

イトマキヒトデホスホリパーゼ A₂ 変異体の 基質極性基特異性

岸村 栄毅,* 尾島 孝男, 林 賢治, 西田 清義

(2003 年 1 月 20 日受付, 2003 年 5 月 14 日受理)

北海道大学大学院水産科学研究科

Polar-group specificity of starfish phospholipase A₂ mutant

HIDEKI KISHIMURA,* TAKAO OJIMA,
KENJI HAYASHI AND KIYOYOSHI NISHITA

Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan

Site-directed mutagenesis study of phospholipase A₂ (PLA₂) from the pyloric ceca of starfish *Asterina pectinifera* was used to probe the relationship between polar-group specificity and structure of the pancreatic loop region. The sequence of the cDNA encoding the starfish PLA₂ was exchanged by the oligonucleotide-directed dual amber-long and accurate polymerase chain reaction method to insert Lys residue between Cys 62 and Gly63 of the wild-type PLA₂ (WT PLA₂) expressed by *Escherichia coli*. The modified cDNA was inserted into the expression plasmid pET-16b, and PLA₂ mutant was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) by induction with isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside. The PLA₂ mutant produced as inclusion bodies was dissociated with urea and 2-mercaptoethanol and renatured by dialyzing against Tris-HCl buffer. Renatured PLA₂ mutant showed essentially the same properties as the WT PLA₂ with respect to positional specificity of substrate, optimum pH and Ca²⁺ requirement. However, the PLA₂ mutant hydrolyzed phosphatidylethanolamine (PE) more effectively than the WT PLA₂. Therefore, it was suggested that the structure of the pancreatic loop region may be associated with polar-group specificity of PE.

キーワード：ホスホリパーゼ A₂ 変異体, 基質極性基特異性, イトマキヒトデ, 幽門盲のう, cDNA

ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) [EC 3.1.1.4] は, 1,2-ジアシル型グリセロリン脂質の sn-2 位の脂肪酸エステルを特異的に加水分解する酵素であり, は乳動物すい臓由来の PLA₂ が古くからよく研究されている。¹⁻⁴⁾ は乳動物すい臓 PLA₂ は分子量約 14,000 で, 分子内に 7 個のジスルフィド結合を有する安定なタンパク質である。また, その活性発現には 1 mM 以上の Ca²⁺ を必要とし, pH 9 付近に最適 pH を示す。⁵⁾ 一方, 海産無脊椎動物由来の PLA₂ に関する研究はほとんど無い。

先に, 我々は北海道沿岸で採取されたヒトデ類 4 種 (イトマキヒトデ *Asterina pectinifera*, ニチリンヒトデ *Solaster paxillatus*, ニッポンヒトデ *Distolasterias nippon*, およびヒトデ *Asterias amurensis*) の幽門盲のうから調製した粗酵素液中のホスホリパーゼ A (PLA) 活性を測定し, イトマキヒトデ幽門盲のうの PLA 活性

が他 3 種のそれらに比べ著しく高値であることを見出した。⁶⁾ そこで, イトマキヒトデ幽門盲のうから PLA₂ の精製を試み, その結果, 1 種類の PLA₂ が単離・精製された。精製された PLA₂ は pH 9.0 付近に最適 pH を有し, 1 mM 以上の Ca²⁺ により強く賦活され, また, 基質リン脂質の sn-2 位に結合する脂肪酸をその鎖長や二重結合数によらず非特異的に加水分解した。⁷⁾ イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ のこれらの性質は, は乳動物すい臓 PLA₂ のそれと同様であった。しかしながら, イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ の分子活性 (1.8 × 10⁹ U/mol) は, 同様の方法で測定した市販のブタすい臓 PLA₂ (Sigma) の分子活性 (6.1 × 10⁷ U/mol) と比較して 30 倍高く, また, ホスファチジルエタノールアミン (PE) に比べてホスファチジルコリン (PC) をよく加水分解し, 基質極性基に対してブタすい臓 PLA₂

