

소 적혈구로부터 새로운 형태의 세포질 포스포리파제 A₂의 동정 및 특성규명

신혜숙 · 김하동 · 장동훈 · 전형준 · 유충규* · 정성윤 · 김대경#
중앙대학교 약학대학 위생약학 교실, *이화여자대학교 약학대학 약품분석화학 교실
(Received May 8, 2001; Revised May 22, 2001)

Identification and Characterization of a Novel Cytosolic Phospholipase A₂ from Bovine Red Blood Cells

Hae-Sook Shin, Ha-Dong Kim, Dong-Hoon Chang, Hyung-Jun Jeon,
Chung-Kyu Ryu*, Sung Yun Jung and Dae Kyong Kim#
*Department of Environmental and Health Chemistry, College of Pharmacy, Chung-Ang University,
221 Huksuk-Dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756,*
**Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Ewha Womans University,
11-1 Daehyun-dong, Seodaemun-Ku, Seoul 120-750, South Korea*

Abstract — A Ca²⁺-dependent PLA₂ activity, termed rPLA₂, was detected in the cytosol of bovine red blood cells (RBCs). The rPLA₂ was characterized as a similar form to Group IV cPLA₂, but different in several column chromatographic profiles including an anion exchange column. To examine whether this rPLA₂ is different from the well characterized cPLA₂, a quinone derivative, BJ50, was developed and tested for the inhibitory effect on the two PLA₂ enzymes. The rPLA₂ activity was inhibited by a quinone derivative (BJ50) with ID₅₀ of 20 μM, but had no effect on the cPLA₂, suggesting that rPLA₂ may be a novel type of cytosolic PLA₂ in RBCs.

Keywords □ phospholipase A₂, BJ50, arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF₃)

혈액 세포 중 가장 풍부한 적혈구는 세포 내 gas transporter 역할만을 한다고 인식되어져 왔으나, 최근 지혈, 혈전반응에 있어서 적혈구에서 유래한 이차 전달물질이 혈소판응집에 영향을 끼친다고 보고되고 있다.¹⁻³⁾ 적혈구에 Ca²⁺ ionophore인 A23187 처리시 lipid-derived bioactive mediators인 12-hydroxyeicosatetraenoic acid(12-HETE) 생성, shear stress를 가했을 경우 prostaglandin E₁, E₂가 생성되었다고 보고되었다.^{4,5)} 이러한 생성물들은 포스포리파제 A₂(PLA₂)활성에 의해 생성된 arachidonic acid의 대사 산물이므로 적혈구에서의 PLA₂는 적혈구 노하나,

shear stress 에 의한 deformability, 혈소판 활성화 등에 영향을 끼칠 것으로 사료된다.

PLA₂는 크게 4종류의 동종이형효소가 알려져 있다. 체장에서 분비되어 소화와 관련될 것으로 생각되는 group I형의 효소는 14 kDa의 분자량과 mM 이상의 칼슘이온을 요구하며, 혈소판 응집시 세포외로 분비되는 형태이며, group II의 효소는 group I과 동일하며 일차구조에서 상동성을 나타내는 효소로 세포내의 분비 과정 내에 존재하며 세포의 활성화 시에 세포 외로 분비되어 활성을 나타낸다. 또한 세포질 내에 존재하며 신호전달과 관련하여 구조, 생화학적 특성이 잘 알려진 세포질(cPLA₂)는 분자량이 85 kDa으로, 활성을 위해 칼슘이온을 요구하며 sn-2위치의 지방산이 arachidonic acid인 경우 높은 선택성을 나타내며, 세

