The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

【10】

氏　　名	趙（ちょう）　英（いん）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　10618　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A_2（PLA_2）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PLA_2と85KDaの細胞内PLA_2に分類できる。Ⅰ型PLA_2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PLA_2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PLA_2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PLA_2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PLA_2cDNA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PLA_2の構造：ラット膵型（Ⅰ型）PLA_2cDNA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PLA_2cDNAを単離した。PLA_2cDNAの全長は569bpで，438bpのcoding regionを持ち，5’端で2bp，3’端で87bpのnon-coding regionを持つ。モルモットPLA_2のN末端側にはラット膵PLA_2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PLA_2とのアミノ酸配列の相同性は70％で，膵型PLA_2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PLA_2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Ca^{2+}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PLA_2cDNAの発現：単離したモルモット胃粘膜PLA_2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PLA_2は精製PLA_2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PLA_2mRNAの分布：モルモット膵型PLA_2cDNA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 PLA_2 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 PLA_2 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 PLA_2 活性は2倍に増加し，30分後に分泌は最高となった。PLA_2 の分泌よりやや遅れて胃粘膜中の膵型 PLA_2 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 PLA_2 のcDNAを単離して塩基配列を決定したところ，その構造はラット膵型 PLA_2 と約70％相同性があり，ラット膵型 PLA_2 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膵型 PLA_2 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膵臓と肺にも微量に膵型 PLA_2 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膵臓の代わりに胃から PLA_2 が分泌され，分泌された PLA_2 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 PLA_2 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 PLA_2 cDNA を単離して塩基配列を決定したところ，ラット膵型 PLA_2 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膵型 PLA_2 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 PLA_2 は精製 PLA_2 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膵臓と肺にも微量に膵型 PLA_2 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 PLA_2 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 PLA_2 mRNA の量が増加する。

本研究は初めてモルモット胃 PLA_2 の生合成および分泌機構を明らかにし，今後 PLA_2 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。