*Tel : 81-138-40-5519. Fax : 81-138-40-5518. Email : kishi@fish.hokudai.ac.jp

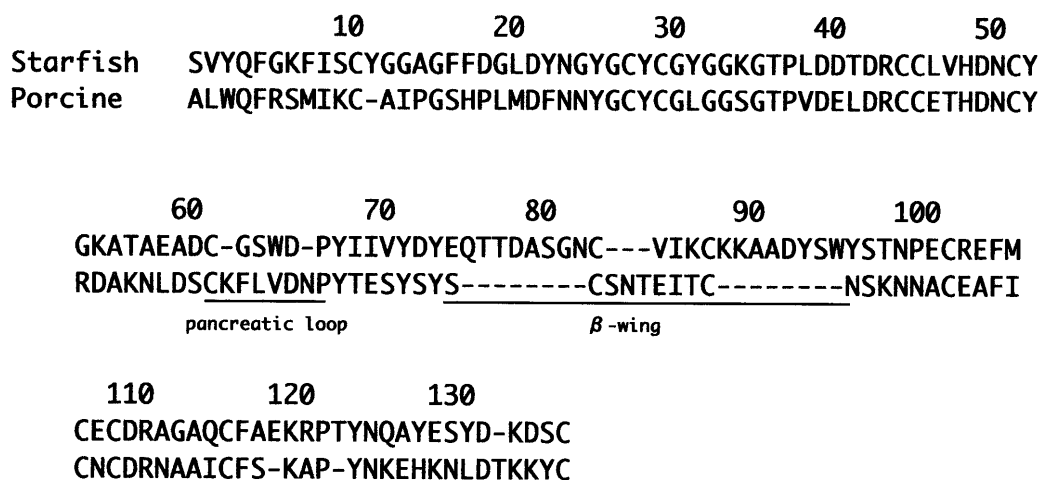


Fig. 1 Alignment of the amino acid sequences of the starfish PLA₂ and porcine pancreatic PLA₂. Dashes indicate deletions introduced for maximizing the sequence similarity. The locations of the pancreatic loop and β-wing are shown with solid bars based on the crystallographic studies of bovine pancreatic and *Crotalus atrox* venom PLA₂s.^{5,20} Starfish, *A. pectinifera* PLA₂^{8,9}; Porcine, porcine pancreatic PLA₂.²¹

と異なる性質を示した。⁷⁾

また、前報^{8,9)}において、イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ の全アミノ酸配列を決定した。イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ は 137 アミノ酸残基から成り、その分子量は 15,300.1 と算出された (Fig. 1)。また、イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ は、Cys-11 および pancreatic loop に相当する部位を有することから I 型 PLA₂⁵⁾ に属すると考えられた。しかしながら、イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ は、ブタすい臓 PLA₂ のアミノ酸配列と比較して、pancreatic loop 部位に 2 残基の欠損および β-ウィングに相当する部位に 16 残基の挿入と 3 残基の欠損を有し、新たなタイプの I 型 PLA₂ に分類された (Fig. 1)。^{8,9)} イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ の高い比活性や PE に比べて PC をよく加水分解する基質極性基特異性は、本 PLA₂ のこのような構造に起因すると推察された。

そこで、前報において、⁹⁾ イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ の cDNA のクローニングを行った。その結果、3 種類のクローン (cDNA 1-3) が得られ、cDNA 1 から演繹されたアミノ酸配列はタンパク質から決定したアミノ酸配列と完全に一致した。さらに、この cDNA 1 を用いてイトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ の大腸菌発現系を構築した。¹⁰⁾ 大腸菌により発現したワイルドタイプ PLA₂ (WT PLA₂) は、イトマキヒトデ幽門盲のうから単離された PLA₂ と同様の酵素化学的性質を有した。

本研究は、イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ の基質極性基特異性と pancreatic loop 部位領域の構造との関係を明らかにする目的で、WT PLA₂ の pancreatic loop 部位の Cys62-Gly63 間に Lys 残基を導入した PLA₂ 変異体を作製し、その PLA₂ 変異体の酵素化学的性質につ

いて調べた。

実験方法

試料 イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ をコードする cDNA 1 は、前報⁹⁾において得られたものを用いた。発現用の宿主大腸菌 BL21 (DE3) および発現用のプラスミド pET-16b は Stratagene より購入した。Mutan-Super Express Km キットおよび制限酵素は TaKaRa より購入した。基質リン脂質の調製に用いたスルメイカ *Todarodes pacificus* は 1999 年 9 月に北海道函館沖で採取し、-20℃ で凍結保存した。卵黄 PC は和光純薬工業より購入した。1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC) は Avanti Polar Lipid より購入した。ブタすい臓 PLA₂ は、天野製薬および Sigma より購入した。

