

ヤケヒョウヒダニ (*Dermatophagoides pteronyssinus*) の 脂肪酸組成とホスホリパーゼ活性について

森 啓至¹⁾, 佐二木順子

Composition of Fatty Acids and Phospholipase Activities in House Dust Mite, *Dermatophagoides Pteronyssinus*.

Keiji MORI, Junko SAJIKI

Summary

The composition of fatty acid and phospholipase (PLase) activities were investigated in mites, *Dermatophagoides pteronyssinus*. Crude total lipid was 4.55 g/100 g of wet wt. Lipid was composed of triglyceride (49.1%), free fatty acid (26%), sterol (12.1%), phospholipid (6.3%), sterol ester (6.3%) and unknown (0.5%). Major fatty acids in total lipid were 18:1 (n-9), 18:2 (n-6), 18:0, 16:0, 16:1 (n-9) and 14:0. Percentage of arachidonic acid (20:4, n-6) (0.43%) in total lipid of mite was higher than that of mite diet (0.19%). Amount in percentage of 18:2 (n-6) and 20:4 (n-6) were much higher in phospholipid (PL) class than in free fatty acid or triglyceride classes.

When mite samples were reacted with ¹⁴C-PC, major metabolites such as lysophosphatidylcholine (lysoPC), free fatty acid and 1,2-diglyceride were produced. This result indicated that PLase A and PLase C are important enzymes on PL catabolism. PLase A₁ activity in mite was 6 times higher than PLase A₂.

I. はじめに

ヒョウヒダニは家の中の塵の中にいるダニで、そのタンパク抗原によるスクラッチテストや皮内反応で高い陽性率が得られることからアレルギー抗原として注目を集めている¹⁾²⁾。これまでにダニアレルギーとしてはダニ由来タンパク質が第7群まで知られ、その遺伝子のクローニングもすでに行われている³⁾⁴⁾が、その他のアレルギーに関しては解明されていない。最近、桜井ら⁵⁾は、皮膚貼付試験結果からヒョウヒダニの脂質画分が皮膚炎患者のアレルギー抗原になりうることを報告しており、ダニ脂質のアレルギーへの関与が新たな問題となっている。

ホスホリパーゼ (PLase) は、消化酵素として魚類や哺乳類などの臓器に存在する⁶⁾ばかりでなく他の細胞にも存在し、炎症のメディエーターと考えられているエイコサノイド代謝を司る重要な酵素として知られている。本酵素の存在は、すでにマダニやハエ等の節足動物でも知られている⁶⁾が、ヒョウヒダニについては不明である。

もし、ヒョウヒダニでもPLaseによりリン脂質からアラキドン酸 (AA, 20:4, n-6) の遊離が生じ、炎症と関連する脂質関連代謝物質がダニ体内あるいはダニの付着したヒトの局所で生産されるのであれば、それがアレルギーの発現と関連あるかもしれないと考え、ダニのPLaseAの活性測定を試みた。また、ヒョウヒダニの脂質組成、脂肪酸組成を調べ、アレルギー発現における脂質の関与の可能性について考察した。

II. 実験材料

供試ダニはマウス飼育用飼料 (オリエンタル酵母工業(株) と乾燥酵母 (局方, アサヒビール(株)) を1:1に混合し水分含量を12%に調整した餌により継続飼育されたヤケヒョウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus* (東京女子医大系) を使用した。生ダニの分離は佐々らの方法⁷⁾に準じた。

脂肪酸標準品、ホスファチジルコリン (PC)、コレステロールはSigma社より購入した。トリオレイン、ジオレイン (1,2-ジオレインと1,3-ジオレイン混合物)、モノオレイン、オレイン酸は北海道大学水産学部の板橋豊博士より分与された。1,2-[1-¹⁴C] dipalmitoylphosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C] palmitoylphosphatidylcholine はAmersham Japan社のものを用いた。他の一般試薬は特級を用いた。シリカゲルプレート (20x 20cm, 0.25mm, メルク社) は120°C, 2時間焼いて活性化させた。

III. 実験方法

1. 試料の調製

生ダニと培地を200ml容の分液ロートに移し飽和食塩水を加えよく振り混ぜ、沈澱する培地とダニの死骸などを除去し、上清のみを取り出した。下層が透明で汚れがなくなるまでこれを数回繰り返し、上清中に浮遊してくる生ダニを利用した。なお、この浮遊物中の生ダニ量は、約83.4%で、残りは死ダニがほとんどであった。

