1ml添加し(反応をとめておくため、この操作は氷中で行った。)41°Cで1時間インキュベートを行ったのち氷中に放置して酵素反応を停止しておき、エーテルを加えて遊離脂肪酸を抽出し、前報(5)で記述した遊離脂肪酸の定量法に従って遊離脂肪酸を定量した。なおあらかじめ基質として用いた血清中の遊離脂肪酸量も求めておき、その差をも

* 琉球大学農学部農芸化学科

って生成脂肪酸量とした。

4. 遊離脂肪酸の定量法 前報(5)で詳しく述べたので省略する。

5. 脂質分析法 本酵素を、基質として用いているニワトリ血清に作用した場合のその血清中の脂質の変動を知る必要から、ハブ毒酵素液を作用させる前後で血清中の総脂質、リン脂質、トリグリセリド、遊離コレステロール、総コレステロール、エステル型コレステロール（間接的に計算により総コレステロールと遊離コレステロールの差によって求めた）および遊離脂肪酸を定量した。また総脂質と遊離脂肪酸については、その脂肪酸組成をケン化、メチル化したのちガスクロマトグラフィーで求め、比較検討した。なおこれらの定量法についても前報(5)で詳細に述べたので省略する。

6. 血清リポ蛋白質の電気泳動法 本酵素反応を行う前後で、血清中のリポ蛋白質を電気泳動法によって分離し、その変動を調べた。その方法の詳細については前報(5)で述べた。

III 実験結果

1. 酵素濃度の影響 基質として用いている血清の量を一定 (1 ml) にし、ハブ毒酵素量を 0.05 ml より 0.5 ml まで増加して加え、これらの反応系を水で補正して一定にしたのち 41°C で 1 時間インキュベーションを行い、その間に生成される脂肪酸を定量した。その結果を Fig 1 に示した。酵素濃度が高くなるに従い生成される脂肪酸量もこれに比例して増加することを認めた。

2. 基質濃度の影響 ハブ毒酵素量を一定 (0.1 ml) にし、基質として用いた血清量を 1.0 ml より 1.8

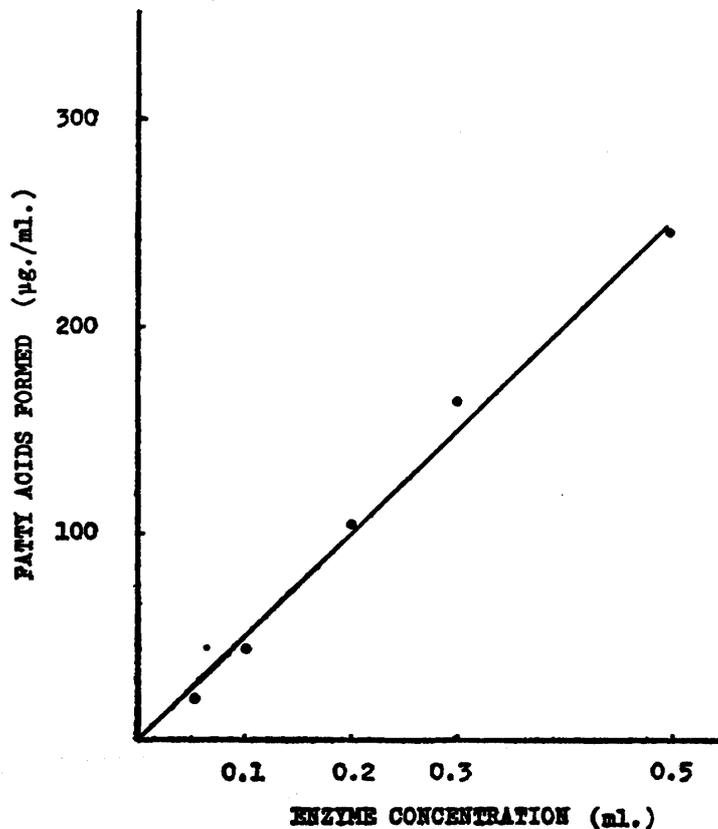


Fig. 1. Relationship of phospholipase A activity in Habu snake venom to the enzyme concentration

mlまで変えて加えたのちこれらの反応系を水で補正して一定としたのち41°Cで1時間インキュベートを行い、生成してくる脂肪酸を定量した。その結果をFig 2に示した。このようにして基質として用い

