

カツオ幽門垂から抽出した粗酵素のホスホリパーゼA₂活性

小泉鏡子*¹・平塚聖一*¹・大場知子*²

利用価値の低いカツオ幽門垂が、ホスホリパーゼA₂の供給源となりうるかを検証するために、幽門垂から抽出した粗酵素の特性把握及び粗精製を行った。その結果、原料カツオの漁場によって活性に差は見られなかったが、鮮度の良い幽門垂から抽出した粗酵素よりも鮮度の低下した幽門垂から抽出した粗酵素の活性が高かった。抽出した粗酵素は40°Cで最も活性が高く、pH8以上で高い活性を有していた。また、0°Cにおいても最大活性の70%の活性を有するなど温度適応性が高く、本酵素を低温下で反応させることにより反応生成物の品質劣化を抑えることができると考えられた。さらに、比較的簡便なイオン交換クロマトグラフィーによる粗精製によって酵素活性が粗精製の33倍に上昇した。以上の結果から、カツオ幽門垂は、ホスホリパーゼA₂供給源としての利用の可能性のあるものと考えられた。

キーワード：カツオ幽門垂、ホスホリパーゼA₂、pH依存性、温度依存性、イオン交換クロマトグラフィー

はじめに

ホスホリパーゼA₂ (E.C.3.1.1.4) は、グリセロリン脂質のグリセロールsn-2位にエステル結合している脂肪酸を特異的に加水分解する酵素であり、分泌性ホスホリパーゼA₂や細胞質ホスホリパーゼA₂など4種類に分類されている¹⁾。哺乳動物の膵臓由来のホスホリパーゼA₂は古くから研究されており^{2, 3)}、豚³⁾や牛・羊⁴⁾の膵臓由来のホスホリパーゼA₂が精製され、それらの性質等が明らかにされてきた。現在、ヘビやハチの毒、牛や豚の膵臓等から抽出・精製されたホスホリパーゼA₂が市販されている。ヘビやハチ由来のものは活性が極めて高く、試薬として使用されている。一方、牛や豚の膵臓由来のホスホリパーゼA₂は、乳化安定剤・分散安定剤・パン生地の品質改良剤等食品添加物として使用されている酵素処理レシチンの製造に利用されている。これに対し、海産動物由来のホスホリパーゼA₂に関する研究例は極めて少なく、魚類ではマダイ^{5, 6)}やタラ⁷⁾、棘皮動物ではヒトデ類^{8, 9)}について報告されているにすぎず、これまでに海産動物由来のホスホリパーゼA₂は市販されていない。

平塚ら¹⁰⁾によれば、カツオ*Katsuwonus pelamis*の幽門

垂から抽出した粗酵素液を用いてホスファチジルコリン(1-C16:0-2-C18:1-PC)を加水分解したところsn-2位由来であるオレイン酸(C18:1)の生成が顕著であったことから、カツオ幽門垂から抽出した粗酵素液は、ホスホリパーゼA₂活性を有すると推察された。

そこで、本研究では、カツオ低利用資源の一つである幽門垂がホスホリパーゼA₂の供給源となりうるかを検証するために、幽門垂から抽出した粗酵素の特性把握及び粗精製を試みた。その結果、いくつかの知見を得ることができたので報告する。

材料及び方法

1 粗酵素液の活性に関する検討

(1) 試料

本実験で用いたカツオの幽門垂は、ロイン及びなまり節加工工場から冷凍または冷蔵状態で入手した。冷凍状態で入手した幽門垂は、以下に記したアセトン脱脂粉末の調製まで-70°Cで保存した。また、冷蔵状態で入手した幽門垂は、入手当日にアセトン脱脂粉末の調製に供した。