PLase活性値測定用のサンプル調製はSchalkwijk⁸⁾らの方法に従った。分離したダニに0.25M sucrose, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 50μM sodium fluoride, 10μM leupeptin,

千葉県衛生研究所

1) 現在; 千葉県中央食肉衛生検査所

(1995年11月20日受理)

0.15mM phenylmethane sulfonyl fluoride を含んだ50mM HEPES緩衝液 (pH7.4) を加えホモジナイズし, 5,000×g, 15分間遠心し, 上清を得た。さらに水で5倍に希釈したものを酵素活性の測定に用いた。

2. ダニの粗脂肪量と脂質分画

一定量のダニから, 0.001%の抗酸化剤 (BHT) を含むクロロホルム-メタノール (2:1) により脂質を抽出し, 一部は粗脂肪の定量に用いた。ルツボに入れたクロロホルム抽出液を120°C, 1時間加熱し, ルツボの加熱前後の重量差を粗脂肪量として表した。残りの抽出脂質をシリカゲルプレートに添付し, 展開溶媒として石油エーテル/ジエチルエーテル/酢酸 (74:15:1) を用い薄層クロマトグラフィー (TLC) にて脂質の分画を行った。脂質の検出は硫酸/無水エタノール (50:50) を噴霧, 180°Cにて10分加熱した後, TLCスキャナー (CS-910, 島津製作所) にて濃度を測定した。なお, ジグリセリド (DG) 異性体の確認は, ベンゼン/ジエチルエーテル/酢酸エチル/酢酸 (80:10:10:0.2) を展開溶媒に用いたTLC⁹⁾による標準品のRf値との一致によった。

3. 脂肪酸の測定

脂質分画を行ったシリカゲルプレートから各脂質画分のゲルをかき取り, 6%硫酸, 0.001%BHTを含むメタノールを加え, 70°C, 45分間反応させることによりメチル化を行った。脂肪酸メチルエステルの分析は, GC14Aガスクロマトグラフ (島津製作所) を用いた。測定条件は, カラム; SP-2330キャピラリーカラム (0.32mm i.d. x 30m, スペルコ社), 測定温度; 注入部位温度 (250°C), カラム温度 (10分間 160°Cその後1分間あたり4°Cずつ200°Cまで昇温), 検出器; FID, キャリアーガス; ヘリウム (0.56kg/cm³) であった。

4. PLase Aの活性測定

Nalboneら¹⁰⁾の方法に従った。すなわち, 0.93KBq 2-[1-¹⁴C] palmitoyl phosphatidylcholine (¹⁴C-PC) を基質

に用い, 5mM CaCl₂, 0.3%のデオキシコール酸ナトリウム, 5μlのダニ抽出物, 50mM緩衝液 (HCl-ベロナールナトリウム-酢酸緩衝液, pH2~10) を加え, 反応液量を0.53mlにした。37°Cで反応させた後3mlのクロロホルム-メタノール (2:1) と5μlの1N HClを加え, 反応を止めた。遠心によりクロロホルム層を分取後, N₂で溶媒を除いた後, 得られた脂質をTLCにて分画した。TLCをクロロホルム/メタノール/水 (65:35:5, v/v/v) にて原点より9cm展開させ, N₂下で十分乾燥させた後, ヘプタン/ジエチルエーテル/ギ酸 (90:60:4, v/v/v) にて原点より同方向に18cm展開させた。ラジオ活性物質をイメージスキャナーにて確認した後, リゾホスファチジルコリン (lyso PC), 遊離脂肪酸 (FFA), ジグリセリド (DG), モノグリセリド (MG) に相当するゲルをかきとり, シンチレーションバイアルに入れ, メタノール/1N HCl (150:1) 1mlとシンチレーター5mlを加えラジオ活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。PLase A₁, PLase A₂の活性値はPC代謝産物の生成量から, Nalboneら¹⁰⁾の考案した計算式によって求めた。

5. タンパク質の測定

牛アルブミンを標準に用い, Bio-Radタンパク質測定用キットで測定した。

IV. 実験結果

ヤケヒョウヒダニの湿重量100g当たりの粗脂肪量は4.55g (2回測定の平均値) であった。脂質構成はトリグリセリド (TG) 49.1%, 遊離脂肪酸 (FFA) 26%, ステロール (ST) 12.1%, リン脂質 (PL) 6.3%, ステロールエステル (STE) 6.2%, 未知物質0.5%であった。未知物質は, ステロールと遊離脂肪酸の間に検出された。