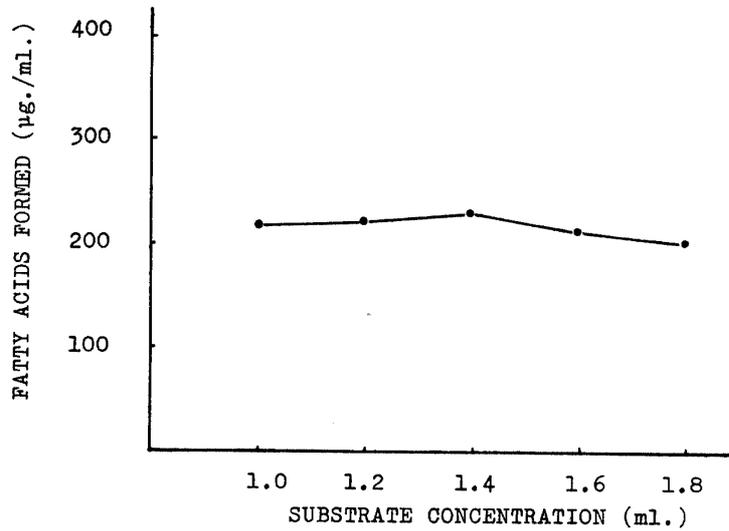


Fig. 2. Effect of substrate concentration on phospholipase A activity.

た血清の濃度を変えて本酵素反応を行った場合には、生成してくる脂肪酸量は常に一定であり 200~226 µgであった。

3. 反応時間の影響

基質として用いた血清 1 mlに酵素液を0.1ml加えて反応時間を0.5, 1, 2, 3および5時間と変えて

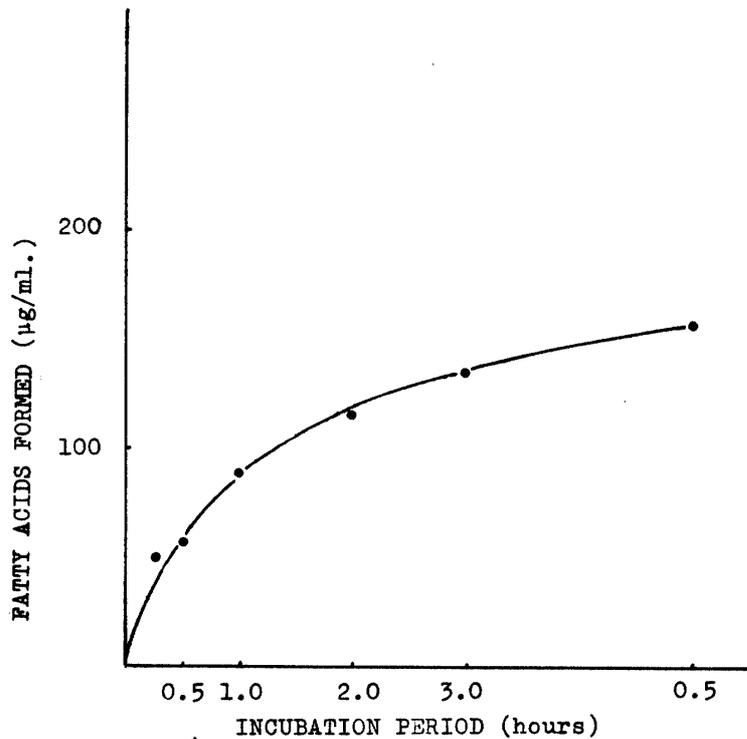


Fig. 3. Phospholipase A activity as a function of incubation time

反応を行い、その間に生成してくる脂肪酸を定量した。その結果をFig. 3に示した。反応時間が長くなるに従い生成される脂肪酸量も増加したが、1時間までは急激な増加を示し、1時間以後はややゆるやかな増加を示した。