脂質の抽出および分析 脂質の抽出および脂質成分の薄層クロマトグラフィー (TLC)、分取 TLC, TLC-炎イオン化検出 (TLC-FID) 法およびガスクロマトグラフィー (GLC) による分析は前報^{11,12)}と同様に行った。スルメイカ外とう筋脂質からの PC および PE の調製は、分取 TLC {展開溶媒: クロロホルム-メタノール-酢酸-水 (55:17:3:2, v/v/v/v)} により行った。

酵素活性の測定 卵黄 PC を基質に用いて前報⁷⁾と同様に行った。活性の単位は 1 時間に 1 μg の基質を加水分解する活性を 1 ユニット (U) とした。

酵素の基質位置特異性の分析 POPC を基質に用いて前報⁷⁾と同様に行った。比較のため、ブタすい臓 PLA₂ (天野製薬) を用いて同様の分析を行った。

酵素の基質極性基特異性の分析 スルメイカ外とう筋脂質から調製した PC および PE を基質に用いて前報⁷⁾

と同様に行った。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は, 0.1% SDS を含む 15% ポリアクリルアミドスラブゲルを用いて Laemmli の方法¹³⁾ に準じて行った。ゲルの染色には Coomassie Brilliant Blue R-250 を用いた。

アガロースゲル電気泳動 核酸溶液に 1/10 容量の色素マーカー液 {40 mM Tris-酢酸緩衝液 (pH 7.8), 1 mM EDTA, 40% グリセロール, 0.1% プロモフェノールブルー, および 0.1% キシレンシアノール} を加えて混合した後, 1.5% アガロースゲルに注入し, 50 V の定電圧で泳動を行った。泳動用緩衝液には核酸検出のために予め 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のエチジウムブロマイドを添加した。泳動後, 紫外線 (312 nm) 照射により核酸を検出し, ポラロイド 667 フィルムを用いて撮影した。

塩基配列分析 DNA の塩基配列分析は, ジデオキシチェーンターミネーション法により解析した。すなわち, ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction キット (Perkin Elmer-ABI) を用いて反応を行った。反応は 96°C で 30 秒間, 50°C で 15 秒間, 60°C で 4 分間を 1 サイクルとして, 合計 25 サイクル行った。生成した DNA はエタノール沈殿により回収した後, 50 mM EDTA-ホルムアミド (1:5, v/v) に溶解し, DNA シークエンサー (Perkin Elmer-ABI) により塩基配列を分析した。

タンパク質の定量 タンパク質の定量は, ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として Lowry *et al.* の方法¹⁴⁾ に準じて行った。

結 果

PLA₂ 変異体発現ベクターの構築 WT PLA₂ の pancreatic loop 部位の Cys62-Gly63 間に Lys 残基を導入した PLA₂ 変異体を作製するため, その発現ベクターを構築した。WT PLA₂ をコードする cDNA の pancreatic loop に相当する部位の塩基配列は oligonucleotide-directed dual amber-long and accurate polymerase chain reaction (ODA-LA PCR) 法により, Mutan-Super Express Km キット (TaKaRa) を用いて変異させた。すなわち, WT PLA₂ をコードする cDNA が挿入された pBluescript II KS+ を *Eco* R I および *Bam* H I で制限消化した後, その挿入断片を, 同様に *Eco* R I および *Bam* H I で制限消化したプラスミド pKF18k にサブクローニングした。このプラスミドを用いて大腸菌 JM109 を形質転換した後, カナマイシン耐性遺伝子上に二重のアンバー変異を持つ組換えプラスミド pKF18k を得た。次いで, 変異用プライマー (5'-GCGGAGG CCGACTGCAAGGGTTCTTGGGACCCC-3') とアンバーを復帰させるためのセクションプライマーを用い

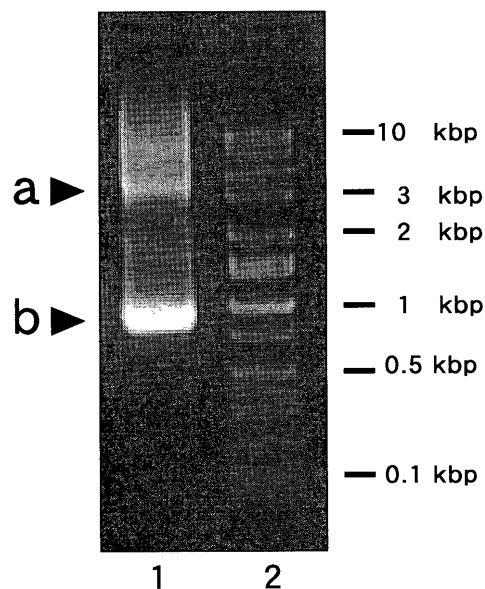


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of LA PCR product. 1, LA PCR products; 2, Hi-Lo DNA Marker (TaKaRa). a, mutation-selection primer; b, LA PCR product amplified with mutation-selection primer.

