The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Characterization of Two Distinct Ca2+-dependent Phospho-lipid-binding Proteins of 68-kDa Isolated from Human Placenta
Author(s)	林, 日出喜
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37573
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

【35】

氏名・（本籍）	林（はやし）　日出喜（ひでき）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9285 号
学位授与の日付	平成 2 年 7 月 11 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	Characterization of Two Distinct Ca^{2+}-dependent Phospholipid-binding Proteins of 68-kDa Isolated from Human Placenta （ヒト胎盤より精製した2種類の分子量68−kDa カルシウム依存的リン脂質結合蛋白質の性状の解析）
論文審査委員	（主査）教授 中田 篤男 （副査）教授 岡本 光弘　教授 祖父江憲治

論文内容の要旨

〔目　的〕

細胞内情報伝達及び細胞の増殖や癌化機構において，カルシウムやリン脂質がセカンドメッセンジャーとして重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。この機構解明には，これらのセカンドメッセイジを受容する蛋白質の同定とその性状解析は不可欠である。

本研究では，カルシウム依存的にリン脂質や細胞膜と結合する蛋白質をヒト胎盤より精製し，その性状をin vitroで解析し，それぞれの蛋白質に対する抗体を用いて，細胞増殖や癌化における役割を検討することを目的とした。

〔方法ならびに成績〕

著明な細胞増殖性を示し大量入手可能なヒト胎盤をカルシウム依存的にリン脂質に結合する蛋白質精製の出発材料とした。ヒト胎盤の細胞膜分画を5mM　FGTAでカルシウムをキレートすることによりカルシウム依存的に細胞膜に結合する蛋白質を濃縮し，さらに種々のカラム・クロマトグラフィーによりSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上単一バンドを示すまでに精製した。こうして精製した2種類の分子量68-kDa蛋白質を便宜上68-I（pI 6.4），68K-II（pI 5.6）と呼ぶことにする。これらの精製した蛋白質を用いて，まず構造解析を行なった。臭化シアンによるペプチド・マップ，リシル・エンドペプチダーゼによるペプチド・マップ，さらに各ペプチドのアミノ酸シーケンスを行なった結果，68-IIはすでに報告されているp68/67-kDaカルエレクトリンと同一であったが，68K-Iはリポコルチン I の二量体と考えられる全く未知の蛋白質であった。

次に生物学的性状の解析を行なった。小型超遠心機を用いF-アクチン及び種々のリン脂質との結合

を調べたところ，68K－IはF－アクチン及び酸性・中性リン脂質とカルシウム依存的に結合したが，68K－IIは酸性リン脂質とのみ結合した。リン脂質との結合性は細胞増殖の情報伝達のみならず，炎症の際のアラキドン酸カスケードの重要な酵素であるホスホリパーゼA_2活性にも影響を及ぼす可能性が考えられたので，大腸菌のリン脂質を基質とするハチ毒ホスホリパーゼA_2（PLA_2）の活性に対するこれらの蛋白質の影響を調べたところ，68K－I，68K－IIともPLA_2活性を容量依存的に阻害した。一方，正常細胞に比べ癌細胞では蛋白質のチロシン残基のリン酸化が著明に亢進している場合が多く，さらに種々の増殖因子受容体がチロシンリン酸化活性を有していることよりこれらの蛋白質がリン酸化の基質になる得るかどうか，v－srcキナーゼの免疫複合体及びA 431細胞のEGF受容体キナーゼを含む膜分画を用いて検討した。68K－IはEGF受容体キナーゼによってEGF及びカルシウム依存的にチロシン残基がリン酸化されたが，v－srcキナーゼではリン酸化されなかった。68K－IIはいずれのキナーゼでもリン酸化されなかった。

最後にこれらの蛋白質に特異的なモノクローナル及びポリクローナル抗体を作製し，ヒト及びラットの種々の組織や細胞での分布を検討した。68K－IIが調べたほとんどの組織・細胞に認められたのに対して，68K－Iはヒト胎盤に特異的に発現していた。

〔総　括〕

ヒト胎盤よりカルシウム依存的にリン脂質と結合する2種類の分子量68－kDaの蛋白質（68K－I，68K－II）を精製し，その症状を検討した。68K－IIはp68/67－kDaカルエレクトリンと同一であったが，68K－Iは全く未知のタンパク質でありカルシウム依存的にF－アクチン及びリン脂質に結合し，ホスホリパーゼA_2阻害作用を有し，EGF受容体キナーゼによりEGF及びカルシウム依存性にチロシン残基がリン酸化された。68K－Iの以上の性質はリポコルチンIと酷似している。また68K－Iは多くの細胞増殖因子やそれらの受容体を持ち増殖の非常に盛んなヒト胎盤に特異的に発現されていることより，炎症のみならず細胞の増殖あるいは癌化において重要な役割を果たしている可能性が考えられた。68K－Iがリポコルチン Iとは異なる遺伝子によってコードされているのか，また胎盤に豊富に存在するトランス・グルタミネースによりリポコルチンIより生成するのかは今後解決されるべき課題である。

論文審査の結果の要旨

本研究は，細胞増殖や癌化におけるカルシウムやリン脂質に依存して機能する蛋白質の役割を解明する目的で，ヒト胎盤から2種類のカルシウム依存的リン脂質結合蛋白質（分子量68－kDa；68K－I，68K－II）を分離・精製し，それらの性状を解析したものである。

68K－I蛋白はヒト胎盤に特異的に存在し，カルシウム依存的にF－アクチンおよびリン脂質と結合し，ホスホリパーゼA_2の作用を阻害し，EGF受容体キナーゼによりEGFおよびカルシウム依存的に，また，v－fps癌遺伝子産物によってチロシン残基がリン酸化されること，そして，リポコルチンIと類似しているが，全く未知の蛋白質であることを明らかにした。これらのことから68K－I蛋白はカルシウム

やリン脂質を介して，炎症のみならず細胞増殖や癌化にも重要な役割を果たしていると考えられる。なお，68K－Ⅱ蛋白は 68/67-kDa カルエレクトリンと同一であることも明らかにした。

以上，本研究は学位授与に値するものと評価した。