4. 反応温度の影響

反応系は、前項3と同様に血清1 mlに酵素液を0.1 ml加えた。反応温度は、10, 20, 30, 40, 50, 60 および70°Cと変え、1時間インキュベートを行い、その各温度で生成する脂肪酸を定量した。その結果をFig. 4に示した。このように反応温度を変えた結果では、50°Cまでは、生成される脂肪酸量も増加す

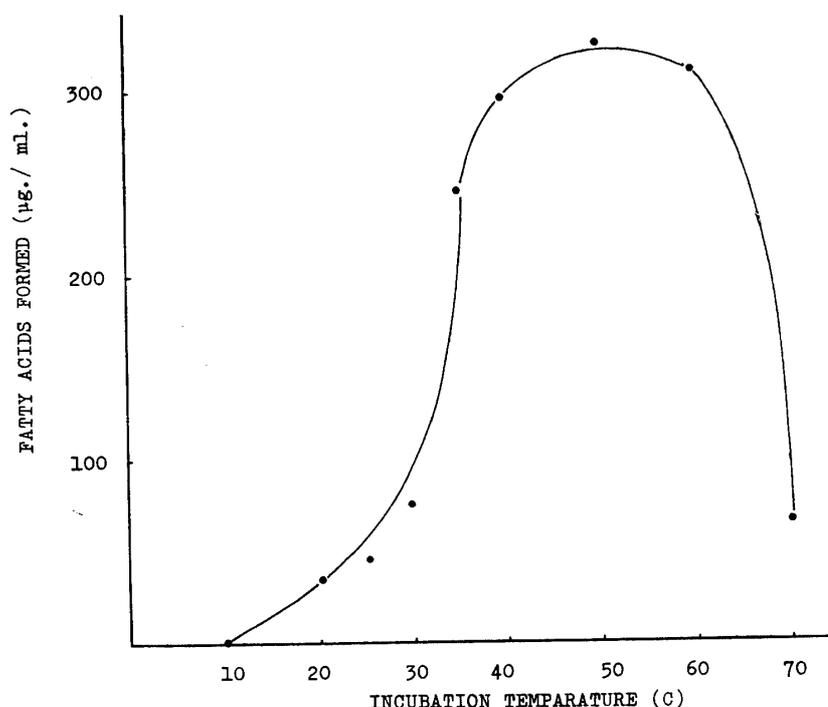


Fig. 4. Effect of reaction temperature on phospholipase A activity

るが、50°C以上では逆に減少し、70°Cでは急激な減少を示した。その結果からニワトリ血清を基質として用いた場合の本酵素反応の至適温度は50°Cであることを認めた。

5. pHの影響

基質として用いた血清のpHを5より10まで調製し、これらの血清1 mlに対し酵素液を0.1 ml加えて、41°Cで、1時間インキュベートし、生成してくる脂肪酸を定量した。なおpH調製は、酸性側を0.1N塩酸溶液を、アルカリ側を0.1N苛性ソーダ溶液を用いた。その結果をFig. 5に示した。基質のpHが高くなるに従い生成される脂肪酸も急激に増加し、pHが7.5で最高値に達した。またpHが7.5以上では逆に生成値も減少することを認めた。その結果からこのニワトリ血清を基質として用いた場合には、その酵