2010年2月2日受理

静岡県水産技術研究所(本所)業績第1137号

*¹ 静岡県水産技術研究所カツオ丸ごと食用化プロジェクトスタッフ

*² (株)マルハチ村松

(2) 粗酵素液の調整

幽門垂から脱脂粉末を得るために、以下の脱脂操作を行った。包丁で細かくたたいた試料に4倍量の冷アセトンを加え、ヒスコロンによりさらに1～2分間磨砕した。磨砕物を4℃で20分間攪拌した後、1,230×g、4℃で15分間遠心分離を行い、沈殿物を回収した。回収した沈殿物に再び試料の4倍量の冷アセトンを加え、上記の条件により磨砕、攪拌、遠心分離を行う脱脂操作を計3回を行い、4回目にアセトンをジエチルエーテルに置き換えて同様の脱脂操作を行った。最後に沈殿物をろ紙上に広げ、4℃で一晩乾燥させたものをアセトン脱脂粉末とした。

アセトン脱脂粉末に4倍量の10mmol/L トリス塩酸・1mmol/L EDTA 緩衝液 (pH7.4, 以下 トリスEDTA緩衝液) を加えて4℃で90分間攪拌抽出した。その後、7,000×g、4℃で30分間遠心分離を行い、上清を粗酵素液とした。

(3) 粗酵素液の活性測定

基質にはホスファチジルコリン標品 (フナコシ社, 1-C16:0-2-C18:1-PC) を用いた。基質10mgに対して0.5mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 3mL, 0.22mol/L CaCl₂ 0.75mL, 50mmol/L デオキシコール酸ナトリウム 0.5mL, 粗酵素液0.5mLを加え、37℃で30分間酵素反応を行った。酵素反応終了後、直ちにクロロホルム、メタノール各10mLを加え、Hanson and OlleyによるBlight and Dyerの変法¹¹⁾に従って全脂質を抽出した。得られた全脂質をSep-Pakシリカカートリッジ (Waters社) により遊離脂肪酸とリン脂質に分画した。

遊離脂肪酸画分はHiratsuka *et al.*¹²⁾に準じて塩化水素メタノールによりメチルエステル化した後、キャピラリーカラムを用いたガスクロマトグラフ (GC-14, 島津製作所) により分析した。なお、分析カラムにはシリカキャピラリーカラムTC-WAX (30m×0.25mm i.d., GLサイエンス社) を用いた。キャリアガスにはヘリウムを使用し、スプリット比は50:1とした。カラム温度は初期温度を170℃、昇温速度を1℃/min、最終温度を225℃に設定し、最終温度での保持時間は15分とした。また、注入部の温度は250℃、検出部の温度は270℃とした。内部標準としてノナデカン酸 (C19:0) を使用して脂肪酸の絶対量を定量し、1分間当たりの生成オレイン酸 (C18:1) 量 ($\mu\text{mol}/\text{min}$) を酵素活性 (Units) とした。

(4) タンパク質の定量

タンパク質の定量は、牛アルブミン (和光純薬工業) を標準タンパク質としてLowry *et al.*の方法¹³⁾により行った。DEAE-イオン交換クロマトグラフィーにより得られた各フラクション液のタンパク質量は、牛アルブミン1mg/mL溶液の280nm吸光度を1.00と標準化して測定した吸光

度値とした。

(5) 原料魚の漁場及び鮮度の違いが酵素活性に与える影響
ロイン加工工場から冷凍状態で入手した、南方漁場で漁獲されたカツオ (以下、南方カツオ) 及び東沖漁場で漁獲されたカツオ (以下、東沖カツオ) の幽門垂を用いた。

半解凍状態の幽門垂から調製した粗酵素液を鮮度良好区とした。また、冷凍状態から4℃で8時間、さらに20℃で1晩放置した幽門垂から調製した粗酵素液を鮮度不良区とした。これら漁場別、鮮度別の4種類の粗酵素液について、各3検体ずつ酵素活性を測定した。さらに、得られた酵素活性値を用いて1元配置分散分析及びTukeyのHSD法による多重比較を行った。統計解析ソフトにはSPSS (14.0J, エス・ピー・エス・エス株式会社) を用いた。