総脂質および各脂質クラス中の脂肪酸組成はTable 1に示した。

Table 1. Fatty acid compositions* in diet and lipids of *Dermatophagoides pteronyssinus*

Fatty acid	Diet	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>			
		Total	PL	TG	FFA
14:0	0.81	1.47	ND	2.31	1.35
16:0	21.64	2.23	1.30	2.92	3.97
16:1 (n-7)	0.15	0.07	ND	0.31	0.10
16:1 (n-9)	5.25	1.92	0.75	2.58	1.92
18:0	4.42	16.35	18.89	16.29	22.33
18:1 (n-9)	18.05	50.81	45.91	59.03	45.10
18:1 (n-7)	1.18	ND	ND	ND	0.44
18:2 (n-6)	33.73	19.78	31.84	7.46	13.88
18:3 (n-3)	2.78	1.08	0.67	1.62	1.27
20:1 (n-7, 9)	1.80	0.12	ND	0.31	0.15
20:4 (n-6)	0.19	0.47	0.82	0.21	0.41
20:5 (n-3)	1.48	0.20	ND	0.08	ND
22:6 (n-3)	1.49	ND	ND	ND	ND
Saturated	26.87	20.05	20.18	21.53	27.65
Monoene	26.44	52.92	46.66	62.23	47.70
Polyene	39.67	21.53	33.33	9.37	15.55
Unknown	7.03	5.50	0.82	6.87	9.10

* : weight %

ND : not detected.

PL : phospholipid, TG : triglyceride, FFA : free fatty acid.

総脂質中に含まれる主要な脂肪酸は18:1 (n-9) 50.81%, 18:2 (n-6) 19.8%, 18:0 16.35%であり, 16:0 2.23%, 16:1 (n-9) 1.92%, 14:0 1.47%がこれらに続いた。エイコサノイドの前駆物質であるAA (20:4, n-6) の割合はFFA (0.41%), TG (0.2%), に比べPL (0.82%) で高かった。

ダニサンプルをpH8.0において異なる温度(25, 37, 45, 55, 70°C) 下で¹⁴C-PCと反応させた際, 生成された主要な代謝産物はlysoPC, DG, FFAであった (Fig. 1)。

温度によるlysoPC, MG, DG, FFAの生成量の推移を Fig. 2に示した。

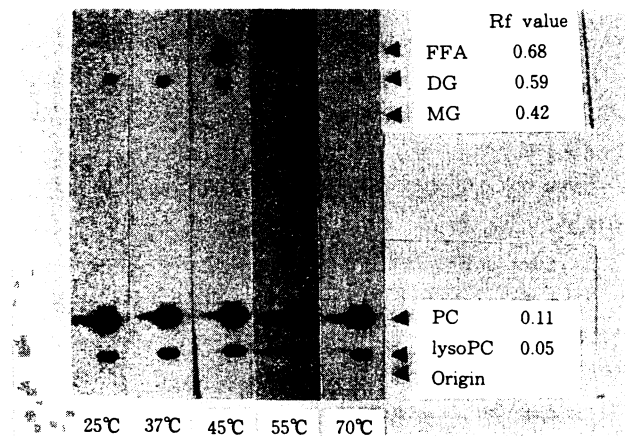


Fig. 1 The productions of PC metabolites separated in 30min. by TLC.

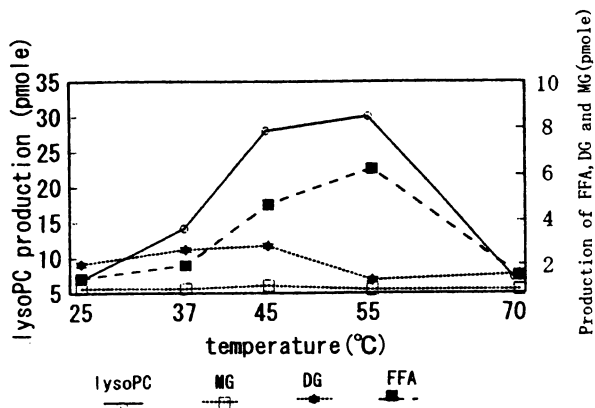


Fig. 2 Changes of lysoPC, MG, DG and FFA productions in mites at various temperature. Emzyme samples were reacted with 2- [¹⁴C] - PC for 30 min

lysoPCは25°C, 70°Cでそれぞれ6.87, 7.19pmoleと少なく, 55°Cの時30.06pmoleと最高値を示した。

FFAは25°C, 70°Cでは1pmole以下であったが, 55°Cで最高値(5.69pmole)を示した。DGは55°C, 70°Cでは1pmole以下であったが, 45°Cで2.11pmoleと最高値を示した。MGはほとんど生成されず全ての温度で1pmole以下であった。