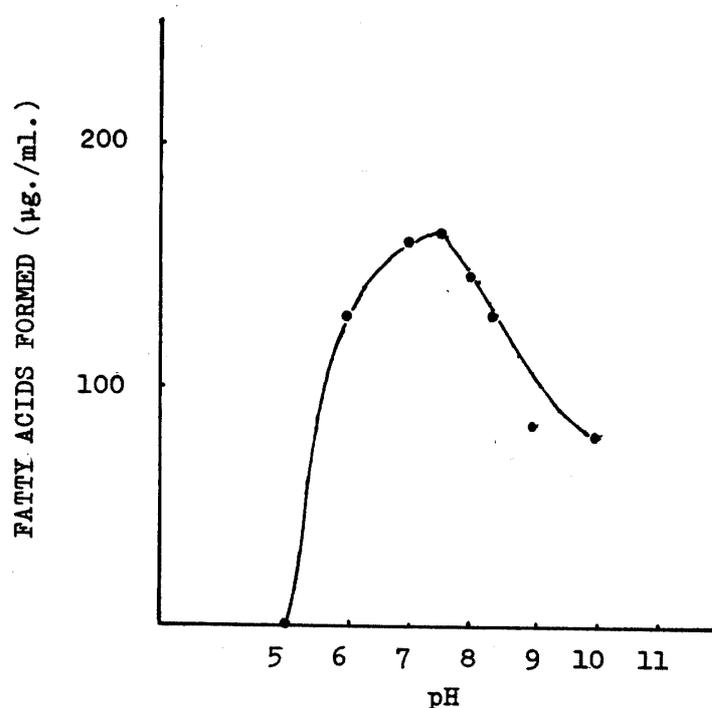


Fig. 5. pH dependence of phospholipase A activity

素反応の至適pHは7.5であることを知った。

6. 血清中の磷脂質および遊離脂肪酸含量と脂肪酸生成量との関係

基質として用いた血清を3種類A, B, C (採血したニワトリが異なる。但し投与した飼料は同じ) 用意し、これらの血清中の磷脂質および遊離脂肪酸含量を定量するとともにこれらを基質として用い、酵素反応を行ない、生成してくる脂肪酸を定量した。その結果をTable 1に示した。血清中の磷脂質含量では、B血清が最も多く次にC, A血清の順に多かった。また本酵素を作用することにより生成する

Table 1. Relationship of phospholipids content and free fatty acids in substrate to fatty acids formed by the reaction (µg/ml)

Substrate	Phospholipids	Free fatty acids	Fatty acids formed
A**	1288 (1281—1295) *	105 (85—122)	167 (132—213)
B	1404 (1373—1431)	132 (98—178)	225 (209—242)
C	1362 (1295—1404)	168 (166—170)	171 (165—176)

* Data in parentheses represent the ranges observed.

** Experimental numbers of the chickens used

脂肪酸量も血清中の磷脂質含量と同様な傾向を示し、B血清が最も多く、次にC、A血清の順に多かった。ところが血清中の遊離脂肪酸含量は、生成脂肪酸量とは関係なくC血清が最も多く、BおよびA血清の順に多いことを認めた。

7. 基質中の脂質の変動

本酵素を作用した際の基質として用いた血清中の脂質の変動を知るため、血清に本酵素を10:1の割合で加え、41°Cで1時間インキュベートしたのち、その基質中の脂質、つまり遊離脂肪酸、遊離型コレステロール、エステル型コレステロール、総コレステロール、トリグリセリド、リン脂質および総脂質を定量した。なお対照として、酵素の代わりに水を加えて同様な反応を行ない、同脂質を定量した。また基質として用いた血清についても同脂質を定量した。これらの結果をTable 2にまとめておいた。

Table 2. Changes of lipids in the substrate before and after the incubation ($\mu\text{g./ml.}$)

Lipids	Serum	Control substrate*	Substrate**
Free fatty acids	138 (85—178)	138 (85—178)	321 (248—402)
Free cholesterol	341 (316—356)	351 (344—360)	363 (340—456)
Cholesterol esters	631 (64.92%)	594 (62.84%)	626 (63.30%)
Total cholesterol	972 (888—1024)	945 (880—992)	989 (952—1024)
Triglycerides	1340 (1000—1580)	1340 (1140—1560)	1400 (1200—1540)
Phospholipids	1316 (1269—1295)	1376 (1295—1431)	1363 (1381—1417)
Total lipids	3766	3799	4073

* Control substrate were added water to chicken serum and incubated at 41° C for 1 hour.

