(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3563091号
(P3563091)
(45)発行日　平成16年9月8日(2004.9.8)　(24)登録日　平成16年6月11日(2004.6.11)

(51)Int.Cl.[7]　F I
C12N 9/16　C12N 9/16 D
C12N 15/09　C12N 15/00 ZNAA

請求項の数 11　(全 42 頁)

(21)出願番号　特願平5-209943
(22)出願日　平成5年8月3日(1993.8.3)
(65)公開番号　特開平7-39373
(43)公開日　平成7年2月10日(1995.2.10)
審査請求日　平成12年7月27日(2000.7.27)

(73)特許権者　503062312
第一サントリーファーマ株式会社
東京都千代田区麹町五丁目７番地２
(74)代理人　100086324
弁理士　小野　信夫
(72)発明者　安達　栄樹
大阪府三島郡島本町若山台１丁目１番１号
サントリー株式会社生物医学研究所内
(72)発明者　辻本　雅文
大阪府三島郡島本町若山台１丁目１番１号
サントリー株式会社生物医学研究所内
(72)発明者　井上　圭三
東京都江東区越中島１－３　公務員住宅
１７－６０５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】酸化リン脂質分解酵素およびその遺伝子

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記の理化学的性質を有する酸化リン脂質分解酵素。
（１）作　用：
１－アシル－２－ω－カルボキシ脂肪酸アシル－３－ホスファチジルコリンを基質とし、２位のエステル結合を加水分解して、１－アシル－２－リゾ－３－ホスファチジルコリンを生成する。
（２）基質特異性：
２位のアシル基がω－カルボキシ脂肪酸アシル基またはアセチル基である１,２－ジアシル－３－ホスファチジルコリンを加水分解するが、２位のアシル基が炭素数６個以上の脂肪酸アシル基である１,２－ジアシル－３－ホスファチジルコリンを加水分解しない。
（３）反応至適ｐＨ：
ｐＨ７.０～８.０
（４）阻害剤：
酵素反応は、１ｍＭのｐ－ブロモフェナシルブロマイド（ＢＰＢ）および１ｍＭのジイソプロピルフロロフォスフェート（ＤＦＰ）によって阻害されるが、１ｍＭのヨードアセトアミド（ＩＡＭ）によって阻害されない。
（５）カルシウムイオンによる活性化：
酵素活性は、４ｍＭの塩化カルシウムによってわずかに増強される。
（６）分子量：

９５±５ｋＤａ（ゲル濾過法による）
（７）サブユニット：
ＳＤＳ－ポリアクリルアミド電気泳動で、分子量がそれぞれ２９ｋＤａ、３０ｋＤａおよび４５ｋＤａと評価される３個のサブユニットより構成される。
【請求項２】
次の配列（１）

```
Ser Gly Asp Glu Asn Pro Ala Ser Lys Pro Thr Pro Val Gln Asp Val
1               5                  10                  15
Gln Gly Asp Gly Arg Trp Met Ser Leu His His Arg Phe Val Ala Asp
            20                  25                  30
Ser Lys Asp Lys Glu Pro Glu Val Val Phe Ile Gly Asp Ser Leu Val
        35                  40                  45
Gln Leu Met His Gln Cys Glu Ile Trp Arg Glu Leu Phe Ser Pro Leu
    50                  55                  60
His Ala Leu Asn Phe Gly Ile Gly Gly Asp Ser Thr Gln His Val Leu
65                  70                  75                  80
Trp Arg Leu Glu Asn Gly Glu Leu Glu His Ile Arg Pro Lys Ile Val
                85                  90                  95
Val Val Trp Val Gly Thr Asn Asn His Gly His Thr Ala Glu Gln Val
            100                 105                 110
Thr Gly Gly Ile Lys Ala Ile Val Gln Leu Val Asn Glu Arg Gln Pro
        115                 120                 125
Gln Ala Arg Val Val Val Leu Gly Leu Leu Pro Arg Gly Gln His Pro
    130                 135                 140
Thr Gln Leu Arg Glu Lys Asn Arg Arg Val Asn Glu Leu Val Arg Ala
145                 150                 155                 160
Ala Leu Ala Gly His Pro Arg Ala His Phe Leu Asp Ala Asp Pro Gly
                165                 170                 175
Phe Val His Ser Asp Gly Thr Ile Ser His His Asp Met Tyr Asp Tyr
            180                 185                 190
Leu His Leu Ser Arg Leu Gly Tyr Thr Pro Val Cys Arg Ala Leu His
        195                 200                 205
Ser Leu Leu Leu Arg Leu Leu Thr Gln Asp Gln Gly Gln Gly Gly Ala
    210                 215                 220
Pro Leu Pro Glu Pro Ser Pro
```

225 230

(1)

で示されるアミノ酸配列もしくは前記配列において１個または数個のアミノ酸が置換、欠失および／または付加されたアミノ酸配列を有する２９ｋＤａのサブユニットを含む請求項第１項記載の酸化リン脂質分解酵素。

【請求項３】

次の配列（２）

Lys Glu Pro Asp Val Leu Phe Val Gly Asp Ser Met Val Gln Leu Met
1 5 10 15
Gln Gln Tyr Glu Ile Trp Arg Glu Leu Phe Ser Pro Leu His Ala Leu
20 25 30
Asn Phe Gly Ile Gly Gly Asp Thr Thr Arg His Val Leu Trp Arg Leu
35 40 45
Lys Asn Gly Glu Leu Glu Asn Ile Lys Pro Lys Val Ile Val Val Trp
50 55 60
Val Gly Thr Asn Asn His Glu Asn Thr Ala Glu Glu Val Ala Gly Gly
65 70 75 80
Ile Glu Ala Ile Val Gln Leu Ile Asn Thr Arg Gln Pro Gln Ala Lys
85 90 95
Ile Ile Val Leu Gly Leu Leu Pro Arg Gly Glu Lys Pro Asn Pro Leu
100 105 110 112

(2)

で示されるアミノ酸配列もしくは前記配列において１個または数個のアミノ酸が置換、欠失および／または付加されたアミノ酸配列を有するペプチドを部分構造として有する３０ｋＤａのサブユニットを含む請求項第１項記載の酸化リン脂質分解酵素。

【請求項４】

次の配列（３）

Val Leu Ser Gln Arg Gln Arg Asp Glu Leu Asn Arg Ala Ile Ala Asp
1 5 10 15
Tyr Leu Arg Ser Asn Gly Tyr Glu Glu Ala Tyr Ser Val Phe Lys Lys
20 25 30
Glu Ala Glu Leu Asp Met Asn Glu Glu Leu Asp Lys Lys Tyr Ala Gly
35 40 45
Leu Leu Glu Lys Lys Trp Thr Ser Val Ile Arg Leu Gln Lys Lys Val
50 55 60
Met Glu Leu Glu Ser Lys Leu Asn Glu Ala Lys Glu Glu Phe Thr Ser
65 70 75 80
Gly Gly Pro Leu Gly Gln Lys Arg Asp Pro Lys Glu Trp Ile Pro Arg
85 90 95
Pro Pro Glu Lys Tyr Ala Leu Ser Gly His Arg Ser Pro Val Thr Arg
100 105 110
Val Ile Phe His Pro Val Phe Ser Val Met Val Ser Ala Ser Glu Asp
115 120 125
Ala Thr Ile Lys Val Trp Asp Tyr Glu Thr Gly Asp Phe Glu Arg Thr
130 135 140
Leu Lys Gly His Thr Asp Ser Val Gln Asp Ile Ser Phe Asp His Ser
145 150 155 160
Gly Lys Leu Leu Ala Ser Cys Ser Ala Asp Met Thr Ile Lys Leu Trp
165 170 175
Asp Phe Gln Gly Phe Glu Cys Ile Arg Thr Met His Gly His Asp His
180 185 190
Asn Val Ser Ser Val Ala Ile Met Pro Asn Gly Asp His Ile Val Ser
195 200 205
Ala Ser Arg Asp Lys Thr Ile Lys Met Trp Glu Val Gln Thr Gly Tyr
210 215 220
Cys Val Lys Thr Phe Thr Gly His Arg Glu Trp Val Arg Met Val Arg

