

ニジマス白血球のアラキドン酸 15-リポキシゲナーゼの精製とその諸性質

吉田美夫*1・沖増英治・雨村明倫

福山大学内海生物資源研究所

Purification and Characterization of Arachidonate 15-Lipoxygenase from Leukocytes of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Yoshio Yoshida*1, Eiji Okimasu and Akinori Amemura

(Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Ohama-cho, Inno-shima, Hiroshima 722-21, Japan¹)

Report Res. Inst. Marine Bioresources, Fukuyama Univ., No.4, 1-12 (1993).

15-Lipoxygenase activity with arachidonic acid as a substrate was detected in leukocyte extract from the kidney of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 15-Lipoxygenase was purified by gel filtration followed by hydroxyapatite chromatography. The enzyme activity towards arachidonic acid was highest at pH 7.5 and at temperatures between 10°C and 20°C. The molecular weight of enzyme estimated by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) was 70,000 near that of the enzyme from human leukocyte (65,000 - 75,000) [E. Sigal et al : *J. Biol. Chem.*, **263**, 5328-5332 (1988)].

リポキシゲナーゼ(LO)は細胞膜から種々の刺激によって産出された遊離アラキドン酸を基質として酸素を添加し、ヒドロペルオキシ酸(HPETE)を作る酵素であり、酸素が添加される炭素の位置によって5-リポキシゲナーゼ(5-LO), 12-リポキシゲナーゼ(12-LO), 15-リポキシゲナーゼ(15-LO)の3種のLOに分けられる¹⁾。哺乳類におけるLO系代謝産物の役割は多岐にわたっており、アレルギー

*1 現住所： 共立商事(株)中央研究所 〒300-12 茨城県稲敷郡荖崎町高見原2-9-22

一、免疫、腫瘍、神経伝達などの各分野において重要な役割を果たしている。

15-LOはアラキドン酸 (C_{20:4})、リノール酸 (C_{18:2})、エイコサペンタエン酸 (C_{20:5}) などの不飽和脂肪酸を基質として反応した後、種々の酵素により生理的に活性のある物質へと代謝されていく。これらの基質の中で動物細胞は一般にアラキドン酸の含有量が高いため、5-, 12-LOと同様15-LOにおいてもその代謝産物は主にアラキドン酸代謝産物であるエイコサノイドであることが知られている。15-LOの生理的役割はまだ確立されていないが、現在のところ、生体膜に及ぼす作用と生理活性のあるリポキシシン(Lxs)を産生する作用と考えられている²⁾。生体膜に及ぼす作用として、ウサギ網状赤血球が赤血球になる際にミトコンドリア膜の破壊に関与したり³⁾、リン脂質にエステル結合したアラキドン酸に酸素添加を行い、膜の特性と過程の変化を誘導したりすることが知られ^{4, 5)}、このことは生体内でも生じていることが報告されている⁶⁾。しかし、15-LOの生理的役割は膜に及ぼす作用よりも主に生理活性のあるLxsを造る方が重要な意味をもっている。

15-LOはヒトでは主に網状赤血球、気管上皮細胞、鼻粘膜細胞、角化細胞、リンパ球、好酸球などに存在し⁷⁾、これまでにウサギ網状赤血球⁸⁾、ウサギ腹腔多形核白血球⁹⁾、ヒト網状赤血球¹⁰⁾、ヒト多形核白血球¹¹⁾、ヒト好酸球増加症患者の白血球¹²⁾などから精製されている。また、その部分アミノ酸配列に基づくオリゴヌクレオチドや抗体をプローブとして、15-LOに対するcDNAや遺伝子DNAのクローニングが行われている。例えば、15-LOのcDNAはヒト¹⁰⁾及びウサギ⁸⁾網状赤血球のcDNAライブラリーにより単離され、その分子量が約75,000の酵素タンパク質であることが報告されている。ヒトLO間でアミノ酸配列を比較すると、5-LOと15-LOでは60%、5-LOと12-LOでは62%、15-LOと12-LOでは80%のホモロジーであることが報告されている⁷⁾。これらのことから5-LOに比較して、15-LOと12-LOは近い関係にあることが報告されている。

このようにLOファミリーは哺乳類においてかなりの研究がなされているが、魚類ではあまりなされておらず、知見に乏しい。一般にLOは香気成分の発生を促進することが知られている¹³⁾。養殖アユにおいては、この香気成分はLO様酵素による高度不飽和脂肪酸の酸化から生成され、養殖アユの特有のにおい成分になることが報告されている¹⁴⁾。また、Germanらはニジマスのエラには12-LOと15-LOが存在し、15-LOが分子量約70,000の酵素タンパクであることを報告している¹⁵⁾。

