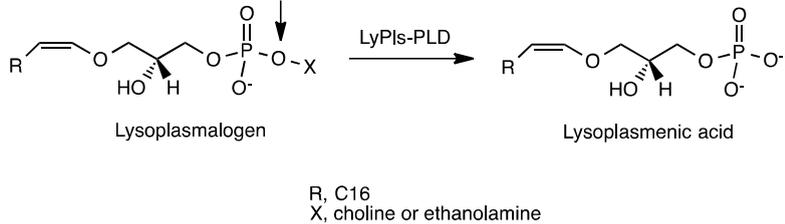


研究代表者	所属学系・職名 物質・エネルギー学系 教授 氏名 杉森大助
研究課題	化石遺伝子の復活と新酵素としての機能解析：アルツハイマー型認知症の早期発見に有効な新酵素の特性解析 Characterization of a novel enzyme from a fossil gene: Characterization of a new enzyme for early detection of mild and Alzheimer-type dementia.
成果の概要	<p>本研究では、「アルツハイマー型認知症の早期発見に有効な新酵素」について酵素の反応特性を明らかにするために、諸性質解析と立体構造解析を目指して研究を実施した。本酵素は、図1の反応式に示すように、リゾプラズマローゲン（以下 LysPls）に特異的に作用する極めて新しい酵素（以下 LysPls-PLD）である。</p> <div style="text-align: center;">  <p style="text-align: center;">R, C16 X, choline or ethanolamine</p> </div> <p style="text-align: center;">図1. LysPls-PLDによるLysPlsの加水分解反応</p> <p>本酵素を電気泳動分析とゲル濾過クロマトグラフィー分析した結果、本酵素の分子量は約 34,000 で、単量体として機能していることがわかった。また、酵素遺伝子のクローニングおよび異種組換え発現に成功した。本酵素は、27 アミノ酸残基のシグナルペプチドと 307 アミノ酸残基の活性型タンパク質から構成されていることがわかった。アミノ酸配列の相同性検索の結果、放線菌由来のグリセロホスホジエステルホスホジエステラーゼ(GDPD)と 68%の相同性を示した。しかしながら、LysPls-PLD は GDPD および類似酵素ホスホリパーゼ D (PLD) とは基質特異性がまったく異なっていることから、これら酵素は基質認識機構が異なることが推察された。</p> <p>酵素反応の至適条件を調べた結果、本酵素は pH 8.0、45°C で最大活性を示し、界面活性剤 Triton X-100 存在下では活性が低下した。Ca²⁺と Al³⁺存在下で活性化し、EDTA 存在下では不活性となった。GDPD は Mg²⁺により活性化することが報告されているが、LysPls-PLD は Mg²⁺存在下では活性が低下した。基質特異性を詳細に調べた結果、LysPls-PLD は LysPls にのみ作用し、ジアシルリン脂質には作用しなかった。また、GDPD の基質であるグリセロホスホコリン (GPC) には全く作用しなかったことから、LysPls-PLD は sn-2 位のヒドロキシル基だけでなく、sn-1 位のエーテル結合（特にアルケニルエーテル）も認識していると考えられた。LysPls-PLD の速度論的解析の結果、1 秒間に約 30 回触媒作用を行うことが判明した。さらに、基質との親和性が極めて高く、Ca²⁺との結合定数も極めて大きいという特徴を持つことが明らかになった。</p>

成果の概要

LysPls-PLD の X 線結晶構造解析を試みたが、良好な結晶が得られなかった。そこで、GDPD の結晶構造を鋳型として本酵素の立体構造モデリングを実施した。その結果、本酵素の立体構造は GDPD と類似した構造をとることがわかり、酵素と基質の結合様式を予想することができた。その一方で、基質のリン酸基およびグリセロール骨格の認識においては類似していることが示唆された。しかしながら、sn-1 位のアルケニルエーテルやヘッドグループの認識機構までは解明に至らなかった。これを明らかにするために、今後さらに詳細な機能解析を進める予定である。

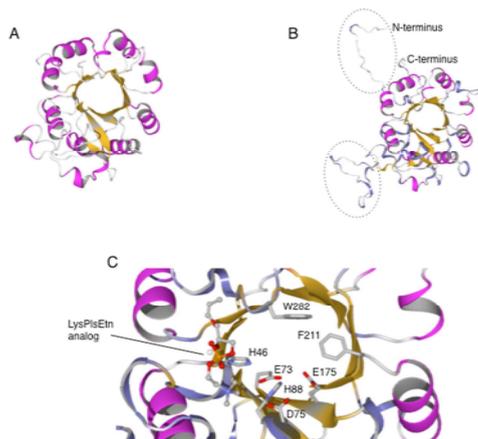


図 2. GDPD (A) と LysPls-PLD (B) の立体構造、および LysPls-PLD と基質類似化合物との結合様式 (C)

なお本研究によって、以下の成果を得た。

査読付き論文

- 1) Yusaku Matsumoto and Daisuke Sugimori, Substrate recognition mechanism of *Streptomyces* phospholipase D and enzymatic measurement of plasmalogen, J. Biosci. Biotechnol. 120 (4), 372-379 (2015).
- 2) Ryouta Maeba, Megumi Nishimukai, Shin-ichi Sakasegawa, Daisuke Sugimori and Hiroshi Hara, Plasma/Serum Plasmalogens, Advances in Clinical Chemistry (ISBN: 978-0-12-803316-6), Elsevier, vol. 70, chapter 2, 31-94.
- 3) Shin-ichi Sakasegawa, Ryouta Maeba, Kazutaka Murayama, Hideyuki Matsumoto, Daisuke Sugimori, Hydrolysis of plasmalogen by phospholipase A₁ from *Streptomyces albidoflavus*, Biotechnol. Lett., 38(1), 109-116 (2015).

記事

福島大学のバイオ関連研究室の紹介、Branch spirit 北日本支部、生物工学会誌, 88 (2), p. 78 (2014.6). 6月号

国際会議

A Novel Lysoplasmalogen Phospholipase D, Y. Matsumoto*, D. Sugimori, S. Sakasegawa and H. Matsumoto, 2014 AOCs annual meeting (23rd Annual Biocatalysis Symposium), May 7, 2014 (San Antonio, TX, USA).

国際会議招待講演

Characterization of a lysoplasmalogen-specific phospholipase D and its application to diagnostic agent, D. Sugimori*, Y. Matsumoto, S.

成果の概要	<p>Sakasegawa and H. Matsumoto, 1st Asian Conference on Oleo Science, September 9, 2014 (Royton Sapporo Hotel, Sapporo, Japan).</p> <p>国内学会</p> <p>1) <i>Chlorella kessleri</i> 由来新規ガラクトリパーゼの精製とその特性解析、藤内恒有、羽城周平、安枝 寿、杉森大助日本農芸化学会 2015 年大会、2015. 3. 29 (岡山大学)</p> <p>2) <i>Chlorella kessleri</i>由来新規ガラクトリパーゼの遺伝子取得とその応用、羽城周平、藤内恒有、杉森大助、安枝 寿、日本農芸化学会2015年大会、2015. 3. 29 (岡山大学)</p> <p>共同研究費 平成 26 年度、旭化成ファーマ株式会社、診断薬用酵素のスクリーニング、240 万円</p> <p>寄付金 平成 26 年度、奨学寄付金、公益財団法人 高橋産業経済研究財団、リゾプラズマローゲン加水分解酵素の基質分子識別機構の解明、代表、1,000 千円</p>
-------	--