225 230 235 240
Pro Asn Gln Asp Gly Thr Leu Ile Ala Ser Cys Ser Asn Asp Gln Thr
245 250 255
Val Arg Val Trp Val Val Ala Thr Lys Glu Cys Lys Ala Glu Leu Arg
260 265 270
Glu His Glu His Val Val Glu Cys Ile Ser Trp Ala Pro Glu Ser Ser
275 280 285
Tyr Ser Ser Ile Ser Glu Ala Thr Gly Ser Glu Thr Lys Lys Ser Gly
290 295 300
Lys Pro Gly Pro Phe Leu Leu Ser Gly Ser Arg Asp Lys Thr Ile Lys
305 310 315 320
Met Trp Asp Val Ser Thr Gly Met Cys Leu Met Thr Leu Val Gly His
325 330 335
Asp Asn Trp Val Arg Gly Val Leu Phe His Ser Gly Gly Lys Phe Ile
340 345 350
Leu Ser Cys Ala Asp Asp Lys Thr Leu Arg Val Trp Asp Tyr Lys Asn
355 360 365
Lys Arg Cys Met Lys Thr Leu Asn Ala His Glu His Phe Val Thr Ser
370 375 380
Leu Asp Phe His Lys Thr Ala Pro Tyr Val Val Thr Gly Ser Val Asp
385 390 395 400
Gln Thr Val Lys Val Trp Glu Cys Arg
405 409

(3)

で示されるアミノ酸配列もしくは前記配列において１個または数個のアミノ酸が置換、欠失および／または付加されたアミノ酸配列を有する４５ｋＤａのサブユニットを有する請求項第１項記載の酸化リン脂質分解酵素。

【請求項５】

配列（１）で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドもしくは前記配列において１個または数個のアミノ酸が置換、欠失および／または付加されたアミノ酸配列を有し、酸化リン脂質分解酵素活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子。

【請求項６】

次の配列（４）

```
AGT GGA GAC GAG AAC CCA GCC AGC AAG CCC ACG CCA GTG CAG GAC GTG   48
Ser Gly Asp Glu Asn Pro Ala Ser Lys Pro Thr Pro Val Gln Asp Val
1               5                  10                  15
CAG GGT GAC GGG CGC TGG ATG TCC CTG CAC CAT CGG TTC GTA GCC GAC   96
Gln Gly Asp Gly Arg Trp Met Ser Leu His His Arg Phe Val Ala Asp
            20                  25                  30
AGC AAA GAT AAG GAA CCC GAA GTC GTC TTC ATC GGT GAC TCC TTG GTC  144
Ser Lys Asp Lys Glu Pro Glu Val Val Phe Ile Gly Asp Ser Leu Val
        35                  40                  45
CAG CTG ATG CAC CAG TGC GAG ATC TGG CGG GAG CTC TTT TCC CCT CTG  192
Gln Leu Met His Gln Cys Glu Ile Trp Arg Glu Leu Phe Ser Pro Leu
    50                  55                  60
CAC GCA CTT AAC TTT GGC ATT GGC GGT GAC AGC ACA CAG CAT GTG CTG  240
His Ala Leu Asn Phe Gly Ile Gly Gly Asp Ser Thr Gln His Val Leu
65                  70                  75                  80
TGG CGT CTG GAG AAT GGA GAG CTG GAA CAC ATC CGG CCC AAG ATT GTG  288
Trp Arg Leu Glu Asn Gly Glu Leu Glu His Ile Arg Pro Lys Ile Val
                85                  90                  95
GTG GTC TGG GTT GGT ACC AAC AAC CAC GGG CAC ACT GCA GAG CAG GTG  336
Val Val Trp Val Gly Thr Asn Asn His Gly His Thr Ala Glu Gln Val
            100                 105                 110
ACT GGG GGC ATC AAG GCC ATA GTG CAG CTG GTG AAC GAG CGG CAG CCC  384
Thr Gly Gly Ile Lys Ala Ile Val Gln Leu Val Asn Glu Arg Gln Pro
        115                 120                 125
CAG GCA CGG GTC GTG GTG CTG GGC CTG CTT CCT CGG GGC CAG CAC CCC  432
Gln Ala Arg Val Val Val Leu Gly Leu Leu Pro Arg Gly Gln His Pro
    130                 135                 140
ACC CAA CTT CGA GAG AAA AAC CGA CGG GTG AAT GAG CTG GTA CGG GCA  480
Thr Gln Leu Arg Glu Lys Asn Arg Arg Val Asn Glu Leu Val Arg Ala
```

```
145                 150                 155                 160
GCA CTG GCC GGC CAC CCT CGG GCC CAC TTC CTG GAC GCA GAC CCT GGC  528
Ala Leu Ala Gly His Pro Arg Ala His Phe Leu Asp Ala Asp Pro Gly
                165                 170                 175
TTT GTG CAC TCA GAT GGT ACC ATC AGC CAC CAT GAC ATG TAC GAT TAC  576
Phe Val His Ser Asp Gly Thr Ile Ser His His Asp Met Tyr Asp Tyr
            180                 185                 190
CTG CAC CTG AGC CGT CTG GGG TAC ACA CCT GTT TGC CGG GCC CTG CAC  624
Leu His Leu Ser Arg Leu Gly Tyr Thr Pro Val Cys Arg Ala Leu His
        195                 200                 205
TCC TTG CTT CTG CGT CTG CTA ACC CAA GAC CAG GGA CAG GGT GGT GCC  672
Ser Leu Leu Leu Arg Leu Leu Thr Gln Asp Gln Gly Gln Gly Gly Ala
    210                 215                 220
CCC CTG CCG GAA CCC AGC CCC                                     693
Pro Leu Pro Glu Pro Ser Pro
225                 230
```

(4)

で表される塩基配列を有する請求項第５項に記載の遺伝子。

【請求項７】

配列（２）で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドもしくは前記配列において１個または数個のアミノ酸が置換、欠失および／または付加されたアミノ酸配列を有し、酸化リン脂質分解酵素のサブユニットであるポリペプチドをコードする遺伝子。

【請求項８】

次の配列（５）

```
AAG GAG CCG GAT GTC CTG TTC GTG GGG GAC TCC ATG GTA CAG TTG ATG   48
Lys Glu Pro Asp Val Leu Phe Val Gly Asp Ser Met Val Gln Leu Met
1               5                  10                  15
CAG CAG TAT GAG ATA TGG CGA GAG CTT TTT TCT CCA CTT CAT GCA CTG   96
Gln Gln Tyr Glu Ile Trp Arg Glu Leu Phe Ser Pro Leu His Ala Leu
            20                  25                  30
AAT TTT GGA ATT GGG GGA GAT ACA ACA AGA CAT GTT TTA TGG AGA CTT  144
Asn Phe Gly Ile Gly Gly Asp Thr Thr Arg His Val Leu Trp Arg Leu
        35                  40                  45
AAG AAT GGA GAA CTG GAG AAT ATT AAA CCT AAG GTC ATC GTT GTC TGG  192
Lys Asn Gly Glu Leu Glu Asn Ile Lys Pro Lys Val Ile Val Val Trp
    50                  55                  60
GTA GGA ACA AAC AAC CAT GAA AAT ACA GCA GAG GAA GTA GCA GGT GGA  240
Val Gly Thr Asn Asn His Glu Asn Thr Ala Glu Glu Val Ala Gly Gly
65                  70                  75                  80
ATC GAG GCC ATC GTA CAG CTT ATC AAC ACA AGG CAG CCA CAG GCC AAA  288
Ile Glu Ala Ile Val Gln Leu Ile Asn Thr Arg Gln Pro Gln Ala Lys
                85                  90                  95
ATC ATT GTA TTG GGT TTG TTA CCT CGA GGT GAG AAG CCC AAC CCT CTC  336
Ile Ile Val Leu Gly Leu Leu Pro Arg Gly Glu Lys Pro Asn Pro Leu
            100                 105                 110     112
```

(5)

で表される塩基配列を有する請求項第７項に記載の遺伝子。

【請求項９】

配列（３）で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドもしくは前記配列において１個または数個のアミノ酸が置換、欠失および／または付加されたアミノ酸配列を有し、酸化リン脂質分解酵素のサブユニットであるポリペプチドをコードする遺伝子。