我々は、先に末梢血に存在する分化したニジマスのマクロファージ細胞をCa²⁺イオノフォアA23-187で刺激することでLxsが産生するとを報告し、15-LO酵素の存在を示唆した¹⁶⁾。本研究はニジマスの造血器官である腎臓から白血球を分離し、Lxs生成の引き金となる15-LO酵素の精製を試みさらにその酵素の特性を検討した。

実験材料および方法

55% Percoll液の調製

Percoll原液を生理的食塩水や培養液にて等浸透圧にするため、Percoll原液 9体積に対し、1.5 M NaCl 1体積の割合で希釈し 55% Percoll液を調製した。(これをストック液(SIP)とした。)

SIP 100 ml = Percoll原液 90 ml + 1.5 M NaCl 10 ml

$$\rho_1 = (V_0 \rho_0 + V_x \rho_x) / (V_x + V_0)$$

ρ_1 : ストック液の密度

ρ_0 : Percoll原液の密度 (1.126 mg/ml)

ρ_x : 1.5 M NaClの密度 (1.058 g/ml)

V_0 : Percoll原液の体積

V_x : 希釈に使う溶液 (1.5 M NaCl)

$$\text{従って } \rho_1 = (90 \times 1.126 + 10 \times 1.058) / (90 + 10) = 1.119 \text{ g/ml}$$

55% Percoll液の密度は0.15 M NaClの検量線により1.066 mg/ml であったから、必要な希釈液の体積は以下の式で求めた。

$$V_y = V_1 (\rho_1 - \rho) / (\rho - \rho_y)$$

V_y : 希釈に使う溶媒 (0.15 M NaCl) の体積

V_1 : SIPの体積

ρ_1 : SIPの密度 (1.126 g/ml)

ρ_y : 0.15 M NaClの密度

ρ : 55% Percoll液の密度 (1.066 g/ml)

$$\text{従って } V_y = 100 (1.119 - 1.066) / (1.066 - 1.0058) = 88.0 \text{ ml}$$

尚、本実験では0.15 M NaClの代わりにL-15培地 (Leibovitz medium) を用いて行った。

末梢血および腎臓からの白血球採取

放血した供試魚の腎臓を摘出し、L-15培地に入れて、ハサミで細片化し、10分間氷中に静置した。静置後、4°C、500 x gで3分間の遠心操作により生じた上清を集め、ペレットは再度L-15培地で懸濁し遠心分離した後、4°C、1,500 x gで5分間、遠心分離した。得られたペレットの懸濁液及び末梢血 0.7 mlを予め4°C、22,000 x gで15分間の遠心操作により、自己密度勾配を形成した55% Percoll液 7 mlに重層した。そして、2,800 x gで30分間遠心分離することにより、ホワイトバ

ンドが生じ、(Fig. 1)これを回収してCa²⁺、Mg²⁺不含のハンクス液で4℃、1,500 x gで5分間の遠心操作を3回行い白血球を洗浄した。そして、0.5%トリパンプルー溶液で生死判別を行い、トーマの血球計算盤で白血球数をカウントした。

15-リポキシゲナーゼ酵素の活性測定

酵素活性は基質としてアラキドン酸を反応させて生じた15-HETEの量を235 nm, 210 nmの吸収の違いを利用した逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC法)で測定することによって求めた。なお、内部標準物質として13-HPODEを用いた。酵素活性はタンパク質1 mgあたりのunitsで表した。1 unitは15℃で15分間の反応で生じた15-HETEのnmolと定義した。

反応液は、1 mM CaCl₂, 10 mMリン酸緩衝液(pH 7.5)に32 mMのアラキドン酸を加えて、15℃で15分間反応させた後、酢酸でpH 3.5に調整した2-プロパノールを1 ml加えて反応を停止させ、酸抽出した。この溶液中でヒドロペルオキシ酸 (15-HPETE) をヒドロキシ酸 (15-HETE) へ還元するために、トリメチルフォスファイト 50 μlを加えて攪拌した後、クロロフォルム 2 mlを加えて攪拌した。そして、4℃で3,000 rpm, 5分間遠心分離を行った後、上層を捨て下層の有機溶媒層を窒素気流下で乾固させた。これにクロマトグラフィーの平衡化溶媒 (メタノール/水/酢酸=90/10/0.01) 100 μlを加え、超音波にかけて懸濁した。この懸濁液を0.45 μmのミリポアフィルターで濾過し、その20 μlを逆相カラム (ODS-80TM) にかけた。溶出液はメタノール/水/酢酸=90/10/0.01を用い、流速は0.5 ml/minであった。クロマトグラムは235 nmと210 nmの2波長でそれぞれ調べた。

