アラキドン酸カスケード作動酵素としての ホスホリパーゼ A₂

工 藤 一 郎*

Phospholipase A₂s which provide arachidonates for eicosanoid generation

Phospholipase A₂ (PLA₂) plays a crucial role in diverse cellular responses including phospholipid digestion and metabolism, host defense, and signal transduction. PLA₂ provides precursors for eicosanoid generation when the cleaved fatty acid is arachidonate. Mammalian tissues and cells generally contain more than one PLA₂ enzyme. Recent advances in molecular and cellular biology enabled us to understand the molecular nature, possible function and regulation of each PLA₂ isozymes. Cytosolic PLA₂ (cPLA₂) and secretory PLA₂ (sPLA₂) are the most well characterized PLA₂s amongst a still expanding large family of mammalian PLA₂s. cPLA₂ exists in the cytosol of various types of cells almost ubiquitously. It exhibits arachidonate-preference and the activity is regulated by protein phosphorylation. sPLA₂ is also widely distributed in mammalian tissues and cells. In particular, sPLA₂ is detected extracellularly in inflamed sites of experimental animals and human. Participation of sPLA₂ in arachidonate metabolism is also demonstrated. Here, I focus on recent studies of involvement of cPLA₂ and sPLA₂ in eicosanoid generation.

*Ichiro Kudo**

key words : phospholipase A₂, eicosanoid generation, arachidonate, sPLA₂, cPLA₂

プロスタグランジンなどの前駆体であるアラキドン酸は、遊離型の脂肪酸としては生体内にほとんど存在せず、その大部分が生体膜の主要構成成分であるグリセリン脂質のグリセロール 2 位にエステル結合している。細胞外の刺激に呼応して細胞内のホスホリパーゼが活性化され、アラキドン酸を遊離し、アラキドン酸カスケードが作動すると信じられてきた。アラキドン酸カスケードの作動酵素であるホスホリパーゼ A₂ に注目した研究が盛んに行われ、現在までに数種の哺乳動物のホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) アイソザイムが精製され、その性状、活性調節機構が調べられてきた。

表 1 は、これまでに遺伝子構造が報告され、複数の研究グループによって解析されてきた PLA₂ についてまとめたものである。I 型 PLA₂ は、主

に腭液中に発現している細胞外酵素で、食餌中のリン脂質を加水分解するために働いている。II 型 PLA₂ は、細胞外に分泌される酵素である。これは細胞表面に存在するヘパリン様構造に結合することで、アラキドン酸カスケードに関与することがわかっている。細胞質ホスホリパーゼ A₂ (cPLA₂) はアラキドン酸含有リン脂質に高親和性を示し、比較的低濃度のカルシウムイオン変動に感受性である。cPLA₂ は細胞外刺激に呼応してリン酸化修飾され、活性化され、アラキドン酸カスケードの開始に重要な役割を担っていると考えられる。

これら以外に、筆者らは iPLA₂ とよぶ新規のアラキドン酸高親和性酵素を、炎症刺激下の培養ラット正常線維芽細胞あるいはラット臓器中に検出した。ほかに、ホスホリパーゼ D 経路の抑制剤に感受性なステップがアラキドン酸カスケードに関与するという報告もある。

本総説では、アラキドン酸放出反応に関わるホ

* Department of Health Chemistry, School of Pharmacological Sciences, Showa University 昭和大学薬学部衛生化学教室

表 1 現在までに遺伝子構造が決定された 3 種のホスホリパーゼ A₂ アイソザイムのまとめ

PLA ₂	I 型	II 型	cPLA ₂
分子量	14,000	14,000	85,000
分布 哺乳動物	脾液	炎症滲出液 炎症担当細胞	種々の細胞の細胞質
哺乳動物以外	蛇毒 (<i>Elapidae</i> , <i>Hydrophiidae</i>)	蛇毒 (<i>Crotalidae</i> , <i>Viperidae</i>)	報告がない
基質特異性	PE=PC	PE>PC	アラキド酸含有 PE, PC
Ca ²⁺ 要求性	mM	mM	μM
哺乳動物での機能	食物中のリン脂質の消化 細胞増殖の促進	炎症, 組織障害 肥満細胞の脱顆粒反応 細菌細胞膜の破壊	受容体とカップルしたアラキ ドン酸遊離
特 徴	不活性型前駆体として生合成され、 プロテアーゼ分解により成熟酵素となる。	炎症性サイトカインにより発現誘導される。 ヘパリンに高い親和性をもつ。	Ca ²⁺ 濃度依存的に膜へ移行する。

スフォリパーゼについて、筆者らの結果を中心にまとめ、今後の展望を述べる。PLA₂ 研究の生化学的側面は他の総説^{1~5)}に譲る。

cPLA₂ (アラキドン酸高親和性ホスホリパーゼ A₂)

ラットやウサギ血小板を刺激すると細胞外にホスホリパーゼ A₂ 活性の大部分が放出されることを見出した。この活性を精製したところ、後章で述べる分泌型の sPLA₂ であった。実験を進める過程で、基質としてグリセロールの 2 位にアラキドン酸をもつリン脂質を使うと、sPLA₂ に加えて別の PLA₂ 活性が血小板の可溶性画分、すなわち細胞質画分に存在することに気付いた。これを精製したところ、sPLA₂ の分子量が約 14 kDa であったのに対し、約 90 kDa と高分子であった^{6~9)}。新規 PLA₂ ということで、高分子量細胞質 PLA₂ あるいはアラキドン酸高親和性 PLA₂ などとよばれたが、現在ではたんに cPLA₂ とよばれている。同様の酵素が単球、マクロファージ系細胞から部分精製された^{10~13)}。

精製 cPLA₂ は、グリセロール 2 位にアラキドン酸をもつ基質を、他の脂肪酸の場合にくらべて約 7 倍効率よく加水分解する。n3 系列の高不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸は cPLA₂ のよい基質となるが、ドコサヘキサエン酸はまったくリン脂質から加水分解されてこない¹⁴⁾。cPLA₂ は、反応系にカルシウムイオンを添加せ

ず、EDTA あるいは EGTA を存在させると活性を示さなくなった。また、遊離カルシウムイオン濃度が 100 nM 以下の場合にも活性を示さないが、遊離カルシウムイオン濃度が数百 nM の範囲の変動に呼応して活性化され、主要膜リン脂質であるホスファチジルコリンあるいはホスファチジルエタノールアミンからアラキドン酸を遊離した^{15,16)}。一般に、細胞質の遊離カルシウムイオンは、活性化に伴いこの範囲で変動すると考えられており、カスケードの作動を考えると好都合である。抗体を調製したところ、肥満細胞や好中球などのさまざまな細胞、あるいは心臓や脳をはじめとするさまざまな臓器に抗原性を一にする酵素活性が存在することがわかった¹⁷⁾。