** Substrate were added the enzyme to the serum and incubated.

基質として用いた血清と酵素の代わりに水を加えてインキュベートした血清の脂質定量結果は、各脂質間でよく一致した結果が得られ、インキュベートにより血清中の脂質は変動しないことを認めた。ところが酵素反応を行なった血清では、遊離脂肪酸は、前2者に比べ著しく多く、基質1 ml当り183 μg の増加が見られた。その他の脂質間では著しい変動はみられなかった。

8. 反応前後での血清中の遊離脂肪酸組成の変動

前項7で述べたように酵素反応を行なった基質中では、遊離脂肪酸定量値が著しく高い値を示しているところから、本項ではその酵素の脂肪酸特異性を知る上からその脂肪酸組成を検索することにした。まず血清、酵素の代わりに水を加えてインキュベートした血清および本酵素を加えてインキュベートした血清について遊離脂肪酸を抽出し、これをメチル化し、その脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで求めた。その結果をTable 3に示した。血清および酵素の代わりに水を加えてインキュベートした対照血清

Table 3. Changes in fatty acid composition of nonesterified fatty acids before and after the incubation (Data given in terms of % of total fatty acids)

Fatty acids	Serum	Control substrate*	Substrate**	Products
C 14:0***	0.57	0.57	0.22	0.12
C 16:0	26.81	26.05	9.00	4.37
C 16:1	4.49	4.27	1.84	1.17
C 18:0	11.25	9.52	1.89	0
C 18:1	34.11	36.48	19.44	15.85
C 18:2	16.85	16.96	29.29	32.17
C 18:3	0.68		0.71	0.89
Unknown			0.91	0.39
Unknown			3.74	4.68
C 20:4	5.24	6.16	30.72	36.81
Unknown			1.24	1.55

* See Table 2.

** See Table 2.

*** First number is carbon chain length, and second number of double bonds.

では、その遊離脂肪酸組成はよく一致した。またその組成では、オレイン酸が最も多く、次にパルミチン酸、リノール酸、ステアリン酸の順に多いことを知った。本酵素を作用した場合には、その脂肪酸組成は前2者とはことなり、アラキドン酸、リノール酸が最も多く、次にオレイン酸、パルミチン酸が多いことを知った。また本酵素を作用した基質中の遊離脂肪酸定量値、およびその脂肪酸組成と対照血清の遊離脂肪酸定量値と、その脂肪酸組成を基にして、本酵素が作用することによって生成された脂肪酸の組成を求めた。この結果も Table 3 に併せて示しておいた。この生成された脂肪酸の組成では、アラキドン酸、リノール酸が多く、次にオレイン酸が多いことを知った。

9. 反応前後での血清脂質の脂肪酸組成の変動

血清と酵素の代りに水を加え、インキュベートした対照血清、および酵素反応を行った基質についての脂質を抽出し、ケン化、メチル化したのちその脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで求めた。その結果は Table 4 に示した。これら三者ともその脂質の脂肪酸組成はよく一致した。またその組成では、リノール酸、オレイン酸、ステアリン酸およびパルミチン酸が主成分であることを認めた。

10. 反応前後での血清リポ蛋白質の変動

血清と対照血清および本酵素を作用させた基質について、口紙電気泳動を行い、血清リポ蛋白質の分離を行った。その結果を Fig. 6 に示した。これら三者の血清では、いずれも α -および β -リポ蛋白質のスポットが検出され変動は認められなかった。

Table 4. Changes in fatty acid composition of total lipids before and after the incubation (Data given in terms of percent of total fatty acids)