(6) 粗酵素液のpH及び温度依存性の検討

なまり節加工工場から冷蔵状態で入手した幽門垂から粗酵素液を調製した。pH依存性については上記(3)の活性測定方法に準じ、トリス塩酸緩衝液とグリシン水酸化ナトリウム緩衝液の2種類の緩衝液を用いて、37℃、pH6～11における活性を測定した。温度依存性については上記(3)の活性測定方法に準じ、トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) を用いて、反応温度を10℃間隔で0～70℃までの8段階に設定し、各温度における活性を測定した。それぞれの結果は、最も活性が高かった条件での酵素活性値を100としたときの相対活性で表した。

2 粗精製に関する検討

(1) 粗酵素液の粗精製

なまり節加工工場から冷蔵状態で入手した幽門垂から粗酵素液を調製し、DEAE-セルロース (DEAE A-500m チックソ) によるイオン交換クロマトグラフィーを以下のとおり行った。4℃の低温室内で、トリスEDTA緩衝液であらかじめ平衡化したカラム (ϕ 3 cm×10cm) に粗酵素液を注入し、KCl濃度を開始濃度0 mol/Lから最終濃度0.7mol/Lの濃度勾配を持たせたトリスEDTA緩衝液560mLでタンパク質を溶出した。フラクションは130滴 (約5mL) を1本とし、連続して110本を採取した。

(2) フラクション液の酵素活性の簡易測定

フラクション液の活性の簡易測定には、卵黄由来ホスファチジルコリン (和光純薬工業) を基質として用いた。

基質2mgに0.5mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 0.2mL, 0.22mol/L CaCl₂ 0.1mL, 50mmol/L デオキシコール酸ナトリウム 0.1mL, フラクション液0.5mLを加え、室温で1時間酵素反応を行った。反応終了後、クロロホルム、メタノール各1mLを加え、攪拌後、630×g、室温で10分間遠心分離を行い、クロロホルム層20 μL をTLCプレート (シリカゲル60, メルク社) にスポットし、薄層クロマ

トグラフィーに供した。展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：蒸留水=65：35：6を使用した。展開終了後に薄層板を乾燥させ、飽和ヨウ素を用いて発色させた。発色したリゾホスファチジルコリン (LPC) とホスファチジルコリン (PC) のバンドをかき取って、それぞれ耐熱試験管に移した。これに過塩素酸 (70%) を加え、150°Cで4時間湿式灰化後、Bartlett法¹⁴⁾によりLPCとPCのリン量を定量し、LPCのPCに対する比率 (以下、LPC比) により簡易的に酵素活性を測定した。

(3) 粗精製における活性測定

(2)の結果をもとに、LPC比のピークがみられた範囲を活性画分として、その範囲の各フラクション液を等量混合し、活性画分のタンパク質量をLowry et al.の方法¹⁵⁾により定量した。粗精製前の粗酵素液と粗精製後の活性画分のそれぞれについて、1-(3)粗酵素液の活性測定に準じて酵素活性を測定したが、基質10mgに対して反応させる粗酵素液及び活性画分溶液中の酵素タンパク量をそろえるために、粗精製前の粗酵素液は100倍に希釈後測定に供した。さらに、得られた酵素活性値をタンパク質量 (mg) で除して比活性値 (Units/mg Protein) を算出した。

結 果

原料カツオの漁場別、幽門垂の鮮度別のホスホリパーゼA₂活性を図1に示した。4区の酵素活性値について分散分析を行ったところ有意差がみられた ($p < 0.001$)。さらに、TukeyのHSD法による多重比較を行ったところ、いずれの漁場に由来する粗酵素液においても、鮮度良好区よりも鮮度不良区の活性が高く、有意差が認められた ($p < 0.001$)。しかし、同じ鮮度において漁場間で比較すると、両者に有意差はみられなかった。

