

氏 名	鮫 島 勇 次
	さめ じま ゆう じ
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	論 薬 博 第 155 号
学位授与の日付	昭 和 51 年 3 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 ₂ -II の全アミノ酸配列の研究

(主 査)
論文調査委員 教 授 山 科 郁 男 教 授 富 田 謙 吉 教 授 矢 島 治 明

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、マムシ毒ホスホリパーゼ A₂-II の全アミノ酸配列に関するものである。

ホスホリパーゼ A には、レンチンの α 位を水解する A₁ 型と、 β 位を水解する A₂ 型があって、動物組織一般に広く分布しているが、特に後者は、蛇毒やハチ毒、サソリ毒での含量が高い。毒性との関係については、紆余曲折を経てきているが、近年、蛇毒中の神経毒や直接溶血因子に対する相乗作用が報告されてから、咬傷事のこの酵素の役割が改めて注目されつつある。一方、蛇毒ホスホリパーゼ A は、リン脂質を含む生体膜の構造と機能の研究にも有用であると考えられている。

著者は、生体膜の基本となるリン脂質と蛋白との相互作用の機構の解明の一助とすべく、かつ、この酵素の構造と機能の関連を明らかにすべく、著者らのグループが均一状態にまで精製したマムシ毒ホスホリパーゼ A₂-II の一次構造の研究に着手した。

ホスホリパーゼ A₂-II は、等電点を pH 4 にもち、ふさがれた N 末端および C 末端ンスチンをもち、126 残基のアミノ酸により構成された分子量 13,700 の単一鎖単純蛋白である。

構造決定に当っては、まず、ホスホリパーゼ A₂-II に含まれる 2 残基のメチオニンに着目し、ブロムシアン分解後、Sephadex G-50 カラムにより分画し、3 断片、Br-III-A, Br-III-C, Br-I をえた。Br-III-A (7 残基)、Br-III-C (3 残基) は、それぞれ、ホモセリンを 1 残基ずつ含み、Br-III-A のみがニヒドリッ反応陰性であった。ホスホリパーゼ A₂-II の N 末端がふさがれていることと、ブロムシアン分解の特異性を考慮し、Br-III-A が N 末端部分に位置し、ホモセリンを含まない Br-I (116 残基) が C 末端に位置し、Br-III-C が中間に位置するものと推定した。

Br-III-A の構造は、部分酸水解、 α -キモトリプシン消化後、えられたペプチド断片にエドマン分解消去法、エドマン-ダンシル法を適用し決定した。N 末端は、合成ペプチド ($\square$ -Glu-Phe-Glu-OH) と Br-III-A 由来のペプチドとの間で電気泳動の移動度を比較してピログルタミン酸であるものと推定したが、Br-III-A の質量分析による構造解析により、N 末端ピログルタミン酸を決定すると同時に、全配列も決定しえ

た。

大きな断片, Br-I は, 還元カルボキシメチル化後, まず, トリプシンにより消化し, Dowex 50-X 2 カラムにより分画し, さらに精製を要するものは, Sephadex G-25 カラム, ろ紙クロマトグラフィー, 高圧ろ紙電気泳動により精製し, 主なるペプチド14種をえた。配列分析には, エドマン分解直接法および消去法, ダンシル化法, カルボキシペプチダーゼ消化法を活用し, 77残基 (66%) のアミノ酸配列を決定した。

Br-I のトリプシンペプチド相互の位置関係ならびにアミノ酸配列未決定部分の構造を明らかにするために, サーマライシン消化を行い, Sephadex G-25 カラムにより分画し, さらに, Dowex 50-X 2 カラム, Bio-Gel P-4 カラム, ろ紙クロマトグラフィー, 高圧ろ紙電気泳動により精製し, 主なるペプチド24種をえた。配列分析には, 主としてエドマン分解消去法を活用した。トリプシンペプチドの位置関係が決定された部分は2箇所のみであり, 17残基 (15%) のアミノ酸配列未決定部分が残った。

残されたトリプシンペプチドの位置関係ならびにアミノ酸配列を明らかにするために, α -キモトリプシン消化を行い, Dowex 50-X 2 カラムにより分画し, さらに, ろ紙クロマトグラフィー, 高圧ろ紙電気泳動により精製した。主なるペプチド23種の配列分析には, エドマン分解直接法, ダンシル-エドマン法, カルボキシペプチダーゼ消化法を適用し, トリプシンペプチドの位置関係は, T-6-2→T-9-1 のつながりの

