



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	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33961
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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 (100 g) を 200 ml の 0.1 mM CaCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 7.4 緩衝液中で破碎後、105,000 g 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 2 M 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、20 mM MES (pH 6.0) で平衡化した CM-Sepharose column に吸着させた。0-0.3 M NaCl の直線濃度勾配をかけたところ、PLA₂ 活性は NaCl 0.12 M 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 を用いたゲルロ過を行ったところ、PLA₂ 活性は分子量約 15,000 の分画に溶出した。得られた酵素タンパク質は SDS-PAGE 上单一であったが、せいぜい 6% (0.086 g) 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ゲルロ過法および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°C、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)

- 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%)。
- 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化学的諸性質を調べた。
- 耐熱性において約60°C、3 minまでは安定であった。
- 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。
- 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 を单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。