

平成25年度 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	アルツハイマー型認知症の早期発見に有効な新酵素の特性解析 Characterization of a new enzyme which is useful for early detection of <i>Alzheimer's disease</i>																		
成果の概要	<p>アルツハイマー型認知症の早期発見に有効な新酵素の特性解析を目指し、まず遺伝子の取得を試みた。LC-MS/MS 分析と次世代シーケンサーを用いたゲノム解析により、目的酵素の遺伝子を同定し、クローニングすることに成功した。これによって、目的酵素の遺伝子配列およびアミノ酸配列を完全に解読することができた。本酵素は分子質量33.5kDaのポリペプチド鎖からなる単量体タンパク質であり、既知ホスホリパーゼD (PLD) とは異なる分子質量を示した。また、本酵素は334アミノ酸残基からなり、そのうちN末端の27アミノ酸残基が分泌シグナルペプチドであることが判明した。既知タンパク質とのアミノ酸配列相同性は、最大でも66%であり、本酵素が新規な配列を有する酵素であることが判明した。</p> <p>次に、本酵素を放線菌を用いて組換え分泌発現に成功し、容易かつ高純度の酵素試料を著量調製する方法を確立した。その酵素生産量は、フラスコ培養で6.5kU/Lまで到達した。</p> <p>分泌生産酵素を用いて、酵素の諸特性解析を行った結果、本酵素は30~60℃、pH 7~9で作用し、45℃、pH 8付近で最大活性を示すことがわかった。本酵素は4℃条件下でpH 5~11において安定で、50℃以下であれば1h活性を維持することがわかった。また、中性にて4℃で3ヶ月以上活性が低下せず、十分な保存安定性を有していた。本酵素はCaイオン要求性であり、界面活性剤(トリトン X-100)の添加により活性が低下することがわかった。本酵素の基質特異性を調べた結果、通常のグリセロリン脂質であるホスファチジルコリンおよびそのリゾ体には全く作用しないことが確認できた(表1)。また、アルキルエーテル型リン脂質(血小板活性化因子 PAF)、スフィンゴミエリンにも全く作用しないことがわかった。一方、リゾプラズマローゲンエタノールアミン(LysPls-Etn)に対する活性を100%とした時、プラズマローゲンエタノールアミン(Pls-Etn)には12%作用することがわかった。さらに、詳細に基質特異性を調べたところ、表1に示すようにリゾプラ</p> <p>表 1. 開発酵素の基質特異性試験の結果</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>基 質</th> <th>相対活性 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>プラズマローゲンコリン (PLS-Cho)</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>リゾプラズマローゲンコリン (LysPLS-Cho)</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>リゾプラズマローゲンエタノールアミン (LysPLS-Etn)</td> <td>約40^b</td> </tr> <tr> <td>ホスファチジルコリン (PC)</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>リゾホスファチジルコリン (LPC)</td> <td>3.86</td> </tr> <tr> <td>血小板活性化因子 (PAF)^a</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>スフィンゴミエリン (SM)</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>グリセロール 3-ホスホコリン (GPC)</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine b. TLC 分析による簡易的な測定結果</p>	基 質	相対活性 (%)	プラズマローゲンコリン (PLS-Cho)	0	リゾプラズマローゲンコリン (LysPLS-Cho)	100	リゾプラズマローゲンエタノールアミン (LysPLS-Etn)	約40 ^b	ホスファチジルコリン (PC)	0	リゾホスファチジルコリン (LPC)	3.86	血小板活性化因子 (PAF) ^a	0	スフィンゴミエリン (SM)	0	グリセロール 3-ホスホコリン (GPC)	0
基 質	相対活性 (%)																		
プラズマローゲンコリン (PLS-Cho)	0																		
リゾプラズマローゲンコリン (LysPLS-Cho)	100																		
リゾプラズマローゲンエタノールアミン (LysPLS-Etn)	約40 ^b																		
ホスファチジルコリン (PC)	0																		
リゾホスファチジルコリン (LPC)	3.86																		
血小板活性化因子 (PAF) ^a	0																		
スフィンゴミエリン (SM)	0																		
グリセロール 3-ホスホコリン (GPC)	0																		