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5610 (팩스) 02-825-7920

포질 내에는 또 다른 형태의 칼슘이온 비의존성 PLA₂가 존재하며 최근 그 기능과 역할 구명을 위해 연구가 진행되고 있다.^{6,8)}

PLA₂는 세포막을 구성하고 있는 인지질의 sn-2 위치의 지방산을 가수분해하여 lysophospholipids와 유리지방산을 생성하는 효소로서 염증반응, 세포사멸, 분화, 증식 등 세포내외의 신호전달과 관련하여 중요한 역할을 담당하는 효소로 알려져 있다. 인지질의 sn-2 위치에는 특히 arachidonic acid가 풍부하게 존재하고 있으며 이것은 여러조직에서 병리적, 생리적으로 다양한 역할을 하는 eicosanoids의 전구체로서 작용하며, 세포내의 이차전달 물질로서 알려져 있다. 또한 같이 생성되는 lysophospholipids 중 1-O-alkyl-lysophosphatidylcholine의 경우 강력한 염증 유발물질로 알려진 platelet activating factor(PAF)의 전구체로서 작용한다.⁹⁻¹⁵⁾ 따라서, 본 효소활성을 억제하는 화합물의 개발은 현재 항염증 및 항혈소판제 신약개발과 관련하여 많은 연구자들의 관심대상이다.

현재 적혈구 PLA₂에 관해서는 몇몇 보고가 있기는 하나 형태, 생화학적 특성에 관해서는 완전히 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 소 적혈구의 세포질로부터 새로운 형태의 PLA₂를 동정하고, 이를 부분 정제하여 기존에 알려진 세포질 존재의 cPLA₂와는 다른 새로운 형태의 효소임을 확인하였다.

실험방법

시약 및 기기

Butyl-toyopearl 650 M gel, preparative DEAE-5PW Ion exchange column(Tosoh, Tokyo, Japan), 1-Stearoyl-2-[1-¹⁴C]arachidonyl-sn-glycerol-3-phospholipid(2-[1-¹⁴C]AA-GPC) (55.3 mCi/mmol), 1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]palmitoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylcholine(2-[1-¹⁴C]PA-GPC) (55.6 mCi/mmol), 1-acyl-[1-¹⁴C]arachidonyl-sn-glycerol-3-phosphatidylethanolamine(2-[1-¹⁴C]AA-GPE) (55.1 mCi/mmol) (Amersham, U.K.), Dithiothreitol(DTT), Arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF₃), Pancreatic group I PLA₂(Sigma Co, St. Louis, MO), 및 기타 시약은 실험에 적합한 높은 순도를 가진 시약을 사용하였다. Group IV cPLA₂는 Kim등¹⁶⁾의 논문에 따라 분리 정제하였다.

PLA₂의 활성 측정

기질인 1-stearoyl-2-[1-¹⁴C] arachidonyl-sr-glycerol-3-phosphocholine(2-[1-¹⁴C]AA-GPC), 55.3 mCi/mmol, Amersham Pharmacia Biotechnology)를 질소 가스에서 용매를 날려보내고 absolute ethanol에 재현탁시켰다. 75 mM Tris-HCl(pH 7.5), 5 mM CaCl₂, 0.45 nmol radioactive phospholipid를 함유하는 활성 측정계에 효소원 일정액을 가하고 37°C에서 30분간 incubation 시켰다. 이 반응은 560 μl의 Dole's reagent (n-heptane/isopropyl alcohol/1N-H₂SO₄; 400/390/10 by volume)를 가함으로써 중단된다. 여기에 증류수 110 μl를 가하고 microcentrifuge 후 상등액 중 150 μl를 취하여 약 25 mg의 silica gel을 함유한 800 μl heptane용액에 넣었다. Vortex 및 microcentrifuge 후 상등액 800 μl를 취하여 2.5 ml scintillation cocktail 용액에 넣고 Packard Tri-Carb liquid scintillation counter로 radioactivity를 측정하였다. 효소 활성 저해제 실험은 활성 측정계에 저해제를 미리 가하고 10분간 37°C에서 incubation 후 기질을 가하였다.

적혈구형 PLA₂의 동정 및 부분정제

효소원 - 서울 독산동 도살장에서 신선한 혈액을 항응고제 헤파린을(40 U/ml) 넣어 처리한 후 얼음에 보관하여 연구실로 수송하여 정제에 이용하였다. 혈액 4 L을 700×g로 20°C에서 20분간 원심 분리한 후 혈소판과 백혈구가 풍부하게 존재하고 있는 상등액과 buffy coat를 진공펌프를 이용하여 제거하였다. 남아 있는 적혈구 분획에 균질화 완충액(25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.12 M NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol)을 넣고 원심분리, aspiration 조작을 3회 반복 실시하여 소량의 혼재되어 있는 혈소판과 백혈구를 완전히 제거한 후 순수한 적혈구에 동량의 균질화 완충액을 넣고 -70°C deep freezer에 보관하였다. 시료를 녹인 후 Sonicator를 이용하여 초음파 파쇄 한 후 3,000×g로 4°C에서 30분간 원심분리한 후 그 상등액을 다시 100,000×g로 4°C에서 2시간 동안 초원심분리하여 세포질 분획을 얻었다.