【請求項１０】

次の配列（６）

```
GTG CTG TCC CAG AGA CAA CGA GAT GAA CTA AAT CGA GCT ATA GCA GAT   48
Val Leu Ser Gln Arg Gln Arg Asp Glu Leu Asn Arg Ala Ile Ala Asp
1               5                  10                  15
TAT CTT CGT TCA AAT GGC TAC GAA GAA GCA TAT TCA GTT TTT AAA AAG   96
Tyr Leu Arg Ser Asn Gly Tyr Glu Glu Ala Tyr Ser Val Phe Lys Lys
            20                  25                  30
GAA GCT GAA TTA GAT ATG AAT GAA GAA TTA GAT AAG AAA TAT GCT GGT  144
Glu Ala Glu Leu Asp Met Asn Glu Glu Leu Asp Lys Lys Tyr Ala Gly
        35                  40                  45
CTT TTG GAA AAA AAA TGG ACA TCT GTT ATT AGA TTA CAA AAG AAG GTT  192
Leu Leu Glu Lys Lys Trp Thr Ser Val Ile Arg Leu Gln Lys Lys Val
    50                  55                  60
ATG GAA TTA GAA TCA AAG TTA AAT GAA GCA AAA GAA GAA TTT ACG TCG  240
Met Glu Leu Glu Ser Lys Leu Asn Glu Ala Lys Glu Glu Phe Thr Ser
65                  70                  75                  80
GGT GGA CCT CTT GGT CAG AAA AGA GAC CCA AAA GAA TGG ATT CCC CGT  288
Gly Gly Pro Leu Gly Gln Lys Arg Asp Pro Lys Glu Trp Ile Pro Arg
                85                  90                  95
CCA CCA GAA AAA TAT GCA TTG AGT GGT CAT AGG AGT CCA GTC ACT CGA  336
Pro Pro Glu Lys Tyr Ala Leu Ser Gly His Arg Ser Pro Val Thr Arg
            100                 105                 110
GTC ATT TTC CAT CCT GTG TTC AGT GTT ATG GTC TCT GCT TCA GAG GAT  384
Val Ile Phe His Pro Val Phe Ser Val Met Val Ser Ala Ser Glu Asp
        115                 120                 125
GCT ACA ATT AAG GTG TGG GAT TAT GAG ACT GGA GAT TTT GAA CGA ACT  432
Ala Thr Ile Lys Val Trp Asp Tyr Glu Thr Gly Asp Phe Glu Arg Thr
    130                 135                 140
CTT AAG GGG CAT ACA GAC TCT GTA CAG GAT ATT TCA TTC GAC CAC AGT  480
Leu Lys Gly His Thr Asp Ser Val Gln Asp Ile Ser Phe Asp His Ser
```

145 150 155 160

GGC AAG CTT CTG GCT TCA TGT TCT GCA GAT ATG ACC ATT AAG CTA TGG 528
Gly Lys Leu Leu Ala Ser Cys Ser Ala Asp Met Thr Ile Lys Leu Trp
165 170 175

GAT TTT CAG GGC TTT GAA TGC ATC AGA ACC ATG CAT GGC CAT GAC CAC 576
Asp Phe Gln Gly Phe Glu Cys Ile Arg Thr Met His Gly His Asp His
180 185 190

AAT GTT TCT TCA GTA GCC ATC ATG CCC AAT GGA GAT CAT ATA GTG TCT 624
Asn Val Ser Ser Val Ala Ile Met Pro Asn Gly Asp His Ile Val Ser
195 200 205

GCC TCA AGG GAT AAA ACT ATA AAA ATG TGG GAA GTG CAA ACT GGC TAC 672
Ala Ser Arg Asp Lys Thr Ile Lys Met Trp Glu Val Gln Thr Gly Tyr
210 215 220

TGT GTG AAG ACA TTC ACA GGA CAC AGA GAA TGG GTA CGT ATG GTG CGG 720
Cys Val Lys Thr Phe Thr Gly His Arg Glu Trp Val Arg Met Val Arg
225 230 235 240

CCA AAT CAA GAC GGC ACT CTG ATA GCC AGC TGT TCC AAT GAC CAG ACT 768
Pro Asn Gln Asp Gly Thr Leu Ile Ala Ser Cys Ser Asn Asp Gln Thr
245 250 255

GTG CGT GTA TGG GTC GTA GCA ACA AAG GAA TGC AAG GCT GAG CTT CGA 816
Val Arg Val Trp Val Val Ala Thr Lys Glu Cys Lys Ala Glu Leu Arg
260 265 270

GAA CAT GAG CAT GTG GTA GAA TGC ATT TCC TGG GCT CCT GAA AGC TCA 864
Glu His Glu His Val Val Glu Cys Ile Ser Trp Ala Pro Glu Ser Ser
275 280 285

TAT TCT TCC ATC TCT GAA GCA ACA GGA TCT GAG ACT AAA AAA AGT GGC 912
Tyr Ser Ser Ile Ser Glu Ala Thr Gly Ser Glu Thr Lys Lys Ser Gly
290 295 300

AAA CCT GGG CCA TTC TTA CTG TCC GGA TCC AGG GAC AAG ACT ATC AAG 960

```
Lys Pro Gly Pro Phe Leu Leu Ser Gly Ser Arg Asp Lys Thr Ile Lys
305                 310                 315                 320
ATG TGG GAT GTC AGT ACT GGC ATG TGC CTT ATG ACC CTG GTG GGT CAT 1008
Met Trp Asp Val Ser Thr Gly Met Cys Leu Met Thr Leu Val Gly His
                325                 330                 335
GAT AAC TGG GTA CGT GGA GTT CTG TTC CAT TCT GGG GGG AAG TTT ATT 1056
Asp Asn Trp Val Arg Gly Val Leu Phe His Ser Gly Gly Lys Phe Ile
            340                 345                 350
TTG AGT TGC GCT GAT GAC AAG ACC CTG CGC GTG TGG GAT TAC AAG AAC 1104
Leu Ser Cys Ala Asp Asp Lys Thr Leu Arg Val Trp Asp Tyr Lys Asn
        355                 360                 365
AAG CGA TGC ATG AAG ACC CTC AAT GCG CAT GAA CAC TTT GTT ACC TCC 1152
Lys Arg Cys Met Lys Thr Leu Asn Ala His Glu His Phe Val Thr Ser
    370                 375                 380
TTG GAT TTC CAT AAG ACG GCC CCA TAT GTG GTT ACT GGC AGT GTA GAT 1200
Leu Asp Phe His Lys Thr Ala Pro Tyr Val Val Thr Gly Ser Val Asp
385                 390                 395                 400
CAA ACA GTA AAG GTG TGG GAG TGT CGT                         1227
Gln Thr Val Lys Val Trp Glu Cys Arg
                405                 409
```

(6)

で表される塩基配列を有する請求項第９項に記載の遺伝子。

【請求項１１】

配列（１）で示されるアミノ酸配列もしくは前記配列において１個または数個のアミノ酸が置換、欠失および／または付加されたアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含み、分子量が２９ｋＤａである酸化リン脂質分解酵素活性を有するペプチド。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【産業上の利用分野】

本発明は新規なリン脂質分解酵素に関し、さらに詳細には、動物細胞質内における酸化リン脂質消去機構に重要な役割を果たしている、酸化リン脂質分解酵素およびこれをコードする遺伝子に関する。

【０００２】

【従来の技術】

様々な酸素ストレスにより、膜構成成分であるリン脂質が酸化され、生体に種々な障害を惹起することが知られている。　生体にはこのような酸素ストレスに対する防御機構が備わっており、酸素ストレスによって生じた酸化リン脂質を酸化リン脂質分解酵素によって速やかに分解し、連鎖的酸化反応による障害を回避するとともに、リン脂質分子の修復に繋がるものと考えられている。

【０００３】

この防御機構で重要な役割を担っている酸化リン脂質分解酵素については、正常リン脂質を分解するのと同一のホスホリパーゼA_2がその役割を担っているとする見解（Ｓｅｖａｎｉａｎ，　Ａ．，　Ｓｔｅｉｎ，　Ｒ．　Ａ．　ａｎｄ　Ｍｅａｄ，　Ｊ．　Ｆ．　Ｌｉｐｉｄｓ　１６，　７８１－７８９．１９８１）もあるが、ホスホリパーゼA_2の酸化リン脂質分解活性が低いため、実際の生体内では、別の酵素がこの役割を担っていると考えられていた。

【０００４】

【発明が解決しようとする課題】

生体内において、酸素ストレスにより生じる様々な障害を防ぐためには、まず、生体内の酸素ストレスに対する防御機構を解明し、これに係わる酸化リン脂質分解酵素を特定することが必要である。

そして、このためには、この酸化リン脂質分解酵素を分離、精製することが必要であり、更に、この酵素を応用して抗酸素ストレス剤を開発するためには、この酵素の遺伝子を解明する必要がある。

【０００５】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、生体組織内に存在する酸化リン脂質分解酵素を分離、精製すべく研究に着手したが、最初に、従来の酸化リン脂質分解酵素のアッセイ法であるＴＬＣ（薄層クロマトグラフィー）法では、一度に１２サンプル程度しか測定できず、しかも、結果が判明するのに５時間もかかり、検体数や精製酵素の失活等を考慮すると使用に耐えないものであることがわかった。

そこで、まず、新しい酸化リン脂質分解酵素のアッセイ法について検討を行ない、２時間程度の所要時間で、一度に４０サンプル程度をアッセイできる方法として、^{14}Ｃでラベルした酸化ホスファチジルコリン（酸化ＰＣ）を基質とする方法を確立した。

【０００６】

更に、研究を進めた結果、酸化リン脂質分解酵素は、酸化ＰＣと同様に、１－ヘキサデシル－２－アセチル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（Ｐｌａｔｌｅｔ　ａｃｔｉｖａｔｉｎｇ　ｆａｃｔｏｒ，　ＰＡＦ）も基質とすることを見出し、この知見に基づいて^{3}ＨラベルしたＰＡＦを基質とする酸化リン脂質分解酵素アッセイ法も確立した。