酵素の精製

10尾のニジマス腎臓を摘出し Percoll法により白血球を採取した。白血球はトーマの血球計算盤により 3.0 x 10⁷ cells/mlの濃度になるように調整した。この白血球のペレットに10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) と1 mM エチレンジグリコールビス (2-アミノエチルエーテル) 四酢酸 (EGTA), 1 mMフェニルメチルサルフォニルフルオリド (PMSF) などのプロテアーゼ阻害剤を添加して3.0 x 10⁷ cells/mlの濃度になるように調整した。

白血球懸濁液は水中で超音波処理を output level 3, 15秒を30秒間隔で2回行い、白血球を破壊した。その後、100,000 x gで60分間遠心分離を行い、得られた上清を粗酵素液とした。30%飽和硫酸溶液になるように硫酸を添加し、40分間攪拌した後、沈澱したタンパク質を取り除くため4℃、10,000 x gで20分間遠心分離した。上清は60%飽和硫酸溶液になるように硫酸を添加した。一晩攪拌した後、4℃、10,000 x gで20分間遠心分離を行い、得られたペレットを2 mlのKPB-1 (50 mMリン酸緩衝液, 10 μM CaCl₂, 1 mM DTT, 20 μM硫酸第一鉄アンモニウム, 5%グリセリン, pH 7.0) で再懸濁した。懸濁液100 μlを透析し、残りを0.45 μmのミリポアフィルターで濾過し、水中で冷やしたゲル濾過カラム (TSK gel G3000SW_{XL}) にかけた。溶出液は冷KPB-1 (50 mMリン酸緩衝液, 10 μM CaCl₂, 1 mM DTT, 20 μM硫酸第一鉄アンモニウム, 5%グリセリン, pH 7.0) を用い、

流速は 0.2 ml/minで行った。得られた活性画分はセントリフローCF25を用いて濃縮した。

次にこの濃縮液をハイドロキシアパタイトカラム (HA-1000 glass) にかけて。溶出液は冷KPB-1 (50 mM リン酸緩衝液, 10 μ M CaCl₂, 1 mM DTT, 20 μ M 硫酸第一鉄アンモニウム, 5%グリセリン, pH 7.0) と冷KPB-2 (250 mM リン酸緩衝液, 10 μ M CaCl₂, 1 mM DTT, 20 μ M 硫酸第一鉄アンモニウム, 5%グリセリン, pH 7.0) を用いた。まず, 分析カラムを冷KPB-1で平衡化させて, 試料注入後から50分まで冷 KPB-1で溶出し, 150分後に冷KPB-2になるように直線濃度勾配で溶出した。流速は 0.3 ml/minで行った。

酵素反応の至適温度と至適pH

粗酵素液をそれぞれの温度 (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 °C) で15分間, アラキドン酸と反応させて酵素反応の至適温度を検討した。また, 至適pHを調べるために pH 4.5~5.5の範囲では 100 mMクエン酸ナトリウム緩衝液, pH 6.0~8.0の範囲では100 mMリン酸カリウム緩衝液, pH 8.5~9.5の範囲では100 mM トリス塩酸緩衝液を使用した。

結 果

1. 15-リポキシゲナーゼ酵素の特性

Fig. 3に示したように, HPLCにおいてアラキドン酸の保持時間は約32分であり, 235 nmのクロマトグラムではピークが現れず, 210 nmのクロマトグラムにおいてピークが現れることが特徴である。15-HETE の保持時間は約13分であり, 235 nmよりも210 nmのほうがピークが低いことが特徴である。内部標準物質の13-HPODEの保持時間は約11分であり, 235 nmよりも210 nmの方がピークが高いことが特徴である。

これらの特徴を利用して, 15-LO酵素の活性を測定した。

① 15-LO酵素反応の至適温度

Fig. 4に示したように, 15-LO反応の至適温度は15°Cであり, 0°C以下および40°C以上で活性が認められなかった。

② 15-LO酵素反応の至適pH

Fig. 5に示したように, 15-LO酵素反応の至適pHは7.5であり, 酸性領域ではpH 4.5以下でアルカリ性領域では pH 9.5以上で活性が認められなかった。

③ 15-LO酵素の分子量

Fig. 6に示したように, 15-LO酵素を 0.2 ml/minの流速でTSK gel G3000SW_{XL}にかけると, 約 9.6 mlで 15-LO 酵素が溶出してきた。標準マーカーによる検量線で分子量を推定すると, 約 70,000の酵素タンパクであった。