Butyl-Toyopearl hydrophobic column - 세포질 분획인 100,000×g 상등액 약 30 ml을 buffer A(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5 M(NH₄)₂SO₄)로 미리 평형화시킨 Butyl-toyopearl column (Tosoh, Tokyo, Japan)에 승액하고 280 nm의 자외선

흡수로 알 수 있는 단백질 피크가 없어질 때까지 세척하였다. 이때 유속은 20 ml/min의 속도로 송액하였으며, 그후 증류수를 송액하여 칼럼에 결합된 단백질을 용출시켰다. 분획 당 20 ml씩 수집하고 그 중 40 µl를 취하여 PLA₂의 활성을 측정하였다.

DEAE-5PW anionic exchange HPLC column
-Butyl-Toyopearl 활성분획을 buffer B(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA)로 미리 평형화 시킨 DEAE-5PW(21.5 mm×15 cm; Tosoh, Tokyo, Japan) 칼럼에 송액하고 280 nm의 자외선 흡수로 알 수 있는 단백질 피크가 없어질 때까지 세척하였다. 이때 유속은 5 ml/min의 속도로 송액하였으며, 분획 당 5 ml씩 분취하였다. 그 후 NaCl의 농도 일차구배로 20분 동안 1 M로 하여 결합한 단백질을 용출시켰다. 그중 30 µl를 취하여 PLA₂의 활성을 측정하였다. 이 활성분획을 이용하여 새로이 개발된 효소 저해제에 대한 효소 활성 저해실험을 행하였다.

2,3,8-Tribromo-juglone(BJ50)의 합성

뜨거운 AcOH 30 ml에 녹인 3.0 g(17.2 mmol)의 juglone(Aldrich Co. USA)에 11.0 g의 bromine(4 mol)을 더해주고 그 용액을 수욕 상에서 3시간 정도 가열하고 냉각하여 적색의 침전을 얻었다. 여과해서 50 ml CHCl₃에 녹인 후 120 ml의 ligroin을 가해 재결정하여 갈색의 2,3,8-tribromo-juglone(mp 167~168°C) 5g을 얻었다. 수득률은 80%이었다.

실험결과 및 고찰

rPLA₂의 동정 및 부분정제

본 실험 결과 소의 적혈구 세포질에 PLA₂가 존재함을 확인하고, rPLA₂로 명명하였다. 효소 활성은 정제 첫 단계인 Butyl-Toyopearl 소수성 칼럼 크로마토그래피에서 약 26 배, 40% 수율로 정제되었으며(Fig. 1), 두 번째 단계인 DEAE-5PW 음이온 교환 수지 칼럼 크로마토그래피에서는 약 200 배, 20%의 수득률로 더욱 정제되었다(Fig. 2). 이전에 알려져 있던 세포질 존재형의 Group IV cPLA₂와 차이점을 확인하기 위하여, Kim 등¹⁶⁾의 논문에 따라 돼지 비장의 세포질로부터 Group IV cPLA₂를 같은 조건에서 크로마토그래피를 실시하였다. 두 종류의 PLA₂의 칼럼에서의 동태를 살펴보면, 소수성 칼럼 크로마토그래피에서는