【０００７】

このＰＡＦを用いる方法は、前記酸化ＰＣを用いる系に較べて、▲１▼　ＰＡＦは純物質であるため、混合物である酸化ＰＣを用いる場合より系を単純化できる、▲２▼　２位の加水分解産物は酢酸であるので、溶媒分画の工夫により、未反応のＰＡＦと完全に分離することができる、▲３▼　^{3}ＨラベルしたＰＡＦが市販されているので、安定したアッセイ系を構築することができる等の利点を有するものである。

【０００８】

本発明者らは、上記の測定法により、動物の種々の臓器の可溶性画分の酸化リン脂質分解酵素活性を測定し、該酵素活性が、脳、腎臓等の臓器に広く分布していることを見出した。

【０００９】

そこで、本発明者は、酸化リン脂質分解酵素の取得原料としてウシ脳を選択し、各種の分離、精製手段を利用し、前記アッセイ法で酵素活性を追跡しつつ純度を高めていった結果、ほぼ純品として酸化リン脂質分解酵素を得た。

また、この酸化リン脂質分解酵素のペプチド配列から、公知方法に従って当該酵素をコードする遺伝子を見いだした。

本発明は、これら知見に基づき完成されたものであり、生体内の酸素ストレス防御機構に重要な役割りをはたす酸化リン脂質分解酵素と、この酵素を遺伝子工学的に合成するために重要な当該酵素をコードする遺伝子を提供するものである。

【００１０】

本発明の酸化リン脂質分解酵素は、当該酵素を含有する動物等の各種生体組織から、酸化

リン脂質分解酵素活性を指標とし、公知方法で分離、精製することにより得られるが、次の理由からウシの脳を利用することが好ましい。

【００１１】

即ち、脳においては、▲１▼ 重要な抗酸化剤であるα－トコフェロール（ビタミンＥ）の濃度が他の臓器に比べて低いこと（Ｆａｕｄ，Ｊ． ａｎｄ ＭｃＮａｌｌｙ， Ｗ． Ｐ．， Ａｒｃｈ． Ｉｎｔ． Ｐｈａｒｍａｃｏｄｙｎ． ２５０， ４－１７ １９８１）、▲２▼ 虚血再灌流が発生することが多いこと、▲３▼ 単位重量あたりの酸素消費量が他の臓器に比べ圧倒的に多いこと、▲４▼ 脳神経細胞はほとんど分裂再生することがないので、一旦障害が生じるとそのダメージが大きいこと等の理由により、酸化リン脂質による障害が問題になりやすく、この障害を防ぐ酸化リン脂質分解酵素の存在量が多いと予想される。

また、生体内の存在量が少ない酵素を得るためには、多量の原料が必要とされるが、現在、大量の脳を容易に入手することができる大型動物として、ウシが最適である。

従って、酸化リン脂質分解酵素取得のための原料としてウシの脳を利用することが好ましいのである。

【００１２】

以下、ウシ脳を原料とした場合を例に取り、酸化リン脂質分解酵素を得る方法を具体的に説明する。

【００１３】

酸化リン脂質分解酵素を得るための原料であるウシ脳としては、屠殺直後のウシ全脳から、表面血管、白質、間脳を除いた後の灰白質を利用する。

【００１４】

このウシ脳を、適当な緩衝液（例えば、２５０ｍＭのショ糖と１ｍＭのＥＤＴＡを含むｐＨ７．４の１０ｍＭのトリス－塩酸緩衝液）で洗浄後、同じ緩衝液でホモジナイズし、遠心分離して細胞質可溶性画分を得る。

【００１５】

この細胞質可溶性画分を常法に従って硫安分画して、４５％～６０％ペレット（４５％飽和上清にさらに６０％飽和になるまで硫安を加えた時に生じる沈澱区分）を得る。

【００１６】

このペレット画分を、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等を組み合わせて、Ｓｕｐｅｒｏｓｅ １２ カラム（ファルマシア）で単一ピークを与えるまで精製することにより、酸化リン脂質分解酵素を得ることができる。

【００１７】

このようにして得られた本酵素は、次のような理化学的性質を有していた。

（１）作用：

１－アシル－２－ω－カルボキシ脂肪酸アシル－３－ホスファチジルコリンを基質とし、２位のエステル結合を加水分解して、１－アシル－２－リゾ－３－ホスファチジルコリンを生成する。

（２）基質特異性：

２位のアシル基がω－カルボキシ脂肪酸アシル基またはアセチル基である１，２－ジアシル－３－ホスファチジルコリンを加水分解するが、２位のアシル基が炭素数６個以上の脂肪酸アシル基である１，２－ジアシル－３－ホスファチジルコリンを加水分解しない。

（３）反応至適ｐＨ：

ｐＨ７．０～８．０

（４）阻害剤：

酵素反応は、１ｍＭのｐ－ブロモフェナシルブロマイド（ＢＰＢ）および１ｍＭのジイソプロピルフロロフォスフェート（ＤＦＰ）によって阻害されるが、１ｍＭのヨードアセトアミド（ＩＡＭ）によって阻害されない。

（５）カルシウムイオンによる活性化：

酵素活性は、４ｍＭの塩化カルシウムによってわずかに増強される。
（６）分子量：　９５±５ｋＤａ（ゲル濾過法による）
（７）サブユニット：
ＳＤＳ－ポリアクリルアミド電気泳動の結果では、本酵素は分子量がそれぞれ２９ｋＤａ、３０ｋＤａおよび４５ｋＤａと評価される３個のサブユニットより構成される。
【００１８】
本発明の酸化リン脂質分解酵素は、上記（７）に記し、また後述の実施例で詳しく示すように、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）の結果により、４５ｋＤａ、３０ｋＤａおよび２９ｋＤａの３つのサブユニットから構成されるヘテロトリマーであることが明らかにされている。
【００１９】
また、本酵素をヘパリンセファロースまたは硫酸化セルロファインカラム処理に付すことにより、４５ｋＤａがはずれた３０ｋＤａ－２９ｋＤａ複合体を得ることができ、得られたこの複合体は本酵素と同様の活性を示していた。
一方、本酵素をトリチウムラベルしたジイソプロピルフロロフォスフェートと反応させると、２９ｋＤａのサブユニットのみが特異的にラベルされるので、本酵素の活性は２９ｋＤａのサブユニット中に存在する活性セリン残基が担っているものと考えられる。　従って、２９ｋＤａサブユニットは、単独で合成酸化リン脂質分解酵素等として使用できるものである。
【００２０】
本発明の酸化リン脂質分解酵素を構成する各サブユニットの一次構造の決定は、常法に従い、相当する完全長ｃＤＮＡをクローニングして塩基配列を決定し、これに相当するアミノ酸配列を決定すれば良い。
即ち、本酵素の各サブユニットを酵素分解によりペプチド断片を得て、このアミノ酸配列を決定した後、これに相当する塩基配列を有するオリゴマーを合成し、これをプローブとしてｃＤＮＡライブラリーより完全長ｃＤＮＡをクローン化する。
得られた完全長ｃＤＮＡの塩基配列を自動シーケンサーで決定し、翻訳開始コドンを推定した後、対応するアミノ酸配列を決定することにより各サブユニットのアミノ酸配列が決定できる。
【００２１】
このようにして得られた本酵素の各サブユニットをコードする遺伝子の塩基配列は、２９ｋＤａのものについては、後記配列表の配列４で、３０ｋＤａのものについては配列５で、４５ｋＤａのものについては、配列６でそれぞれ示される通りである。
また、これらから推定される本酵素の各サブユニットのアミノ酸配列は、２９ｋＤａのものが後記配列表の配列１、３０ｋＤａのものが配列２、４５ｋＤａのものが配列３でそれぞれ示されるとおりである。
【００２２】
なお、本明細書において、相同性を有するアミノ酸配列とは、配列の一部にアミノ酸の置換、欠失、付加等があるが、機能は元のアミノ酸配列で表されるペプチドと同一であるものをいう。
【００２３】
【作用】
以上のようにして得られた本発明の酸化リン脂質分解酵素は、後記実施例においても示すように、酸化リン脂質を選択的に分解するものである。
従って、本酵素は細胞原形質膜やオルガネラ膜が酸化されて生じる酸化リン脂質を分解し、連鎖的酸化反応による障害から膜を守ると共にリン脂質分子の修復再生を促す作用を有するものと考えられる。
【００２４】
【発明の効果】
本発明の酸化リン脂質分解酵素は、選択的に酸化リン脂質を分解するので、生体内のリン