筆者らは cPLA₂ 酵素こそが細胞外の刺激に呼応して血小板内で活性化され、アラキドン酸カスケードを作動する酵素そのものであると予想して、その構造決定に力を注いだ。しかし残念なことに、cPLA₂ 遺伝子クローニングはアメリカの 2 グループ(ジェネティックス研究所¹⁸⁾とイーライリリー¹⁹⁾)に先を越された。筆者らは cPLA₂ を血小板から精製したのに対して、彼らはヒト白血病細胞株 U937 細胞に cPLA₂ を検出し、部分精製品から配列を決定し、cDNA を得た。彼らのデータによるとヒト cPLA₂ は、① 749 アミノ酸残基からなり、② 分泌型の sPLA₂ と一次構造上の同一性がまったくなく、③ N末端近傍にカルシウムイオン依存的に膜へ結合する配列(以下、CalB)が

図1 肥満細胞における抗原抗体刺激による cPLA₂ の即時的リン酸化と脱リン酸化

存在するとされた。また、cPLA₂ はさまざまな細胞や臓器で発現していることがノーザン解析でわかった。

CalB ドメインは、cPLA₂ 以外にも GAP, PKC, PLC などの情報伝達のキー蛋白に共通して見出されており、細胞内局在性の変動をもたらし構造である。現在では、cPLA₂ の反応に必要な μM 以下程度のカルシウムイオンは、酵素の活性発現、すなわち加水分解反応に直接必要ではないとされている^{20,21)}。この点は、分泌性 sPLA₂ が加水分解の過程において、mM レベルのカルシウムを必要としているのと対照的である。

ところで、肥満細胞を抗原と抗体で刺激すると、アラキドン酸カスケードが作動する。この反応に関わる PLA₂ がどのように調節されているか調べた。マウス骨髄由来培養肥満細胞を、抗原と IgE 抗体で刺激するとアラキドン酸が遊離するが、これは蛋白リン酸化酵素阻害剤で阻害された²²⁾。また、可溶性画分中の cPLA₂ 活性は刺激直後に上昇し、ただちにベーサルなレベルにまで低下した。この経時変化は、予め放射標識アラキドン酸でラベルした細胞を、抗原と IgE 抗体で刺激したときに観察されるアラキドン酸の遊離反応に見かけ上一致した。また、放射標識無機リン酸でラベルした細胞を同様の条件で刺激後、特異抗体で cPLA₂ を沈降して解析すると、活性上昇に伴って cPLA₂ がリン酸化され、ベーサルレベルに戻ると同時に、

脱リン酸化されていることがわかった(図1)。同様の cPLA₂ のリン酸化はトロンビン刺激ヒト血小板でも報告された²³⁾。

cPLA₂ はさまざまな細胞や臓器で細胞外の刺激に呼応して活性化され、アラキドン酸を遊離し、いわゆるアラキドン酸カスケードを作動する酵素として中心的な役割を担っていると考えられるに至っている。また、その活性調節には、情報伝達の結果のカルシウム濃度変動および蛋白リン酸化、脱リン酸化が関わりと結論される^{23,24)}。ジェネティクス研究所のグループは、部位特異的変異を導入することによって、cPLA₂ をリン酸化する酵素は MAP キナーゼであり²⁶⁾、そのリン酸化部位は N 末端から 505 番目のセリン残基であることを報告した。SDS-PAGE 上で、MAP キナーゼでリン酸化を受け、活性化された cPLA₂ はリン酸化されていない酵素と挙動が違うとされており、リン酸化酵素の簡便な検出方法として用いられている。

最近、アラキドン酸誘導体であるアラキドノイルトリフルオロメチルケトンが cPLA₂ 特異的阻害剤として開発され、これが活性化血小板のアラキドン酸代謝物産生を阻害することが報告された^{27,28)}。また、cPLA₂ 遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチド処理によって、単球でのエンドトキシン誘発のプロスタグランジン E₂ 合成が抑制されることが示された²⁹⁾。cPLA₂ の機能を直接示唆しているといえる。

ごく最近、cPLA₂ の N 末端から 228 番目のセリン残基が加水分解活性に必須であることが、エライリリーの研究グループによって示された³⁰⁾。彼らはさらに、斎藤ら³¹⁾によって以前に決定された真菌 *Penicillium notatum* 由来のホスホリパーゼ B (グリセロリン脂質のグリセロールの 1 位および 2 位に結合する脂肪酸を、両方とも加水分解する酵素) と cPLA₂ との間に、110 アミノ酸残基にわたって相同性があることを指摘し、その領域に活性発現に必要な 228 番のセリンがあると報告した。この点は、cPLA₂ には A₂ タイプの活性に加えて、リゾホスホリパーゼ活性があるとするレスリーら³²⁾と筆者ら³³⁾の結果と関係するものと思われる。なお、cPLA₂ にあるリゾホスホリパーゼ活性の生理的な意味はいまだ不明なままで

ラット I 型 PLA ₂	AVWQFRNMIKCTIPGSDPLREYNNYGCYCGLGSGTPVDDLDRCCTQTHDHCYNQAKKLESCKFLID
ラット II 型 PLA ₂	SLLEFGQMIL-FKTGKRADVSYGYGCHCGVGGSGPKDATDWCCVTHDCCYNRLEKRG-C-----
ヒト II 型 PLA ₂	NLVNFHRMIK-LTTGKEAALSYGFGCHCGVGGSGPKDATDRCCVTHDCCYKRLEKRG-C-----
ヒト I 型 PLA ₂	AVWQFRNMIKCVIPGSDPFLREYNNYGCYCGLGSGTPVDELDKCCQTHDNCYDQAKKLDSCCKFLLD

NPYTNTYSYKCSGNVITCSDKNNDCESEFICNCDRQAACIFS--KVPYNKEYKDLDTKKHCH
 GTKFLTYKFSYRGQISCSTNQDSCRQLCQCDKAAAEFCFARNKKSYSYLKYQFY-PNKFCKGKTPSC
 GTKFLSYKFSNSGSRITCA-KQDSCRQLCECDKAAATCFARNKTTYNKKYQYY-SNKHCRGSTPRC
 NPYTHTYSYSCSGSAITCSSKNKECEAFICNCDRNAAICFS--KAPYNKAHKNLDTKKYCQS

