

Title	ラット小腸 Ca ²⁺ 非依存性ホスホリパーゼ A2の精製とその性質
Author(s)	市田, 哲一
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37941
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	いち だ てつ いち 市 田 哲 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 0 1 7 7 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 内科系専攻
学位論文名	ラット小腸 Ca^{2+} 非依存性ホスホリパーゼ A_2 の精製とその性質
論文審査委員	(主査) 教 授 吉川 邦彦 (副査) 教 授 岡本 光弘 教 授 祖父江憲治

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

ホスホリパーゼ A_2 は、活性発現に Ca^{2+} を必要とする酵素 (Ca^{2+} 依存性 PLA_2) と、必要としない酵素 (Ca^{2+} 非依存性 PLA_2) とに大別され、前者に属するものとしては、低分子量型の腓 PLA_2 (I 群) と II 群 PLA_2 およびリン脂質の 2 位アラキドノイル基に特異性の高い、高分子量型 PLA_2 とが知られている。後者についての研究は前者に比べて乏しく、詳しい蛋白質化学的性質や反応機構などは全く分っていない。我々はラット小腸粘膜に I 群および II 群 PLA_2 抗体とは交差しない Ca^{2+} 非依存性 PLA_2 活性を持つ酵素が存在することを見出した。本研究では、ラット小腸から Ca^{2+} 非依存性 PLA_2 を単一標品にまで精製し、その性質について検討した。

(方 法)

1. 酵素の活性測定法 : PLA_2 反応は、各種リン脂質と胆汁酸塩との混合ミセルを基質として用い、10 mM EDTA 存在下の PLA_2 活性を Ca^{2+} 非依存性 PLA_2 活性とした。LysoPLase 反応は、各種リゾ体を基質として用いた。活性測定は、酵素反応産物の脂肪酸を Dole 法で抽出した後、ADAM 試薬でラベルし、誘導体化脂肪酸を逆相 HPLC で分離定量した。アルカリホスファターゼ活性は、Weiser の方法にしたがって測定した。
2. 小腸刷子縁膜の調製 : ラット小腸の口側 $1/3 \sim 3/4$ の粘膜をガラス板で剥離し、この粘膜標品から刷子縁膜 Kessler の方法によって調製した。
3. Ca^{2+} 非依存性 PLA_2 活性の可溶化 : PI-specific PLC, DOC, Triton X-100 をそれぞれ用いて刷子縁膜からの PLA_2 活性の可溶化について検討した。また、刷子縁膜分画を $-35^\circ C$ で冷凍保存し、

上清への活性の移行を経時的に追った。

4. Ca²⁺非依存性 PLA₂の精製の手順：-35°Cで1か月以上保存し、自己消化により可溶化された酵素を、QAE-Toyopearl, Phenyl-Sepharose, Hydroxyapatite, ConA-Sepharose, Cosmogel QAの各クロマトグラフィーを用いて単一標品にまで精製した。
5. SDS-ゲル電気泳動：Laemmliの方法に従って行った。電気泳動後、3mm間隔でゲル切りだしで酵素を抽出しPLA₂活性とLysoPLase活性を測った。

(結 果)

1. Ca²⁺非依存性 PLA₂活性の消化管における分布：小腸とりわけ近位回腸で最も比活性が高く、胃、十二指腸、大腸にはほとんどその活性は認められなかった。また、近位回腸粘膜から調製した刷子縁膜分画のCa²⁺非依存性PLA₂活性は、刷子縁膜のマーカー酵素であるアルカリフォスターゼ活性と同程度に濃縮されていた。これらの結果から、Ca²⁺非依存性PLA₂活性は近位回腸の刷子縁膜に主に存在していることが確認された。
2. Ca²⁺非依存性 PLA₂活性の可溶化：本酵素活性は、高濃度の塩やPI-specific PLCによっては全く可溶化されず、可溶化には界面活性剤を要した。可溶化標品を非還元条件下のSDS-PAGEで分析したところ、刷子縁のみやTriton X-100で可溶化した場合は分子量15万の位置に、DOCで可溶化した場合は7.8万の位置に活性が現れ、刷子縁膜分画を凍結保存中に可溶化された上清の活性は3.5万の移動度を示した。従って、本酵素は、内因性プロテアーゼの限定分解により、活性中心を含む可溶性のドメインと膜アンカー部分に分離されることが明らかとなった。
3. 酵素の精製：クロマトグラフィーに用いる溶媒中に、非イオン性界面活性剤を添加することは必須であり、最初の粗抽出液以後の各精製ステップでLysoPLase/PLA₂活性比は一定になった。精製酵素を非還元条件下のSDS-PAGEで分析したところ、3.5万の位置に銀染色で単一バンドが見られ、このバンドに一致してPLA₂活性とLysoPLaseが出現した。この泳動度は、刷子縁膜分画が凍結保存の間に限定分解を受けて可溶化された酵素のそれと一致する。還元条件下では2.1万と1.4万の2本のバンドに分れたが、どちらにも活性はみられなかった。この原因として、限定分解によるニックの存在、あるいは、本酵素は2個のサブユニットからなるダイマーとして存在している可能性が考えられる。また、本酵素を還元カルキボキシメチル化した後、逆相HPLCで分離すると2本のペプチドが得られたこととも一致している。
4. 精製した酵素の性質：PLA₂活性については、リン脂質がリポソームの状態ではほとんど活性がなく、胆汁酸との混合ミセルの状態でのみ高い活性が得られたが、LysoPLase活性は胆汁酸塩がなともリゾリン脂質ミセルに対して高い活性があり、その存在によって活性の上昇がみられた。両活の至適pHはともに9付近であった。各種の基質に対しての反応性を調べた。

(総 括)

本研究により、初めて哺乳動物由来の膜結合型Ca²⁺非依存性PLA₂を、内因性プロテアーゼによる限定分解により可溶化したのちに単一標品にまで精製し、酵素反応の基本的性質について検討した。その結果、本酵素は、PLA₂反応とLysoPLase反応を触媒し、リン脂質を脂肪酸とグリセロホスホリルコリ

ンにまで分解するユニークな酵素であることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

ホリスホリパーゼ A₂は、活性発現に Ca²⁺を必要とする酵素 (Ca²⁺依存性 PLA₂) と、必要としない酵素 (Ca²⁺非依存性 PLA₂) とに大別され、前者に属するものとしては、低分子量型の腭 PLA₂ (I群) と II群 PLA₂ およびリン脂質の 2 位アラキドノイル基に特異性の高い、高分子量型 PLA₂ とが知られている。後者についての研究は前者に比べて乏しく、詳しい蛋白化学的性質や反応機構などは全く分っていない。

本研究により、初めて哺乳動物由来の膜結合型 Ca²⁺非依存性 PLA₂ を、内因性プロテアーゼによる限定分解により可溶化したのちに単一標品にまで精製し、酵素反応の基本的性質について検討した。その結果、本酵素は、PLA₂ 反応と LysoPLase 反応を触媒し、リン脂質を脂肪酸とグリセロホスホリルコリンにまで分解するユニークな酵素であることが明らかになった。

このように、本研究は世界でも初めての仕事であり、今後細胞内情報伝達の研究や酵素学的反応機構の研究に役立つと思われるので学位授与に値する。