脂質の酸化に起因して生じる疾患、例えば、虚血再灌流による組織障害、炎症、有機塩素化合物等による肝障害、成人呼吸促進症候群等の疾患の予防・治療用の医薬や生化学試薬として利用できるものである。

【００２５】

また、本発明の酸化リン脂質分解酵素をコードする遺伝子は、これを遺伝子操作の手法により大腸菌等の宿主で発現させることにより、本酵素を大量に得ることも可能である。

【００２６】

更に、上記遺伝子をＣＨＯ細胞等に導入して、酸化リン脂質消去機構を評価するアッセイ系を構築することもできる。

【００２７】

【実施例】

以下、実施例および参考例により、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に何ら制約されるものではない。

【００２８】

参　考　例　１．

酸化リン脂質分解酵素基質の調製：

（ａ）１－パルミトイル－２－［１－^{14}Ｃ］－リノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（２－^{14}Ｃ－リノレオイルＰＣ）　の合成

１－パルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（リゾＰＣ）５μｍｏｌ（Ｂａｃｈｅｍ　Ｆｅｉｎｃｈｅｍｉｋａｌｉｅｎ　社）と［１－^{14}Ｃ］－リノレイン酸　３．５μｍｏｌ（２０３μＣｉ）（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｎｕｃｌｅａｒ　社）を混合し、エバポレーション後、６．２５ｍｌのリン酸バッファー（ｐＨ　７．４）にサスペンドした。

【００２９】

これに、ラット肝臓のミクロソームフラクション（７．２ｍｇ／ｍｌ）を１．５ｍｌ、１００ｍＭ　ＡＴＰを１．２５ｍｌ、１００ｍＭ　$MgCl_2$　を１．２５ｍｌ、５ｍＭ　ＣｏＡを０．７５ｍｌ加え、３７℃で３０分間インキュベーションして、Ｂｌｉｇｈ　＆　Ｄｙｅｒ法（Ｂｌｉｇｈ，　Ｅ．　Ｇ．　ａｎｄ　Ｄｙｅｒ，　Ｗ．　Ｊ．　Ｃａｎ．　Ｊ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　Ｐｈｙｓｉｏｌ．　３７，　９１１　１９５９）　により、総脂質を抽出後、溶媒を除去した。

【００３０】

これを少量のクロロホルムに溶かし、ＣＭ　セルロース　５２カラム（１．５×５．０ｃｍ）（Ｗｈａｔｍａｎ　社）　に付し、クロロホルム／メタノール（９９：１）混液でカラムを洗浄して未反応のリノール酸を溶出した後、クロロホルム／メタノール（９６：４）の混液で溶出した。　ＴＬＣでモニターしながら、全溶出画分を集め、溶媒除去後、クロロホルム／メタノール（２：１）の混液に溶解して保存した。　放射活性の回収率は約５５％であった。

【００３１】

（ｂ）比放射活性（スペック）の調整と酸化

上記（ａ）で得られた　２－^{14}ＣリノレオイルＰＣ（ホット）と非放射性（コールド）の２－リノレオイルＰＣ（Ｓｅｒｄａｒｙ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　社）を混合してスペックを約３０００ｄｐｍ／ｎｍｏｌに調整し、Ｇｅｒｌａｃｈらの方法（Ｇｅｒｌａｃｈ，　Ｅ．　ａｎｄ　Ｄｅｕｔｉｃｋｅ，　Ｂ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　Ｊ．　３３７，　４４７．　１９６９）でリンの定量を行って正確なスペックを測定した。

【００３２】

スペック調製後のＰＣは　Ｓｈｉｍｏｊｏらの方法（Ｓｈｉｍｏｊｏ，　Ｔ．，　Ａｂｅ，　Ｍ．　ａｎｄ　Ｏｈｔａ，Ｍ．　Ｊ．　Ｌｉｐｉｄ　Ｒｅｓ．　１５，　５２５－５２７．　１９７４）に従い酸化した。　即ち、スペック調製後のＰＣ　７．５μｍｏｌを溶媒除去後、９０％酢酸　１．５ｍｌに溶解し、これに、２４ｍＭ　過マンガン酸カリウ

ム／２０ｍＭ　過ヨウ素酸ナトリウム水溶液から成る酸化溶液を撹拌しながら２００μｌずつ２０回（計４ｍｌ）加え、更に室温で２時間撹拌した。

【００３３】

反応終了後、２０％亜硫酸ナトリウム少量を加え、未反応の酸化剤を失活させた後、１Ｎ塩酸でｐＨを２に調整し、Ｂｌｉｇｈ　＆　Ｄｙｅｒ法で３回抽出した。　総抽出物を合わせて溶媒を除去し、少量のクロロホルムに溶解し、分取用シリカゲルプレートを用いる薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）に付して、クロロホルム／メタノール／アンモニアの混液（６５：３５：１０）で展開した。　コントロールとして同時に２－リノレオイルＰＣ及び２－アゼラオイルＰＣの標品の展開した。

【００３４】

展開後、ヨード発色によって同定されたコントロールの位置と、ＴＬＣスキャナーによる放射活性の分布を参考に、酸化ＰＣに相当する区分を分取した。　これを酢酸酸性下にＢｌｉｇｈ　＆　Ｄｙｅｒ　法で３回抽出し、溶媒除去後クロロホルム／メタノール混液（２：１）に溶解して－２０℃で保存した。

【００３５】

参　考　例　　２．

酸化ＰＣを用いる酸化リン脂質分解酵素活性の測定：

酸化ＰＣを用いる酸化リン脂質分解酵素活性の測定は、基質として参考例１で得られた酸化ＰＣを２０ｎｍｏｌ（６００００　ｄｐｍ）を含む、最終濃度５０ｍＭのトリス－塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）に、必要に応じて５ｍＭのＥＤＴＡまたは４ｍＭの$CaCl_2$を加え、これに測定すべき試料（酵素源）を加えて２５０μｌとする。

【００３６】

氷上でこれらを試験管内で混合後、３７℃、３０分インキュベーションした後、クロロホルム／メタノール混液（１：１）５６０μｌを加えて反応を停止させる。５分間ボルテックスミキサーで激しく混合した後、３０００ｒｐｍで５分間遠心分離し、二層に分ける。　上層を３００μｌ分取し、クリアゾルＩ（ナカライテスク）３ｍｌと混合し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定する。　放射活性の強さから、２位の加水分解によって生じたジカルボン酸の量を計算して酵素活性を算出する。

【００３７】

参　考　例　　３．

ＰＡＦを用いる酸化リン脂質分解酵素活性の測定：

（ａ）　基質の調製

１－ヘキサデシル－２－［^{3}Ｈ］アセチル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ホットＰＡＦ、Ｂａｃｈｅｍ　Ｆｅｉｎｃｈｅｍｉｋａｌｉｅｎ　社）と非放射性ＰＡＦ（コールドＰＡＦ）を混合してスペックを約３０００ｄｐｍ／ｎｍｏｌに調整し、同様にリンの定量を行って正確なスペックを測定した。

【００３８】

（ｂ）　ＰＡＦを用いる酸化リン脂質分解酵素活性の測定

ＰＡＦを用いる酸化リン脂質分解酵素活性の測定は参考例２と同様に行った。即ち、基質としてステップ１で得られたラベル化ＰＡＦの２０ｎｍｏｌ（６００００ｄｐｍ）を含む、最終濃度５０ｍＭのトリス－塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）に、必要に応じて５ｍＭのＥＤＴＡまたは４ｍＭの$CaCl_2$を加え、これに測定すべき試料（酵素源）を加えて２５０μｌとする。

【００３９】

氷上でこれらを試験管内で混合後、３７℃、３０分インキュベーションした後、クロロホルム／メタノール混液（４：１）２．５ｍｌを加えて反応を停止させる。水　０．２５ｍｌを加えた後、５分間ボルテックスミキサーで激しく混合して、３０００ｒｐｍで５分間遠心分離し、二層に分ける。　上層を６００μｌ分取し、クリアゾルＩ（ナカライテスク）３ｍｌと混合し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定する。　放射活性の強さから、２位の加水分解によって生じた酢酸の量を計算して酵素活性を算出する。