なお, 25, 37, 45°CでのPLase A₁, A₂活性値の変化はFig. 3に示したとおりであった。PLase A₁はPLase A₂に比べ温度が高いほど活性値が高かったが, PLase A₂は温度の変化に影響されなかった。

産生したDGが1,2-DGか1,3-DGであるかを確認するため標準品とともにTLCにて分画したところ, 1,2-DGと一致した。

ダニの37°CでのpHによるPLase A₁とA₂の活性値の推移を Fig. 4に示した。pH5以下では活性を示さなかった。PLase A₁, PLase A₂ともに至適pHはpH8~pH9であった。

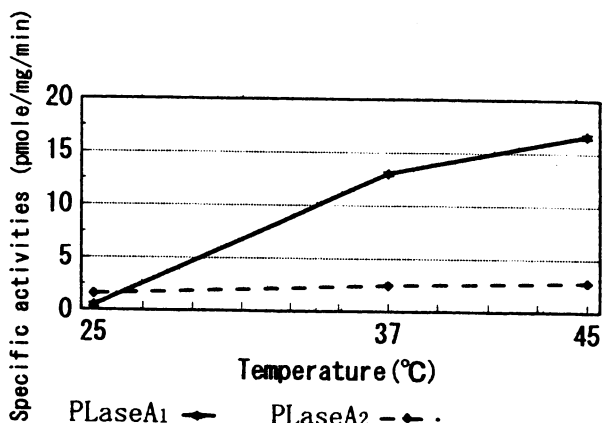


Fig. 3 Changes of PLase A activities in mites at various temperatures.

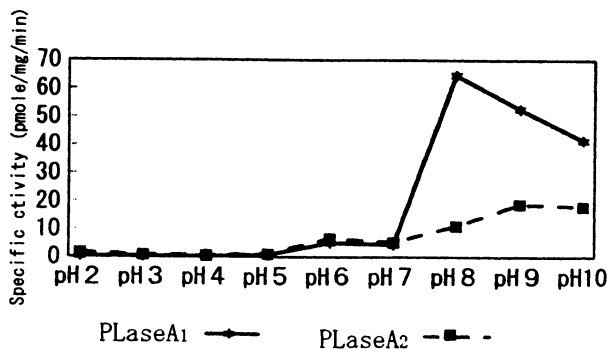


Fig. 4 Changes of PLase A activities in mites at various pH.

PLase A₁活性のCa²⁺依存性について調べたところ, PLase A₁はCa²⁺添加により活性値が増加し, 5mMの時最高値であった (Table 2)。PLase A₂の活性値は5mMまでは余り変化がなかったが, 10mM添加ではCa²⁺無添加の1/2に低下した。

Table 2 Effect of Ca²⁺ on the PLase A₁ and PLase activity (pmole/min.).

	CaCl ₂ (-)	CaCl ₂ 5mM	CaCl ₂ 10mM
PLase A ₁	29.00	116.44	60.95
PLase A ₂	21.01	19.89	11.38

* Assayed at pH8 and 37°C

V. 考 察

ダニの脂質構成, 脂肪酸組成については, マダニ *Amblyomma americanum* の唾液腺について詳細に報告されている¹³⁾。ヤケヒョウヒダニの脂質構成比 (TG > FFA > ST > PL) はマダニ