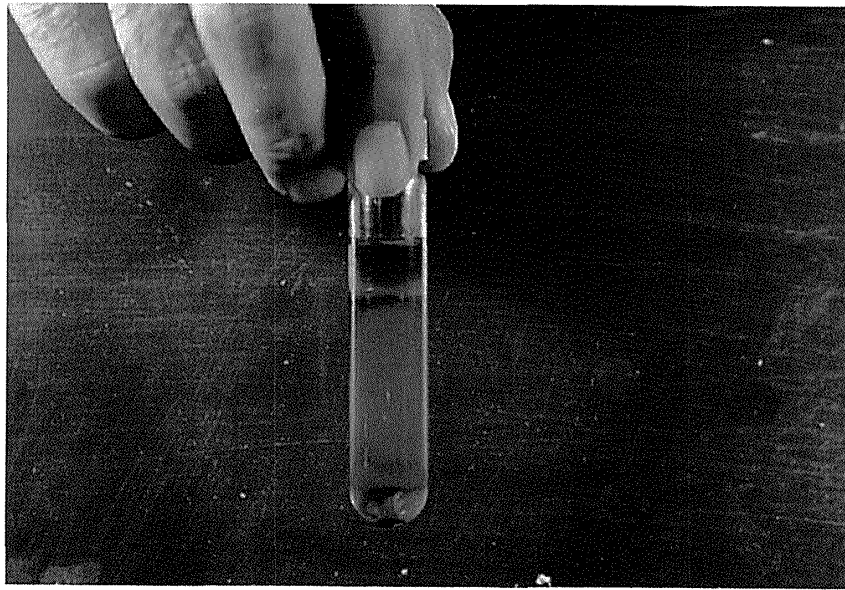


Fig. 1. Isolation of leukocytes from peripheral blood by 55% Percoll continuous gradients.

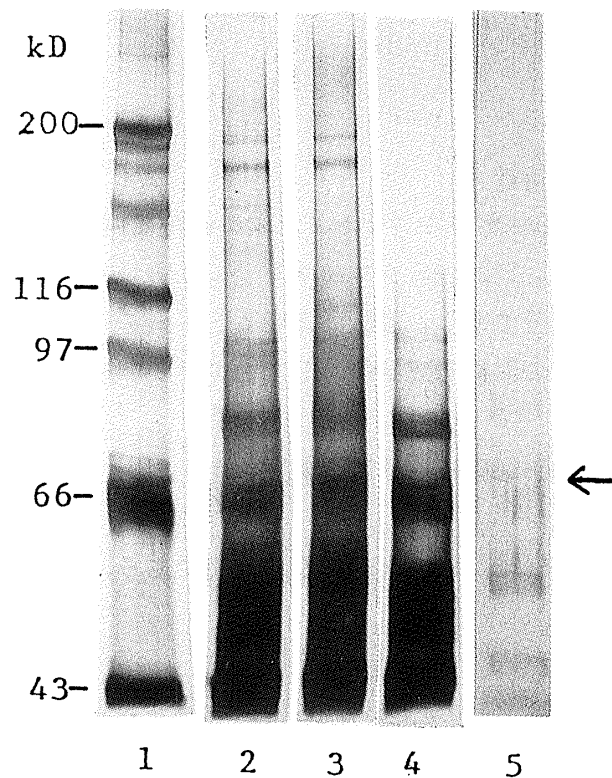


Fig. 2. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of fractions obtained during the purification of 15-lipoxygenase. The samples were molecular weight standards (lane 1), crude extract (lane 2), 30-60% ammonium sulfate precipitant (lane 3), G3000SW_{XL} elute (lane 4) and hydroxyapatite elute (lane 5). The samples were run on a 7.5% SDS polyacrylamide gel. The gel was stained with silver stain.

