

氏名	河 内 佐 十 かわ ち さ じゅう
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	論 薬 博 第 82 号
学位授与の日付	昭 和 45 年 5 月 23 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	マムシ毒ホスホリパーゼAの研究

論文調査委員 (主査) 教授 山科郁男 教授 冨田謙吉 授教 高木博司

論 文 内 容 の 要 旨

蛇毒中にレシチンを加水分解する酵素が見出されたのは古く1911年で、それ以来この酵素は咬傷のときの溶血と結びつけられ、また、蛇毒の致死因子と考えられていた時代もあった。このホスホリパーゼA（レシチナーゼA）はマムシ科（Crotalidae）、コブラ科（Elapidae）、およびクサリヘビ科（Viperidae）の蛇毒に極めて高い活性で含まれており、従来種々の生化学的研究に本酵素を活用する機会も多かった。しかし、蛇毒にはホスホリパーゼA以外の種々の酵素や致死因子なども含まれており、粗毒をそのままホスホリパーゼA標品として利用できない場合もある。また、リン脂質の構造決定にはホスホリパーゼAの特異性をはっきりさせなければならない。

著者はカラムクロマトグラフィーをマムシ（*Agkistrodon halys blomhoffi* BOIE）毒、および台湾コブラ（*Naja naja atra* CANTOR）毒に適用することによって、これらの蛇毒の諸酵素の失活をできるだけ防止しつつホスホリパーゼAを好収量に分離する方法を研究した。この分離過程において台湾コブラ毒のホスホリパーゼAを結晶化し、また、台湾コブラとマムシの両蛇毒にはカラムクロマト的に分離される2種のホスホリパーゼAがあることを明らかにした。マムシ毒から分離、精製した2種のホスホリパーゼAのうち一方は塩基性の蛋白質で、これはホスホリパーゼA-Iと名付けた。他方の酸性蛋白であったものをホスホリパーゼA-IIと名付けた。

マムシ毒のホスホリパーゼA-IおよびA-IIはDEAE-セルロースカラムで容易に分けることができる。それぞれの酵素につき、さらに各種のイオン交換クロマトグラフィー、ならびにセファデックスによるゲル濾過法を適用し、電気泳動的、超遠心的に均一な標品にまで精製する方法を確立した。この精製したマムシ毒のホスホリパーゼA-IとA-IIを用いて、1. 酵素化学的性質、2. 化学的性質、3. 物理化学的性質、4. 高次構造などについて調べ、以下に述べる知見をえた。

1. マムシ毒のホスホリパーゼA-IとA-IIは共に卵黄レシチンの β -位の脂肪酸エステル結合を加水分解する。ホスファチジルエタノールアミンに対する両酵素の作用は著しく異なり、A-Iはホスファチ

ジルエタノールアミンをよく分解するが、A-IIは分解しにくい。A-Iの至適pHは7.8、A-IIは8.5である。両酵素は共に熱に著しく安定で、pH安定性や卵黄レシチンを基質にしたときのMichaelis定数、および最大反応速度は類似していた。

2. ホスホリパーゼA-IとA-IIとではアミノ酸組成に明らかな差が見られ、A-Iはリジンおよびアルギニンを多く含み、A-IIではアスパラギン酸およびグルタミン酸の含量が高い。両酵素はいずれもC-末端に半シスチン残基をもつが、N-末端の遊離アミノ基をもたない。また、分子内に7個のS-S結合をもつ。

3. ホスホリパーゼA-Iの等電点は約10.0、A-IIの等電点は約4.0であり、共に単純蛋白である。両酵素の偏比容、沈降定数、固有粘度、および拡散定数から分子量を計算すると、A-Iは13,130、A-IIは13,900と算出される。これらの物理定数とゲル濾過法、ならびにアミノ酸分析の結果などからホスホリパーゼA-Iの分子量は13,970、A-IIの分子量は13,700と定めた。

4. ホスホリパーゼA-Iのヘリックス含量は約28%、A-IIは約33%で両酵素はヘリックス以外の規則構造として β -構造をもっと推定される。この β -構造は70%以上のエタノール濃度で α -ヘリックスに変換し、そのとき酵素活性は消失する。ホスホリパーゼA-IIの分子表面で解離するカルボキシル基数と塩基性解離基数はアミノ酸分析の結果と一致した。ホスホリパーゼA-IIは分子内に7個の異常なチロジン残基をもち、これらは7個のS-S結合とともに強固で安定な高次構造の保持に寄与しているものと推論した。

論文審査の結果の要旨

リン脂質は生体に広く分布し、とくに細胞の膜構造においてはタンパクとともに主要な構成成分となっている。近時、細胞の膜に関する生化学的研究は急速に進展し、薬学領域においても薬物と細胞の膜との相互作用はとくに注目を惹いている問題である。これらの研究の一層の進展のためには、細胞の膜の酵素処理、とくにホスホリパーゼ処理によって膜構造に特異的变化を与えたのち、種々の性質の変化を調べることは極めて有力な方法の一つである。

ホスホリパーゼAはリン脂質のうちでも最も分布の広いホスファチジルコリン型の脂質に作用するといわれ、上述の観点からもその精製、作用機作、特異性の研究が期待されていた酵素である。

著者は蛇毒が高いホスホリパーゼA活性を有することに着目し、精製を繰返して、マムシ毒、コブラ毒に二種のホスホリパーゼAが存在することを見出し、マムシ毒からA-I、A-IIの二種の酵素を均一状態に単離することに成功している。

それぞれの酵素について、反応機作、基質特異性、反応速度論的定数、阻害物質の影響などについて明らかにしたほか、酵素タンパクのアミノ酸組成、分子量を決定し、さらに高次構造と活性との関係についても検討している。とくに注目すべき点は次の諸点である。

A-Iはホスファチジルコリンのほかホスファチジルエタノールアミンにも働くが、A-IIは後者には働かない。両酵素は至適pH、ミハエリス定数について若干の差を示す。A-Iが酸性タンパクであるのに対し、A-IIは塩基性タンパクである。両酵素とも β -構造が活性と密接な関係を有している。

以上、本論文はマムシ毒の二種のホスホリパーゼAについて酵素学およびタンパク化学的に可能な限り詳細に研究したものであって、薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。