



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | ラット脾臓膜結合性ホスホリパーゼA2の精製とその諸性質                                                                                                                                                                                                                                          |
| Author(s)    | 小野, 隆                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Citation     | 大阪大学, 1988, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/35979">https://hdl.handle.net/11094/35979</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>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

【4】

|         |                                                       |        |
|---------|-------------------------------------------------------|--------|
| 氏名・(本籍) | おのの                                                   | たかし    |
| 学位の種類   | 医                                                     | 学 博 士  |
| 学位記番号   | 第                                                     | 8081 号 |
| 学位授与の日付 | 昭和 63 年 3 月 25 日                                      |        |
| 学位授与の要件 | 医学研究科生理系専攻<br>学位規則第5条第1項該当                            |        |
| 学位論文題目  | ラット脾臓膜結合性ホスホリパーゼA <sub>2</sub> の精製とその諸性質              |        |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教 授 岡本 光弘<br>(副査)<br>教 授 谷口 直之      教 授 田川 邦夫 |        |

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

哺乳動物のホスホリパーゼA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) は、脾臓より分泌され消化酵素として働くPLA<sub>2</sub>と、細胞内に存在しエイコサノイドの生合成に関与するPLA<sub>2</sub>の2種類に分類される。細胞内PLA<sub>2</sub>に関する詳細な研究は少なく、脾臓由来PLA<sub>2</sub>との比較研究もなされていない。本研究では、ラット脾臓の細胞内PLA<sub>2</sub>の精製を行い、脾臓PLA<sub>2</sub>との酵素化学的、免疫学的、タンパク化学的比較研究を行うことを目的とした。

〔方法ならびに成績〕

1. ラット脾臓膜結合性PLA<sub>2</sub>の可溶化

ラット脾臓膜結合性PLA<sub>2</sub>は、高イオン強度の塩や穏和な界面活性剤では全く可溶化されず、その可溶化にはSDSなどの強力な可溶化剤を必要とする。私は、低温での溶解度が高く、低温での操作に便利なラウリル硫酸リチウム(LDS)を可溶化剤として用いた。LDS (0.3% w/v) により脾臓膜画分(108,000×g pellet)から約90%のPLA<sub>2</sub>活性が可溶化された。

2. ラット脾臓膜結合性PLA<sub>2</sub>の精製

ラット脾臓をホモジナイズし、108,000×g, 60分間、遠心分離後、沈渣を0.3% LDS, 10mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.4)で、4℃, 2時間インキュベーションして酵素を可溶化した。標品を108,000×gで遠心し、その上清に対してカラム操作を行った。DEAEセルロファイナカラムでLDSを一部除去したあと、強イオン強度下でオクチルセファロースに吸着させ濃縮精製した。これ以後、0.5% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] -1-propanesulfonate (CHAPS) 存在下で、セ

ルロファインGCL-300m, Sセファロース, Bio-Gel P-30のカラム操作により得られた最終標品は, SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動上単一なタンパク質であり, 分子量は約13,600であった。

### 3. ラット脾臓膜結合性PLA<sub>2</sub>の諸性質

ラット脾臓膜結合性PLA<sub>2</sub>の至適pHは8.0-9.5であり, 4 mM Ca<sup>2+</sup>存在下で最高活性を示した。ホスファチジルコリン(PC), ホスファチジルエタノールアミン(PE), ホスファチジルグリセロール(PG), ホスファチジルセリン(PS)をそれぞれ基質として活性を測定したところ, 界面活性剤共存の有無を問わずPGが最も良い基質であったが, PSの分解はほとんど見られなかった。界面活性剤非共存下でのPE, PCの分解は非常にわずかであったが, 界面活性剤共存下ではその分解がかなり促進された。脾臓PLA<sub>2</sub>の基質特異性と比較すると, PC, PEに対する界面活性剤(コール酸)の効果に相違があった。リン脂質(PC)の2位アシル鎖に対する基質特異性は, リノール酸>オレイン酸>アラキドン酸の順であり, 脾臓PLA<sub>2</sub>と同じ基質特異性を示した。

抗ラット脾臓PLA<sub>2</sub>抗体と脾臓膜結合性PLA<sub>2</sub>は, 免疫学的交差性を示さなかった。

脾臓膜結合性PLA<sub>2</sub>のアミノ酸組成を調べると, 酸性アミノ酸残基数が脾臓PLA<sub>2</sub>とくらべると少ないことが特長であった。

脾臓膜結合性PLA<sub>2</sub>のN末端アミノ酸配列を36残基まで決定したところ, 脾臓PLA<sub>2</sub>とのホモロジーは約35%であった。哺乳動物由来の膜結合性PLA<sub>2</sub>のアミノ酸部分配列の決定は, この研究が最初である。

本酵素のアミノ酸組成, N末端アミノ酸配列は, 脾臓PLA<sub>2</sub>よりむしろ蛇毒(マムシ毒, *Crotalus durissus terrificus*) PLA<sub>2</sub>に類似している(N末端アミノ酸36残基におけるホモロジーは約55%)。

#### [総括]

1. ラット脾臓膜結合性PLA<sub>2</sub>は, 穏和な条件では可溶化されないintegral membrane proteinである。LDSを可溶化剤として使用することにより, 約90%のPLA<sub>2</sub>活性が膜から可溶化された。
2. 精製酵素の至適pH, 至適Ca<sup>2+</sup>濃度, リン脂質2位アシル鎖に対する基質特異性は脾臓PLA<sub>2</sub>と類似していたが, PC, PEに対する界面活性剤(コール酸)の効果に差があった。
3. 抗脾臓PLA<sub>2</sub>抗体と本酵素は, 免疫学的交差性を示さなかった。
4. アミノ酸分析, N末端アミノ酸配列の分析結果から, 本酵素は脾臓PLA<sub>2</sub>よりもむしろ蛇毒(マムシ毒)PLA<sub>2</sub>に類似していた。
5. 本研究により, 細胞内PLA<sub>2</sub>の酵素化学的, 免疫学的, タンパク化学的知見が明らかとなった。本研究のデータは, エイコサノイド生合成に関与すると言われている細胞内PLA<sub>2</sub>の生理的意義の解明へ貢献するものである。

## 論文の審査結果の要旨

哺乳動物の膜結合性ホスホリパーゼA<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)は, その精製が困難なため, 精製酵素を用いた研

究が不可能で酵素化学的諸性質に不明な点が多く、それが本酵素のエイコサノイド生合成における役割を探索する上での障害であった。本論文において著者は、初めて膜結合性  $PLA_2$  の精製法を確立し、その酵素化学的、免疫学的、タンパク化学的な性質を明らかにし、さらに脾臓から分泌される  $PLA_2$  との比較研究を行った。その結果、哺乳動物の諸臓器には、タンパク化学的に異なる 2 種類の  $PLA_2$  アイソザイムが存在することが明らかとなった。

これらの新たな知見をもとにすればエイコサノイド生合成の律速酵素としての  $PLA_2$  の機能の正しい解釈が可能になる。したがって本論文は、医学博士の学位論文として価値あるものと認める。