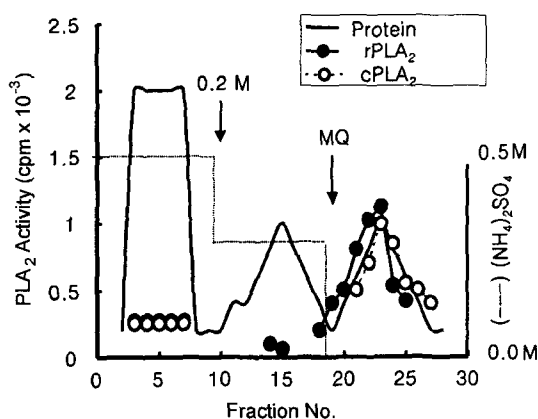


Fig. 1 – Butyl-Toyopearl Hydrophobic Chromatography Profile of Bovine Red Blood Cells PLA₂ (rPLA₂) and Porcine Spleen Cytosolic PLA₂ (cPLA₂) To prepare a RBC form of cytosolic PLA₂ (rPLA₂) and porcine spleen form of 100 kDa cPLA₂, the 100,000 × g supernatants were obtained from bovine RBCs and porcine spleen, respectively, and were applied to a Butyl-Toyopearl column pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol and 0.5 M (NH₄)₂SO₄ at a flow rate of 20 ml/min. The Butyl-Toyopearl-binding proteins were eluted with water, 40 µl of each fraction (20 ml) was assayed for the PLA₂ activity using 2-[1-¹⁴C]AA-PC.

상이한 점을 발견하지는 못하였으나(Fig. 1), 음이온 교환 칼럼크로마토그래피인 DEAE-5PW 칼럼에서는 서로 다른 염 농도에서 용출되는 양상을 보인다(Fig. 2). 이는 rPLA₂가 기존의 Group IV cPLA₂와는 다른 효소일 가능성을 보여주는 것이다.

rPLA₂의 특성규명

rPLA₂와 Group I, II PLA₂ 및 Group IV cPLA₂와의 상이성을 더욱 확인하고, rPLA₂의 생화학적 특성을 파악하기 위하여 기질특이성실험 및 수종의 활성 저해제에 대한 민감성 실험을 행하였다.

DTT는 이미 기존에 group I과 group II PLA₂는 저해 하지만, Group IV cPLA₂의 활성은 저해하지 않는 물질로 잘 알려져 있었다.^{6,7)} 각 PLA₂의 활성에 대한 DTT의 영향을 실험 해 본 결과 20 µM의 DTT 농도에서 알려진 바와 같이 Group I(Pancreatic group I PLA₂, Sigma Co, St. Louis, MO)과 랫트 혈소판 유래의 group II 분비성 PLA₂의(sPLA₂) 활성은 저해되지만, Group IV cPLA₂와 rPLA₂의 활성은

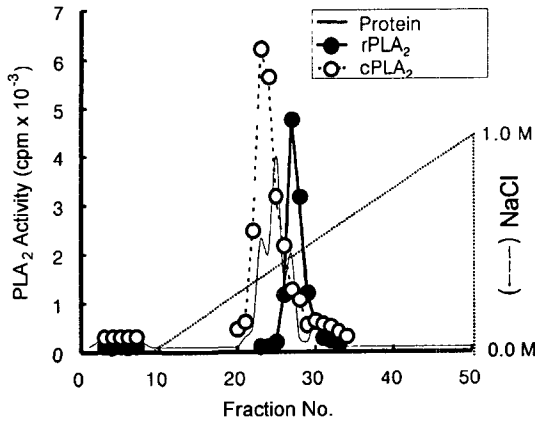


Fig. 2 – DEAE-5PW Anion Exchange HPLC Profile of Bovine Red Blood Cells PLA₂ and Porcine Spleen Cytosolic PLA₂. The active fractions obtained from the Butyl-Toyopearl hydrophobic column were applied to a DEAE-5PW anion exchange HPLC column pre-equilibrated with 50 mM Tris/HCl (pH 7.5) containing 1 mM EDTA and 10 mM 2-mercaptoethanol at a rate of 5 ml/min. The column was eluted at a flow rate of 5 ml/min with 40 ml of the same buffer in a linear gradient elution of 0 to 1.0 M NaCl. 30 μl of each fraction (5 ml) was assayed for the PLA₂ activity using ¹⁴C-AA PC as substrate and the incubation time was 30 min.