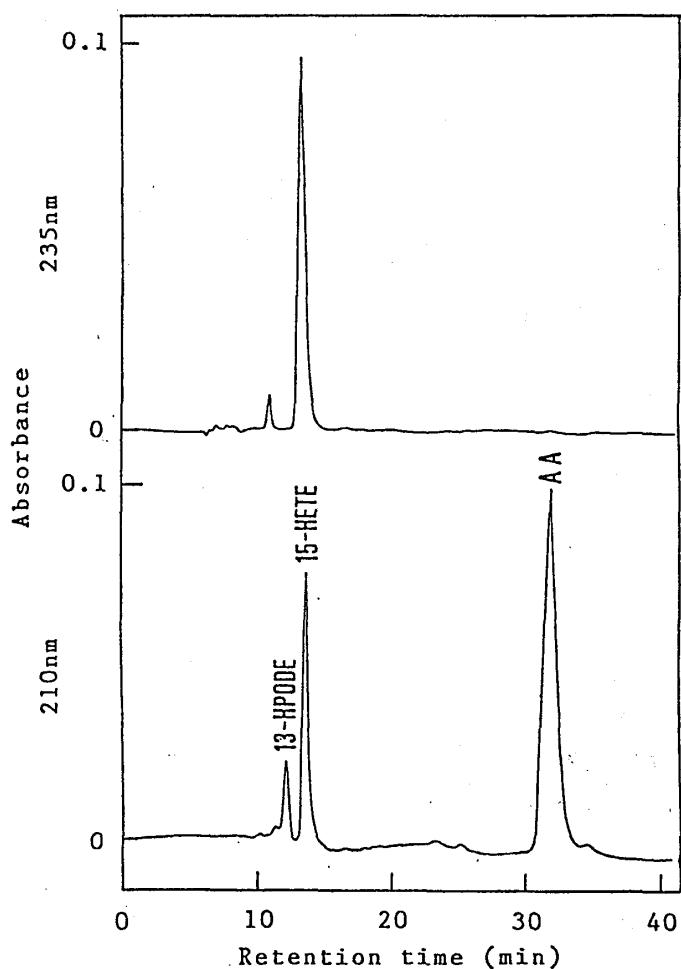


Fig. 3. HPLC chromatogram of authentic 13-HPODE, 15-HETE, and arachidonic acid (AA).

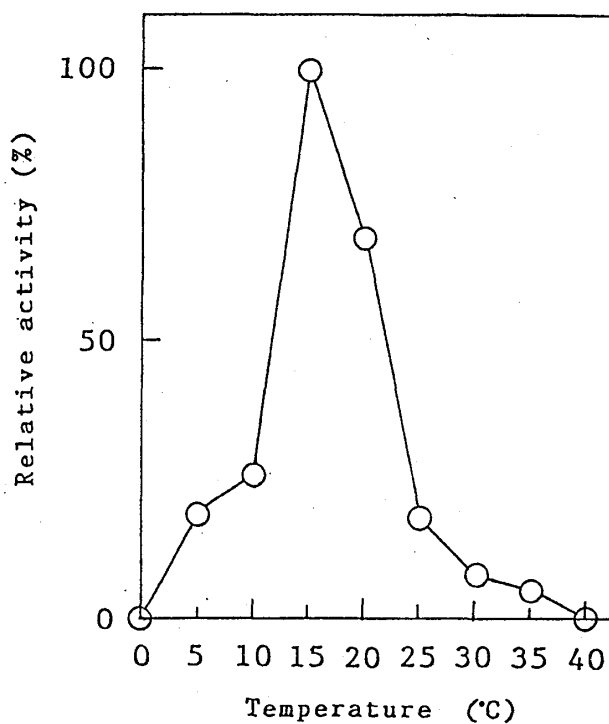


Fig. 4. Effect of temperature on the reaction rate. The reaction rate was expressed as relative activity to the highest rate at 15°C.

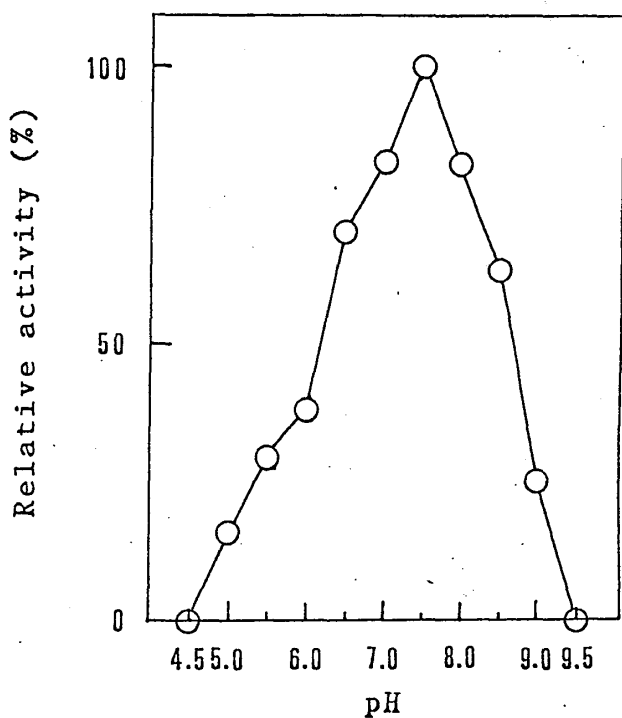


Fig. 5. Effects of pH on the reaction rate. The buffers used were 100 mM sodium citrate at pH 4.5, 5.0 and 5.5, 100 mM potassium phosphate at pH 6.0, 6.5, 7.0 7.5 and 8.0, and 100 mM Tris-HCl at pH 8.5, 9.0 and 9.5. The reaction rate was expressed as relative activity to the maximal rate at pH 7.5.