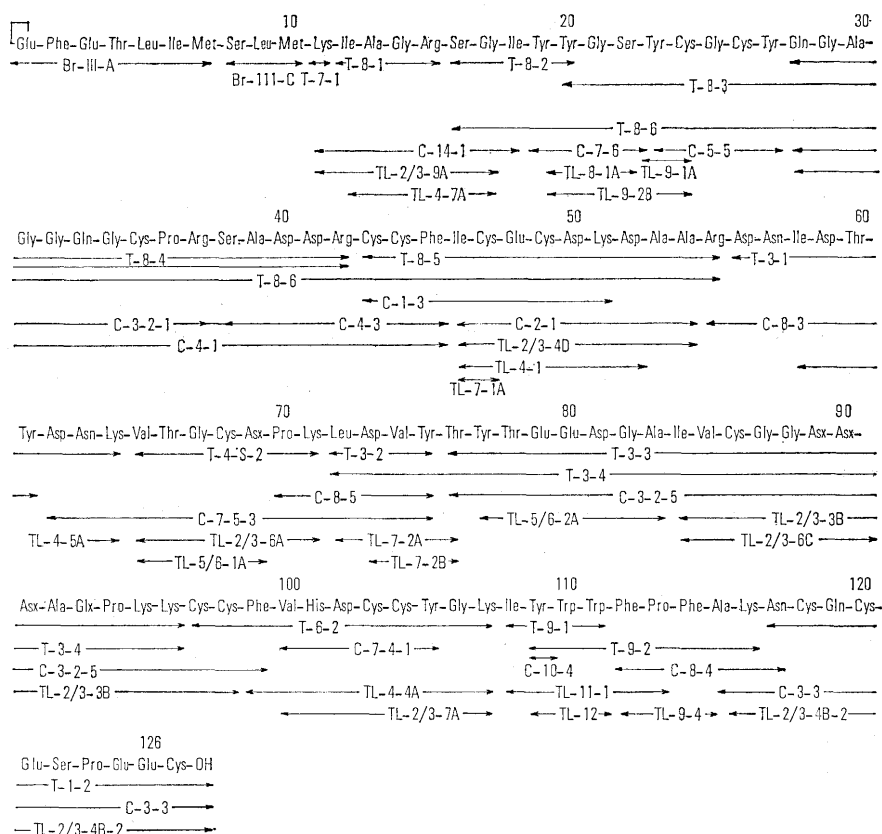


図1. マムシ毒ホスホリパーゼ A₂-II の全アミノ酸配列

直接的な証明を残すほか、109残基（94%）のアミノ酸配列を決定した。

さらに、キモトリプシンペプチド、C-3-3、の部分酸水解物の配列分析と酸性プロテアーゼを用いて行った S-S 架橋構造の分析の結果から、Br-I の全アミノ酸配列を決定した。

以上で、ホスホリパーゼ A₂-II の全アミノ酸配列（図 1）を明らかにしえたが、ホスホリパーゼ A₂-II では、メチオニン 2 残基が N 末端近傍に局在し、グリシンが N 末端側に集中し、アスパラギン酸が分子の中間に集中し、C 末端部分に特異な疎水域が存在している。これらの構造上の特徴は、この酵素の構造と機能の関係に重要な役割を果しているものと推定される。

ブタ脾臓とハチ毒のホスパーゼ A、ならびに、著者が、ホスホリパーゼ A₂-II の構造を決定した直接に報告された 2 種の蛇毒 (*B. gabonica*, *N. melanoleuca*) のホスホリパーゼ A₂ のアミノ酸配列を比較すると、*B. gabonica* との間に共通点が見出されるものの、相同性は比較的低い。このことは、酵素の分子進化上興味深い。

論文審査の結果の要旨

ホスホリパーゼは蛇毒の代表的な酵素であり、毒性との関係のために古くから興味をもたれていたものである。毒性との関係は薄いことが分ったが、ホスホリパーゼは細胞膜修飾試薬として現在非常に注目されている酵素の一つである。従って、本酵素を精製し、諸性質を調べ、構造と活性との関係を明らかにすることは意義深いことである。

本論文は先づマムシ毒よりホスホリパーゼ A₂-II を精製する方法を述べ、次いで全アミノ酸配列の決定を述べたものである。

本論文はマムシ毒の 2 種のホスホリパーゼ A₂ のうち酸性のものを取扱っているが、細胞膜のように酸性基に富む試料に用いるものとして適当な選択である。精製は簡便に行われ収量も高い。

一次構造の決定は酵素のおよび化学的断片化、断片の分画、各断片の配列決定等概ね常法に従っているが、すべての過程が再現性良く行われ、126個のアミノ酸の配列が明快に決定されている。とくに、N-末端から得られるペプチドについては有機合成されたペプチドと質量分析法を用いて厳密に比較検討し、N-末端にピログルタミン酸をもつその構造を決定している。また、エドマン法を充分に駆使して各断片の配列を手際良く決定している。

本酵素の一次構造上の特徴としてメチオニン残基が 2 個とも N-末端部に局在し、アスパラギン酸が中央部に集中し、C-末端部には疎水性アミノ酸が多いことなどが明らかになった。

構造と活性の相関については未だ明らかではないが、他の起源より得られる酸性のホスホリパーゼ A₂ との一次構造上の類似性が少ないことから、活性に必要な構造は比較的小さな領域に限定されていることが推定される。いずれにせよ、本論文の成果を基礎にして今後構造と活性の相関が詳しく研究されることになる。

以上、本論文は生化学的に重要なホスホリパーゼ A₂-II の全アミノ酸配列を決定して構造と活性の相関を追究する基盤を確立した点で意義深い。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。