て LA PCR を行った。その結果, 両プライマー間の DNA 配列が増幅され, 約 800 bp の変異導入-セクション DNA が生成し, この DNA が PCR のプライマーとなり, ポリメラーゼ反応がさらに進行し, 約 3 kbp のニックの入った二本鎖環状 DNA が形成された (Fig. 2)。これを *Sup*⁰ の大腸菌 MV1184 株に導入するとニックが連結され, カナマイシン耐性形質転換体を得られた。この形質転換体から変異導入プラスミドを精製した後, PLA₂ をコードする領域の塩基配列分析を行った。その結果, Fig. 3 に示すように, 5'-末端から 190-192 塩基目に Lys に対応するコドン AAG が挿入されており, イトマキヒトデ PLA₂ の Cys62-Gly63 間に Lys 残基を導入した PLA₂ 変異体をコードする cDNA が得られた。

PLA₂ 変異体の大腸菌による発現 カナマイシン耐性形質転換体から精製した変異導入プラスミドを用いて, PLA₂ 変異体をコードする領域を PCR により増幅した。PCR 産物は *Nco* I および *Bam* H I で消化した後, 同様に *Nco* I および *Bam* H I で制限消化した発現用のプラスミド pET-16b にサブクローニングした。このプラスミドを用いて発現用の大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した後, IPTG 誘導により PLA₂ 変異体を発現させた。その結果, Fig. 4 に示すように, 1 mM の IPTG を添加した後, 3~4 時間後に PLA₂ 変異体が最も多く発現された。そこで, 1 L の培養液で PLA₂ 変異体を多量に発現させた。発現した PLA₂ 変異体は不溶性の封入体を形成

TCAGTTTACCAGTTCGGCAAGTTCATTCGTGCTATGGTG 40
S V Y Q F G K F I S C Y G
1 10

GTGCTGGGTTTTTCGATGGGTTGGACTACAACGGCTATGG 80
G A G F F D G L D Y N G Y G
20

GTGTTACTGCGGCTACGGAGGCAAAGGAACACCGTTGGAT 120
C Y C G Y G G K G T P L D
30 40

GACACCGACAGATGCTGTCTAGTGCACGATAACTGTTACG 160
D T D R C C L V H D N C Y
50

GCAAAGCTACCGCGGAGGCCGACTGCAAGGGTTCTTGGGA 200
G K A T A E A D C K G S W D
60

CCCCTACATCATAGTTTACGACTATGAACAAACCACTGAT 240
P Y I I V Y D Y E Q T T D
70 80

GCGTCTGGAACTGTGTCATCAAATGCAAGAAAGCGGCCG 280
A S G N C V I K C K K A A
90

ACTATTCTTGGTATTCTACCAATCCCGAATGCAGAGAGTT 320
D Y S W Y S T N P E C R E F
100

CATGTGCGAATGTGACCGCGCGGGGCGCAGTGCTTCGCT 360
M C E C D R A G A Q C F A
110 120

GAAAAGCGCCCAACGTACAACCAAGCTTACGAGTCATACG 400
E K R P T Y N Q A Y E S Y
130

ACAAGGATTCATGC 414
D K D S C

Fig. 3 The nucleotide and deduced amino acid sequence of the starfish mutant PLA₂ cDNA. The deduced amino acid sequence and the residue numbers are shown below the codons. The single-letter amino acid code is used. Numbers in the right margin refer to the last nucleotide in each row. Annealing site of mutation-primer is underlined.