図2 分泌型ホスホリパーゼ A₂ のアミノ酸一次構造

ある。グリセロリン脂質 1 モルから、1 モルのアラキドン酸の供給ごとに生じる 1 モルのリゾリン脂質を、細胞にとって有害であるがゆえに加水分解しているのかもしれない。

cPLA₂ の作用によって生じるアラキドン酸が生理的に重要であることはおそらく間違いない。それに加えて、疾患に結びつく過剰なアラキドン酸カスケードについても、cPLA₂ が関与するという仮説の基に、ある種のサイトカインあるいは増殖因子刺激下で cPLA₂ 遺伝子の発現量が変動することが示された。IL-1 処理線維芽細胞^{34~36}、M-CSF 刺激単球系白血病細胞³⁷、IL-1 あるいは TGF β 処理した腎メサンギウム細胞^{38,39}、TNF 刺激ヒト癌細胞^{40,41}、抗原抗体刺激肥満細胞²²、LPS 処理ヒト好中球⁴²の例などがこれに当る。これらのうち、肥満細胞の例を除くといずれもその遺伝子発現の上昇量は 2~3 倍であり、あまり顕著とはいえない。肥満細胞の例では酵素量は免疫的にみる限り 10 倍程度に上がったが、その上昇に見合ったプロスタグランジン産生量の増加はみられなかった。cPLA₂ はいわゆるハウスキーピング遺伝子の一つであって、発現量の上昇が直接疾患と結びつくのではなく、細胞のある種の“分化”を意味しているのかもしれない。

sPLA₂ (14 kDa II 型 PLA₂)

先に述べた cPLA₂ より先行して、分子量約 14 kDa の分泌性ホスホリパーゼ A₂ (sPLA₂) の研究が盛んに行われた。sPLA₂ は、活性化血小板の刺激上清⁴³、脾臓^{44,45}、肝臓⁴⁶などから単離、同定され、炎症部位の浸出液からも精製された⁴⁷。血小板放出性の sPLA₂ の構造を蛋白レベルおよび遺伝子レベルで決めたところ、それまでに報告のない新規な酵素蛋白であった。

図2にヒト⁴⁸とラット⁴⁹の sPLA₂ の構造を示した。この図で注目していただきたい酵素は“II 型”酵素である。“I 型”酵素は当時すでにわかっていた脾液中の消化酵素である。両者の分子サイズはほぼ同じであるが、そのホモロジーはお互いに約 30%であった。なお、“I 型”酵素と“II 型”酵素は、一次構造中にある 14 残基のシステインの位置、C 末端部分に余分なペプチドの有無などでそれぞれ特徴づけられているが、これはそれぞれコブラあるいはマムシ蛇毒液に見出されていた細胞外 PLA₂ との相同性に基づいて分類されたものである。

遺伝子構造を調べたところ、成熟蛋白の N 末端側には分泌蛋白に特徴的なシグナル配列があり⁵⁰、これがプロセスされることとカップルして、細胞質で合成された本酵素が ER のルーメン側に移行し、結果として、sPLA₂ は細胞内の膜リン脂質を加水分解することなく、不活性型で細胞内に留まることになる。この不活性化の機構は不明である。後に述べるように、細胞外に放出された sPLA₂ は未刺激細胞の形質膜を加水分解することはできないが、TNF などのサイトカインで刺激した細胞にはアタックする。sPLA₂ が不活性型であるのは基質側の問題なのかもしれない。

sPLA₂ が特に注目された理由は、この酵素がさまざまな炎症浸出液に見出され、炎症の進展に伴ってその活性が増加することが指摘されたからであった。たとえば、グリコーゲンで誘導したウサギ腹腔炎症の浸出液⁵¹、カゼイン誘導ラット腹腔炎症浸出液⁵²、アジュバント関節炎モデルラットやカラゲニン浮腫モデルラットの局所⁵³などで、sPLA₂ が炎症の進展に伴って検出された。ヒト疾患では、リウマチ患者関節腔内液中に sPLA₂ の活性が検出され⁵⁴、その量は血清 CRP 値、つ

図3 慢性関節リウマチ患者関節腔液中のホス
フォリパーゼ A₂ 活性. 横線は平均値

まり炎症像の軽度なほど少なく、重度なほど多いという関係であった(図3, 東大物療内科松田先生協同研究). ヒト結核性胸膜炎患者の胸水中に sPLA₂ が検出されたとする報告もある⁵⁵⁾. これらの結果から、炎症浸出液中の sPLA₂ は炎症の進展に働くメディエーターの産生を惹起するものと予想された.

炎症性サイトカイン IL-1 および TNF の刺激で、標的細胞内の PLA₂ が活性化し、アラキドン酸カスケードが開始する可能性が指摘されてきた. どの PLA₂ アイソフォームかわかっていなかったが、ウサギ軟骨細胞を IL-1 刺激したとき、sPLA₂ の遺伝子が発現してくることが示された^{56,57)}. その後、いくつかの研究グループによって、炎症性サイトカイン刺激で sPLA₂ の遺伝子発現量が増加することが指摘されてきた. すなわち、IL-1, TNF あるいは IL-6 刺激したヒト肝癌細胞 HepG 2 細胞では、sPLA₂ が細胞上清に検出され⁵⁸⁾, これは sPLA₂ の遺伝子 5' 上流に存在す

図4 カラゲニンで誘導したラット胸膜炎に及ぼす抗 II 型ホスフォリパーゼ A₂ 抗体 (MC 5.2) の影響

る IL-6 応答エレメントとよばれる急性期炎症タンパクに共通にみられる配列によると報告されている. sPLA₂ は急性期炎症蛋白の一つといえる. このほかにも、ラット血管平滑筋細胞を IL-1, TNF またはリポポリサッカライド刺激すると sPLA₂ が 10~30 倍発現上昇すると報告された⁵⁹⁾. 細胞内 cAMP 濃度を上昇させた場合にも、sPLA₂ の発現量は上昇し、その効果はサイトカインと相乗的に働くこと、これらの効果が炎症性ステロイドであるグルココルチコイドで抑制されることが示された⁶⁰⁾. ほかに、ラット脳アストロサイト⁶¹⁾や腎メサンギウム細胞⁶²⁾でサイトカイン刺激が sPLA₂ を発現上昇し、グルココルチコイドがそれを抑制することが示されている. これらの報告から、sPLA₂ の発現は炎症の進展に関与することが強く示唆されたといえる.