ニ唾液腺のそれ (ST>FFA>PL>TG) と異なっていた。しかし, FFA, STの総脂質に占める割合が大きいという点では一致していた。

マダニの唾液腺中には約8%のAA (20:4, n-6) が含まれると報告されているが, ヤケヒョウヒダニでは0.47%と非常に低かった。AAは, その代謝産物が動物細胞で種々の生理活性作用を示す重要な脂肪酸である。そのため, 細胞内での組成比率が問題にされる。今回ヤケヒョウヒダニでAAの比率がマダニに比べ低かった理由の1つに, 餌の脂肪酸組成の差が考えられる。マダニはAAを多く含んだ宿主の動物の血液を餌とするが, 今回のダニの餌はAAを殆ど含んでいなかった。にもかかわらず, ダニ体内の総脂肪酸に対するAAの割合 (0.47%) は餌 (0.19%) に比べ高く, PL中では0.8%とさらに高値を示した。これは, ダニ体内でAAがわずかながらも合成されていることを示すものであった。アレルギーの原因となる家の塵の中でのヤケヒョウヒダニはヒトの脱落表皮を餌にしていると考えられている。AAの動物細胞での組成は餌の組成を反映するため, このような条件下で飼育されたダニの脂肪酸組成は今回の組成とは異なっているのかもしれない。今後, 室内塵で飼育されたダニの脂肪酸組成を調べることは, ダニアレルギーの発症とアラキドン酸代謝との関連を究明する上で重要である。

一方, 16:0/18:0, 16:0/18:1 (n-9) が餌ではそれぞれ4.9, 1.2であったが, ヒョウヒダニの総脂質中ではそれぞれ0.1, 0.04であった。この値はヒョウヒダニでエロンゲーションやデサチュレーションにより16:0から18:1 (n-9) への生合成が行われていることを示すものと考えられた。動物では Δ 12デサチュラーゼを欠くため, 18:1 (n-9) から18:2 (n-6) の合成はできないと考えられている¹³⁾。18:1 (n-9) が18:2 (n-6) に比べ高値であった結果は, ヒョウヒダニも例外なく18:1 (n-9) から18:2 (n-6) の合成系を欠いており, 18:2 (n-6) が餌に由来することを示唆するものと考えられた。18:2 (n-6) の多くはPL中に取り込まれていたが, この結果はマダニの唾液腺でラベルされたリノール酸の殆どがPL中に取り込まれたという報告⁶⁾と一致した。

アレルギーを含む多くの炎症の発症過程では, PLase A₁, PLase A₂, PLase Cなどの脂質分解酵素がkey enzymeの一つと考えられている。本実験でPLase A₁の活性値がPLase A₂より高かった事実は, ヒョウヒダニにおけるリン脂質の加水分解がPLase A₂よりむしろPLase A₁に依存していることを示すものであった。ヒョウヒダニによるPCからの主要代謝物としてlysoPC, FFAに次ぐ濃度の1,2-DGが生成された事実, MGがDGに約20分遅れて生成された事実, lysoPC, FFA生成の至適温度 (45~55°C) とDG生成の至適温度 (25~45°C) が異なっていた事実は, ヒョウヒダニにPLase Cが存在し, PC→DG→MGの経路が重要なリン脂質代謝系であることを示すものと考えられた。すでにマダニではPLase Cの存在が確認されているが, ヒョウヒダニにもマダニ類の唾液腺と同様に, PLase Cが存在する可能性が示された事実は, ヒョウヒダニやマダニのような節足動物ではPLase Aと同様PLase Cも生理学的に重要な役割を果たしている事を示している。PLase Cによるリン脂質からの生成物 (DGやIP₃) は細胞内での重要な

メディエーターとして注目されており¹³⁾¹⁴⁾, 粘膜で生ずるヒョウヒダニの関与するアレルギーの発症に, ヒョウヒダニのPLase Cが何らかの役割を果たしている可能性も否定できない。

PLase A₁, A₂は哺乳類の細胞やヘビ, ハチの毒囊に多く含まれ, アレルギーと深く関係している事が知られている¹⁵⁾。また, ダニの脂質がアレルギーになるという報告も桜井ら¹⁾によりなされている。今回確認されたPLase A₁, PLase A₂およびPLase Cとダニのアレルギーとの関与についてはアラキドン酸代謝を含め, 今後深く研究する必要があるであろう。

以上, ヒョウヒダニにもマダニと同様PLase A₁, PLase A₂, PLase Cが存在する事が明らかになり, これら酵素がダニの生存に重要な役割を果たしているものと思われた。これら酵素の至適温度, 至適pHはマダニのそれと類似していた。一方, AAを殆ど含まない餌で飼育されたヒョウヒダニではAAの全脂肪酸に対する割合は極めて低かった。今後, 室内塵で飼育されたヒョウヒダニの脂肪酸組成を調べることは, アレルギーの発現と脂質関連物質の関係を解明する上で必要と思われた。

