

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43839">https://hdl.handle.net/11094/43839</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について〈/a〉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
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 <sub>2</sub> /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 <sub>2</sub> /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<sub>2</sub> (PA-PLA<sub>2</sub>) の存在が推測されてきたが、その分子の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<sup>2+</sup> に依存せず酸性至適 pH を示す比較的高い PA 特異的 PLA<sub>2</sub> 活性を検出した。本研究では、この PA-PLA<sub>2</sub> 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ホスファチジン酸 (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<sub>2</sub> 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腓型 PLA<sub>2</sub> 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。腓型 PLA<sub>2</sub> は LBPA を分解しないため LBPA は残存する。PA-PLA<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sup>2+</sup>、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<sub>2</sub> の N-末端アミノ酸配列は、 $\alpha/\beta$  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エステラーゼ ES-10 のそれと一致していた。実際、PA-PLA<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> と異なっていた。PA-PLA<sub>2</sub> 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  $\alpha/\beta$  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<sub>2</sub> は Ser を触媒基とする新しいタイプの PLA<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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。腓 PLA<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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ホ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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) 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<sub>2</sub> の存在が

以前より指摘されてきたが、その分子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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> が新しい PLA<sub>2</sub> 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ホスファチジン酸 (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<sub>2</sub> をターゲットにした薬剤開発の発展に寄与する。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。