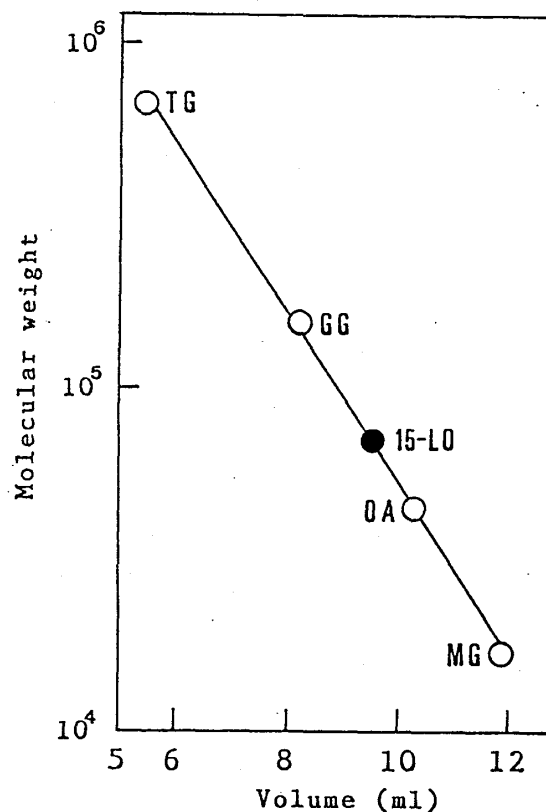


Fig. 6. Estimation of molecular weight arachidonic acid 15-lipoxygenase by gel filtration on TSK gel G3000SWXL column. TG, thyroglobulin; GG, gamma globulin; OA, ovalbumin; MG, myoglobin; 15-LO, 15-lipoxygenase.

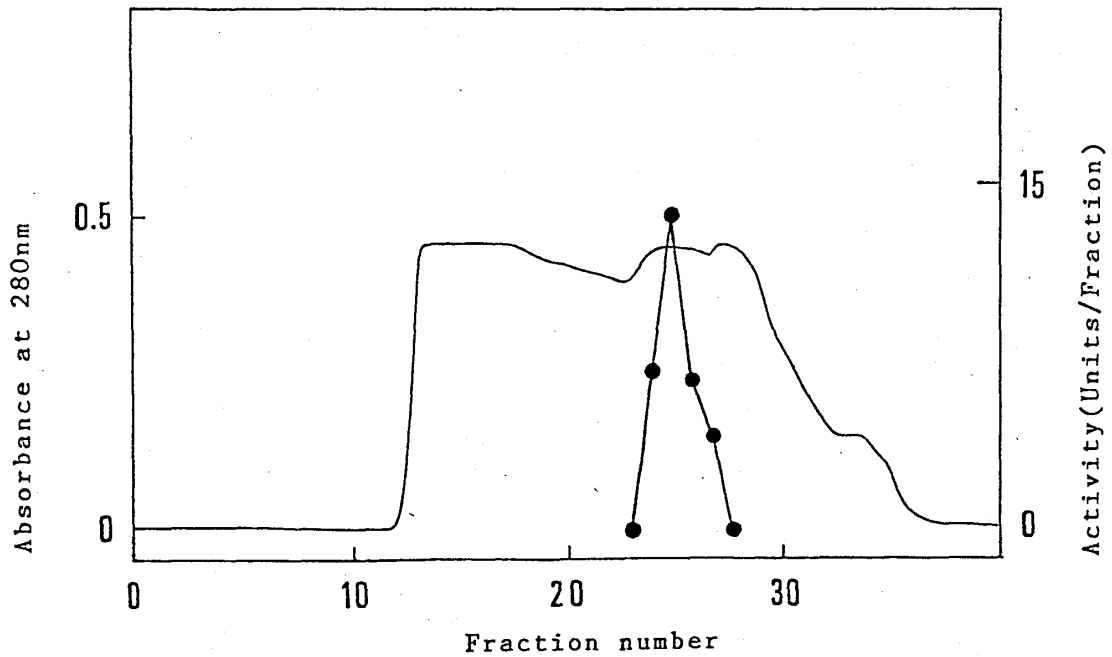


Fig.7. Elution profile of protein (—) and enzymic activity (●) obtained from gel filtration on TSK gel G300 SW column. The 30 - 60% ammonium sulfate precipitant was eluted with 0.05 M potassium phosphate buffer at a flow rate of 0.2 ml/min.