したため、8 M 尿素と 10 mM 2-メルカプトエタノールで可溶化した後、透析により再生し、活性型の PLA₂ 変異体を調製した。

PLA₂ 変異体の酵素化学的性質 本研究において作製された PLA₂ 変異体により POPC を加水分解し、生成した遊離脂肪酸の組成を分析した。その結果、WT

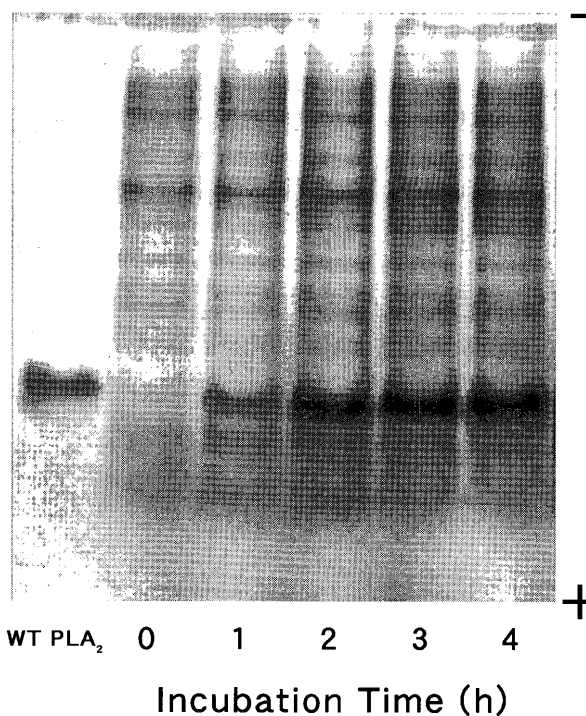


Fig. 4 Overexpression of PLA₂ mutant by IPTG induction. Expression of PLA₂ mutant in *E. coli* BL21 (DE3) containing recombinant pET-16b was induced by 1 mM IPTG. Aliquots of the culture (200 μ L) were pipetted off at 1–4 h after induction and the protein composition was analyzed by SDS-PAGE. WT PLA₂, wild-type PLA₂ expressed by *E. coli*.¹⁰⁾

Table 1 Composition of fatty acids released from 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine by hydrolysis of PLA₂ mutant. (%)

Fatty acid	PLA ₂ mutant	Wild-type PLA ₂ ^{*1}	Porcine pancreatic PLA ₂ ^{*2}
16:0	15.5	15.5	15.4
18:1n-9	84.5	84.5	84.6

^{*1} Wild-type PLA₂ expressed by *E. coli*.¹⁰⁾

^{*2} PLA₂ from porcine pancreas (Amano Pharmaceutical Co.).

PLA₂¹⁰⁾ およびブタすい臓 PLA₂ と同様に、オレイン酸が主成分 (85.0%) であり (Table 1), 本 PLA₂ 変異体は POPC から主に *sn*-2 位のオレイン酸を遊離することが確認された。PLA₂ 変異体の卵黄 PC に対する活性の最適 pH は pH 9~10 付近にあり (Fig. 5), また、本 PLA₂ 変異体の活性を種々の濃度 (0~10 mM) の CaCl₂ を添加して測定した結果、1 mM 以上の CaCl₂ により強く賦活された (Fig. 6)。本 PLA₂ 変異体のこれらの性質は、WT PLA₂¹⁰⁾ と同様であった。

PLA₂ 変異体によりスルメイカ外とう筋 PC および PE をそれぞれ加水分解してそれらの基質残存率の経時

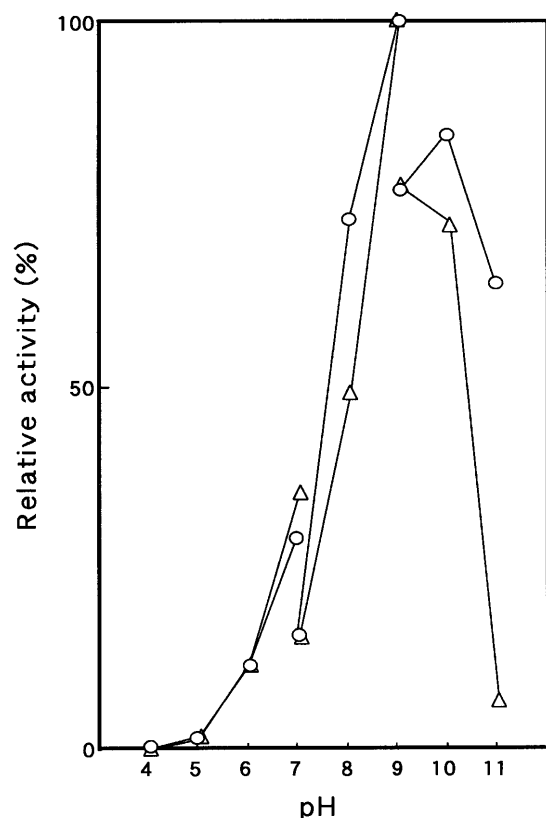


Fig. 5 Effects of pH on the activity of PLA₂ mutant. The activities were determined in 50 mM buffer solutions [acetic acid-sodium acetate (pH 4.0–7.0), Tris-HCl (pH 7.0–9.0), and glycine-NaOH (pH 9.0–11.0)] at 37°C. ○, PLA₂ mutant; △, wild-type PLA₂.¹⁰⁾

