

23PO-am256

細胞内 I 型 PAF- アセチルヒドロラーゼ活性の新規測定法

○原田 史子¹, 山浦 沙樹², 酒瀬川 信一², 杉森 大助³, 谷川 和也¹, 唐澤 健¹ (¹帝京大薬, ²旭化成ファーマ, ³福島大共生システム理工)

【目的】血小板活性化因子を加水分解し不活化する酵素として同定された三種類の PAF-アセチルヒドロラーゼ (PAF-AH) のうち、細胞内 I 型 PAF-AH はアセチル基に対する特異性が高く、活性測定には主に^[3H]で標識した PAF を用いる RI 法が用いられてきた。今回私たちは、細胞内 I 型 PAF-AH の非 RI で簡易な活性測定法として、血漿型 PAF-AH の活性測定用に新規開発された、PAF を基質として放線菌由来のホスホリパーゼ D を用いた活性測定系 (酵素法) について検討した。

【方法】酵素源には、N 末端に His-tag を付加し大腸菌で発現・精製したヒト細胞内 I 型 PAF-AH α_1, α_2 サブユニットのリコンビナントを使用した。RI 法の基質には 1-O-hexadecyl-2-^[3H]acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine を用い、常法に従い反応停止後に Sep-PakC18 で分離した^[3H]酢酸の放射活性を測定した。既存の血漿型 PAF-AH 活性測定法として、1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine を基質とし、4-nitrophenol の生成を OD410 で測定する化学法を用いた。酵素法の試薬は旭化成ファーマ株式会社より供与いただき、測定法は同社のプロトコールに従った。

【結果】RI 法と酵素法、および化学法で、細胞内 I 型 PAF-AH の活性測定を行った。化学法では、細胞内 I 型 PAF-AH の活性は全く検出できなかった。酵素法と RI 法で細胞内 I 型 PAF-AH リコンビナントの比活性を測定したところ、酵素法では RI 法の約 30%であった。これは、酵素法の基質がラセミ体であることに由来すると考えられた。酵素量と活性の関係について調べたところ、少なくとも 5 μ g/mL から、100 μ g/mL の間では直線性が見られることがわかった。今後、生体由来試料への適用について検討したいと考えている。