The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ウシ血小板フォスフォリパーゼCの精製と性質
Author(s)	博多, 尚文
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33977
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

【26】

氏名・(本籍)	博(はた) 多(た) 尚(ひさ) 文(ふみ)
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6406 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 外科系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ウシ血小板フォスフォリパーゼCの精製と性質**
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞 (副査) 教授 坂本 幸哉 教授 和田 博

論文内容の要旨

(目 的)

血小板はthrombin, collagen などの刺激受容にともない，特有な形態変化及び分泌反応を行い，一次止血栓の形成に寄与する。この分泌反応にともないarachidonic acid metabolism が活性化され，強力な血管収縮作用を持つthromboxane が生成される。arachidonic acid よりthromboxane 生成までの過程は詳細に研究され，明らかにされているが，arachidonic acid metabolism の律速段階である血小板膜リン脂質の水解の機構については，未だ解明されていない。本研究では，血小板膜リン質の水解に関与していると考えられるphosphatidylinositol specific phospholipase C をウシ血小板より初めて精製し，その酵素学的諸性質の検討を行ったものである。

(方法ならびに成績)

本酵素の基質である^{3}H−phosphatidylinositol は，ラット肝ミクロソームを用い，^{3}H−myoinositol より生合成の後，抽出・分離したものを用いた。

屠殺場にて得たウシ新鮮血60ℓに，終濃度5mMのEDTAを直ちに加え，抗凝固処理を行った。続いて1500×g，10分間の遠心により赤血球，白血球を分離除去し，100mM KCl と5mM EGTA を含む50mM Tris −maleate buffer pH6.9 による洗滌を繰り返えして，混在細胞1％以下の血小板浮遊液(血小板数4×10^{12})を得た。

次に氷冷下にて血小板の超音波破砕を2分間行い，105,000×g，60分間の超遠心により得られた上清を，25−50％飽和硫安塩析した。

続いて，5mM EGTAを含む50mM Tris − maleate buffer，pH6.9に再溶解し，1M NH_4Clと5mM

5 mM EGATを含む50 mM Tris－maleate buffer, pH 6.9で飽和されたOctyl Sepharose CL－4B column に吸着させ，（0％ethylene glycol＋1 M NH_4Cl）→（50％ ethylene glycol＋0 M NH_4Cl）の直線濃度勾配にて酵素活性分画を溶出した。酵素活性分画に混在するNH_4Clとethylene glycol を透析にて除き，50 mM Tris－maleate buffer, pH 6.9 で飽和したDEAE Sepharose CL－6 B column に吸着させた。0→300 mM KClに至る50 mM Tris–maleate buffer, pH 6.9の直線濃度勾配にて溶出した酵素活性分画を，さらにSephadex G－150 column のゲル 過にかけ，高純度の酵素標品を得た。

本酵素の至適pHは7.0であり，その分子量はSephacryl S－300を用いたゲルろ過パターンより約14万と推定された。

本酵素の基質特異性を検討するために，^{14}C－arachidonie acid を取り込ました血小板 phosphatidylserine , phosphatidylcholine , phosphatidylethanolamine , phosphatidylinositol を調整した。それらの混合液に純化した酵素標品を作用させ，水解の程度を薄層クロマト・オートラジオグラムにより観察したところ，phosphatidylinositol のみを特異的に分解することがわかった。

さらに，厳密に調整されたCa^{2+}－EGTA buffer, pH 6.9を用いて本酵素のCa依存性を検討したが，10－100 μMの低濃度Ca^{2+}存在下でも十分活性を有することがわかった。しかし，その他の二価金属イオンであるMg^{2+}，Mn^{2+}，Cu^{2+}，などの存在下では，活性の発現はみられなかった。

また，本酵素にcalmodulinを添加しても活性の上昇は認められなかったが，終濃度 500 μMのarachidonic acid を添加することにより約2倍の活性上昇を認めた。一方，他の脂肪酸であるoleic acid , stearic acid , palmitic acid などの添加では活性の上昇は認められなかった。

本酵素の阻害剤としては，EDTAやEGTAなどのキレート剤の他に，quinacrine が強い阻害作用を示した。更に興味深いことに，aminoglycoside 系抗生物質であるgentamycin やneomycinでも活性が阻害されることが明らかになった。

（総　括）

①ウシ血小板より初めてphosphatidylinositol specific phospholipase Cを精製し，高純度の酵素標品を得た。酵素活性の至適pHは7.0で分子量は約 14万と推定された。

②本酵素の活性発現には10 μM以上の濃度のCa^{2+}を必要とし，arachidonic acid の添加により，活性の上昇を認めた。

③一方，quinacrine，aminoglycoside系抗生物質の添加により，本酵素の活性は濃度依存的に阻害された。

以上の知見は，血小板反応に於いて，本酵素が，従来考えられていたphosholipase A_2よりも主たる役割を司どっていることを示唆する。

論文の審査結果の要旨

本研究は，ウシ血小板より初めて，phosphotidylinositol-specific phospholipose C を高純度に精製したものである。

この酵素の至適 pH は7.0であり，分子量は約14万と推定された。この酵素は Ca^{2+} 依存性で，50％活性発現に必要な濃度は 70 μM であった。また，arachidonic acid 存在下で酵素活性は上昇し，quinacrine, aminoglycoside 系抗生物質で活性が阻害されることを明らかにした。これらの新しい知見は，血小板膜よりの arachidonic acid 遊離機構解明に大きく寄与したものと思われる。