



Title	モルモット胃粘膜ホスホリパーゼA2のクローニングとその発現：カルバコール刺激によるその誘導
Author(s)	趙, 英
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38172
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

氏 名	趙 英
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 6 1 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 5 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	モルモット胃粘膜ホスホリパーゼ A ₂ のクローニングとその発現 —カルバコール刺激によるその誘導—
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡本 光弘 (副査) 教 授 谷口 直之 教 授 田川 邦夫

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) は立体特異的にグリセロリン脂質の 2 位エステル結合を加水分解する酵素である。本酵素は食餌中リン脂質の消化、膜リン脂質の脱アシル化による代謝回転、アラキドン酸遊離を介するエイコサノイドの合成、血小板活性化因子の合成など、多彩な生理的役割を司っている。一次構造上の特徴から 14KDa 外分泌性 I 型および II 型 PLA₂ と 85KDa の細胞内 PLA₂ に分類できる。I 型 PLA₂ は一般に哺乳動物膵臓に豊富に存在し、腺房細胞でプロ酵素として合成され腸内でトリプシンにより活性化される。活性化された PLA₂ は食物や胆汁由来のリン脂質の消化を司ると考えられている。しかし、モルモット膵には他の哺乳動物と異なり、I 型 PLA₂ の活性が非常に低いことが報告されている。われわれは膵臓の代わりにモルモットの胃粘膜に多量の PLA₂ が存在することを見いだした。本研究ではモルモットの胃粘膜における PLA₂ cDNA をクローニングし、その一次構造を決定し、さらにこの酵素の生理的役割を明らかにすることを目的とした。

(方法並び結果)

1. モルモット胃粘膜の PLA₂ の構造：ラット膵型 (I 型) PLA₂ cDNA をプローブとして、λgt10 に作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングしモルモット胃 PLA₂ cDNA を単離した。PLA₂ cDNA の全長は 569bp で、438bp の coding region を持ち、5' 端で 2 bp、3' 端で 87bp の non-coding region を持つ。モルモット PLA₂ の N 末端側にはラット膵 PLA₂ と同じようにプレとプロ配列が存在していた。本酵素とラット膵型 PLA₂ とのアミノ酸配列の相同性は 70% で、膵型 PLA₂ の特徴を備えている。もう 1 つの特徴はこれまでに決定された膵型 PLA₂ のすべての例で保存されている、カルシウム結合ループ内にあり Ca²⁺ イオンの結合部位の 1 つと考えられる Tyr 28 が Phe 28 に置換されていることである。
2. モルモット膵型 PLA₂ cDNA の発現：単離したモルモット胃粘膜 PLA₂ の cDNA を発現ベクターに挿入したのち、COS-7 細胞を用いて発現させた。発現酵素を精製し精製酵素との比較試験を行った。発現酵素は大部分プロ酵素として培地中へ分泌され、一部分は活性化されていた。活性型 PLA₂ は精製 PLA₂ と同じ酵素学的、免疫化学的性質を示した。
3. モルモット膵型 PLA₂ mRNA の分布：モルモット膵型 PLA₂ cDNA をプローブとしてその mRNA の分布を調べた。mRNA は膵臓と肺にも微量に存在しているが、他の臓器には検出できなかった。

4. カルバコール刺激によるモルモット胃 PLA₂ の分泌：アセチルコリンアナログであるカルバコールをモルモットに皮下注射 (0.4mg/kg) したのち、胃液中への PLA₂ の分泌応答と粘膜中の mRNA 含量の変化を調べた。カルバコールを注射してから 5 分後に胃液中の PLA₂ 活性は 2 倍に増加し、30 分後に分泌は最高となった。PLA₂ の分泌よりやや遅れて胃粘膜中の腭型 PLA₂ mRNA も増加し、45 分後に mRNA の増加は最高となった。一方 β -actin の mRNA レベルには変化がなかった。

(総括)

1. モルモット胃粘膜 PLA₂ の cDNA を単離して塩基配列を決定したところ、その構造はラット腭型 PLA₂ と約 70 % 相同性があり、ラット腭型 PLA₂ と同様にプレとプロ構造が存在していた。これまでに一次構造が決定されたすべての腭型 PLA₂ で保存されているカルシウム結合ループ内の Tyr 28 が Phe 28 に置換されていた。
2. モルモットでは胃以外に腭臓と肺にも微量に腭型 PLA₂ mRNA が存在している。
3. モルモットでは迷走神経刺激により腭臓の代わりに胃から PLA₂ が分泌され、分泌された PLA₂ は腸においてリン脂質の消化を司ることが示唆される。

論文審査の結果の要旨

本研究はモルモットの胃粘膜に存在する PLA₂ cDNA をクローニングしその一次構造を決定し、さらにこの酵素の生理的役割を明らかにすることを目的として行われたものである。

モルモット胃粘膜 PLA₂ cDNA を単離して塩基配列を決定したところ、ラット腭型 PLA₂ と同様にプレとプロ構造が存在していた。これまでに一次構造が決定されたすべての腭型 PLA₂ で保存されているカルシウム結合ループ内の Tyr 28 が Phe 28 に置換していた。COS-7 細胞で発現した結果、酵素は大部分プロ酵素として培地中へ分泌されることがわかった。活性型 PLA₂ は精製 PLA₂ と同じ酵素的、免疫学的性質を示した。

モルモットでは胃以外に腭臓と肺にも微量に腭型 PLA₂ mRNA が存在している。

アセチルコリンアナログであるカルバコールの刺激により胃液中の PLA₂ の活性と含量が増加し、これよりもやや遅れて胃粘膜中の PLA₂ mRNA の量が増加する。

本研究は初めてモルモット胃 PLA₂ の生合成および分泌機構を明らかにし、今後 PLA₂ の機能を分子レベルで解明する上で重要であり、学位論文として充分価すると認められる。