Fatty acids	Serum	Control substrate	Substrate
C 16:0	19.41	19.20	20.04
C 16:1	2.31	2.18	2.04
C 18:0	19.41	19.73	19.89
C 18:1	22.57	21.99	22.82
C 18:2	24.77	25.88	25.39
C 20:4	11.52	11.03	9.78

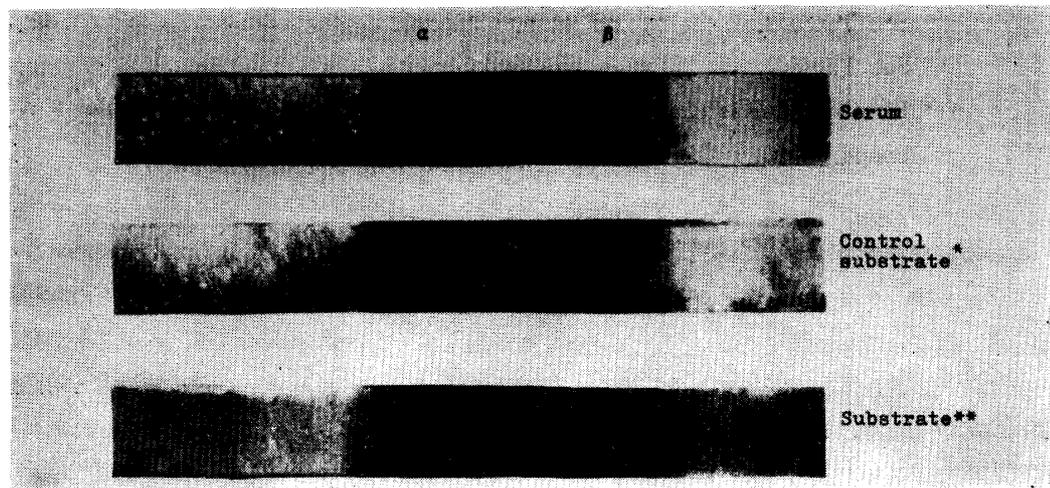


Fig. 6. Electrophoretical patterns of the substrate before and after the incubation

* See Table 2.

** See Table 2.

α - and β -indicate α -lipoproteins and β -lipoproteins respectively

IV 考 察

ハブ毒中のホスホリパーゼAの酵素活性を測定するに際し、基質としてニワトリ血清を用いた場合には、本酵素反応によって得られる単位時間当りの生成物、つまり生成脂肪酸の量は、酵素濃度に比例

し、基質濃度に関係なく一定量を生成する。このことから本酵素の活性を定量するに当って基質としてニワトリ血清を用いた場合には、酵素量は極微量でも測定が可能である。また基質量も本研究で検討した範囲内であれば十分に測定可能であるが、著者は、脂肪酸の定量範囲を考慮して、基質 1 ml に対し酵素を 0.1 ml 加えて反応を行った。また本酵素反応を行う時間については、反応時間が長くなるに従い生成物の量も増大した。また至適反応 pH は 7.5 であり、至適反応温度は 50°C であるが、ニワトリの生理的体温は 41°C であり、また血清等は長時間のインキュベートにより物理的・化学的变化を受ける (6) ことから、本酵素の活性を測定する場合には、その反応温度は 41°C が妥当であり、反応時間は 1 時間以上が妥当であると考えられる。またニワトリ血清そのものの pH は、7.5~8.0 であるところから、この場合には、あらかじめ pH 処理をする必要がないことを示唆する。また本酵素反応では、基質として用いた血清中の磷脂質含量が多い場合には、生成される脂肪酸量も多くなるが、本酵素反応では磷脂質が基質となる (4) ことが知られているところから血清中の磷脂質含量は、本酵素反応では重要な役割をなしその含量によって本酵素活性は変動するものと推察される。また本酵素を作用した場合には基質中の磷脂質含量では、遊離脂肪酸以外では変動がみられなかったが、本酵素反応においては前述したように磷脂質が基質となるところから磷脂質で変動がみられるべきであるが、本研究では、リン脂質の定量に際しては、脂質を灰化し、リン含量を定量し、計算によってリン脂質を求めているために変動がみられなかったものであり、本酵素反応によって直接生成されるリゾレシチンと基質中のレシチン間では変動があるものと思われる。また本酵素反応で生成される脂肪酸では、アラキドン酸、リノール酸等が多いが、蛇毒中のホスホリパーゼ A については、種々のイソ酵素の存在が報告されている (7) ところから、本酵素のこの基質に対する脂肪酸特異性は、ホスホリパーゼ A を代表するものであり、各々のイソ酵素の基質特異性についてはさらに検討する必要がある。