変化を測定し、その基質極性基に対する反応性を WT PLA₂ およびブタすい臓 PLA₂ のそれらと比較した。その結果、Fig. 7 に示すように、PLA₂ 変異体および WT PLA₂¹⁰⁾ は PC をよく加水分解し、ブタすい臓 PLA₂ と同様であった。一方、pancreatic loop 部位に Lys 残基を導入した本 PLA₂ 変異体の PE 加水分解率は、WT PLA₂ と比較して高く、Lys 残基の導入は PE 極性基に対する反応性を高める結果を示した (Fig. 7)。

考 察

イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ は、ブタすい臓 PLA₂ のアミノ酸配列と比較して、pancreatic loop 部位に 2 残基の欠損および β-ウィングに相当する部位に 16 残基の挿入と 3 残基の欠損を有し、新たなタイプの I 型 PLA₂ に分類された。^{8,9)} イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ の高い分子活性や PE に比べ PC をよく加水分解する基質極性基特異性は、本酵素のこのような構造に起因すると推察された。そこで本研究では、まず、イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ の cDNA を用いて発現した WT PLA₂ の pancreatic loop 部位の Cys62–Gly63 間に

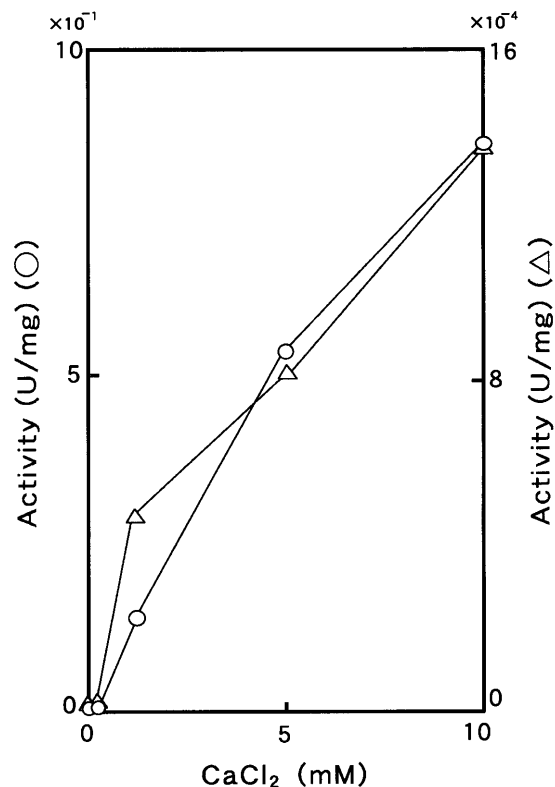


Fig. 6 Effect of calcium ion on the activity of PLA₂ mutant. The activities were determined at pH 8.5 and at various concentration of CaCl₂. ○, PLA₂ mutant; △, wild-type PLA₂.¹⁰⁾

Lys 残基を導入した PLA₂ 変異体を作製し、その PLA₂ 変異体の基質極性基反応性と pancreatic loop 部位の構造との関係を明らかにすることを目的とした。

大腸菌により発現した PLA₂ 変異体は、WT PLA₂¹⁰⁾ と同様に、不溶性の封入体を形成した。この封入体は 8 M 尿素と 10 mM 2-メルカプトエタノールで可溶化した後、透析により再生し、活性化させた。活性化した PLA₂ 変異体は、POPC から主に *sn*-2 位のオレイン酸を遊離させた。卵黄 PC に対する本 PLA₂ 変異体の活性の最適 pH は pH 9–10 にあり、また、1 mM 以上の CaCl₂ により強く賦活された。これらの性質は、WT PLA₂¹⁰⁾ およびブタすい臓 PLA₂⁵⁾ と同様のものではあった。Fig. 6 において、PLA₂ 変異体の比活性が WT PLA₂ のそれより低い、これは PLA₂ 変異体が粗精製品であることによる。

Kuipers ら¹⁵⁾ は、ブタすい臓 PLA₂ の pancreatic loop (62–66 残基) を欠損させた Δ62–66 PLA₂ 変異体を作製し、Δ62–66 PLA₂ 変異体のミセル状両極性 PC に対する触媒活性が WT PLA₂ のそれと比較して 16 倍増加することを報告した。そのことから、pancreatic loop (62–66 残基) の Lys62 残基は、胆汁酸塩-リン脂質混合ミセルと PLA₂ の相互作用に重要な役割を担うものと