成果の概要

ズマローゲンコリン (LysPls-Cho) に対する活性が極めて高く、かつ高い選択性を持つことが判明した。その活性は、LysPls-Etn に対する活性の約2.5倍であり、LysPls-Etn に対してはエンドポイントアッセイが適していることを示唆する結果を得た。LysPls-Choは動脈硬化症やある種のガンの病態マーカーとなり得ることが知られており、本酵素の基質特異性から考えると、これら疾患の診断にも適用が十分可能であるという結果を得ることもできた。

本酵素は、図1に示す反応を触媒する酵素で、これまで全く報告例がない世界初の酵素であることを明らかにできた。申請者は、本酵素をリゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼDと仮命名した。

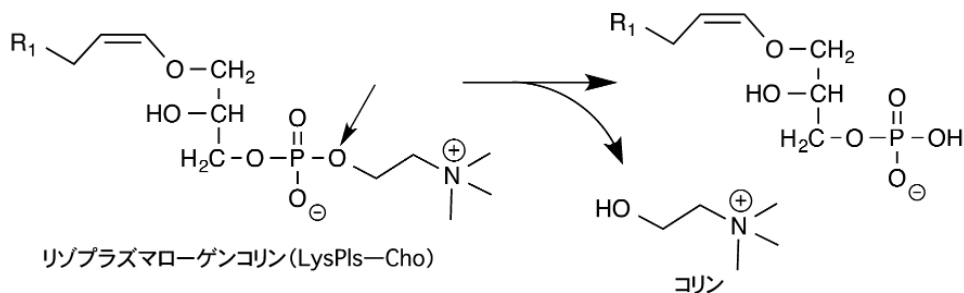


図1. 新酵素（リゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼD）によるLysPLS-Choの加水分解反応

なお本研究によって、以下の成果を得た。

査読付き論文

- 1) Kazutaka Murayama, Kano Kota, Yusaku Matsumoto, and Daisuke Sugimori, Crystal structure of phospholipase A1 from *Streptomyces albidoflavus* NA297, *J. Struct. Biol.*, 182, 192–196 (2013).
- 2) Yusaku Matsumoto, Shingo Mineta, Kazutaka Murayama, Daisuke Sugimori, A novel phospholipase B from *Streptomyces* sp. NA684 : purification, characterization, gene cloning, extracellular production, and prediction of the catalytic residues, *FEBS J.*, 280, 3780–3796 (2013).

特許出願

- 1) 杉森大助、酒瀬川信一、松本英之、エタノールアミンオキシダーゼ、特願2013-115395、平成25年5月31日出願。
- 2) 前場良太、荒木 厚、藤原佳典、小川貴志子、原 博、西向めぐみ、酒瀬川信一、松本英之、松本優作、杉森大助、認知機能検査法、及びそのキット、PCT/JP2013/068965、平成25年7月11日出願。

国際会議

- 1) A novel amine oxidase from *Syncephalastrum racemosum*, Daisuke Sugimori and Yoshitaka Hirano, *Enzyme Engineering XXII*, September 24, 2013 (Toyama, Japan).
- 2) *Streptomyces* phospholipase D recognizes substrate micelle surface, Yusaku Matsumoto and Daisuke Sugimori, *Enzyme Engineering XXII*, September 24, 2013 (Toyama, Japan).

国際会議依頼講演

- 1) A Novel Lysoplasmalogen Phospholipase D, Y. Matsumoto*, D. Sugimori, S. Sakasegawa and H. Matsumoto, 2014 AOCs annual meeting (23rd Annual Biocatalysis Sympo-

成果の概要	<p>sium), May 7, 2014 (San Antonio, TX, USA).</p> <p>受託研究費 平成25年度、JST A-STEP 探索タイプ、アルツハイマー型認知症の早期発見に有用な酵素の開発、170万円。</p>
-------	--