予め sPLA₂ の中和モノクローナル抗体を静注しておく、ラットカラゲニン誘導胸膜炎で、局所に浸潤する白血球数と浸潤液量が有意に低下した⁶⁴⁾(図4). 炎症刺激で誘導された内在性の sPLA₂ が炎症反応の進展になんらかの関わりをもつものと結論した. 実際、カルシウムイオノフォア刺激好中球⁶⁵⁾, 抗原抗体刺激肥満細胞⁶⁶⁾, TNF 刺激血管内皮細胞⁶⁷⁾などで細胞外から sPLA₂ を作用させると、用量依存的にプロスタグランジンが生成した. これらの結果から、炎症部位で sPLA₂ が組織の細胞膜に作用し、アラキドン酸を

図5 II型ホスホリパーゼ A₂ を中心とした
肥満細胞の脱顆粒反応モデル

切り出し、これが再び細胞に取り込まれアラキドン酸カスケードがスタートし、炎症性プロスタグランジンを産生したものと考えている。

ここで強調したい点は、sPLA₂ 単独で細胞を処理しても有意な量のプロスタグランジンは生じてこないことである。sPLA₂ に加えて、それ単独では十分なカスケード開始には至らない程度の別の刺激剤(カルシウムイオノフォア, TNF あるいは抗原抗体反応など)が共存する必要があった。同様のことが *in vivo* でも観察された。すなわち、精製 sPLA₂ をアジュバント関節炎で浮腫を形成しているラット下肢に皮下投与すると、炎症像が増悪化した⁵³⁾。一方、健常ラットの下肢に sPLA₂ を投与してもなにも効果がなかった。別の炎症刺激(おそらくサイトカイン?)で刺激されている場合にだけ、投与した sPLA₂ が下肢の浮腫を増悪化するように働いたものと思われる。

この現象は、組織や細胞の形質膜が sPLA₂ に感受性に変化している必要があること、および細胞内に取り込まれたアラキドン酸がさらに代謝されるための酵素系が十分発現している必要があることを示唆しているものと考えている。

sPLA₂ の特徴の一つとしてヘパリンに親和性が高いことが挙げられる。たとえば、血管内皮細胞⁶⁷⁾や肝実質細胞⁶⁸⁾で合成された sPLA₂ は、細胞外に分泌されたのち、速やかに細胞表層のプロテオグリカンに結合する(この意味で sPLA₂ は、完全な可溶性蛋白とはいえないのかもしれない)。培

養ラット肝実質細胞を用いた解析では、内在性の sPLA₂ が細胞表層のプロテオグリカンに結合すると、血清刺激あるいは TNF 刺激によるプロスタグランジン合成の大部分に関与するようになることがわかった。また、sPLA₂ 遺伝子を遺伝子工学的操作で多量発現させた細胞のプロスタグランジン合成能が増加していること⁶⁹⁾、sPLA₂ 遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理したマクロファージ系培養細胞は、刺激に呼応したアラキドン酸代謝を起こさないこと⁷⁰⁾などが報告された。さらに最近では、ラットメサングウム細胞を IL-1 β や TNF α で刺激すると観察できるプロスタグランジン E₂ には、内在性の sPLA₂ が重要な役割を果たすことが示唆されている⁷¹⁾。したがって、sPLA₂ が細胞の外から形質膜のリン脂質に作用し、アラキドン酸を加水分解することでアラキドン酸カスケードをスタートし、遊離したアラキドン酸が再び細胞に取り込まれて、プロスタグランジンに代謝される反応があることはおそらく間違いない。

sPLA₂ のもう一つの側面として、肥満細胞の脱顆粒過程での役割が挙げられる。肥満細胞はその顆粒中に sPLA₂ を貯留しており、抗原抗体刺激で細胞の外に放出する⁷²⁾。肥満細胞を活性化すると、細胞の外に抗 sPLA₂ 抗体や特異的な阻害蛋白(筆者らは補体の第3成分の部分分解物が、sPLA₂ を特異的に阻害することを見出した⁷³⁾)、あるいは微生物由来の低分子阻害物質を共存させると、抗原抗体刺激した肥満細胞からのヒスタミン遊離反応が効率よく阻害されることを見出した^{72,74)}。このとき、アラキドン酸カスケードはまったく影響されないことから、この場合のカスケード開始では cPLA₂ が中心的に働いているものと考えている。抗原と抗体以外の刺激剤を用いた場合にも同様な効果があったことから、図5に示すようなメカニズム、すなわち活性化によって誘導される脱顆粒反応のごく初期に細胞外の放出された sPLA₂ は、細胞自身あるいは近傍の細胞に働きかけ、引き続いて起こるヒスタミン顆粒の放出を導くものと予想した。

別途精製した sPLA₂ で未刺激肥満細胞を処理すると、アラキドン酸カスケードは働かずに、ヒスタミン顆粒の放出が惹起され⁷⁵⁾、内在性の酵素

の場合にみられた性状を再現出来た。この反応はチロシンリン酸化を介しており、神経成長因子(NGF)の処理によっていちじるしく促進された⁷⁵⁾。

以上の結果から、炎症部に出現する sPLA₂ は常在性の肥満細胞に作用して、ヒスタミンを放出することによって、炎症像をさらに悪化させる可能性も考えられる。アラキドン酸カスケードの開始とは別の sPLA₂ の炎症への関わりかたといえる。

その他の PLA₂

以上述べてきた cPLA₂ と sPLA₂ がこれまでの PLA₂ 研究の主流であったが、おそらくこれらとは別の分子であると結論できる PLA₂ がいくつか報告されており、今後の機能解析が待たれる。

(1) iPLA₂

正常ラット線維芽細胞を炎症性サイトカインで刺激した場合、あるいはエンドトキシンを投与したラットの臓器で、処理前に発現していた cPLA₂ が減少し、既存の抗体と反応性を示さない新規な細胞内 PLA₂ が発現してくることを見出した。この炎症刺激による PLA₂ アイソフォームパターンの変化に着目し、新しい PLA₂ の精製を行った。新規 PLA₂ は“誘導型:inductive”の意味から iPLA₂ と名付けられた。iPLA₂ は分子量約 60 kDa であり、アラキドン酸含有グリセロリン脂質に高い親和性を示し、他の脂肪酸をほとんど加水分解せず、マイクロモル濃度以下のカルシウムイオン濃度変動で活性調節された。これらの点で iPLA₂ は cPLA₂ と類似していた。iPLA₂ の構造を解析するとともに、なぜアラキドン酸高親和性 PLA₂ アイソフォームのパターンが変わるか、その生理的、病理的意味を明らかにすることが今後の課題である。

