Osaka University Knowledge Archive

Title	Purification and Properties of a Phospholipase A2/Lipase Preferring Phosphatidic Acid, Bis (monoacylglycerol) Phosphate, and Monoacylglycerol from Rat Testis
Author(s)	伊藤, 雅文
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43839
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏　　名	伊　藤　雅　文（いとう まさふみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　17373　号
学位授与年月日	平成14年12月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学　位　論　文　名	Purification and Properties of a Phospholipase A_2/Lipase Preferring Phosphatidic Acid, Bis (monoacylglycerol) Phosphate, and Monoacylglycerol from Rat Testis. （ホスファチジン酸特異的ホスホリパーゼ A_2/モノアシルグリセロールリパーゼの精製と諸性質、ーリゾビスホスファチジン酸分解活性の検討ー）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　岡本　光弘 （副査） 教　授　谷口　直之　　教　授　高井　義美

論　文　内　容　の　要　旨

［目的］

リゾホスファチジン酸（LPA）はリン脂質の *de novo* 合成の中間体であるとともに、特異的受容体を介して血小板凝集、平滑筋収縮、細胞増殖促進など多彩な生理作用を発揮する脂質性メディエータの一つである。最近、数種のLPA受容体がクローニングされ下流のシグナル伝達機構は活発に研究されている。しかし、LPA合成経路についてはまだよく分かっていない。LPAの主要な生合成酵素としてホスファチジン酸（PA）を特異的に加水分解するホスホリパーゼ A_2（PA-PLA_2）の存在が推測されてきたが、その分子的実体はまだ明らかにされていない。そこで、ラット種々臓器を検索したところ、精巣で Ca^{2+} に依存せず酸性至適pHを示す比較的高いPA特異的 PLA_2 活性を検出した。本研究では、この PA-PLA_2 を精製して性状解析をした。酸性化された後期エンドゾーム内膜系（～pH 5.5）には、コレステロール輸送やたんぱく質小胞輸送を制御する酸性リン脂質リゾビスフォスファチジン酸（LBPA）が存在する。LBPAは、ホスファチジルグリセロール（PG）の構造異性体で、リン酸が *sn*-1位（一般的なリン脂質の対称体の位置）に結合し、2つのグリセロールのそれぞれに1本ずつアシル鎖が結合するユニークな構造を示している。LBPAの代謝はほとんどわかっていないので、精製酵素のLBPA分解活性もあわせて検討した。

［方法］

TEAE cellulose、Phenyl-Sepharose、SuperQ、Biogel、Cosmogel QA、Super SW3000の各クロマトグラフィーを用いて、ラット精巣の上清画分から本酵素を精製した。PLA_2 活性・リパーゼ活性は、酵素作用により遊離する脂肪酸を抽出し9-アントリルジアゾメタン（ADAM）で誘導体化後、HPLCを用い分離定量することにより測定した。LBPAは、クロマトグラフィー支持体による触媒作用によりアシル基が容易に2,3-転位してその構造が変化してしまうためTLCやHPLC等の方法では精製できない。この問題を回避するため、抗マラリア剤クロロキン（100 mg/kg体重）を1週間投与してLBPAを誘導したラット肝臓から粗リソソームを調製し、そこから抽出した全脂質を大過剰の膵型 PLA_2 で処理してほとんどのジアシルリン脂質を1-アシルリゾリン脂質に変換した。膵型 PLA_2 はLBPAを分解しないためLBPAは残存する。PA-PLA_2 は1-アシルリゾリン脂質に作用しないので、これを精製せずそのまま

基質として用いた。反応産物のうち脂肪酸を上記のADAMラベル化法を用い経時的に定量し、酵素活性を測定した。もう一つの反応産物リゾホスファチジルグリセロールの化学構造は、HPLC/エレタトロスプレー質量分析（LC/MS）でタンデムマススペクトル（MS/MS）を測定して決定した。