【００４０】
実　施　例　　１．
ウシ脳からの酸化リン脂質分解酵素の精製：
（ａ）　ウシ脳細胞質可溶性画分の調製
ウシ脳約５００ｇから、表面血管、白質、間脳を除き、約３００ｇの灰白質を得た。　これを２５０ｍＭのシュークロースと１ｍＭのＥＤＴＡを含む１０ｍＭのトリス－塩酸緩衝液（ｐＨ７．４、以下ＳＥＴバッファーと称す）で３回洗浄した後、約６００ｍｌのＳＥＴバッファーを加え、ナショナルＭＸ－Ｖ３５０型ミキサーで３０秒間ホモジナイズした。
【００４１】
これを計５回繰り返した。　得られたホモジネートをトミー遠心機（Ｎｏ．９，　１０ｋｒｐｍ）で２０分間遠心して固形物を除いた後、上清を１時間、１０万Ｇ超遠心（日立－７０Ｐ，　ＲＰ４２　ｒｏｔｅｒ，　４０ｋｒｐｍ）処理して、約５７０ｍｌのウシ脳細胞質可溶性画分を得た。　ローリー法による蛋白濃度は約１１．６ｍｇ／ｍｌであった。
【００４２】
（ｂ）　硫安分画
上記（ａ）で得たウシ脳細胞質可溶性画分３００ｍｌに、常法に従って固形硫安（和光純薬の酵素精製用）をオズボーンの飽和度で、４５％飽和になるように氷中撹拌しながら少しづつ加えた。　添加終了後さらに３０分間撹拌し、トミー遠心機（Ｎｏ．９，　１０ｋｒｐｍ）で２０分間遠心して沈殿と上清に分離した。　上清に６０％飽和になるように更に固形硫安を加え、同様に処理して沈澱を得た（この画分を４５～６０％ペレットと称する）。
【００４３】
（ｃ）　ブチルトヨパールカラムクロマトグラフィー
上記（ｂ）で得た４５～６０％ペレットを１ｍＭのＥＤＴＡを含む１０ｍＭのトリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）１５０ｍｌにサスペンドし、５０００ｍｌの同緩衝液に対して透析した。　透析後、３０％飽和になるように硫安を加え、僅かに生じた沈殿を遠心分離（３５００ｒｐｍ，　１０分）で除去した。　この遠心上清を３０％飽和の硫安を含む上記緩衝液で平衡化したブチルトヨパール６５０Ｍ（東ソー）のカラム（２．５×１８ｃｍ）に付し、３０％飽和の硫安を含む上記緩衝液で洗浄した後、上記緩衝液中、５００ｍｌの３０％飽和から０％飽和の硫安の直線濃度勾配で溶出した。
【００４４】
２８０ｎｍの紫外吸収でモニターしながら８ｍｌずつ分画し、各フラクションを５ｍＭのＥＤＴＡを含むＰＡＦの系で活性を測定した。　メインの活性区分は１０％飽和硫安濃度付近で溶出される紫外吸収のピークに一致して認められた。
この結果を図１に示す。
【００４５】
（ｄ）　ＤＥＡＥセファロースＣＬ－６Ｂカラムクロマトグラフィー
上記（ｃ）で得た活性区分を、１ｍＭのＥＤＴＡおよび１０％のグリセロールを含む１０ｍＭのトリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．４、以下ＴＥＧバッファーと称する）５０００ｍｌに対して透析した。　透析後、ＴＥＧバッファーで平衡化したＤＥＡＥセファロースＣＬ－６Ｂ（ファルマシア）のカラム（１．５×１５ｃｍ）に付し、ＴＥＧバッファーで洗浄した後、ＴＥＧバッファー中４００ｍｌの０ｍＭから３００ｍＭのＮａＣｌの直線濃度勾配で溶出した。
【００４６】
２８０ｎｍの紫外吸収でモニターしながら６ｍｌずつ分画し、各フラクションを５ｍＭＥＤＴＡを含むＰＡＦの系で活性を測定した。　メインの活性区分はＮａＣｌ濃度１３０ｍＭ付近に紫外吸収のピークと分離して認められた。
この結果を図２に示す。
【００４７】

（ｅ）　ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー
上記（ｄ）で得た活性区分を、そのまま、５ｍＭの２－メルカプトエタノールと１０％のグリセリンを含むカリウム－燐酸緩衝液（ｐＨ６．８、以下バッファーＡと称する）で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム（１．５×１５ｃｍ）に付し、バッファーＡで洗浄した後、４００ｍｌの１０ｍＭから３００ｍＭのKH_2PO_4－ＫＯＨの直線濃度勾配で溶出した。
【００４８】
２８０ｎｍの紫外吸収でモニターしながら６ｍｌずつ分画し、各フラクションを５ｍＭＥＤＴＡを含むＰＡＦの系で活性を測定した。　メインの活性区分は、KH_2PO_4－ＫＯＨ濃度１１０ｍＭ付近に紫外吸収のピークと一致して認められた。　この精製ステップでの本酵素の純度は約７０％であった。
この結果を図３に示す。
【００４９】
（ｆ）　ｍｏｎｏ　Ｑ　ＦＰＬＣカラムクロマトグラフィー
上記（ｅ）で得た活性区分を、３０００ｍｌのバッファーＡに対して透析後、ＦＰＬＣシステム（ファルマシア）を用いて、バッファーＡで平衡化したｍｏｎｏ　Ｑカラム（ファルマシア）に０．５ｍｌ／ｍｉｎの流速で吸着させた。　カラムを同じ流速で１０ｍｌのバッファーＡで洗浄した後、バッファーＡ中、２８ｍｌの０ｍＭから２００ｍＭのＮａＣｌの直線濃度勾配で溶出した。
【００５０】
２８０ｎｍの紫外吸収でモニターしながら０．５ｍｌずつ分画し、各フラクションを５ｍＭＥＤＴＡを含むＰＡＦの系で活性を測定した。　メインの活性区分は、ＮａＣｌ濃度１２５ｍＭ付近に紫外吸収のピークと一致して認められた。
この結果を図４に示す。
【００５１】
（ｇ）　精製サンプルのゲル濾過による純度確認
上記（ｆ）で得た活性区分を、１００μｌを、ＦＰＬＣシステムを用いて、バッファーＡで平衡化したＳｕｐｅｒｏｓｅ　１２カラム（ファルマシア）に０．２５ｍｌ／ｍｉｎの流速で添加した。　カラムを２８０ｎｍの紫外吸収でモニターしながら同じ流速で展開すると、図５に示すように９５ｋＤａの箇所に１ピークの吸収が認められ、酵素活性もこのピークに一致して認められた。
【００５２】
ここまでの精製で得られた各ステップの精製テーブルを表１に示す。

表　1

精製ステップ	全活性*	全蛋白 (mg)	比活性**	精製度 (倍)	回収率 (%)
可溶性画分	4800	6600	0.72	1	100
硫安分画	3360	690	4.9	6.8	70.0
ﾌﾞﾁﾙﾄﾖﾊﾟｰﾙ	1520	81	18.8	26.3	31.7
DEAE ｾﾌｧﾛｰｽ	1210	2.7	448	622	25.2
ﾊｲﾄﾞﾛｷｼｱﾊﾟﾀｲﾄ	907	0.9	1008	1400	18.9
Mono Q FPLC	435	0.3	1450	2010	9.1

* 単位は、nmol/minである。

** 単位は、nmol/min/mgである。

【００５３】

実　施　例　　２．

酸化リン脂質分解酵素の性状及び構造解析：

（ａ）　分子量の測定

実施例１の（ｇ）で、本酵素の分子量が約１００ｋＤａと評価されたが、本酵素を　Ｌａｅｍｍｌｉ（Ｌａｅｍｍｌｉ，　Ｕ．　Ｋ．，　Ｎａｔｕｒｅ　２２７，　６８０－６８５，　１９７０）の方法に従って、ゲル濃度１２％、２－メルカプトエタノール存在下でＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を行うと、図６に示すように、２９ｋＤａ、３０ｋＤａおよび４５ｋＤａに相当する３個のスポットを与えた。

このことから、本酵素は２９ｋＤａ、３０ｋＤａおよび４５ｋＤａの３個のサブユニットからなるヘテロトリマー構造をしていることが示唆された。

【００５４】

（ｂ）　ヘパリンセファロースによる、４５ｋＤａサブユニットの分離

実施例１の（ｅ）の粗精製画分　１５ｍｌをバッファーＡに対して透析し、バッファーＡで平衡化したヘパリンセファロース（ファルマシア）のカラム（１×５ｃｍ）に通液すると、酵素活性の約８０％は吸着されずにカラムを素通りした。　通液後、バッファーＡでカラムを洗浄すると、活性はテーリングしながら徐々に溶出された。

【００５５】

約３０ｍｌの洗浄後に、バッファーＡ中、３０ｍｌの０Ｍから１．５ＭのＮａＣｌ濃度の直線濃度勾配で溶出すると、酵素活性はＮａＣｌ約０．３Ｍ付近に溶出された。　これらのフラクションを（ａ）の方法でＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を行うと、通過液には、２９ｋＤａ、３０ｋＤａおよび４５ｋＤａの３個のスポットが、溶出区分には、２９ｋＤａおよび３０ｋＤａの２個のスポットが観察された。　さらに、ＮａＣｌ約０．６Ｍ付近に溶出されるフラクションは、４５ｋＤａの１個のスポットのみを与えた。