(2) I 型 PLA₂

膵液中の消化酵素と考えられてきた I 型 PLA₂ に、線維芽細胞の増殖⁷⁶⁾や血管平滑筋細胞の走化性亢進作用⁷⁷⁾があることが報告された。この作用は細胞表面上に存在する特異的結合蛋白を介するものであるとされているが⁷⁸⁾、生理的な位置づけはいまだ明確でない。

(3) Ca 非依存性 PLA₂

イヌ⁷⁹⁾あるいはウサギ⁸⁰⁾心臓細胞質中に Ca 非依存性 PLA₂ が存在する。イヌ酵素は分子量約 40 kDa、アルケニルアラキドノイル PC に強い選択性があると報告されている。本酵素は ATP 結合性の蛋白によって活性制御されているらしい⁸¹⁾。脳に同様の活性を見出したとの報告もあり、幅広く生体に分布している可能性がある。

その他に遺伝子を単離したとする報告が以下の通りある。

(4) 14-3-3 蛋白

ヒツジ赤血球由来分子量約 30kDa の μ Mレベルの Ca 感受性 PLA₂ の抗体との反応性のもとに、ヒト胎盤から単離された。最近、14-3-3 蛋白が *raf* などの情報伝達カスケードのキナーゼと相互作用することが盛んに報告されていることを考えると、興味深い。

(5) ヒト精子の PLA₂

分子量 16.7 kDa の蛋白をコードする遺伝子が単離されている。構造は一部 I 型、II 型と類似。

(6) II 型類似 PLA₂

ごく最近、システインがそれぞれ 12⁸⁵⁾、16⁸⁶⁾残基含まれる II 型酵素の類縁体の遺伝子が単離された。新しいタイプの sPLA₂ の機能に結び付くものと期待される。

おわりに

数種類の酵素群がカップルして働くアラキドン酸カスケードでは、細胞外刺激に呼応して活性化したホスホリパーゼによって、アラキドン酸が膜リン脂質から遊離されると、それ以後のカスケードが一気に進む。カスケードの開始反応であるホスホリパーゼのステップとして、① ホスホリパーゼ A₂ によって、直接アラキドン酸が切り出される、② ホスホリパーゼ C またはホスホリパーゼ D によってジアシルグリセロールが生じ、リパーゼによりアラキドン酸が生じる二つの経路が従来考えられてきたが、本稿では主に①の経路、特に cPLA₂ と sPLA₂ の関与について解説してきた。②の経路の関与も、この阻害剤であるエタノールやプロプラノロールがアラキドン酸遊離反応を阻害する場合があること⁸⁷⁻⁸⁹⁾から確かである。

ただし、この場合、②の経路単独でアラキドン酸が遊離するのか(直接説)、あるいはここで生じるメディエーターによって①の経路が動き、結局は cPLA₂ がアラキドン酸を切り出しているのか(調節説)、論議のあるところで、今後の課題といえる。

もう一つの重要な点は、最近注目されている誘導型シクロオキシゲナーゼ(COX2)との関連である。はたして、COX1 と COX2 に供給されるアラキドン酸のソースは同じなのだろうか。LOXにはどのようにアラキドン酸が受け渡されるのだろうか。現在のところ、cPLA₂ は、ラレントな細胞での short burst な刺激に呼応して活性化し、COX1 または LOX にアラキドン酸を渡す。一方、sPLA₂ は刺激で遺伝子発現が上昇し、同じく誘導される COX2 にアラキドン酸を渡すことで、比較的 prolonged period で、ある程度ブライムされた細胞でカスケードを動かすのではないかと予想して解析を進めている。

今後、アラキドン酸カスケード開始反応をグループ化して理解し、高等動物細胞に広く共通に起こるアラキドン酸遊離反応に、なぜ複数の経路が存在するのか、それぞれのフェーズがどの生理現象や病理現象に相当するか解析していく必要がある。

文 献

- 1) Waite, M. : The phospholipases. Handbook of Lipid Research. Plenum Press, New York, 1988.
- 2) Kudo, I., Murakami, M., Hara S., Inoue, K. : Mam-malian non-pancreatic phospholipase A₂. Biochim. Biophys. Acta 1170 : 217-231, 1993.
- 3) 村上 誠, 工藤一郎, 井上圭三 : 哺乳動物ホスホリパーゼ A₂ : その生化学と生命現象との関わり. 現代医療 25 : 823-955, 1993.
- 4) Dennis, E. A. : Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. J. Biol. Chem. 269 : 13057-13060, 1994.
- 5) 厚味厳一, 工藤一郎 : ホスホリパーゼ A₂. 臨床分子生物学. 日本臨牀 (特別号) : 202-206, 1994.
- 6) Kim, D. K., Kudo, I., Inoue, K. : Detection in human platelets of phospholipase A₂ activity which preferentially hydrolyzes an arachidonoyl residue. J. Biochem. 104 : 492-494, 1988.
- 7) Kim, D. K., Kudo, I., Fujimori, Y., Mizushima, H., Masuda, M., Kikuchi, R., Ikizawa, K., Inoue, K. : Detection and subcellular localization of rabbit platelet phospholipase A₂ which preferentially hydrolyzes an arachidonoyl residue. J. Biochem. 108 : 903-906, 1990.
- 8) Kim, D. K., Kudo, I., Inoue, K. : Purification and characterization of rabbit platelet cytosolic phospholipase A₂. Biochim. Biophys. Acta 1083 : 80-88, 1991.
- 9) Takayama, K., Kudo, I., Kim, D. K. et al. : Purification and characterization of human platelet phospholipase A₂ which preferentially hydrolyzes an arachidonoyl residue. FEBS Lett. 282 : 326-330, 1991.
- 10) Leslie, C. C., Voelker, D. R., Channon, J. Y., Wall, M. M., Zelarney, P. T. : Purification and properties of an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A₂ from a macrophage cell line, RAW 264.7. Biochim. Biophys. Acta 963 : 476-492, 1988.
- 11) Diez, E., Mong, S. : Purification of a phospholipase A₂ from human monocytic leukemic U937 cells. J. Biol. Chem. 265 : 14654-14661, 1990.
- 12) Wijkander, J., Sundler, R. : An 100-kDa arachidonate-mobilizing phospholipase A₂ in mouse spleen and the macrophage cell line J774 : purification, substrate interaction and phosphorylation by protein kinase C. Eur. J. Biochem. 202 : 873-880, 1991.
- 13) Clark, J. D., Milona, N., Knopf, J. L. : Purification of a 110-kilodalton cytosolic phospholipase A₂ from the human monocytic cell line U937. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 7708-7712, 1990.
- 14) Shikano, M., Masuzawa, Y., Yazawa, K., Takayama, K., Kudo, I. et al. : Complete discrimination of docosahexanoate from arachidonate by 85 kDa cytosolic phospholipase A₂ during the hydrolysis of diacyl and alkenylacylglycerophosphoethanolamine. Biochim. Biophys. Acta 1212 : 211-216, 1994.
- 15) Channon, J. Y., Leslie, C. C. : A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A₂ with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7. J. Biol. Chem. 265 : 5409-5413, 1990.
- 16) Leslie, C. C., Channon, J. Y. : Anionic phospholipids stimulate an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A₂ from macrophages and reduce the calcium requirement for activity. Biochim. Biophys. Acta 1045 : 261-270, 1990.
- 17) Fujimori, Y., Murakami, M., Kim, D. K. et al. : Immunochemical detection of arachidonoyl-preferential phospholipase A. J. Biochem. 111 : 54-60, 1992.
- 18) Clark, J. D., Lin, L.-L., Kriz, R. W. et al. : A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA₂ contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. Cell 65 : 1043-1051, 1991.
- 19) Sharp, J. D., White, D. L., Chiou, X. G., Goodson, T., Gamboa, G. C., McClure, D., Burgett, S., Hoskins, J.,