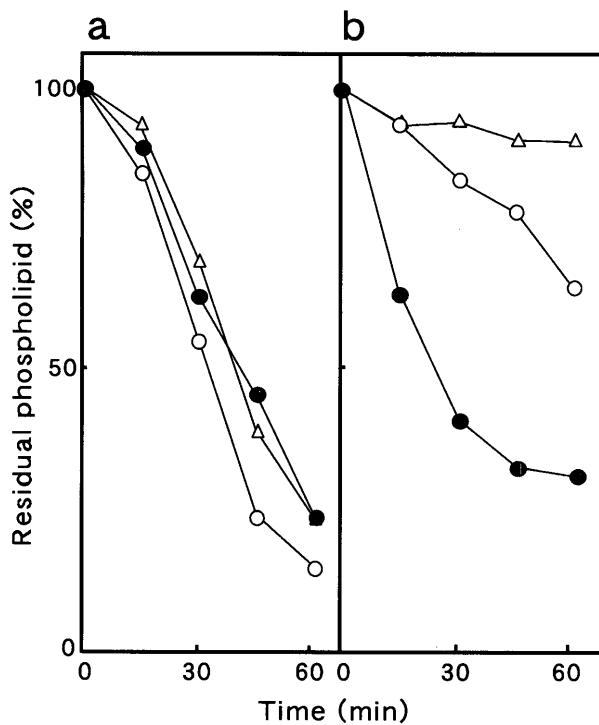


Fig. 7 Time-course of hydrolysis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine with PLA₂ mutant. Reaction mixture containing PLA₂, 100 μ g phosphatidylcholine (a) or phosphatidylethanolamine (b) prepared from squid mantle muscle, 2.7 mM sodium deoxycholate, 5 mM CaCl₂, and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) in a total volume of 130 μ L was incubated at 37°C for various time periods. ●, porcine pancreatic PLA₂ (4.5 μ g); ○, PLA₂ mutant (84 μ g); △, wild-type PLA₂ (24 ng).

	54	60	69
Starfish	GKATAEADC	GSWD	P
Mutant	GKATAEADC	KGSWD	P
Porcine	RD	AKNLDSC	KFLVDNP
bovine	KQ	AKKLDSC	KVLVDNP

Fig. 8 The comparison of amino acid sequences of PLA₂s. Sixteen amino acid residues in pancreatic loop region (residue 54–69) are shown. Starfish, *A. pectinifera* PLA₂; Mutant, PLA₂ mutant; Porcine; porcine pancreatic PLA₂; Bovine, bovine pancreatic PLA₂. Key residues are shown in shaded.

推察された。さらに、ほ乳動物すい臓の PLA₂ 変異体を用いた研究^{16–18)}により、pancreatic loop 部位近接のブタすい臓 PLA₂ の Arg53 およびウシすい臓 PLA₂ の Lys53 並びに Lys56 (Fig. 8 においてはそれぞれ Arg54, Lys54 および Lys57) は正の電荷を示し、両極

性リン脂質の陽イオン性極性基に対して電氣的に反発することから、PLA₂ の基質極性基反応性に影響を及ぼすことが示唆された。また、ヘビ毒 PLA₂ は pancreatic loop 部位近接のアミノ酸が欠損しており、^{8,9)} PE よりも PC をよく加水分解する基質極性基特異性を有することが報告されている。¹⁹⁾ Fig. 8 に示すように、イトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ の pancreatic loop 部位近接の一次構造において、これらの正に荷電したアミノ酸残基は欠損 (Cys62–Gly63 間) または中性アミノ酸残基 (Gly54 および Thr57) に置換していた。^{8,9)} このことから、PE よりも PC をよく加水分解するイトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ の基質極性基特異性は、本 PLA₂ の pancreatic loop 部位近接の一次構造に起因するのものと推察された。

本研究では、WT PLA₂ の pancreatic loop 部位の一次構造をほ乳動物すい臓 PLA₂ のそれと類似させるため、Cys62–Gly63 間に Lys 残基を導入し、PLA₂ 変異体を作製し、その PLA₂ 変異体の基質極性基反応性を検討した。その結果、WT PLA₂¹⁰⁾ と同様に、PLA₂ 変異体は PC をよく加水分解した。一方、本 PLA₂ 変異体の PE 加水分解率は WT PLA₂ と比較して高く、ブタすい臓 PLA₂ に近似した極性基反応性を示した。本研究の結果は、PE よりも PC をよく加水分解するイトマキヒトデ幽門盲のう PLA₂ の基質極性基特異性が、本 PLA₂ の pancreatic loop 部位の Lys 残基の欠損を一因とすることを示唆した。

