

Title	ウシ血小板フォスホリパーゼ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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33977">https://hdl.handle.net/11094/33977</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名・(本籍)	はた 博	た 多	ひさ 尚	みみ 文
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	ウシ血小板フォスホリパーゼ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  $^3\text{H}$ -phosphatidylinositol は、ラット肝ミクロソームを用い、 $^3\text{H}$ -myoinositol より生合成の後、抽出・分離したものをを用いた。

屠殺場にて得たウシ新鮮血 60  $\ell$  に、終濃度 5 mM の EDTA を直ちにに加え、抗凝固処理を行った。続いて 1500  $\times$  g, 10 分間の遠心により赤血球、白血球を分離除去し、100 mM KCl と 5 mM EGTA を含む 50 mM Tris - maleate buffer pH 6.9 による洗滌を繰り返して、混在細胞 1 % 以下の血小板浮遊液 (血小板数  $4 \times 10^{12}$ ) を得た。

次に氷冷下にて血小板の超音波破碎を 2 分間行い、105,000  $\times$  g, 60 分間の超遠心により得られた上清を、25-50 % 飽和硫酸塩析した。

続いて、5 mM EGTA を含む 50 mM Tris - maleate buffer, pH 6.9 に再溶解し、1M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  と 5 mM

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<sub>4</sub>Cl) → (50% ethylene glycol + 0 M NH<sub>4</sub>Cl) 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<sub>4</sub>Cl 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-6B 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, <sup>14</sup>C-arachidonic acid を取り込んだ血小板 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<sup>2+</sup>-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<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, 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<sup>2+</sup> 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 phospholipase A<sub>2</sub> よりも主たる役割を司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、phosphatidylinositol-specific phospholipase 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  $\text{Ca}^{2+}$  依存性で、50% 活性発現に必要な濃度は  $70 \mu\text{M}$  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である。