

氏名	小田 圭一		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	農学		
学位授与番号	博乙第4331号		
学位授与の日付	平成22年 3月25日		
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第5条第2項該当)		
学位論文の題目	非天然型ホスファチジル基受容体とタンデム型質量分析法の組み合わせによるホスホリパーゼD活性の追跡		
論文審査委員	教授 馬場 直道	教授 中島 修平	教授 木村 吉伸

学位論文内容の要旨

Phospholipase D (以下 PLD と略す)は、動物、植物、微生物等、自然界に広く存在する酵素である。この酵素はグリセロリン脂質とアルコールを基質として、ホスファチジル基転移反応を触媒することが知られている。

一方で、PLD の活性測定法は様々な方法が知られているが、簡便性、迅速性及び感度の点で必ずしも技術的に十分と言えるものではなかった。

また、PLD の基質であるグリセロリン脂質には非常に多くの分子種が存在し、加えて、生体内における脂質成分はトリアシルグリセロールなどの脂肪酸を構成要素とするものを含んでおり、これらも同様に多くの分子種が存在する。このような複雑な脂質を含む生体成分中では、今までに知られている方法を用いて、特定の分子種に対して PLD を作用させ、その生成物を個別に検出することは困難である。このような背景から、PLD 活性を、簡便・迅速で感度よく、また、複雑な脂質を含む試料中で特定の分子種に対する PLD 活性を検出する方法を開発することは有意義であると考えられた。

自然界に存在せず、かつ、ホスファチジル基受容体となり新たに生じる非天然型グリセロリン脂質がタンデム型質量分析装置で感度良く検出できるような各種「分子プローブ」を合成し、これを基質として酵素反応を行い、生成物である非天然型グリセロリン脂質を検出する方法を考案し、実験的に検証した。これらの分子プローブは、いずれも PLD の触媒作用によってホスファチジル基を受け取り、非天然型グリセロリン脂質を生成し、この非天然型グリセロリン脂質を ESI-MS で検出することで、PLD 活性を追跡できることが検証できた。今回開発した方法は、通常のホスファチジルコリンのみならず、脂肪酸が酸化することで生成する過酸化脂質誘導体についても応用でき、それぞれの誘導体に対する PLD の作用を、選択的に検出することが可能であった。また、本法を用いることで、複雑な組成をもつ脂質混合物中であっても、特定のホスファチジル基供与体に対する PLD の活性を検出することが出来ることが明らかになり、本法は、PLD の探索に応用できる可能性が示された。

また、本法が、PLD 活性に影響を与える成分の探索に応用できることが強く示された。

本研究は、複雑な組成の混合物中でも特定の基質に対して選択的に、かつ感度良く PLD 活性を追跡できる方法を提供するものであり、これは、ホスファチジル基転移活性を有する有用な PLD の探索や、PLD への阻害物質（又は活性化物質）の探索に応用できる。近年、PLD は生体内のシグナル伝達に関与していることで注目される酵素であり、本研究によって得られる知見及び技術は、これらの PLD に関する研究の発展にも寄与するものと期待される。

論文審査結果の要旨

Phospholipase D (以下 PLD と略す) は、動物、植物、微生物等、自然界に広く存在する酵素である。この酵素はグリセロリン脂質とアルコールを基質として、ホスファチジル基転移反応を触媒する。PLD に対する種々の活性測定法が知られているが、簡便性、迅速性及び感度の点で必ずしも技術的に十分と言えるものではない。PLD の基質であるグリセロリン脂質には非常に多くの分子種が存在し、生体脂質成分はトリアシルグリセロールなどの脂肪酸を構成要素とするものを含んでいて、それぞれに同様に多くの分子種が存在する。このような複雑な脂質を含む生体成分中では特定の分子種に対して PLD を作用させ、その生成物を個別に検出することは困難である。このような背景から、本研究では、簡便・迅速で感度よく、また、複雑な脂質を含む試料中で特定の分子種に対する PLD 活性を検出する方法に関する研究が行われている。

本研究では、自然界に存在しないがホスファチジル基受容体となり、新たに生じる非天然型グリセロリン脂質がタンデム型質量分析装置で感度良く検出できるような各種「分子プローブ」を合成し、これを基質として酵素反応を行い、生成物である非天然型グリセロリン脂質を検出する方法を考案し、実験的に検証された。これらの分子プローブは、いずれも PLD の触媒作用によってホスファチジル基を受容した結果、非天然型グリセロリン脂質を与え、これは ESI-MS で検出でき、PLD 活性を追跡できることを申請者は明らかにした。今回開発した方法は、通常ホスファチジルコリンのみならず、脂肪酸が酸化することで生成する過酸化脂質誘導体についても応用でき、それぞれの誘導体に対する PLD の作用を、選択的に検出することが可能であった。また、本法を用いることで、複雑な組成をもつ脂質混合物中であっても、特定のホスファチジル基供与体に対する PLD の活性を検出することが可能となり、本法は、PLD 活性や PLD 阻害剤の探索に応用できる可能性が示された。分子プローブと ESI MS (Neutral Loss Scan Mode) を組み合わせる本方法が野菜類の持つ PLD 活性の測定に応用され、その結果、0.2-0.5g の試料があれば活性検出が十分行える事を明らかにした。また、微生物由来の PLD を用いて、その酵素に対する阻害作用の検出を行った。その結果、乾燥茶葉に強い阻害活性がある事を明らかにした。これらのスクリーニング試験は、粉碎の他、野菜や植物試料の前処理を必要とせず、従来の方と比べると著しく微量、簡便かつ迅速である。

以上のように本研究で開発された方法・技術は PLD に関する今後の研究の発展に大きく寄与する事が期待され、博士学位 (農学) の価値が十分であると判断した。