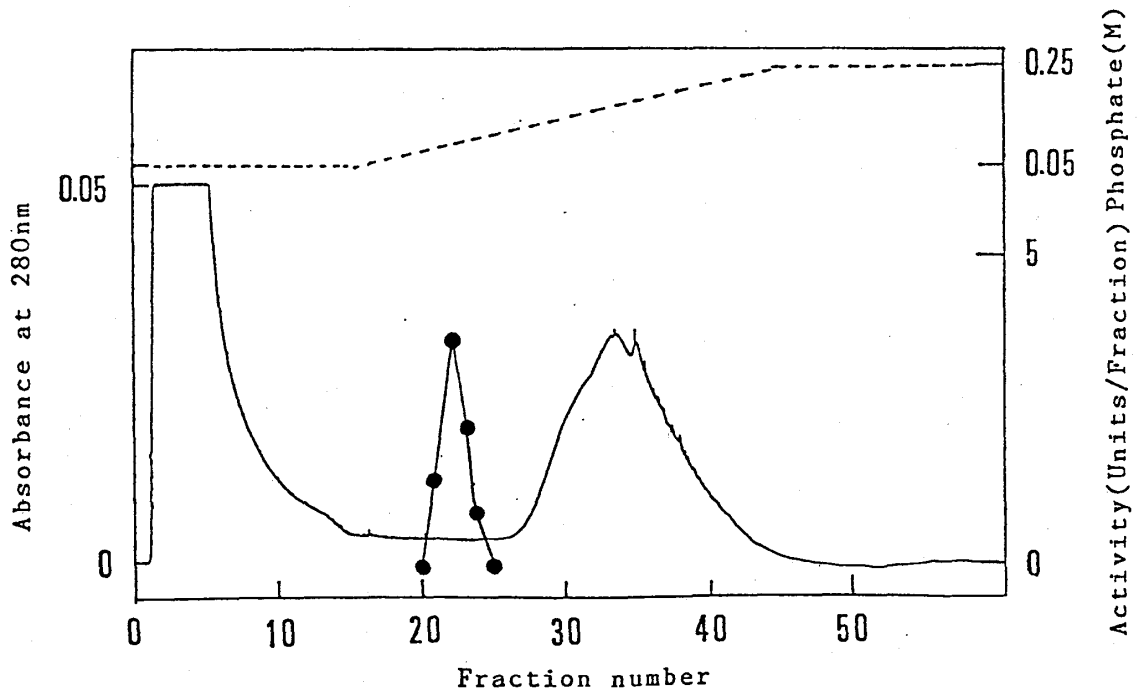


Fig. 8. Elution profile of protein (—) and enzymic activity (●) obtained from chromatography on hydroxyapatite. The column was eluted with a linear gradient (--) of increasing potassium phosphate (0.05 - 0.25 M) at a flow rate of 0.3 ml/min.

2. 15-リポキシゲナーゼ酵素の精製とその問題点

15-L0酵素の精製純度を高めるために 100,000 x g上清の粗酵素液を硫酸塩析し、ゲルろ過クロマトグラフィー (TSK gel G3000SW_{XL})カラム, ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーに順次かけ、各精製段階における精製純度を検討した。

Table 1. Purification of 15-lipoxygenase from rainbow trout leukocytes.

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units / mg)	Yield (%)	Purification fold
Supernatant (100,000 xg)	42.2	229	5.4	100	1
Ammonium Sulfate (30-60%)	14.6	175	12.0	76.4	2.2
G3000SW _{XL}	2.14	31.5	14.7	13.8	2.7
Hydroxyapatite	0.28	7.2	26.1	3.1	4.8

硫酸塩析により得た 30-60%沈澱物の段階では回収率が 76.4%, 精製純度は 2.2倍であった (Table 1)。この 30-60%硫酸沈澱物をTSK gel G3000SW_{XL}カラムにかけると, Fig. 7のようなクロマトグラムになった。このとき, 酵素活性は22~27番目のフラクションに現れ, その中で24番目のフラクションが最大のピークとなった。この段階では回収率が13.8%, 精製純度は2.7倍であった。さらにこの活性画分をハイドロキシアパタイトカラムにかけるとFig. 8のようなクロマトグラムになった。このとき, 酵素活性は20~25番目のフラクションに現れ, その中で22番目のフラクションが最大のピークとなった。この最終精製段階における回収率は3.1%, 精製純度は4.8倍であった。これらの各精製段階における活性画分を SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い, 精製度合を確かめた (Fig. 2)。その結果, 硫酸塩析の段階では粗酵素液に比べ, あまりバンドの数は変わらなかったが, TSK gel G3000SW_{XL}カラム, ハイドロキシアパタイトカラムに行くにつれ, 精製度が高くなることが確認できた。

考 察

15-L0酵素は最初にダイズで発見され、現在では、動物において種々の細胞や臓器に存在していることが明らかになった。しかし、魚類においてはあまり研究がなされておらず、Germanらがニジマスのエラに 12-L0酵素と 15-L0酵素が存在し、15-L0酵素の分子量が約 70,000であることを報告しているに過ぎない¹⁵⁾。