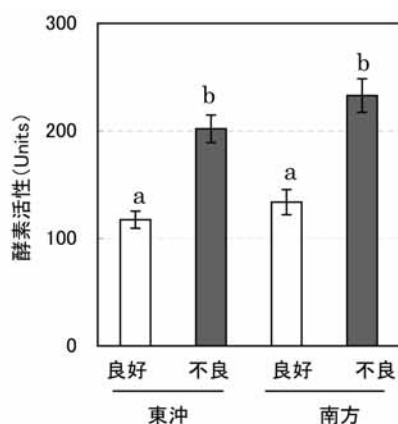


図1 原料カツオの漁場及び鮮度が異なる粗酵素液のホスホリパーゼA₂活性

a,bは異なる符号間で有意差があることを示す ($p < 0.001$, Tukey-HSD test)

粗酵素液のホスホリパーゼA₂活性のpH及び温度依存性を図2に示した。pH依存性については、pH8以上で高い活性を有していた。温度依存性については、40°Cで最も活性が高かった。また、60°Cでは最大活性の34%に低下したが、反応温度10~50°Cにおいて最大活性の87~94%と高い活性を有し、0°Cでも最大活性の70%の活性を有していた。

粗酵素液をDEAE-イオン交換クロマトグラフィーで粗精製して得られたフラクションの280nm吸光値及びLPC比を図3に示した。粗精製の結果、0.2mol/L KCl付近と0.4mol/L KCl付近の2か所にLPC比の高いフラクションが見られた。そこで、最初の活性画分 (フラクションNo. 38~46) をPL-1、2つ目の活性画分 (フラクションNo. 54~70) をPL-2とした。

得られた活性画分と粗精製前の粗酵素液の比活性値を表1に示した。粗精製によって得られたPL-1の比活性値は粗酵素液の比活性値の2分の1であったが、PL-2は33倍となった。

表1 カツオ幽門垂のホスホリパーゼA₂の粗精製

フラクション	タンパク質量 (mg)	比活性値 (Units/mg protein)
粗酵素液	400	0.10
DEAE-イオン交換クロマトグラフィー PL-1	9.18	0.05
DEAE-イオン交換クロマトグラフィー PL-2	3.82	3.30

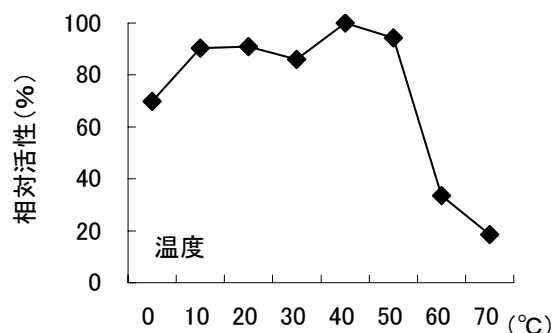
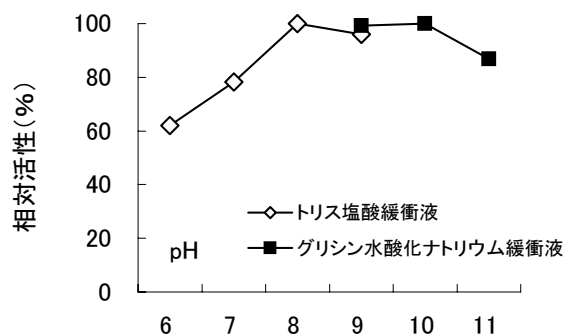