- Skatrud, P. L., Sportsman, J. R., Becker, G. W., Kang, L. H., Roberts, L. H., Kramer, R. M. : Molecular cloning and expression of a human Ca^{2+} -sensitive cytosolic phospholipase A_2 . *J. Biol. Chem.* 266 : 14850-14853, 1991.
- 20) Wijkander, J., Sundler, R. : Macrophage arachidonate-mobilizing phospholipase A_2 : role of Ca^{2+} for membrane binding but not for catalytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184 : 118-124, 1992.
- 21) Nalefeki E. A., Sultzman, L. A., Martin, D. M., Kriz, R. W., Towler, P. S., Knopf, J. L., Clark, J. D. : Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A_2 , a regulatory Ca^{2+} -dependent lipid-binding domain and a Ca^{2+} -independent catalytic domain. *J. Biol. Chem.* 269 : 18239-18249, 1994.
- 22) Nakatani, Y., Murakami, M., Kudo I., Inoue K. : Dual regulation of cytosolic phospholipase A_2 in mast cells after cross-linking of $\text{Fc}\epsilon$ receptor. *J. Immunol.* 153 : 796-803, 1994.
- 23) Kramer, R. M., Roberts, E. F., Manetta, J. V., Hyslop, P. A., Jakubowski, J. A. : Thrombin-induced phosphorylation and activation of Ca^{2+} -sensitive cytosolic phospholipase A_2 in human platelets. *J. Biol. Chem.* 268 : 26796, 1993.
- 24) Qiu, Z.-H., de Carvalho, M. S., Leslie, C. C. : Regulation of phospholipase A_2 activation by phosphorylation in mouse peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 268 : 24506, 1993.
- 25) Svensson, U., Houweling, M., Holst, E., Sundler, R. : Phosphorylation and activation of the arachidonate-mobilizing phospholipase A_2 in macrophages in response to bacteria. *Eur. J. Biochem.* 213 : 81, 1993.
- 26) Lin, L.-L., Wartmann, M., Lin, A. Y., Knopf, J. L., Seth, A., Davis, R. J. : cPLA $_2$ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72 : 269, 1993.
- 27) Riendeau, D., Guay, J., Weech, P. K., Lalibert, F., Yergey, J., Li, C., Desmarais, S., Perrier, H., Liu, S., Nicoll-Griffith, D., Street, I. P. : Arachidonyl trifluoromethyl ketone, a potent inhibitor of 85-kDa phospholipase A_2 , blocks production of arachidonate and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid by calcium ionophore-challenged platelets. *J. Biol. Chem.* 269 : 15619-15624, 1994.
- 28) Bartoli, F., Lin, H.-K., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Jain, M. K., Apitz-Castro, R. : Tight binding inhibitors of 85-kDa phospholipase A_2 but not 14-kDa phospholipase A_2 inhibit release of free arachidonate in thrombin-stimulated human platelets. *J. Biol. Chem.* 269 : 15625-15630, 1994.
- 29) Roshak, A., Sathe, G., Marshall, L. A. : Suppression of monocyte 85-kDa phospholipase A_2 by antisense and effects on endotoxin-induced prostaglandin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 269 : 25999-26005, 1994.
- 30) Sharp, J. D., Todd Pickard, R., Grace Chiou, X., Manetta, J. V., Kovacevic, S., Miller, J. R., Varshavsky, A. D., Roberts, E. F., Striffler, B. A., Brems, D. N., Kramer, R. M. : Serine 228 is essential for catalytic activities of 85-kDa cytosolic phospholipase A_2 . *J. Biol. Chem.* 269 : 23250-23254, 1994.
- 31) Masuda, N., Kitamura, N., Saito, K. : Primary structure of protein moiety of penicillium notatum phospholipase B deduced from the cDNA. *Eur. J. Biochem.* 202 : 783-787, 1991.
- 32) Leslie, C. C. : Kinetic properties of a high molecular mass arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A_2 that exhibits lysophospholipase activity. *J. Biol. Chem.* 266 : 11366-11371, 1991.
- 33) Fujimori, Y., Kudo, I., Fujita K., Inoue, K. : Characteristics of lysophospholipase activity expressed by cytosolic phospholipase A_2 . *Eur. J. Biochem.* 218 : 629-635, 1993.
- 34) Lin, L.-L., Lin, A. Y., DeWitt, D. L. : IL-1 α induces the accumulation of cPLA $_2$ and the release of PGE $_2$ in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 267 : 23451-23454, 1992.
- 35) Lin, L.-L., Lin, A. Y., Knopf, J. L. : Cytosolic phospholipase A_2 is coupled to the hormonally regulated release of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 6147-6151, 1992.
- 36) Hulkower, K. I., Hope, W. C., Chen, T., Anderson, C. M., Coffey, J. W., Morgan, D. W. : Interleukin-1 β stimulates cytosolic phospholipase A_2 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184 : 712, 1992.
- 37) Nakamura, T., Lin L.-L., Kharbanda, S., Knopf, J., Kufe, D. : Macrophage colony stimulating factor activates phosphatidylcholine hydrolysis by cytoplasmic phospholipase A_2 . *EMBO J.* 11 : 4917, 1992.
- 38) Gronich, J. H., Bonventre, J. V., Nemenoff, R. A. : Identification and characterization of a hormonally regulated form of phospholipase A_2 in rat renal mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 263 : 16645-16651, 1988.
- 39) Schalkwijk, C. G., De Vet, E., Pfeilschifter, T., Van den Bosch, H. : Interleukin-1 β and transforming growth factor- β 2 enhance cytosolic high-molecular-mass phospholipase A_2 activity and induce prostaglandin E_2 formation in rat mesangial cells. *Eur. J. Biochem.* 210 : 169, 1992.
- 40) Goppelt-Strube, M., Rehfeldt, W. : Glucocorticoids inhibit TNF α -induced cytosolic phospholipase A_2 activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1127 : 163-167, 1992.
- 41) Hoeck, W. G., Ramesha, C. S., Chang, D. J., Fan, N., Heller, R. A. : Cytoplasmic phospholipase A_2 activity and gene expression are stimulated by tumor necrosis factor : Dexamethasone blocks the induced synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 4475-4479, 1993.
- 42) Rodewald, E., Tibes, U., Maass, G., Scheuer, W. : Induction of cytosolic phospholipase A_2 in human