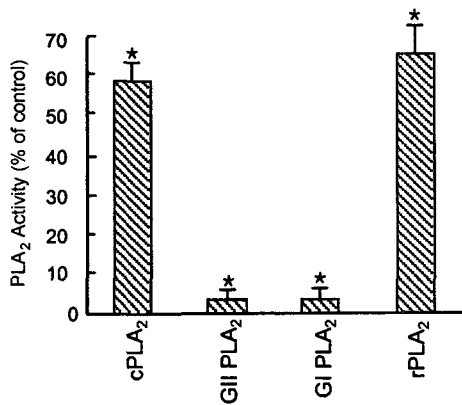


Fig. 3 – Effect of Dithiothreitol (DTT) for PLA₂s. PLA₂s activities were assayed in the presence of 20 μM Dithiothreitol (DTT). 2-[¹⁴C] AA-PE was used as substrate. DTT was pre-incubated with the enzyme preparation for 10 min at 37°C before adding the substrate into the assay system. Results indicate mean ± SD from 3 separate experiments.

저해하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 3). 따라서 sPLA₂인 Group I, II와는 달리 rPLA₂는 효소 활성에

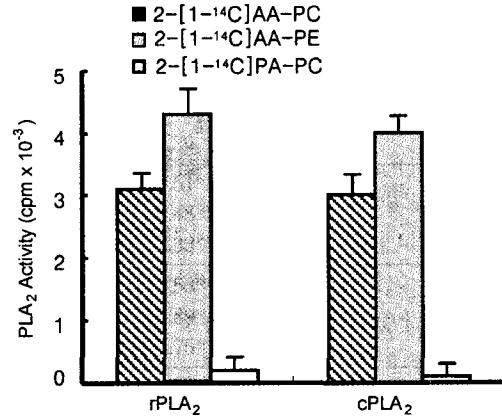


Fig. 4 – Substrate specificity of the PLA₂ activities partially purified from bovine blood cells and porcine spleen. The bovine RBC PLA₂ (rPLA₂) was partially purified and the activity fraction from DEAE-5PW anion exchange column was measured by using 1-stearoyl-2-[¹⁴C]AA-GPC (2-[¹⁴C]AA-PC), 1-acyl-2-[¹⁴C]AA-GPE(2-[¹⁴C]AA-PE) and 1-palmitoyl-2-[¹⁴C]PA-GPC (1-[¹⁴C]-DPPC) as a substrate, respectively.

disulfide 결합이 촉매 역할을 하지 않는 것으로 사료되며, DTT에 대한 민감성으로는 rPLA₂와 비슷한 형태인 Group IV cPLA₂와의 구분은 불가함을 확인하였다.

또한, 1-stearoyl-2-[¹⁴C]arachidonyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine(2-[¹⁴C]-AA-PC, 55.3 mCi/mmol, Amersham Pharmacia Biotechnology), 1-acyl-[¹⁴C]arachidonyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine(2-[¹⁴C]-AA-PE) (55.1 mCi/mmol, Amersham Pharmacia Biotechnology) 1-palmitoyl-2-[¹⁴C]palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine(2-[¹⁴C]-DPPC, 55.6 mCi/mmol, Amersham Pharmacia Biotechnology) 등을 이용한 기질 특이성 실험에서,⁹⁾ rPLA₂는 Group IV cPLA₂와 거의 유사한 기질 특이성을 나타내었다(Fig. 4).

Group IV cPLA₂의 특이적 저해제로 알려진 AACOCF₃¹⁷⁻¹⁹⁾에 대한 민감성 실험결과 rPLA₂쪽이 Group IV cPLA₂보다 더욱 민감하게 그 활성이 감소되는 것으로 나타났다. 그러나, 민감성의 차이는 있었으나 두 효소 모두 활성이 저해되는 것으로 보아 두 효소의 생화학적 특성이 유사할 것으로 사료된다(Fig. 5).

이상의 결과를 종합하여 보면 새롭게 확인된 rPLA와 기존에 알려져 있던 형태인 Group IV cPLA₂는 음이온 교환 칼럼 크로마토그래피에서의 거동만이 다

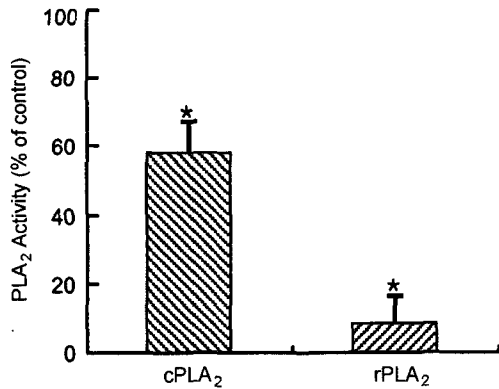


Fig. 5 - Inhibition of RBC rPLA₂ and Group IV cPLA₂ by AACOCF₃. rPLA₂ and Group IV cPLA₂ activity were assayed in the presence of 50 μM AACOCF₃. 2-[1-¹⁴C]-AA-PC was used as substrate. AACOCF₃ was preincubated with enzyme for 10 min at 37°C. Results indicate mean ± SD from 3 separate experiments.