図2 粗酵素液のホスホリパーゼA₂活性のpH及び温度依存性

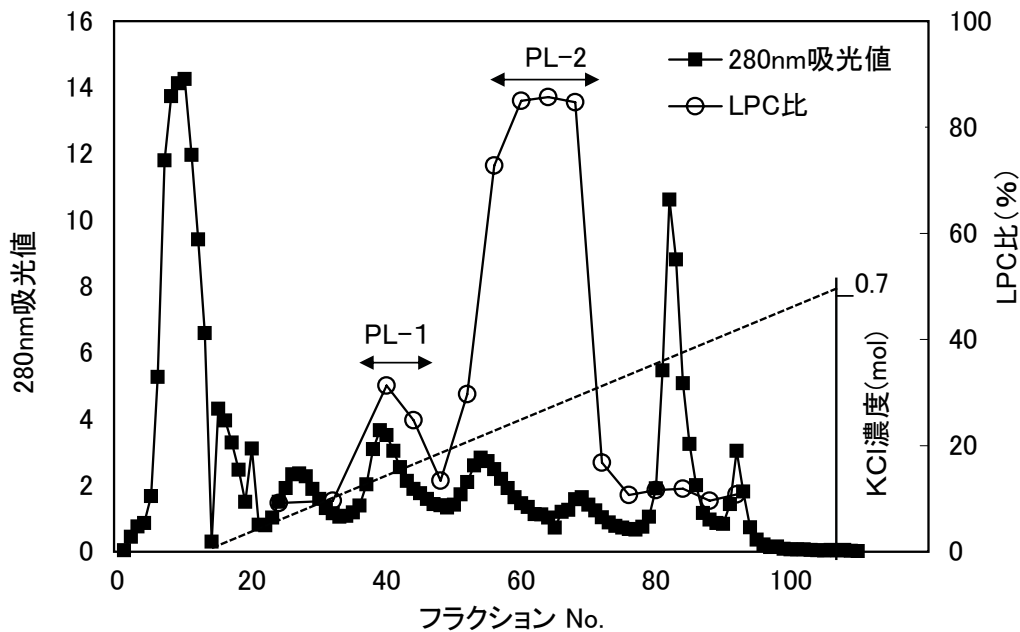


図3 DEAE-イオン交換クロマトグラフィーにおけるタンパク質量 (280nm吸光値) と酵素活性 (LPC比) の推移

考 察

原料となるカツオ幽門垂の鮮度がホスホリパーゼA₂活性に与える影響について調べた結果、鮮度が良い状態の幽門垂から抽出した粗酵素よりも、鮮度が低下した状態の幽門垂から抽出した粗酵素の活性が高かった。Iijima *et al.*⁵⁾は、新鮮なマダイの肝臓のホスホリパーゼA₂活性は低い、磨砕した肝臓を20℃で数日間保存した結果、自己消化に伴ってホスホリパーゼA₂活性が急激に上昇したと報告している。今回カツオ幽門垂においても同様の傾向が見られたが、これも、自己消化等の影響によるものと思われる。現在、低利用資源として排出されているカツオ幽門垂には、ロイン加工工場などから冷凍状態のまま排出される鮮度良好なものと、鰹節やなまり節の加工工場などから排出される、解凍されて鮮度の低下したものの2種類が存在する。粗酵素の活性が鮮度の低下したもので高かったことから、鮮度良好なものの鮮度を低下させることで、現在排出されている全てのカツオ幽門垂からホスホリパーゼA₂を効率よく抽出できるものと推察された。

海産動物由来のホスホリパーゼA₂に関する研究例は極めて少なく、比活性値に関しては、マダイの肝臓⁵⁾、ニチリンヒトデ⁸⁾及びイトマキヒトデ⁹⁾の幽門盲のうなどについて報告されているにすぎない。これら海産動物の消化腺由来ホスホリパーゼA₂の粗酵素状態での比活性値は、マダイ:0.5~0.7×10⁻³Units/mg Protein⁵⁾、ニチリンヒトデ:0.3×10⁻³ Units*/mg Protein⁸⁾、イトマキヒトデ:2×10⁻⁶Units*/mg Protein⁹⁾であり、カツオ幽門垂から抽出

した粗酵素のホスホリパーゼA₂比活性値 (0.1 Units/mg Protein) はこれらの値よりもかなり高かった。

さらに、pH依存性については、マダイ (最適pH: pH 8.0)⁶⁾、及びイトマキヒトデ (最適pH: pH9.0)⁹⁾では活性が低下していたpH11でも高い活性を有しており、ニチリンヒトデ (最適pH: pH9-10)⁸⁾と同様の傾向がみられた。また、最適温度は40℃であり、ニチリンヒトデ (最適温度: 30-40℃)⁸⁾とほぼ同様であったが、イトマキヒトデ (最適温度: 50℃付近)⁹⁾よりも低かった。