【００５６】

（ｂ）の溶出区分は、実施例１の（ｇ）の方法で、分子量約５０ｋＤａの箇所にシングルピークを与えた。　このことから、この溶出区分はもとの酵素から４５ｋＤａのサブユニットがはずれた構造を有すると推定された。　また、この溶出区分は、もとの酵素と同様の活性を有していた。

【００５７】
（ｃ）　精製酵素の基質特異性の測定
実施例１の（ｆ）で得られた本精製酵素の基質特異性を、ＰＡＦ、ＰＣ、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）、リゾＰＣおよび酸化ＰＣについて検討した。　ＰＣ、ＰＥおよびリゾＰＣに対する分解活性は、４ｍＭ　$CaCl_2$の存在下、Ｄｏｌｅらの方法（Ｄｏｌｅ，　Ｖ．　Ｐ．　ａｎｄ　Ｍｅｎｅｒｔｚ，　Ｈ．　Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．　２５３，　２５９５（１９６０））で測定した。　酸化ＰＣおよびＰＡＦに対する活性は、参考例２および３の方法で測定した。　結果を表２に示す。
【００５８】

表　２
基　質　特　異　性

基　質	比活性　(nmol/min/mg)
ＰＡＦ	１．４５
ＰＣ	分解せず
ＰＥ	分解せず
リゾＰＣ	分解せず
酸化ＰＣ	０．８６

【００５９】
表２の結果から、本酵素は酸化ＰＣおよびＰＡＦに対して分解活性を示すが、正常のＰＣおよびＰＥに対しては全く分解活性を示さず、また、２位が既に加水分解されているリゾＰＣに対しても全く分解活性を示さないことが判明した。即ち、本酵素は酸化リン脂質分解の最初のステップに作用すると推定された。
【００６０】
（ｄ）　精製酵素の阻害剤感受性の測定
実施例１の（ｆ）で得られた精製酵素（４０ｍｇ／ｍｌ）に、０．１ｍＭおよび１ｍＭの最終濃度になるようにヨードアセトアミド（ＩＡＭ）、ｐ－ブロモフェナシルブロマイド（ＢＰＢ）およびジイソプロピルフロロフォスフェート（ＤＦＰ）を加え、室温で１０分間プレインキュベーション後の活性の変化を調べた。結果を表３に示す。
【００６１】

表　3

酵素阻害性剤感受性

酵素阻害剤	最終濃度（mM）	阻　害（%）
ＩＡＭ	0.1	0
	1.0	0
ＢＰＢ	0.1	20
	1.0	97
ＤＦＰ	0.1	96
	1.0	99

【００６２】
表３に示すように、精製酵素はＤＦＰによって強く阻害され、また、１ｍＭという高濃度のＢＰＢによっても阻害されたが、ＩＡＭによっては全く阻害されなかった。このことから、本酵素の活性中心には不可欠なセリン残基及びヒスチジン残基が存在することが推定された。
【００６３】
（ｅ）　トリチウムラベルによる、活性を担うサブユニットの同定
上記（ｄ）で示したように、本精製酵素はＤＦＰによって強く阻害されるので、標識ＤＦＰを用いて活性を担うサブユニットを同定した。　すなわち、精製酵素５０μｇ（５０μｌのバッファーＡ溶液）にトリチウムラベルしたＤＦＰ（１０μＣｉ、１．１６ｎｍｏｌ、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｎｕｃｌｅａｒ）を加え、室温で３０分間インキュベートした後、実施例２（ａ）の方法でＳＤＳ－ＰＡＧＥを行い、ＣＢＢ染色後、エンハンサー（En^3Hance，　Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｎｕｃｌｅａｒ）で１時間処理した。
【００６４】
処理後ゲルを乾燥し、フィルム（ＸＲＰ－５、コダック）と密着させて、－７０℃で４日間露光した。　その結果、２９ｋＤａのサブユニットだけが特異的にラベルされ、これに活性セリン残基が存在することが明かとなった。
【００６５】
（ｆ）酵素活性のｐＨ依存性の測定
参考例３の方法を用い、５ｍＭのＥＤＴＡ存在下に緩衝液を代えて反応ｐＨを４．０～９．０の間、０．５きざみで変化させて（ｐＨ４．０～５．５の間は１００ｍＭ酢酸緩衝液、ｐＨ５．５～７．０の間は１００ｍＭトリス－マレート緩衝液、ｐＨ７．０～９．０の間は１００ｍＭトリス－塩酸緩衝液を用いた）酵素活性を測定した。　その結果、本酵素の至適ｐＨは７．０～８．０であることが判明した。
【００６６】
（ｇ）カルシウムイオンの酵素活性に及ぼす影響の評価
参考例３の測定法で５ｍＭのＥＤＴＡの代わりに４ｍＭの$CaCl_2$を加えて酵素活性を測定した。その結果、カルシウムの添加により、酵素活性は約１．３倍に増強されることが判明した。
【００６７】
実　施　例　　３．
精製酵素のペプチド断片の一次構造の決定：

精製した本酵素の一次構造を解析する目的で、本酵素を還元ピリジルエチル化した後ＡＰＩ消化し、各ペプチド断片の構造決定を試みた。　ＡＰＩ消化後、逆相ＨＰＬＣにより各ペプチド断片を回収し、１０個のペプチド断片について常法に従い、アミノ酸シーケンサーで構造決定を行った。　各ペプチド断片のアミノ酸配列を以下の配列番号７～１６に示す。

【００６８】

(配列番号 7)

Ile Val Val Val Trp Val Gly Thr Asn Asn His Gly His Thr Ala Glu
1 5 10 15

(配列番号 8)

Ala Ile Val Gln Leu Val Asn Glu Arg Gln Pro Gln Ala Arg Val Val Val
1 5 10 15

Leu Gly Leu Leu Pro Arg Gly Gln His Pro
20 25

(配列番号 9)

Asp Lys Glu Pro Glu Val Val Phe Ile Gly Asp Ser Leu Val Gln Leu Met
1 5 10 15

His Gln Cys Glu Ile Trp Arg Glu Leu Phe Ser Pro Leu His Ala Leu Asn
20 25 30

Phe Gly Ile
35

【００６９】

(配列番号１０)

Asp Lys Glu Pro Asp Val Leu Phe Val Gly Asp Ser Met Val Gln Leu
1 5 10 15

(配列番号１１)

Ile Ile Val Leu Gly Leu Leu Pro Arg Gly Glu Lys Pro Asn Pro Leu Arg
1 5 10 15

Lys
18

【００７０】

(配列番号１２)

Leu Ala Asn Val Gln Leu Leu Asp Thr Xaa Gly Gly Phe Val His Ser Asp
1 5 10 15
Gly Ala Ile Ser Cys His Asp Met Phe Asp Phe Leu His
20 25 30

(配列番号１３)

Val Leu Ser Gln Arg Gln Arg Asp Glu Leu Asn Arg Ala Ile Ala Asp Tyr
1 5 10 15
Leu Arg Ser Asn Gly Tyr Glu Glu Ala Tyr
20 25

【００７１】

(配列番号１４)

Thr Phe Thr Gly His Arg Glu Trp Val Arg Met Val Arg Pro Asn Gln Asp
1 5 10 15
Gly Thr
19

(配列番号１５)

Thr Leu Asn Ala His Glu His Phe Val Thr Ser Leu Asp Phe His Lys
1 5 10 15

(配列番号１６)

Val Trp Glu Cys Arg
1 5

【００７２】

実　施　例　　４.

