

Title	ヒト肝アルカリホスファターゼのホスファチジン酸水 解活性に関する研究
Author(s)	佐伯, 巧
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/35288">http://hdl.handle.net/11094/35288</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

## 【1】

氏名・(本籍)	佐 伯 巧
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 7 3 5 6 号
学位授与の日付	昭 和 61 年 5 月 30 日
学位授与の要件	医学研究科社会系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ヒト肝アルカリホスファターゼのホスファチジン酸水解活性に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 大河内寿一 (副査) 教 授 田中 武彦 教 授 岸本 進

## 論 文 内 容 の 要 旨

## [目 的]

アルカリホスファターゼ (AP) は種々のリン酸モノエステルを基質とする水解酵素として知られ、その酵素学的、免疫学的性質については多くの報告がなされてきた。しかし AP の生理的役割に関しての報告は極めて乏しい。近年の生理的役割についての報告の中に腸 AP が脂肪の吸収に関与するとの報告もあり、脂質代謝における重要な臓器である肝においても AP が脂質代謝に関与する可能性が考えられる。一方 phospholipid や triglyceride の合成経路においてホスファチジン酸が水解されて diglyceride となる過程は、特に重要な位置を占めている。これらの観点から、AP の脂質代謝における生理的作用を明らかにする目的で、ヒト正常肝より精製した肝 AP を用い、ホスファチジン酸を基質としてその水解活性について検討した。

## [方 法]

1. 肝 AP の精製は、ヒト正常肝から butanol 抽出、acetone 沈澱の後、DEAE-cellulose, phenyl-sepharose クロマトグラフィーさらに Sephadex G-200 でのゲルろ過によって行った。AP 活性の測定はフェニルリン酸を基質として、蛋白定量は Bio-Rad protein assay kit を用いて行った。
2. 精製肝 AP によるホスファチジン酸水解活性は、予備実験で pH9.0 付近に至適があり、基質濃度を 6 mM とすると、AP との反応時間は 37°C で 20 分まで直線性が得られ、また反応時間を 15 分としたときの酵素量を検討すると 0.1 unit まで直線性が得られた。従って肝 AP によるホスファチジン酸水解活性の測定は、6 mM ホスファチジン酸と適当量 (0.1 unit 以下) の AP を 50 mM Tris-HCl buffer (pH9.0) 中で 37°C 15 分間反応させ、氷冷した BSA と TCA を加えて反応を停止し遠心後、上清に遊

離した無機リンをChenらの方法に準じて定量することにより求めた。なお基質となるホスファチジン酸はegg yolk lecithin由来のsodium phosphatidate (純度98%; Sigma社)をソニケータによってemulsion化して用いた。

3. 精製肝A Pのホスファチジン酸水解活性に対するMgCl<sub>2</sub>, detergent, アミノ酸, NaF添加の影響を検討した。

#### [成績]

1. 肝A Pはcrude homogenateから約34,000倍に精製され、比活性780units/mg proteinの標品が得られ、ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動で活性帯と一致した単一の蛋白帯として認められた。
2. 0.05unitの精製肝A Pは37°C15分間の反応により70nmolesのホスファチジン酸を水解でき、フェニルリン酸を基質としたときと比べてホスファチジン酸水解の活性比は約1/12であった。
3. 肝A Pのホスファチジン酸水解活性はMgCl<sub>2</sub>濃度が0.2mMまでは影響がなく、それ以上の濃度では阻害傾向を示したが、フェニルリン酸水解活性はMgCl<sub>2</sub>濃度の増加と共に上昇した。detergentによる影響では、Tween-20の濃度が0.02-0.05%ではホスファチジン酸水解活性は約15%の活性上昇がみられたが、DOCやTriton X-100では阻害傾向を示した。一方、フェニルリン酸水解活性はTween-20, Triton X-100では影響がなく、DOCで阻害された。

0.03% Tween-20, 0.1mM MgCl<sub>2</sub>存在下で、6mMホスファチジン酸を基質としたときのpHによる影響を検討すると、至適pHは9.0-9.5にあり、pH9.0における見かけのKm値は1.6mMであった。

アミノ酸添加による効果は、20mM L-homoarginine, 20mM L-phenylalanineによりホスファチジン酸水解活性はそれぞれ約90%, 約50%の阻害をうけ、フェニルリン酸を基質としたときと同程度の阻害を示した。

ホスファチジン酸を特異的に水解するとされているphosphatidate phosphohydrolaseの阻害剤であるNaFの添加によっては、肝A Pのホスファチジン酸水解活性もフェニルリン酸水解活性もほとんど影響を受けなかった。

#### [総括]

1. ヒト肝A Pはホスファチジン酸をよく水解することが明らかとなった。その活性比はフェニルリン酸を基質としたときと比べて約1/12であった。
2. ヒト肝A P活性のMgCl<sub>2</sub>やdetergentによる影響は合成基質であるフェニルリン酸とホスファチジン酸を基質とした場合とでは異なったが、アミノ酸添加による影響は両者は差がなかった。
3. ヒト肝A PはMgCl<sub>2</sub>やNaF添加による影響、至適pHの違いから、ホスファチジン酸を水解するphosphatidate phosphohydrolaseとは異なった条件でホスファチジン酸を水解することが明らかとなり、A Pが脂質代謝に関与する可能性が示唆された。

## 論文の審査結果の要旨

アルカリホスファターゼについては、これまで数多くの研究がなされてきたが、その生理的役割に関する知見は乏しく、とくに肝アルカリホスファターゼに関しては全く不明といってよい。

本研究は、肝アルカリホスファターゼをヒト肝homogenateから34,000倍に精製し、この精製肝アルカリホスファターゼが、肝における triglyceride ならびにリン脂質合成経路の上で重要な中間体であるホスファチジン酸をよく水解するという事実を初めて明らかにするとともに、そのホスファチジン酸水解活性について種々の検討を加えて、肝アルカリホスファターゼが脂質代謝に関与している可能性を示唆している。

従って、本論文は、肝アルカリホスファターゼの生理的役割を探求する上で重要な知見を与えており、学位を授与する価値があると認められる。