VI. 謝 辞

ホスホリパーゼ活性の測定において, アイソトープ実験施設の使用を許可して頂き, 種々の便宜を図っていただいた千葉県ガンセンターの崎山 樹研究局長, 日和佐隆樹研究員に深謝致します。

VII. 引用文献

- 1) 桜井美佐, 中山秀夫, 久米井見子, 鶴町和道, 高岡正敏 (1990): アトピー性皮膚炎患者におけるダニ成分貼付試験結果 第2報 虫体脂質. 日本皮膚科学会誌, 100, 1135-1141.
- 2) Miyamoto, T., Oshima, S., Ishizaki, T. and Saito, S. (1968): Allergenic identity between the common floor mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and house dust as a causative antigen in bronchial asthma, *J. Allergy*, 42, 14-28.
- 3) 奥村康 (1994): アレルゲンの分子生物学. 医学のあゆみ, 170, 1002-1006.
- 4) Chua, K. Y., Stewart, G. A., Thomas, W. R., Shimpson, R. J., Dilworth, R. J., Plozza, T. M. and Turner, K. J. (1988): Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, *Der p 1*, *J. Exp. Med.*, 167, 175-182.
- 5) Iijima, N., Nakamura, M., Uematsu, K. and Kayama, M. (1989): Partial purification and characterization of phospholipase A₂ from the hepatopancreas of red sea bream, *Bull. Jpn. Soc. Fish.*, 56, 1331-1339.
- 6) Sauer, J. R., Bowman, A. S., Shipley, M. M., Gengler, C. L., Surdick, M. R., McSwain, J. L., Luo, C., Essenberg, R. C. and Dillwith, J. W. (1993): Arachidonate metabolism in tick salivary glands. In *Insects*

- lipids:Chemistry, biochemistry and biology, Stanley-Samuelson D.W. and Nelson D.R. (eds.), University of Nebraska Press, Lincoln, 99-138.
- 7) Sasa, M., Miyamoto, J., Shinohara, S., Suzuki, H. and Katsuhata, A. (1970) : Studies on mass culture and isolation of *Dermatophagoides farinae* and other mites associated with house dust and stored food, *Jpn. J. Exp. Med.*, 40, 367-382.
 - 8) Schalkwijk, C. G., Vervoordeldonk, M., Pfeilschifter, J. and van den Bosch, H. (1993) : Interleukin-1 β -induced cytosolic phospholipase A₂ activity and protein synthesis is blocked by dexamethasone in rat mesangial cells, *FEBS LETTERS*, 333, 339-343.
 - 9) Storry, J. E. and Tuckley, B. (1967) : Thin-layer chromatography of plasma lipids by single development, *Lipids*, 2, 501-502.
 - 10) Nalbone, G. and Hostetler, K. Y. (1985) : Subcellular localization of the phospholipase A of rat heart : evidence for a cytosolic phospholipase A₁, *J. Lipid Res.*, 26, 104-114.
 - 11) Shipley, M. M., Dillwith, J. W., A. S. Bowman, A. S., Essenberg, R. C. and Sauer, J. R. (1993) : Changes in lipids of the salivary glands of the lone star tick, *Amblyoma americanum*, during feeding, *J. Parasitol.*, 79, 834-842.
 - 12) Shipley, M. M., Dillwith, J. W., Essenberg, R. C., Howard, R. W. and Sauer, J. R. (1993) : Analysis of lipids in the salivary glands of *Amblyomma americanum* (L.) : detection of a high level of arachidonic acid, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 23, 37-52.
 - 13) Boyer, J. L., Helper, J. R. and Harden, T. K. (1989) : Hormone and growth factor receptor-mediated regulation of phospholipase C activity, *Trends Pharmacol. Sci.*, 10, 360-364.
 - 14) Duane, P. G., Rice, K. L., Charboneau, D. E. and Niewoehner, D. E. (1992) : Amiodarone-induced endothelial injury is associated with phospholipase C-mediated hydrolysis of membranephospholipids. *J. Lab. Clin. Med.*, 120, 955-963.
 - 15) Soldatova, L., Kochoumian, L. and King, T. P. (1993) : Sequence similarity of a hornet (*D. maculata*) venom allergen phospholipase A₁ with mammalian lipases, *FEBS Letters*, 320, 145-149.