- leukocytes by lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* 223 : 743-749, 1994.
- 43) Horigome, K., Hayakawa, M., Inoue, K., Nojima, S. : Selective release of phospholipase A₂ and lyso-phosphatidylserine-specific lysophospholipase from rat platelets. *J. Biochem.* 101 : 53-61, 1987.
 - 44) Ono, T., Tojo, H., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., Okamoto, M. : Purification and characterization of a membrane-associated phospholipase A₂ from rat spleen. *J. Biol. Chem.* 263 : 5732-5738, 1988.
 - 45) Tojo, H., Ono, T., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., Okamoto, M. : A phospholipase A₂ in the supernatant of rat spleen. *J. Biol. Chem.* 263 : 5724-5731, 1988.
 - 46) Aarsman, A. J., de Jong, J. G. N., Arnoldussen, E., Neys, F. W., van Wassenaar, P. D., Van den Bosch, H. : Immunoaffinity purification, partial sequence, and subcellular localization of rat liver phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 264 : 10008-10014, 1989.
 - 47) Frost, S., Weiss, J., Elsbach, P., Maraganore, J. M., Reardon, I., Henrikson, R. L. : Structural and functional properties of phospholipase A₂ purified from an inflammatory exudate. *Biochemistry* 25 : 8381-8385, 1986.
 - 48) Seihamer, J. J., Pruzanski, W., Vadas, P. et al. : Cloning and recombinant expression of phospholipase A₂ present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J. Biol. Chem.* 264 : 5335-5338, 1989.
 - 49) Komada, M., Kudo, I., Mizushima, H. et al. : Structure of cDNA coding for rat platelet phospholipase A₂. *J. Biochem.* 106 : 545-547, 1989.
 - 50) Komada, M., Kudo, I., Inoue, K. : Structure of gene coding for rat group II phospholipase A₂. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168 : 1059-1065, 1990.
 - 51) Franson, R., Dobrow, R., Weiss, J., Elsbach, P., Weglicki, W. B. : Isolation and characterization of a phospholipase A₂ from an inflammatory exudate. *J. Lipid Res.* 19 : 18-23, 1978.
 - 52) Chang, H. W., Kudo, I., Tomita, M., Inoue, K. : Purification and characterization of extracellular phospholipase A₂ from peritoneal cavity of caseinate-treated rat. *J. Biochem.* 102 : 147-154, 1987.
 - 53) Murakami, M., Kudo, I., Nakamura, H. et al. : Exacerbation of rat adjuvant arthritis by intradermal injection of purified mammalian 14-kDa group II phospholipase A₂. *FEBS Lett.* 268 : 113-116, 1990.
 - 54) Hara S., Kudo, I., Chang, H. W. et al. : Purification and characterization of extracellular phospholipase A₂ from human synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J. Biochem.* 105 : 395-399, 1989.
 - 55) Baek, S. H., Takayama, K., Kudo, I., Inoue, K., Chang, H. W. : Detection and characterization of extracellular phospholipase A₂ in pleural effusion of patients with tuberculosis. *Life Sci.* 49 : 1095-1102, 1991.
 - 56) Kerr, J. S., Stevens, T. M., Davis, G. L., McLaughlin, J. A., Harris, R. R. : Effects of recombinant interleukin-1 beta on phospholipase A₂ activity, phospholipase A₂ mRNA levels, and eicosanoid formation in rabbit chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 165(3) : 1079-1084, 1989.
 - 57) Lyons-Giordano, B., Davis, G. L., Galbraith, W., Pratta, M. A., Arner, E. C. : Interleukin-1 β stimulates phospholipase A₂ mRNA synthesis in rabbit articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164 : 488-495, 1989.
 - 58) Crowl, R. M., Stoller, T. J., Conroy, R. R., Stoner, C. R. : Induction of phospholipase A₂ gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *The Journal of Biological Chemistry* 266 : 2647-2651, 1991.
 - 59) Nakano, T., Ohara, O., Teraoka, H., Arita, H. : Group II phospholipase A₂ mRNA synthesis is stimulated by two distinct mechanisms in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS* 261(1) : 171-174, 1990.
 - 60) Nakano, T., Ohara, O., Teraoka, H., Arita, H. : Glucocorticoids suppress group II phospholipase A₂ production by blocking mRNA synthesis and post-transcriptional expression. *The Journal of Biological Chemistry* 265(21) : 12745-12748, 1990.
 - 61) Oka, S., Arita, H. : Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A₂ in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of the gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* 266(15) : 9956-9960, 1991.
 - 62) Schalkwijk, C., Pfeilschifter, J., Marki, F., van den Bosch, H. : Interleukin-1 β tumor necrosis factor and forskolin stimulate the synthesis and secretion of group II phospholipase A₂ in rat mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174 : 268-275, 1991.
 - 63) Schalkwijk, C., Vervoordeldonk, M., Pfeilschifter, J., Märki, F., van den Bosch, H. : Cytokine- and forskolin-induced synthesis of group II phospholipase A₂ and prostaglandin E₂ in rat mesangial cells is prevented by dexamethasone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 180 (1) : 46-52, 1991.
 - 64) Kakutani, M., Murakami, M., Okamoto, H., Kudo, I., Inoue, K. : Role of type II phospholipase A₂ in the inflammatory process of carrageenan-induced pleurisy in rats. *FEBS Letters* 339 : 76-78, 1994.
 - 65) Hara, S., Kudo, I., Inoue, K. : Augmentation of prostaglandin E₂ production by mammalian phospholipase A₂ added exogenously. *J. Biochem.* 110 : 163-165, 1991.
 - 66) Murakami, M., Kudo, I., Inoue, K. : Eicosanoid generation from antigen-primed mast cells by extracellular mammalian group II phospholipase A₂. *FEBS Lett.* 294 : 247-251, 1991.
 - 67) Murakami, M., Kudo, I., Inoue, K. : Molecular