また、カツオ幽門垂から抽出した粗酵素のホスホリパーゼA₂は0℃でも最大活性の70%の活性がみられた。ニチリンヒトデでは10℃⁸⁾で最大活性の約20%まで活性が低下し、イトマキヒトデでは20℃⁹⁾で最大活性の約10%まで活性が低下していることから考えると、カツオ幽門垂由来の粗酵素液は、低温下でも高いホスホリパーゼA₂活性を有しているといえる。このことは、高度不飽和脂肪酸などを多く含んだリン脂質と反応させる場合等において、本酵素を低温下で反応させることにより反応生成物の品質劣化を抑えることができると考えられた。

カツオ幽門垂から抽出した粗酵素について、イオン交換クロマトグラフィーによる粗精製を行った結果、KCl濃度0.2mol付近で溶出したPL-1とKCl濃度0.4mol付近で溶出したPL-2の2つの活性画分が得られた。通常、哺乳動物の膵臓から分泌される分泌性ホスホリパーゼA₂は、不活性な前駆体 (チモーゲン) として生合成され、分泌後、限定分解を経て活性型に変わる¹⁾。同様の代謝経路がカツオ幽門垂においても存在するのであれば、今回得られた活性

*文献中の酵素活性(Units)の単位は、μg/minであるため、本報告で用いた単位μmol/minに換算した。

が低かったPL-1が前駆体、活性が高かったPL-2が活性型に相等すると推察されるが、詳細については、これらの画分を精製し、一次構造等についてさらに検討する必要がある。

現在、食品添加物等に利用されているホスホリパーゼA₂は主に牛・豚の膵臓由来であるが、コラーゲンも牛・豚が主な供給動物となっている¹⁵⁾。コラーゲンにおいては、狂牛病の病原体であるタンパク質のプリオンが通常の殺菌や滅菌工程では不活性化されないことが明らかとなったことから、牛由来のコラーゲンの安全性に疑問が生じている¹⁶⁾。さらに、豚についても内在性レトロウィルスの存在が指摘される¹⁷⁾など、家畜由来コラーゲンの安全性に対する懸念から、近年、病原体の危険性の少ない魚類由来のコラーゲンの市場が拡大しつつある¹⁸⁾。さらに、宗教上の理由から利用可能な食材が制限されることがあり、宗教・宗派によっては豚・牛由来製品が使用できない場合も存在する。このような観点から、海産動物由来のホスホリパーゼA₂は十分商品価値があると思われる。

前述のとおり、カツオ幽門垂のホスホリパーゼA₂活性は、海産動物の中では比較的高いレベルであると考えられる。さらに、カツオの幽門垂の排出量は多く、安定的に確保できること、加工工程で排出される低利用資源のため原料コストが低いことに加え、現在、海産動物由来のホスホリパーゼA₂が市販されていないことから、カツオ幽門垂はホスホリパーゼA₂供給源としての利用の可能性があると考えられた。