V 要 約

ニワトリ血清を基質として用いて、ハブ毒中のホスホリパーゼ A の酵素活性を測定した。1. その酵素活性は、酵素濃度に対しては比例的に増大したが、基質濃度に対しては一定であった。2. インキュベーション時間に対しては、1 時間までは急激な増大を示したが 1~5 時間では、ゆるやかな増大が見られた。3. 至適反応温度は 50°C であり、至適 pH は 7.5 であった。4. また本酵素活性は、基質中の磷脂質含量が多い程、増大する傾向がみられたが、遊離脂肪酸含量とはそのような関係はみられなかった。5. 本酵素を作用した場合には、基質中の遊離脂肪酸は著しく増加したが他の脂質、つまりコレステロール、磷脂質およびトリグリセリドではこのような変動はみられなかった。6. またこの増加した遊離脂肪酸の組成では、アラキドン酸、リノール酸およびオレイン酸が特に増加していることを知った。7. 基質中の総脂質の脂肪酸組成は、本酵素反応で変動が認められなかった。8. 血清リポ蛋白質でも変動がみられなかった。

最後に本研究を作成するにあたり数々の文献を提供して下さった琉大農学部高良鉄夫教授に心から感謝します。

参 考 文 献

- (1) 桑島謙夫 1942 蛇毒とその免疫, 医学の進歩, 第 1 輯, 1~45 共立出版
- (2) Slotta, K. H. 1935 Chemistry and biochemistry of snake venoms, Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, 12: 406~465
- (3) Ghosh, B. N. and Sarkar, N. K. 1936 Active principles of snake venoms. Venoms,

- 1st Ed., pp 189~69, American Association for the Advancement of Science, Washington
- (4) Hanahan, D. J. 1952 The enzymic degradation of phosphatidyl choline in diethyl ether, *J. Biol. Chem.*, **195** : 199~206
 - (5) 富村玲子, 知念功 1971 絶食時におけるニワトリ血清脂質およびその脂質の脂肪酸組成の経時的変化, 琉球大学農学部学術報告, **18** : 57~66
 - (6) 知念功 1970 ニワトリ血清における lecithin : cholesterol acyltransferase 反応, (2)血清リポ蛋白質の経時的変化, *生化学*, **42** : 190~195
 - (7) James I. S, Paola T, Richard S, Hauber J. and Thomas P. S. 1971 Phospholipase A of Snake Venoms, *J. Biol. Chem.*, **246** : 331~339

Summary

Phospholipase A activity in Habu venom was studied by using chicken serum as a substrate. (1) Increased amounts of enzyme resulted in a proportionally linealy larger amount of fatty acid formed in serum. (2) Increase in substrate concentration produced no additional effect. (3) The amount of free fatty acid formed was greatly increased for intial one hour incubation, but more than one hour incubation losed activity. (4) It was found that a pH maxium was 7.5 and temperatature optimum was around 50° C in this enzyme reaction. (5) High content of phospholipids in the substrate caused to high appearance of fatty acids by the reaction, but in case of free fatty acids such a relationship was not found. (6) The free fatty acids in the substrate were increased by this reaction, but the other lipids (cholesterol, phospholipids and triglycerides) were kept constant. (7) The fatty acid composition of the products was mainly consisted of arachi-donic acid, linoleic acid and oleic acid.