我々はマダイにおいても 15-L0酵素が存在していることを認めた（結果は示さず）。今回、ニジマスの腎臓から分離した白血球に存在する 15-L0は最終精製純度が 4.8倍、回収率は 3.1%で非常に不安定な酵素であることが明らかになった。哺乳類の 15-L0酵素も非常に不安定な酵素で、そのほとんどがカラム精製段階において回収率がかなり低下することが知られている。

ニジマス腎臓白血球に存在する 15-L0酵素の分子量は約70,000であることがFig. 6より明らかにされた。哺乳類の 15-L0酵素の分子量が約65,000～ 75,000の範囲にあるので、哺乳類の15-L0酵素と類似している。ニジマス白血球の 15-L0酵素反応の至適温度はFig. 4より、15℃であった。哺乳類の 15-L0酵素反応の至適温度を検討した報告は見られないが、ほぼ体温に近い温度（37℃）で酵素活性を測定している。ニジマスの生息水温は13～18℃であることから哺乳類と同様、酵素活性も至適水温によるものと示唆された。ニジマス白血球の 15-L0酵素反応の至適pHはFig. 5より、pH 7.5 であった。ウサギ白血球⁹⁾ではpH 7.0で、他の哺乳類においてもpH 7.0で酵素活性を測定している。

ニジマスの腎臓より分離した白血球の 15-L0酵素は哺乳類の 15-L0酵素と比べ、酵素の安定性、分子量及び酵素反応の至適pHの点において類似していたが、酵素反応の至適温度においては異なっていた。これは両者の至適水温と至適体温の違いによるものではないかと推察された。

要 約

ニジマス白血球の 15-L0酵素の分子量は約70,000であり、哺乳類の 15-L0酵素の分子量とも類似していた。至適反応pHは 7.5であり、これも至適反応pH 7.0をもつ哺乳類と類似していた。しかし、至適反応温度は15℃であり、これは至適反応温度を高温領域にもつ哺乳類とは異なっていた。ニジマス白血球の 15-L0酵素の最終精製段階における回収率は 3.1%、精製純度が 4.8倍と非常に不安定な酵素であることが明らかになった。

文 献

- 1) 山本尚三, 吉本谷博, 上田夏生 : 生化学, **63**, 188-201 (1991).
- 2) S. E. Dahlen, and C. N. Serhan : " Lipoxygenase and Their Products ", pp. 161-166, Academic Press, New York (1988).
- 3) S. M. Rapport, T. Schewe, R. Wiesner, W. Halangk, P. Ludwig, M. Janicke-Hohne, C. Tannert, C. Hiebsch and D. Klatt : Eur. J. Biochem., **96**, 545-561 (1979).
- 4) H. Kuhn, F. Pliquett, S. Wunderlich, T. Schewe and W. Krause : FEBS Lett., **735**, 283-290 (1983).
- 5) G. Jung, D. C. Yang and A. Nakano : Biochem. Biophys. Res. Commun., **130**, 559-566 (1985).
- 6) H. Kuhn and A. R. Brash : J. Biol. Chem., **265**, 1454-1458 (1990).
- 7) 和泉孝志 : 生化学, **63**, p 212-217 (1991).
- 8) J. Fleming, B. J. Thiele, J. Chester, J. O. Prey, A. Janetzki, A. Aitken, I. A Anton, S. M. Rapoport and P. R. Harrison : Gene, **79**, 181-188 (1989).
- 9) S. Narumiya, J. A. Salmon, F. H. Cottee, B. C. Weatherley and R. J. Flower : J. Biol. Chem., **256**, 9583-9592 (1981).
- 10) E. Sigal, C.S. Craik, E. Highland, D. Grunbergar, L.L. Costello, R. A. F. Dixon and J. A. Nadel : Biochem. Biophys. Res. Commun., **157**, 457-464 (1988).
- 11) T. Izumi, O. Radmark and B. Samuelsson : Adv. Prostaglandin, Thromboxane Leukotriene Res., **21**, 101-104 (1990).
- 12) E. Siegal, D. Grunbergar, C. S. Craik, G. H. Caughey and J. A. Nadel : J. Biol. Chem., **260**, 5328-5332 (1988).
- 13) H. Kuhn and A. R. Brash : J. Biol. Chem., **265**, 1454-1458 (1990).
- 14) C. H. Zhang, T. Shirai, T. Suzuki and T. Hirano : Nippon Suisann Gakkaishi, **58**, 959-964 (1992).
- 15) J. B. German and R. K. Crevelling : J. Agric. Food Chem., **38**, 2144-2147 (1990).
- 16) Y. Yoshida, E. Okimasu, K. Takeda and A. Amemura : Report Res. Inst. Marine Bioresources, Fukuyama Univ., **4**, 13-22 (1993).