- nature of phospholipase A₂ involved in prostaglandin I₂ synthesis in human umbilical vein endothelial cells: Possible participation of cytosolic and extracellular type II phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 268 : 839-844, 1993.
- 68) Suga, H., Murakami, M., Kudo, I., Inoue, K. : Participation in cellular prostaglandin synthesis of type II phospholipase A₂ secreted and anchored on cell surface heparan sulfate proteoglycan. *Eur. J. Biochem.* 218 : 807-813, 1993.
 - 69) Pernas, P., Masliah, J., Olivier, J. L., Salvat, C., Rybkine, T., Berezat, G. : Type II phospholipase A₂ recombinant overexpression enhances stimulated arachidonic acid release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178(3) : 1298-1305, 1991.
 - 70) Suzanne, E. Barbour, Edward, A. Dennis. : Antisense inhibition of group II phospholipase A₂ expression blocks the production of prostagrandin E₂ by P388 D₁ cells. *JBC* 268 : 21875-21882, 1993.
 - 71) Pfeilschifter, J., Schalkwijk, C., Briner, V. A., van den Boach, H. : Cytokine-stimulated secretion of group II phospholipase A₂ by rat mesangial cells. Its contribution to arachidonic acid release and prostaglandin synthesis by cultured rat glomerular cells. *J. Clin. Invest.* 92 : 2516-2523, 1993.
 - 72) Murakami, M., Kudo, I., Suwa, Y., Inoue, K. : Release of 14-kDa group II phospholipase A₂ from activated mast cells and its possible involvement in the regulation of degranulation process. *Eur. J. Biochem.* 209 : 257-265, 1992.
 - 73) Suwa, Y., Kudo, I., Imaizumi, A. et al. : Proteinaceous inhibitors of phospholipase A₂ purified from inflammatory sites in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 2395-2399, 1990.
 - 74) Murakami, M., Kudo, I., Fujimori, Y., Suga, H., Inoue, K. : Group II phospholipase A₂ inhibitors suppressed lysophosphatidylserine-dependent degranulation of rat peritoneal mast cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 181 (2) : 714-721, 1991.
 - 75) Murakami, M., Hara, N., Kudo, I., Inoue, K. : Triggering of degranulation in mast cells by exogenous type II phospholipase A₂. *J. Immunol.* 151 : 1-10, 1993.
 - 76) Arita, H., Hanasaki, K., Nakano, T., Oka, S., Teraoka, H., Matsumoto, K. : Novel proliferative effect of phospholipase A₂ in Swiss 3T3 cells via specific binding site. *J. Biol. Chem.* 266 : 19139-19141, 1991.
 - 77) Kanemasa, T., Hanasaki, K., Arita, H. : Migration of vascular smooth muscle cells by phospholipase A₂ via specific binding sites. *Biochim. Biophys. Acta* 1125 : 210-214, 1992.
 - 78) Lambeau, G., Ancian, P., Barhanin, J., Lazdunski, M. : Cloning and expression of a membrane for secretory phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 269 : 1575-1578, 1994.
 - 79) Hazen, S. L., Stuppy, R. J., Gross, R. W. : Purification and characterization of canine myocardial cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 265 : 10622-10630, 1990.
 - 80) Hazen, S. L., Ford, D. A., Gross, R. W. : Activation of a membrane-associated phospholipase A₂ during rabbit myocardial ischemia which is highly selective for plasmalogen substrate. *J. Biol. Chem.* 266 : 5629-5633, 1991.
 - 81) Hazen, S. L., Gross, H. W. : ATP-dependent regulation of rabbit myocardial cytosolic calcium-independent phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 266 : 14526-14534, 1991.
 - 82) Loeb, L. A., Gross, R. W. : Identification and purification of sheep platelet phospholipase A₂ isoforms. *J. Biol. Chem.* 261 : 10467-10470, 1986.
 - 83) Zupan, L. A., Steffens, D. L., Berry, C. A. : Cloning and expression of a human 14-3-3 protein mediating phospholipolysis. *J. Biol. Chem.* 267 : 8707-8710, 1992.
 - 84) Langlais, J., Chafouleas, J. G., Ingraham, R., Vigneault, N., Roberts, K. D. : The phospholipase A₂ of human spermatozoa : purification and partial sequence. *Biophys. Res. Commun.* 182 : 208-214, 1992.
 - 85) Chen, J., Engle, S. J., Seilhamer, J. J., Tischfield, J. A. : Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight Ca²⁺-dependent phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 269 : 2365-2368, 1994.
 - 86) Chen, J., Engle, S. J., Seilhamer, J. J., Tischfield, J. A. : Cloning and characterization of novel rat and mouse low molecular weight Ca²⁺-dependent phospholipase A₂s containing 16 cysteines. *J. Biol. Chem.* 269 : 23018-23024, 1994.
 - 87) Hashizume, T., Taniguchi, M., Sato, T., Fujii, T. : Arachidonic acid liberation induced by phosphatidic acid endogenously generated from membrane phospholipids in rabbit platelets. *Biochimica et Biophysica Acta* 1221(2) : 179-184, 1994.
 - 88) Koike, T., Mizutani, T., Hirai, K., Morita, Y., Nozawa, Y. : SCF-c-kit receptor-mediated arachidonic acid liberation in rat mast cells : Involvement of PLD activation associated tyrosine phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 197(3) : 1570-1577, 1993.
 - 89) Sato, T., Ishimoto, T., Akiba, S., Fujii, T. : Enhancement of phospholipase A-2 activation by phosphatidic acid endogenously formed through phospholipase D action in rat peritoneal mast cell. *FEBS Lett.* 323(1-2) : 23-26, 1993.