［成績］

(1) PA-PLA_2 の精製と諸性質

ラット精巣可溶画分から酸性pH（至適pH 5.5）でPAの *sn*-2位のアシル基を特異的に分解する63-kDa PLA_2 を精製した。ゲルろ過による推定でも72 kDaの分子質量が得られ、測定条件下では単量体として存在することが分かった。本酵素はアルカリ性領域（至適pH 8.5）では、PA分解活性よりも高い比活性で不飽和脂肪酸を含むモノアシルグリセロールを分解した。精製の最後の3ステップで PLA_2 活性とモノアシルグリセロールリパーゼ活性の比はほぼ同じであること、セリンを修飾する不可逆性阻害剤で両活性ともに阻害されることから、一つの活性中心により両活性が触媒されることが示唆された。Ca^{2+}、EDTAの存在は、酵素活性に影響を与えなかったが、酸性界面活性剤は、両活性を促進した。本酵素は、リゾPAを含めリゾリン脂質とトリアシルグリセロールを分解しなかった。PA-PLA_2 のN-末端アミノ酸配列は、α/βヒドロラーゼフォールド・リパーゼファミリーに属するセリンカルボキシルエステラーゼES-10のそれと一致していた。実際、PA-PLA_2 は短鎖と長鎖脂肪酸のp-ニトロフェノールエステルを効率良く分解した。一方、ES-10エステラーゼは3量体として存在し、長鎖脂肪酸含有モノアシルグリセロールをほとんど分解しない点で PA-PLA_2 と異なっていた。PA-PLA_2 は、酸性とアルカリ性条件で異なる基質特異性を示すが、同様の性質は同じα/βヒドロラーゼフォールド・リパーゼファミリーに属し分泌経路の酸性区画でプロホルモンを限定分解するカルボキシペプチダーゼで報告されている。以上の結果、PA-PLA_2 はSerを触媒基とする新しいタイプの PLA_2 であることが分かった。また、血漿中リゾPAの供給源の一つであるヒト血小板にも精巣と同性状の酸性領域で比較的高い PA-PLA_2 活性が検出された。

(2)LBPA分解活性の検討

LC/MSによる解析からリソソーム画分脂質に含まれる基質LBPAは主に22：6；22：6と22：6；18：2の脂肪酸をもつ分子種で構成されていたが、この様に特異な脂肪酸組成を示すリン脂質分子群は他に無かった。膵 PLA_2 処理後の脂質中にはLBPA、ホスファチジルイノシトール（18：0；20：4）以外のジアシルリン脂質はほとんど検出できなかった。そして PA-PLA_2 が2-リゾリン脂質を分解しないことより22：6と18：2の遊離反応でLBPA分解活性を追跡した。LBPA分解活性はPA分解活性に匹敵する比活性が得られ、18：2遊離反応が22：6遊離反応にくらべ約2.5倍高かった。また、もう一つの反応産物リゾフォスファチジルグリセロール（22：6）は、コントロールにはほとんど存在しないが脂肪酸遊離に対応して増加した。

［総括］

ラット精巣から単一酵素でPAなどの酸性リン脂質に特異的な PLA_2 活性（至適pH 5.5）と、モノアシルグリセロールリパーゼ活性（至適pH 8.5）を示す63-kDa PA-PLA_2 を精製した。セリンエステラーゼ阻害剤で両活性は阻害され、N末端12アミノ酸はラット肝臓カルボキシルエステラーゼES-10と同一であった。さらに、LBPAに対しPAと同程度の比活性を示すことが分かった。本酵素は、後期エンドソーム内のpH 5.5で作用できる初めてのLBPA分解酵素であり、細胞内酸性区画でPAとLBPAの代謝に関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

リン脂質は、生体膜の主要な構成成分であるだけでなく脂質性メディエータとして重要である。その中で最近、特に注目されているのは、リゾホスファチジン酸（LPA）である。LPAはリン脂質の *de novo* 合成の中間体であるだけでなく、血小板凝集、平滑筋収縮、細胞増殖促進など多彩な生理作用を発揮し、その特異的受容体も数種クローニングされている。LPAの主要な合成経路として、細胞内情報変換酵素ホスホリパーゼD（PLD）の作用で産生されるホスファチジン酸（PA）をホスホリパーゼ A_2（PLA_2）が水解し生成する経路と、リゾホスホリパーゼDがリゾホスファチジルコリンを水解し生成する経路が考えられる。前者の経路にあるPAを特異的に加水分解する PLA_2 の存在が

以前より指摘されてきたが、その分子的実体は明らかにされていない。本研究は、PA を特異的に分解する PLA_2 をはじめて純品にまで精製し、その部分一次構造からこの PLA_2 が新しい PLA_2 ファミリーに属する事を明らかにした。さらに本酵素がエンドソーム系での脂質・蛋白質選別シグナル分子リゾビスフォスファチジン酸（LBPA）を分解する活性を持つことを最新の高感度高速液体クロマトグラフィー/質量分析法により明らかにした。本研究の成果により、シグナル伝達経路における LPA 産生の位置づけがはっきりし、LPA の病態との関係の解明や、この PLA_2 をターゲットにした薬剤開発の発展に寄与しうる。また、LBPA を介したエンドソーム系分子選別機構解明にむけた新しい展開にも結びつく研究であり、学位論文に充分値するものと認める。