文 献

- 1) 工藤一郎・井上圭三 (1992) : 高等動物非膵型ホスホリパーゼA₂構造, 性状, 機能, 生化学 (社団法人日本生化学会), **64**(11), 1330~1331.
- 2) Arnesjo B, Barrowman J, Borgstron B (1967) : The zymogen of phospholipase A₂ in rat pancreatic juice, *Acta Chem. Scand.*, **21**, 2897~2900.
- 3) De Haas G H, Postema N H, Nieuwenhuizen W, Van Deneen L L M (1968) : Purification and properties of an anionic zymogen of phospholipase A from porcine pancreas, *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 118~129.
- 4) Dutilh C E, Van Doren P J, Verheul F E A M, De Haas G H (1975) : Isolation and properties of phospholipase A₂ from ox and sheep pancreas, *Eur. J. Biochem.*, **53**, 91~97.
- 5) Iijima N, Nakamura M, Uematsu K, Kayama M (1990) : Partial purification and characterization of phospholipase A₂ from the hepatopancreas of red sea bream, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**(8), 1331~1339.
- 6) Iijima N, Uchiyama S, Fujikawa Y, Esaka M (2000) : Purification, characterization, and molecular cloning of group I phospholipase A₂ from the gills of the red sea bream, *Pagrus major*, *Lipids*, **35**(12), 1359~1370.
- 7) Audley M A, Shetty K J, Kinsella J E (1978) : Isolation and properties of phospholipase A from pollock muscle, *J. Food Sci.*, **43**, 1771~1775.
- 8) 岸村栄毅・林賢治 (1998) : ニチリンヒトデ幽門盲のうホスホリパーゼA₂様酵素の精製と性質, *日本水産学会誌*, **64**(2), 264~269.
- 9) 岸村栄毅・林賢治 (1999) : イトマキヒトデ幽門盲のうホスホリパーゼA₂の精製と性質, *日本水産学会誌*, **65**(4), 739~746.
- 10) Hiratsuka S, Kitagawa T, Yamagishi K, Wada S (2008) : Phospholipase A₁ activity of crude enzyme extracted from the ovaries of skipjack tuna, *FISHERIES SCIENCE*, **74**, 146~152.
- 11) Hanson S W F, Olley J (1963) : Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates, *J Biochem*, **68**, 101~102.
- 12) Hiratsuka S, Kitagawa T, Matsue Y, Hashidume M, Wada S (2004) : Lipid class and fatty acid composition of phospholipids from the gonads of skipjack tuna, *FISHERIES SCIENCE*, **70**, 903~909.
- 13) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275.
- 14) Bartlett G R (1959) : Phosphorus assay in column chromatography, *J. Biol. Chem.*, **234**, 466~468.
- 15) 永井毅 (2001) : 食の科学—水産食品を中心に—, 成山堂, 東京, 144.
- 16) Aguzzi A, Montrasaio F, Kaeser P S (2001) : Prions: health scare and biological challenge, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **2**, 118~126.
- 17) Ericsson T, Oldmixon B, Blomberg J, Rosa M, Patience C, Andersson G (2001) : Identification of novel porcine endogenous betaretrovirus sequences in miniature swine, *J Virol.*, **75**, 2765~2770.
- 18) 株式会社富士経済 (2008) : 2008年版生物由来有用成分・素材市場徹底調査, 267pp.

Investigation of the phospholipase A₂ activity of crude enzyme extracted from the pyloric caeca of the skipjack tuna *Katsuwonus pelamis*

Kyoko Koizumi, Seiichi Hiratsuka and Tomoko Ooba

Abstract In this study, the phospholipase A₂ (PLA₂) activity of the crude enzyme extracted from the pyloric caeca of the skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* were investigated; the crude enzyme was partially purified using diethylaminoethyl (DEAE) -cellulose column chromatography. There was no difference in the PLA₂ activity of the crude enzyme extracted from the pyloric caeca of skipjack obtained from two kinds of fishing grounds: the tropical western Pacific and off the Pacific coast of eastern Honshu, Japan; however the PLA₂ activity of the crude enzyme obtained from the frozen pyloric caeca was lower than that obtained from the dissolved one. The optimal temperature and pH for the PLA₂ activity of the crude enzyme were 40°C and above pH8.0, respectively. At 0°C, the PLA₂ activity showed 70% of its maximal activity at 40°C, indicating that this enzyme can function at low temperatures. Thus, it has an advantage in the hydrolysis reaction using polyunsaturated fatty acids substrate because it might prevent lipid peroxidation. The enzyme was purified by approximately 33-fold after DEAE-cellulose column chromatography. These results suggest that the pyloric caeca of the skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* might be used as a source of PLA₂.

Key words: DEAE-cellulose column chromatography, pH dependency, phospholipase A₂, pyloric caeca, skipjack, temperature dependency