



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | ヒト脾臓の膜結合性phospholipase A2の精製と性質                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Author(s)    | 中口, 和則                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Citation     | 大阪大学, 1987, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/35820">https://hdl.handle.net/11094/35820</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"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">&lt;/a&gt;</a> 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) | 中                                            | 口    | 和  | 則        |
| 学位の種類   | 医                                            | 学    | 博  | 士        |
| 学位記番号   | 第                                            | 7895 | 号  |          |
| 学位授与の日付 | 昭和62年10月13日                                  |      |    |          |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当                                 |      |    |          |
| 学位論文題目  | ヒト脾臓の膜結合性phospholipase A <sub>2</sub> の精製と性質 |      |    |          |
| 論文審査委員  | (主査)                                         |      |    |          |
|         | 教授                                           | 森    | 武貞 |          |
|         | (副査)                                         |      |    |          |
|         | 教授                                           | 岡本   | 光弘 | 教授 谷口 直之 |

### 論文内容の要旨

#### 〔目 的〕

膜結合性phospholipase A<sub>2</sub> (以下PLA<sub>2</sub>) は生体膜の主要構成要素であるリン脂質を水解する。その結果生じるアラキドン酸からは種々の生理活性物質が産生され、PLA<sub>2</sub>はこの一連の反応系の律速酵素である。膜結合性PLA<sub>2</sub>の活性は非常に低く、かつ微量であるので、この酵素を精製し、その性質を検討した報告は少なく、とくに、ヒト脾臓からPLA<sub>2</sub>を精製した報告はまったくない。本研究はヒト脾臓から膜結合性PLA<sub>2</sub>を精製し、その性質を解明することを目的とした。

#### 〔方法ならびに成績〕

PLA<sub>2</sub>の活性は、2位の脂肪酸を<sup>14</sup>Cで標識したリン脂質 (phosphatidylcholine) の水解により生じた遊離脂肪酸の放射活性より測定した。測定系には0.3% sodiumdeoxycholate, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 50mM Glycine-NaOH (pH9.0) を含んでいる。

ヒト脾臓を0.25M sucrose, 10mM Tris-HCl (pH7.4) 中でhomogenizeし, 105,000 X g, 1時間, 4℃の遠沈により得られた沈渣を10mM Tris-HCl (pH7.4) に懸濁した。これにKBrを1 Mになるように加え, 5℃, 1.5時間incubateし, 105,000 X g, 1時間で遠沈し, 得られた上清を10mM Tris-HCl (pH7.4) に透析した。これにトリフルオロ酢酸を0.1%になるように加え, 1 M TrisにてpHを7.4に調節し, さらに8,000 X g, 30分間遠沈した。この上清を10mM Tris-HCl (pH7.4) にて平衡化したDEAE-Sephroseカラム (1.8×25cm) でクロマトグラフィーを行った。PLA<sub>2</sub>活性部分は, カラムを素通りする部分と吸着される部分に分かれた。吸着されたものは, NaClによるイオン濃度勾配で30 m mho付近に溶出した。次に, 吸着したPLA<sub>2</sub>活性画分を逆相HPLCにかけた。カラムはSynChrop-

ak RP-8 (10×250mm)を使用し、0.1% TFAで平衡化して、アセトニトリルで溶出を行った。PLA<sub>2</sub>活性はアセトニトリル20%付近で溶出し、この活性画分を4.1×250mmのカラムにて再度クロマトし、単一ピークになるまで精製した。得られた酵素のspecific activityは185.7n mol/min/mg, 精製倍率は1,688倍, 収率は5%であった。

精製酵素は、SDS電気泳動にて単一のバンドを示し、TSKG 2000 SWのゲルろ過にて分子量14,000と推定された。リン脂質(PC)の1位の脂肪酸を<sup>14</sup>C標識したもの、および2位を標識したものに本酵素を作用させ、Blih & Dyer法にて全脂質を抽出し、TLCにて展開した。1位標識のPCに対してはlyso-PC, 2位標識のPCに対しては遊離脂肪酸の放射活性の上昇がみられ、本酵素がリン脂質の2位のアシルエステル結合を特異的に水解することを確認した。本酵素の至適pHは9.5付近であった。また、PLA<sub>2</sub>はCa<sup>2+</sup>要求性であり、活性発現はCa<sup>2+</sup>濃度依存性で0~500μMまでは急速に、以後は緩徐に上昇し、4mMでその活性は最大に達した。本酵素は、phosphatidylcholine(PC)よりもphosphatidylethanolamine(PE)に対して3倍以上強い水解作用を示した。各種薬剤の活性に及ぼす影響について検討したところ、p-bromophenacyl bromide(50μM)は46%, gabexate mesilate(0.5mM)は73%, chlorpromazine(0.5mM)は74%の阻害作用を示したが、CDP-choline(5mM)は活性にほとんど影響を及ぼさなかった。Ca<sup>2+</sup>非存在下では、5mMの各種イオン(Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>)によっても活性は発現しなかった。Ca<sup>2+</sup>(5mM)存在下で、Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>は高度に、Mn<sup>2+</sup>は中等度に、それぞれ濃度依存性に活性を阻害したが、Mg<sup>2+</sup>は10mMまでほとんど阻害作用をしめさなかった。

#### [総括]

ヒト脾臓より膜結合性PLA<sub>2</sub>を精製し、その性質を明らかにした。ヒト膵臓の外分泌性PLA<sub>2</sub>と比較すると、分子量およびCa<sup>2+</sup>要求性の点では類似していたが、両者の間には次のような相違点がみられた。

- 1) 脾PLA<sub>2</sub>の比活性は膵PLA<sub>2</sub>の500分の1と低い。
- 2) 膵PLA<sub>2</sub>の至適pH域よりも脾PLA<sub>2</sub>のそれはアルカリ側にある。
- 3) イオンや薬剤の活性阻害効果が異なる。
- 4) PE, PCの水解作用に差がある。

### 論文の審査結果の要旨

本研究は、ヒト脾臓のホモジネートより膜結合性phospholipase A<sub>2</sub>を可溶化後、SDS電気泳動上単一にまで精製し、その性質をヒト膵臓の分泌型phospholipase A<sub>2</sub>と比較して検討したものである。両者の分子量、Ca<sup>2+</sup>要求性は類似していたが、比活性、至適pH域、イオンや薬剤の活性阻害効果、基質の水解作用には差があることを明らかにしている。生体内での両酵素の動態とその意義を検討するための基礎研究として、価値あるものと認める。