



# Rat brain and liver soluble phospholipase C : resolution of two forms with different requirements for calcium

中西, 宏之

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1987-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0677

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000677>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	なかにしひろゆき 中 西 宏 之 （大阪府）
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医博い第545号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	昭和62年3月31日
学 位 論 文 題 目	RAT BRAIN AND LIVER SOLUBLE PHOSPHOLIPASE C: RESOLUTION OF TWO FORMS WITH DIFFERENT REQUIREMENTS FOR CALCIUM (ラット大脳および肝臓組織可溶性分画におけるホスホリパーゼC：カルシウム依存性の異なる2種類のホスホリパーゼCの分離)
審 査 委 員	主査 教授 西 塚 泰 美 教授 斉 藤 洋 一      教授 岩 井 誠 三

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 序 文

多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質がその標的細胞の細胞膜受容体に作用すると、形質膜のイノシトールリン脂質が加水分解され、それに共役して細胞内情報伝達系が作動する。ホスホリパーゼCはこのイノシトールリン脂質を加水分解する酵素であり、細胞内情報伝達機構の初期応答として重要な役割りを果たしている。現在にいたる迄、ホスホリパーゼCの酵素学的性質については種々の報告がなされているが、一般に本酵素の触媒機能の発揮には $10^{-3}$  M 程度の高濃度のカルシウムが必要であることが知られている。しかし上記の受容体に共役するイノシトールリン脂質の加水分解反応にはカルシウムを必須とするが、酵素反応において認めるような高濃度のカルシウムは必要としない。すなわちこの種のリン脂質分解の調節機構は現在あきらかになっていない。

ホスホリパーゼCはラット大脳、および肝臓など多数の組織にその存在が報告されており、最近では同一組織内での本酵素の多様性が示唆されている。本論文ではラット大脳および肝臓組織の可溶性分画から、カルシウム依存性の異なる2種類のホスホリパーゼCを分離し、部分精製するとともにその性質を比較解析した。この2種のホスホリパーゼCのうち一方は生理的にきわめて低濃度のカルシウムイオンの存在下にホスファチジルイノシトールを加水分解するが、他方はこれまで既知の酵素と同様に $10^{-3}$  M 程度のカルシウムを必要とした。

## 実験方法

ホスホリパーゼC活性は $^{14}\text{C}$ にて標識したホスファチジルイノシトールを基質としてもちい、加水分解物であるイノシトールリン酸の放射活性により測定した。本酵素のカルシウム依存性は pH 7.4 または pH 5.5 の条件下で  $\text{Ca}^{2+}$ -EDTA 緩衝液をもちいて測定した。イノシトール二リン酸、イノシトール三リン酸は Wilson らの方法に従って確認した。

## 実験結果

ラット大脳のホスホリパーゼCは、その可溶性分画を DE-52 カラムに吸着させ、食塩の濃度勾配にて溶出させた。このカラムクロマトグラフィーにおいてホスホリパーゼC活性を測定すると単一のピークとして出現した。活性分画を回収して透析したのちに、ヘパリンセファロースカラムクロマトグラフィーを行なったところ、酵素活性は2つのピークとして現われた。最初のピーク(Type I)と第2のピーク(Type II)をそれぞれ回収し、限外濾過にて濃縮したのち、各々をセファクリル S-400 カラムクロマトグラフィーによるゲル濾過、続いてアミノヘキシルセファロースカラムクロマトグラフィーをおこない、それぞれ約100倍に精製した。肝臓においても同方法で Type I, Type II を部分精製した。

ホスホリパーゼC Type I, Type II はゲル濾過によって各々分子量が30万、25万と推定された。この2種類の酵素におけるカルシウム依存性を検討した結果、従来行なわれてきた pH 5.5 の条件では、Type I, Type II 共に  $10^{-3}\text{M}$  範囲のカルシウム濃度で活性を示し低濃度カルシウムでは活性は認められなかった。一方、生理的条件に近い pH においては、Type I は  $10^{-6}\text{M}$  程度のカルシウムで十分に活性が現われるが、Type II では低濃度カルシウムでは活性がなく、 $10^{-3}\text{M}$  範囲ではじめて活性が出現した。カルシウム以外の2価金属イオンについては、ストロンチウムがカルシウムに比べ約20~30%の活性を示した。デオキシコール酸存在下においては Type I のカルシウム至適濃度が  $10^{-3}\text{M}$  範囲に移動し、その最大活性は約5倍に増加した。本酵素の3種のイノシトールリン脂質に対する活性を比較検討した結果、Type I, Type II 共に低濃度カルシウムにおいては、ホスファチジルイノシトールよりもホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸、ホスファチジルイノシトール4リン酸が加水分解を受けやすい結果が得られた。またいずれの酵素によってもホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンは加水分解を受けなかった。

## 考 察

ホスホリパーゼC Type I, Type II の酵素学的性質を比較検討した結果、Type I は生理的細胞内カルシウムの存在下においてイノシトールリン脂質を加水分解し、この酵素が実際細胞内で作用している可能性が示唆された。ホスホリパーゼC Type I, Type II の分子量は両者とも従来報告されている分子量よりも大きく、また両者の分子量の比較の結果、本酵素の活性調節に蛋白分解酵素が関与していることも推定される。最近同一組織におけるホスホリパーゼCの多様性を示す報告がなされており、本酵素のカルシウム感受性においても統一した見解が得られていない。本論文で

明らかにされたホスホリパーゼCの性状はこれら疑問点の解明に糸口となりうると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

ホスホリパーゼCはイノシトールリン脂質の加水分解反応をつかさどる酵素であり、細胞内情報伝達機構で重要な位置を占めている。本酵素は古くから、その酵素学的性質の解析が行なわれてきたが、粗抽出物での研究が大部分であり、ホスホリパーゼCの細胞内での活性化機構、カルシウム依存性等は明らかになっていない。本学位申請者の提出した論文では、ラット大脳および肝臓組織の可溶性分画からカルシウム依存性の異なる2種類のホスホリパーゼCを分離、部分精製し、その性質の比較解析を行ない、ホスホリパーゼCの活性化調節機構を解明しようと試みている。

従来、本酵素の試験管内での触媒機能の発揮には、 $10^{-3}$ M程度の高濃度のカルシウムが必要であることが知られている。本研究では、ラット大脳および肝臓の可溶性分画に、生理的なきわめて低濃度のカルシウムで活性化されるホスホリパーゼC type Iが存在することを見い出している。また同組織内に高濃度カルシウム依存性のホスホリパーゼC type IIが共存することも明らかにしている。このtype I, type IIの両酵素を部分精製し、各種条件下で酵素活性を比較した結果、生理的条件下で触媒機能を有するtype Iが実際に細胞内で作用している可能性を示唆している。また分子量の解析により、最近報告されつつあるホスホリパーゼCの多様性の意義を明らかにしようと試みており、本酵素の活性化調節において蛋白質分解酵素の関与が推定される結果が得られている。

最近、細胞が外界刺激を受容した際、イノシトールリン脂質の中で特にフォスファチジルイノシトール4,5-二リン酸の加水分解が重要な意味を持つことが明らかになってきた。本論文において、低濃度カルシウムの存在下においてホスファチジルイノシトールよりもホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸が加水分解を受け易いことを示しており、この部分精製したホスホリパーゼCの生理的意義をさらに確立している。

このように、本研究では従来解明されていなかったホスホリパーゼCのカルシウム依存性の不明点を明らかにするとともに、本酵素の活性化調節機構の研究にインパクトを与えたものとして価値ある業績と認める。

よって、本研究者は医学博士を得る資格があると認める。