

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	関口敏史
論文題目	Solvent Engineering Studies on Improvement in the Activity and Stability of Bovine Intestine Alkaline Phosphatase for Its Application to Enzyme Immunoassay (ウシ小腸アルカリホスファターゼの酵素免疫測定法への応用に向けた活性と安定性の改善に関する溶媒工学的研究)		
(論文内容の要旨)			
ウシ小腸アルカリホスファターゼ（BIALP）は52 kDaのサブユニットからなる105 kDaのホモダイマーである。本酵素はサブユニットあたり亜鉛イオン2個とマグネシウムイオン1個を有し、リン酸エステルの加水分解を触媒する。本酵素は大腸菌由来のアルカリホスファターゼに比べ10～60倍高い活性を有しており、酵素免疫測定法において標識酵素として用いられている。酵素免疫測定法では、測定対象物質の濃度が標識酵素の活性に変換される。標識酵素の反応速度はミカエリス-メンテン式に従い、分子活性（k_{cat}）に比例する。標識酵素の活性が向上しk_{cat}が増大すれば、測定系の高感度化と迅速化につながる。また、反応温度の上昇に伴い、酵素反応速度は増大する。従って、標識酵素の安定性が向上し反応をより高温で行うことができれば、測定系の高感度化と迅速化につながる。本研究は、このような背景に基づいて、BIALPの活性と安定性の改善を目的としたものである。その主な内容は以下の通りである。 1. 化学発光酵素免疫測定法を用いたレプチン測定法の確立： レプチンは脂肪細胞から分泌されるホルモンであり、その血中濃度は体脂肪量や全身エネルギー状態の優れた指標になると考えられている。BIALPを標識酵素として、抗レプチンポリクローナル抗体を用いて化学発光酵素免疫測定法によるレプチンの測定系を構築した。非特異的結合を抑えるためのブロッキング剤としてはウシ血清アルブミンが最適であった。本測定系でのレプチンの測定範囲は0.1～1.0 pg/mlであり、測定に要する時間は40分であった。このことから、本測定系は十分な感度と迅速性を有し、血中レプチン濃度の測定に有効であることが示された。 2. BIALPの活性に対するアミンとアミノアルコールの添加効果： ジエタノールアミンは、BIALPの活性測定の際に緩衝液として用いられている。アミンとアミノアルコールの添加がBIALPの<i>p</i>-nitrophenyl phosphate (pNPP) 加水分解活性に及ぼす効果を検討した。ジエタノールアミンの濃度に依存してk_{cat}とミカエリス定数（K_{m}）が増大し、それぞれ最大で12倍と25倍に達した。k_{cat}が増大したことから、十分に高い基質濃度では、BIALPの活性化効果が期待できることが示唆された。エチルアミン、エタノール、メチルアミン、ジエチルアミンの添加では、k_{cat}の顕著な増大は見られなかった。一方、<i>N</i>-メチルエタノールアミン、トリエタノールアミンの添加では、ジエタノールアミン添加と同様のk_{cat}の顕著な増大が見られた。これらのことから、ジエタノールアミン、<i>N</i>-メチルエタノールアミン、トリエタノールアミンはBIALPを活			

性化することが示された。

3. BIALPの熱安定性に対する糖類の添加効果： BIALPのpNPP加水分解活性を指標として、糖類によるBIALPの熱安定性に対する効果を検討した。1.0 M スクロース、1.0 M トレハロース、2.0 M グルコース、2.0 M フルクトース存在下では、30分間の熱処理によりBIALPの活性が50%に低下する温度 (T_{50}) は55.0～55.5℃であり、非存在下 (50.3℃) に比べて約5℃上昇した。熱処理による失活が一次反応に従うと仮定し、熱失活の速度定数を求め、熱力学的解析を行った結果、糖類によるBIALPの安定化は、BIALPの熱失活の活性化エンタルピーの増加により引き起こされることが示された。これらのことから、これまで酵素の安定化に最も効果的な糖類であると考えられてきたトレハロースだけでなく、スクロース、グルコース、フルクトースもBIALPを顕著に安定化することが示された。

4. BIALPの活性と安定性に対するポリエチレングリコールの効果： ポリエチレングリコール (PEG) の添加および結合によるBIALPの活性と安定性に対する効果を調べた。PEG1000、PEG2000、PEG6000、PEG20000 (平均分子量はそれぞれ1,000、2,000、6,000、20,000) の添加により、濃度依存的にpNPP加水分解の k_{cat}/K_m が増大した。PEG2000の効果が最も大きく、 k_{cat}/K_m は最大でPEG非添加時の300%に達した。PEG2000を添加したBIALPと分子量10,000のPEGを共有結合させた (PEG化) BIALPの活性はいずれも、pH 7.0～10.0、反応温度20～65℃において、平均で天然酵素の130%であった。さらに、PEG2000を添加したとき、BIALP標識抗体の酵素活性は、各pHおよび各反応温度において、PEG非存在下よりも高かった。一方、PEG2000を添加したBIALPとPEG化BIALPの T_{50} は天然酵素と同程度であった。これらのことから、PEGの添加および結合はBIALPの安定性には効果をもたらさないが、活性を増大させることが示された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ウシ小腸アルカリホスファターゼ (BIALP) は大腸菌由来のアルカリホスファターゼに比べ高い活性を有しており、酵素免疫測定法において標識酵素として用いられている。本酵素の性能向上は、酵素免疫測定法のさらなる迅速化と高感度化を目指すうえで重要な課題である。本研究は、溶媒工学的な検討によりBIALPの活性と熱安定性を向上させたものであり、成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. BIALPを標識酵素として用い、化学発光酵素免疫測定法によるレプチンの測定系を構築した。本測定系は十分な感度と迅速性を有し、血中レプチン濃度の測定に有効であることを示した。

2. BIALPの活性に対するアミンとアミノアルコールの添加効果を調べた。ジエタノールアミン、*N*-メチルエタノールアミン、トリエタノールアミンがBIALPの *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) 加水分解の分子活性 (k_{cat}) を増加させることを見出し、これらのアミノアルコールがBIALPを活性化することを示した。

3. BIALPの熱安定性に対する糖類の添加効果を調べた。スクロース、トレハロース、グルコース、フルクトースがBIALPの熱失活を抑制することを見出し、これらの糖類がBIALPを顕著に安定化することを示した。

4. BIALPの活性と安定性に対するポリエチレングリコール (PEG) の効果を調べた。PEGの添加とPEGの結合はともに、広いpHおよび温度領域においてBIALPの活性を上げることを見出し、PEGがBIALPを活性化することを示した。

以上のように、本論文は、ウシ小腸アルカリホスファターゼ (BIALP) を用いて化学発光酵素免疫測定法によるレプチンの測定系を開発したことに加え、溶媒工学的検討によりBIALPの活性と熱安定性を向上させ、酵素免疫測定法の高感度化と迅速化への可能性を示したものであり、酵素化学、食品工学、栄養化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成24年1月12日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降