

Title	ラット脾臓ホスホリパーゼA2の精製とその諸性質
Author(s)	寺元, 隆
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/33961
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	寺	元	隆
学位の種類	医	学	博士
学位記番号	第	6399	号
学位授与の日付	昭和59年3月24日		
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当		
学位論文題目	ラット脾臓ホスホリパーゼA ₂ の精製とその諸性質		
論文審査委員	(主査) 教授 山野 俊雄 (副査) 教授 田川 邦夫 教授 和田 博		

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

膜リン脂質からアラキドン酸を遊離する脱アシル化反応を触媒するホスホリパーゼA₂(PLA₂)は、アラキドン酸カスケードの律速酵素と考えられ細胞レベルにおいて数多くの研究が行われてきた。しかし細胞内に存在するPLA₂は脾液中に分泌されるPLA₂とくらべて比活性が低くまた酵素量も微量であるため、その酵素化学的研究は遅れている。そこで、我々はラットの諸臓器の中で比較的活性の高い脾臓から細胞内PLA₂の精製を試み、その酵素学的諸性質を明らかにした。

(方法ならびに成績)

I ラット脾臓PLA₂の精製

ラット脾臓(100g)を200mlの0.1mM CaCl₂, 20mM Tris-HCl pH 7.4 緩衝液中で破碎後、105,000gで90分間遠心し、得られた上清を同緩衝液に透析し、DEAE-Sepharose columnにかけ、素通りした活性画分を出発材料とした。

a) 精製法1. 活性画分を2M NaCl存在下にOctyl-Sepharose columnに吸着させ、イオン強度を下げることによって酵素をcolumnより溶出させた。活性画分をDEAE-Sepharose columnに通した後、20mM MES (pH 6.0)で平衡化したCM-Sepharose columnに吸着させた。0-0.3M NaClの直線濃度勾配をかけたところ、PLA₂活性はNaCl 0.12Mで溶出した。得られた活性画分を凍結乾燥により濃縮後、Bio-Gel P-30を用いたゲルろ過を行ったところ、PLA₂活性は分子量約15,000の画分に溶出した。得られた酵素タンパク質はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)上単一であったが、せいぜい6%(0.086g)の低い収率しか得られなかった。そこで、収率をさらに上げ

るため高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を利用して精製法の改良を試みた。

b) 精製法 2. 活性画分に終濃度が 0.1% となるようにトリフルオロ酢酸を加えた後、逆相カラム (Synchropack RP-P) に吸着させ、20~45% アセトニトリルの直線濃度勾配をかけ HPLC を行ったところ、酵素活性のピークはアセトニトリル 25% 付近に現われた。得られた活性画分を、再び逆相カラムに吸着させ、15~40% のアセトニトリルの直線濃度勾配で溶出したところ、PLA₂ 活性は不純物から充分に分離した単一のタンパク質ピークとして溶出された。この精製法による酵素の収率は 70% であった。

両精製法により得られた酵素標品はどちらも比活性 300~500 nmol/min/mg protein, 約 10,000~20,000 倍に精製された。

II 精製酵素の諸性質

酵素タンパク質の分子量は TSK-Gel G-2000 SW ゲルろ過法および SDS-PAGE で約 14,800 と推定された。アミノ酸組成では Asp 22 残基, Ala 10 残基, Ser 9 残基, Lys 9 残基, 他のアミノ酸は 1~8 残基であり, 計 132 残基のタンパク質であった。本酵素は 60℃, 3 分の処理で酵素活性は安定であった。pH 8.0~10.5 に至適 pH を持ち, 酵素活性の発現に Ca²⁺ の存在を必須とした (5~10 mM)。0.1 mM Ca²⁺ およびカルモデュリンの存在下で酵素の活性化は見られなかった。本酵素はリン脂質の 2 位アシル鎖のエステル結合を特異的に加水分解した。1-Acyl-2-linoleoyl-sn-glycerol-3-phosphorylethanolamine に対する *K_m*, *V_{max}* は 280 μM, 11.4 nmol linoleic acid/min/nmol enzyme であった。また約 150 mM KCl の存在下で酵素活性が約 4 倍に上昇した。

(総括)

1. ラット脾臓より細胞内 PLA₂ を conventional な方法を用いて, 比活性 325 nmol/min/mg protein, 約 10,000 倍に精製した。さらに, 逆相-HPLC を用い, 簡易大量精製法を開発し, 電気泳動的に単一な酵素タンパク質を精製し得た (収率 70%)。
2. PLA₂ の分子量は 14,700~14,800 と推定された。さらにアミノ酸組成など他のタンパク質化学的諸性質を調べた。
3. 耐熱性において約 60℃, 3 min までは安定であった。
4. 本酵素は pH 8.0~10.5 に至適 pH を持ち, 酵素活性の発現に Ca²⁺ の存在を必須とし, 0.1 mM Ca²⁺ およびカルモデュリンの存在下で酵素の活性化は見られなかった。
5. 1-Acyl-2-linoleoyl-sn-glycerol-3-phosphorylethanolamine に対する *K_m*, *V_{max}* は 280 μM, 11.4 nmol linoleic acid/min/nmol enzyme であった。

論文の審査結果の要旨

細胞内に存在する phospholipase A₂(PLA₂) はアラキドン酸カスケードの律速酵素とされ, その生理的意義が注目されている。しかし酵素含量が低く, 精製が困難なため, 酵素化学的性質の解明は遅れ

ている。本論文の著者はラット脾臓より細胞内PLA₂を単一蛋白にまで精製し、純化した酵素を用いてその諸性質を明らかにした。

細胞内PLA₂の分子量の決定、活性の至適pHの確立、Ca²⁺要求性の確立など細胞内PLA₂がもつ基本的性質を明らかにしたことは本酵素に関する今後の研究の基盤を築いたといえる。

細胞内PLA₂の困難な精製の遂行と諸性質の解明は学問上の寄与を充分評価しうると考える。