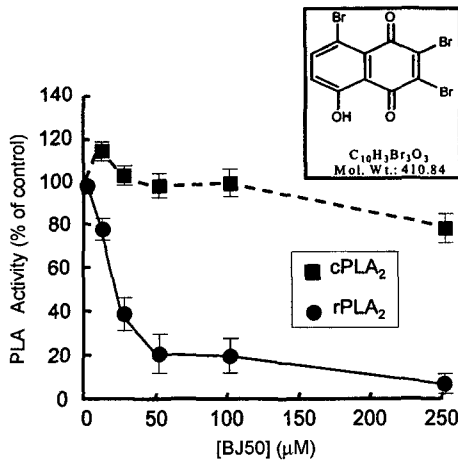


Fig. 6 - Concentration-dependent inhibition of RBC rPLA₂ and Group IV cPLA₂ by BJ50, a quinone derivative. rPLA₂ activity was assayed in the presence of increasing concentrations of BJ50. 2-[1-¹⁴C]-AA-PC was used as substrate. BJ50 was pre-incubated with enzyme for 10 min at 37°C. The active fraction from DEAE-5PW ion exchange column was used as enzyme source. Results indicate mean ± SD from 3 separate experiments.

를 뿐 그 생화학적 특징에는 차이점이 거의 없는 비슷한 효소로 보인다.

따라서, 본 연구자들은 이 두가지 효소를 구별할 수 있는 새로운 저해제를 이용하여 두 효소의 상이성을 조사하고자 하였다. 새로이 합성한 quinone 유도체에

대한 민감성 실험을 행하였다.

rPLA₂에 대한 선택적 저해제 개발

새로운 형태의 효소인 rPLA₂를 선택적으로 저해하는 저해제를 개발하기 위하여, 새로운 quinone 유도체로서 BJ50는 rPLA₂의 효소활성이 저해됨을 알 수 있었다. 즉, BJ50에 의해 rPLA₂의 활성은 저해되는 반면, Group IV cPLA₂의 활성은 전혀 변함이 없었다 (Fig. 6). BJ50의 rPLA₂에 대한 ID₅₀는 20 μM로 나타났다.

결론

소 적혈구의 세포질 분획에서 PLA₂활성이 확인되었다. 본 활성에 대해 칼럼크로마토그래피를 이용하여 부분 정제한 후 그 특성을 조사한 결과 기존에 알려진 cPLA₂와 매우 유사하였으나, 다음과 같은 점에서 다른 효소임이 확인되었다. 첫째, DEAE-5PW anion exchange 칼럼에서 용출 분획이 달랐으며, 둘째, 새로이 개발된 rPLA₂ 저해제 quinone 유도체 BJ50는 cPLA₂ 효소에 대해서는 어떠한 저해활성도 보이지 않았다. 따라서, 적혈구형 cPLA₂는 지금까지 알려진 PLA₂ 효소와는 다른 형태일 것으로 예상된다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부 주관 과학재단 특정기초연구 개발사업(97-04-03-11-01-3)에 의해 수행되었으며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

문헌

- 1) Andrews, D. A. and Low, P. S. : Role of red blood cells in thrombosis. *Curr. Opin. Hematol.*, **6**, 76 (1999).
- 2) Juana, V, Santos, M. T, Aznar, J., Marcus, A. J. and Safier, L. B. : Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, adenosine diphosphate release and recruitment. *Blood*, **78**, 154 (1991).
- 3) Santos, M. T, Valles, J., Marcus, A. J., Safier, L. B. and Aznar, J. : Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact

- erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, **87**, 571 (1991).
- 4) Kobayashi, T. and Levine, L. : Arachidonic acid metabolism by erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **258**, 9116 (1983).
 - 5) Oonishi, T., Sakashita, K., Ishioka, N., Suematsu, N., Shio, H. and Uyesaka, N. : Production of prostaglandins E₁ and E₂ by adult human blood cells. *Prostaglandins other Lipid Mediat.*, **56**, 89 (1998).
 - 6) Kudo, I., Murakami, M., Hara, S. and Inoue, K. : Mammalian non-pancreatic phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta*, **117**, 217 (1993).
 - 7) Dennis, E. A. : Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.*, **269**, 13057 (1994).
 - 8) Ackermann, E. J., Kempner, E. S. and Dennis, E. A. : Ca²⁺-independent cytosolic phospholipase A₂ from macrophage-like P388D1 cells : Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.*, **269**, 9227 (1994).
 - 9) Mayer, R. J. and Marshall, L. A. : New insights on mammalian Phospholipase A₂(s) : Comparison of arachidonyl-selective and non-selective enzymes. *FASEB J.*, 339 (1993).
 - 10) Stroebel, M. and Goppelt-Struebe, M. : Signal transduction pathways responsible for serotonin-mediated prostaglandin G/H synthase expression in rat mesangial cells. *J. Biol. Chem.*, **269**, 22952 (1994).
 - 11) Kramer, R. M., Roberts, E. F., Hyslop, P. A., Utterback, B. G., Hui, K. Y. and Kakubowski, J. A. : Differential activation of cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) by thrombin and thrombin receptor agonist peptide in human platelets. Evidence for activation of cPLA₂ independent of the mitogen-activated protein kinases ERK1/2. *J. Biol. Chem.*, **270**, 14816 (1995).
 - 12) Chang, H. W. and Kudo, I. : Purification and Characterization of extracellular phospholipase A₂ from peritoneal cavity of caseinate-treated rat. *J. Biochem.*, **102**, 147 (1987).
 - 13) Seilhamer, J. J., Pruzanski, W., Vadas, P., Plant, S., Miller, J. A., Kloss, J. and Johnson, L. K. : Cloning and recombinant expression of phospholipase A₂ present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J. Biol. Chem.*, **264**, 5335 (1989).
 - 14) Neagos, G. R. and Feysa, A. : Phospholipase A₂ in aveolar type II epithelial cell: Biochemical and immunologic characterization. *Am. J. Physiol.*, **264**, L261 (1993).
 - 15) Asaoka, Y. and Yoshida, K. : Possible role of mammalian secretory Group II phospholipase A₂ in Y-lymphocyte activation : Implication in propagation of inflammation reaction. *Pros. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 716 (1993).
 - 16) Kim, D. K. and Bonventre, J. V. : Purification of a 100 kDa PLA₂ from spleen, lung and kidney : antiserum raised to pig spleen PLA₂ recognizes a similar for in bovine lung, kidney and platelet and immunoprecipitates PLA₂ activities. *Biochem. J.*, **294**, 261 (1993).
 - 17) Urasaki, T., Takasaki, J., Nagasawa, T. and Ninomiya, H. : Pivotal role of 5-lipoxygenase in the activation of human eosinophils: platelet-activating factor and interleukin-5 induce CD69 on eosinophils through the 5-lipoxygenase pathway. *J. Leukoc. Biol.*, **69**, 105 (2001).
 - 18) Thommesen, L., Sjursen, W., Gasvik, K., Hanssen, W., Brekke, O. L., Skattebol, L., Holmeide, A. K., Espevik, T., Johansen, B. and Laegreid, A. : Selective inhibitors of cytosolic or secretory phospholipase A₂ block TNF-induced activation of transcription factor nuclear factor-kappa B and expression of ICAM-1. *J. Immunol.*, **161**, 3421 (1998).
 - 19) Riendeau, D., Guay, J., Weech, P. K., Laliberte, F., Yergey, J., Li, C., Desmarais, S., Perrier, H., Liu, S. and Nicoll-Griffith, D. : Arachidonyl trifluoromethyl ketone, a potent inhibitor of 85-kDa phospholipase A₂, blocks production of arachidonate and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid by calcium ionophore-challenged platelets. *J. Biol. Chem.* **269**, 15619 (1994).