文 献

- 1) Nieuwenhuizen W, Kunze H, de Haas GH. Phospholipase A₂ (phosphatide acylhydrolase, EC 3.1.1.4) from porcine pancreas. *Methods Enzymol.* 1974; **32B**: 147–154.
- 2) Dutilh CE, van Doren PJ, Verheul FEAM, de Haas GH. Isolation and properties of phospholipase A₂ from ox and sheep pancreas. *Eur. J. Biochem.* 1975; **53**: 91–97.
- 3) Evenberg A, Meyer H, Verheij HM, de Haas GH. Isolation and properties of phospholipase A₂ and phospholipase A₂ from horse pancreas and horse pancreatic juice. *Biochim. Biophys. Acta* 1977; **491**: 265–274.
- 4) Ono T, Tojo H, Inoue K, Kagamiyama H, Yamano T, Okamoto M. Rat pancreatic phospholipase A₂: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J. Biochem.* 1984; **96**: 785–792.
- 5) Arni RK, Ward RJ. Phospholipase A₂—a structural review. *Toxicon* 1996; **34**: 827–841.
- 6) 岸村栄毅, 林 賢治. ヒトデ類幽門盲のうのホスホリパーゼ A 活性. *日水誌* 1999; **65**: 110–111.
- 7) Kishimura H, Hayashi K. Isolation and characteristics of phospholipase A₂ from the pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1999; **124B**: 483–488.
- 8) Kishimura H, Ojima T, Tanaka H, Hayashi K, Nishita K. Amino acid sequence of phospholipase A₂ from the pyloric ceca of starfish *Asterina pectinifera*. *Fish. Sci.* 2000; **66**: 104–109.

- 9) Kishimura H, Ojima T, Hayashi K, Nishita K. cDNA cloning and sequencing of phospholipase A₂ from the pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2000; **126B**: 579–586.
- 10) Kishimura H, Ojima T, Hayashi K, Nishita K. Bacterial expression and characterization of starfish phospholipase A₂. *Comp. Biochem. Physiol.* 2001; **128B**: 565–573.
- 11) Hayashi K. Occurrence of diacyl glyceryl ethers in liver lipids of gonatid squid *Gonatopsis borealis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1989; **55**: 1383–1387.
- 12) Hayashi K, Kishimura H. Preparation and purification of DHA-enriched triacylglycerols from fish oils by column chromatography. *Fish. Sci.* 1996; **62**: 842–843.
- 13) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–685.
- 14) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; **193**: 265–273.
- 15) Kuipers OP, Thunnissen MMGM, de Geus P, Dijkstra BW, Drenth J, Verheij HM, de Haas GH. Enhanced activity and altered specificity of phospholipase A₂ by deletion of a surface loop. *Science* 1989; **244**: 82–85.
- 16) Lugtigheid RB, Otten-Kuipers MA, Verheij HM, de Haas GH. Arginine 53 is involved in head-group specificity of the active site of porcine pancreatic phospholipase A₂. *Eur. J. Biochem.* 1993; **213**: 517–522.
- 17) Noel JP, Bingman CA, Deng T, Dupureur CM, Hamilton KJ, Jiang R-T, Kwak J-G, Sekharudu C, Sundaralingam M, Tsai M-D. phospholipase A₂ engineering. X-ray structural and functional evidence for the interaction of Lysine-56 with substrates. *Biochemistry* 1991; **30**: 11801–11811.
- 18) Dua R, Wu S-K, Cho W. A structure-function study of bovine pancreatic phospholipase A₂ using polymerized mixed liposomes. *J. Biol. Chem.* 1995; **270**: 263–268.
- 19) Ibrahim SA, Sanders H, Thompson RH. The action of phospholipase A on purified phospholipids, plasma and tissue preparations. *Biochem. J.* 1964; **93**: 588–594.
- 20) Renetseder R, Brunie S, Dijkstra BW, Drenth J, Sigler PB. A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J. Biol. Chem.* 1985; **260**: 11627–11634.
- 21) Puijk WC, Verheij HM, de Haas GH. The primary structure of phospholipase A₂ from porcine pancreas: a reinvestigation. *Biochim. Biophys. Acta* 1977; **492**: 254–259.