

### 外部資金獲得力向上経費（新テーマ育成資金）

研究代表者	所属・職名 共生システム理工学類 教授 氏 名 杉 森 大 助
研究課題	血清中の疾患マーカーリン脂質定量用酵素「リゾホスホリパーゼ C」の開発 Development of lysophospholipase C as diagnostic enzyme for phospholipids measurement involving in a disease.
成果の概要	<p>昨年度、発見した新規な酵素「リゾホスホリパーゼ C」を純品まで精製し、アミノ酸配列や作用温度・pH など酵素の諸特性を解明する。さらに、遺伝子クローニングにより酵素遺伝子の DNA 配列を明らかにすることを目的に本研究を行った。</p> <p>酵素生産菌の培養上澄み液から、硫酸アンモニウム分画、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー、等電点カラムクロマトグラフィーにより、酵素を純品まで精製することができた。また、SDS-PAGE 分析およびゲル濾過カラムクロマトグラフィー分析の結果より、本酵素は約66kDa の単量体として機能することがわかった。当初リゾホスファチジルコリンに最も作用する「リゾホスホリパーゼ C」と考えられたが、精製酵素を用いた詳細な基質特異性試験の結果、グリセロール 3-ホスホリルコリン（以下 GPC と略記）とグリセロール 3-ホスホエタノールアミン（以下 GPE と略記）に最も良く作用し、ついでリゾホスファチジルコリンの順に高い活性を示す新規酵素 Glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase [3.1.4.38]（以下 GPC-CP と略記）であることがわかった。本酵素の特性解析の結果、本酵素は40°C、pH7.2において最大活性を示した。また、本酵素は EDTA 存在下でも活性を示し、金属イオン添加による顕著な活性の増加が認められないことから、金属イオン非要求性であることがわかり、既知哺乳類 GPC-CP とは全く異なる特性を有していた。</p> <p>さらに、本酵素の GPC 加水分解における速度論的解析により、<math>K_m=1.41\text{mM}</math>、<math>V_{\max}=25.7\text{mmol}/\text{min}/\text{mg-protein}</math>、<math>k_{\text{cat}}=2.84\times 10^4\text{ s}^{-1}</math>を明らかにした。これらの特性は既知哺乳類 GPC-CP とは全く異なっており、本酵素はこれまで報告例のない新規酵素であると結論づけた。本酵素遺伝子をクローニングした結果、本酵素遺伝子は2052塩基から構成され、38アミノ酸残基のシグナル配列と646アミノ酸残基の成熟部分から成ることがわかった。明らかとなった本酵素のアミノ酸配列について Blast 検索した結果、<i>S. auratus</i> 由来推定 phospholipase C (PLC) と76%の相同性を示し、本酵素は PLC と同じファミリーに属することが示唆された。</p> <p>本研究成果の一部は、国内学会で学生が6件発表し、学生との連名で特許出願2件を行った。</p>