酸化脂質分解酵素各サブユニットｃＤＮＡの構造決定

（ａ）ウシ脳由来のｍＲＮＡの調製

ＩＳＯＧＥＮ（和光純薬）を用いてウシ脳から、ＲＮＡを調製し、Ｏｌｉｇｏｔｅｘ－ｄＴ３０＜Ｓｕｐｅｒ＞（宝酒造）を用いて、ｍＲＮＡを精製した。

【００７３】

（ｂ）　ウシ脳由来のｃＤＮＡプラスミド・ライブラリーの調製

（１）ファースト・ストランドｃＤＮＡの合成

ウシ脳由来のｍＲＮＡ　５μｇから、ＧＩＢＣＯ社のＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ｄＴ$_{17}$プラスミドシステムを用いて、ｃＤＮＡを合成した。　先ず、２μｌのＮｏｔＩプライマー・アダプターを、ジエチルピロカーボネート（ＤＥＰＣ）処理蒸留水５μｌに溶解したｍＲＮＡ　５μｇに加え、７０℃にて１０分間加熱した後、氷上で冷却した。

【００７４】

５×ファースト・ストランド緩衝液４μｌ，　０．１　ＭＤＴＴ溶液２μｌ、１０ｍＭ　ｄＮＴＰｓ　１μｌ及びＤＥＰＣ処理蒸留水１μｌ　を添加し、３７℃にて２分間保温した。　５μｌのＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ逆転写酵素を加え、３７℃にて１時間保温した後、氷上に置き反応を停止した。

【００７５】
（２）セカンド・ストランドｃＤＮＡの合成
ファースト・ストランドｃＤＮＡの合成に用いた２０μｌの反応液のうち１８μｌに、ＤＥＰＣ処理蒸留水　９３μｌ、５×セカンド・ストランド緩衝液　３０μｌ、１０ｍＭ　ｄＮＴＰｓ　３μｌ、１０Ｕ／ｍｌ　Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤＮＡリガーゼ１μｌ、１０Ｕ／ｍｌ　Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤＮＡポリメラーゼ　４μｌ、及び２Ｕ／ｍｌ　Ｅ．ｃｏｌｉ　ＲＮａｓｅＨ　１μｌを添加し、１６℃にて２時間保温した。これに、２μｌ（１０Ｕ）のT_4ＤＮＡポリメラーゼを添加し、１６℃にて５分間保温した。
【００７６】
反応液を氷上に置き１０μｌの０．５Ｍ　ＥＤＴＡ及び１５０μｌ　のフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（２５：２４：１）を加えて、激しく撹拌した後、１４，０００×ｇにて１０分間遠心し、上清１４０μｌ　を新たな遠心チューブに移した。７．５Ｍ　酢酸アンモニウム　７０μｌ　及びエタノール　０．５ｍｌを加えて撹拌し、－８０℃にて３０分間放置した。１４，０００×ｇにて１０分間遠心し、上清を除いた後、０．５ｍｌ　の７０％エタノールで沈殿を洗浄し、減圧下で乾燥した。
【００７７】
（３）ＢｓｔＸＩアダプターの付加
上記のｃＤＮＡ沈殿を、２５μｌのＤＥＰＣ処理蒸留水に溶解し、５×T_4ＤＮＡリガーゼ緩衝液１０μｌ、ＢｓｔＸＩ　アダプター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　社）１０μｌ及びT_4ＤＮＡ　リガーゼ５μｌを添加し、１６℃にて１６時間保温した。　５０μｌのフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（２５：２４：１）を加えて、激しく撹拌した後、１４，０００×ｇにて５分間遠心し、上清４５μｌを新たな遠心チューブに移した。
【００７８】
７．５Ｍ　酢酸アンモニウム　２５μｌ及びエタノール　１５０μｌを加えて撹拌し、－８０℃にて３０分間放置した。　１４，０００×ｇにて１０分間遠心し、上清を除いた後、０．５ｍｌの７０％エタノールで沈殿を洗浄し、減圧下で乾燥した。
【００７９】
（４）ＮｏｔＩ消化
上記のｃＤＮＡ沈殿を、４１μｌのＤＥＰＣ処理蒸留水に溶解し、ＲＥＡＣＴ７緩衝液５μｌ及びＮｏｔＩ　４μｌを添加し、３７℃にて２時間保温した。５０μｌのフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（２５：２４：１）を加えて、激しく撹拌した後、１４，０００×ｇにて１０分間遠心し、上清４５μｌを新たな遠心チューブに移した。
【００８０】
（５）アダプターの除去と部分的ｃＤＮＡのサイズ分画
上記のｃＤＮＡ溶液を、Ｑｕｉｃｋ　Ｓｐｉｎ　Ｃｏｌｕｍｎ　Ｌｉｎｋｅｒ　５（ＢＭＹ社）を用いて分画して、４０ｎｇ／μｌのｃＤＮＡが５０μｌ得られた。
【００８１】
（６）ｃＤＮＡのプラスミドベクターへの組み込みと大腸菌のエレクトロポレ　ーション
上記のｃＤＮＡ溶液３μｌ　に、ＮｏｔＩ及びＢｓｔＸＩ消化した、ｐＲＣ／ＣＭＶ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）ベクター（２９ｎｇ／μｌ）を１μｌ加え、Ｔａｋａｒａ　ＬｉｇａｔｉｏｎキットＡ液　３２μｌ及びＢ液　４μｌを添加し、１６℃にて３０分間保温した。　４０μｌのフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（２５：２４：１）を加えて、激しく撹拌した後、１４，０００×ｇにて１０分間遠心し、上清３５μｌを新たな遠心チューブに移した。
【００８２】
７．５Ｍ　酢酸アンモニウム　２５μｌ及びエタノール　１５０μｌを加えて撹拌し、－８０℃にて３０分間放置した。１４，０００×ｇにて１０分間遠心し、上清を除いた後、０．５ｍｌの７０％エタノールで沈殿を洗浄し、減圧下で乾燥し、５μｌ　の蒸留水に溶解した。　Ｅｌｅｃｔｒｏ　Ｍａｘ　ＤＨ１０Ｂコンピテントセル（ＢＲＬ社）５０μｌ

を用いてトランスフォーメーションを行い、２０６，０００クローンの組み換え体を得た。 またＢｓｔＸＩ消化したｐＲＣ／ＣＭＶ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）ベクター（２９ｍｇ／ｍｌ）を用いて同様に、５０５，４００クローンの組み換え体を得た。

【００８３】

（ｃ） ＭＯＰＡＣ（Ｍｉｘｅｄ Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｐｒｉｍｅｄ Ａｍｐｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｃＤＮＡ） による酸化脂質分解酵素２９ｋＤａサブユニットｃＤＮＡのクローニング

上記（ｂ）（５）で得られたｃＤＮＡ ５ｎｇをＰＣＲ反応の鋳型ＤＮＡとして、１０×ＰＣＲ緩衝液５μｌ、１．２５ｍＭ ｄＮＴＰｓ ８μｌ、１０ＯＤ／ｍｌプライマー（下記配列番号１７、１８）各々１μｌを添加して、総量をＤＰＣ処理蒸留水にて４９μｌとし、９５℃にて５分間加熱した後、５Ｕ／ｍｌ ＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（Ｐｅｒｋｉｎ ＥｌｍｅｒＣｅｔｕｓ社）０．２５μｌを添加して、９４℃にて１分間、５８℃にて２分間、７２℃にて２分間の反応サイクルを３５回行い、７２℃にて１０分間保温した。

【００８４】

（配列番号１７）

ＧＧＹＴＧ ＮＣＫＹＴ ＣＲＴＴＮ ＡＣ

（配列番号１８）

ＣＡＹＣＡ ＲＴＧＹＧ ＡＲＡＴＨ ＴＧ

【００８５】

ＰＣＲ反応産物（２３０ｂｐ）のバンドを２％アガロースゲルによる電気泳動にて確認し、クロロホルムを用いてミネラルオイルを除いた後、Ｓｕｐｒｅｃ ＴＭ０２（宝酒造）を用いて過剰のプライマー及びｄＮＴＰを除去した後フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（２５：２４：１）を加えて、激しく撹拌した後、１４，０００×ｇにて１０分間遠心し、上清４５μｌを新たな遠心チューブに移した。 ７．５Ｍ 酢酸アンモニウム ２５μｌ及びエタノール １５０μｌを加えて撹拌し、－８０℃にて３０分間放置した。 １４，０００×ｇにて１０分間遠心し、上清を除いた後、０．５ｍｌの７０％エタノールで沈殿を洗浄し、減圧下で乾燥し、５μｌの蒸留水に溶解した。

【００８６】

ｐＣＲＩＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）に挿入した後、大腸菌ＤＨ５α Ｍａｘ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ ｃｅｌｌｓ（ＢＲＬ社）をトランスフォーメーションした。 トランスフォーマントのプラスミドＤＮＡについてＭ１３ リバース ＣＡＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣ 及びＭ１３（－２０）フォワード ＧＴＡＡＡＡＣＧＡＣＧＧＣＣＡＧ を用いたＰＣＲによりクローン化を確認し、クローン化した後、培養を行い、プラスミドＤＮＡをＣｓＣｌ及び超遠心を用いて精製し、挿入ＤＮＡ断片の一次構造配列をＭ１３フォワードプライマー及びＭ１３リバースプライマーを用いて決定した（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社の自動シーケンサー、モデル３７０Ａ）。

【００８７】

その結果、配列表の配列番号４のヌクレオチドの番号２３１～４６１に相当する２３１ｂｐの配列が明かとなり、実施例３で明らかになった配列番号９の１４アミノ酸（ＲＥＬＦＳＰＬＨＡＬＮＦＧＩ）、配列番号７の１２アミノ酸（ＩＶＶＶＷＶＧＴＮＮＨＧ）及び配列番号８の５アミノ酸（ＡＩＶＱＬ）が存在し、このＰＣＲ反応産物が過酸化脂質分解酵素２９ｋＤａサブユニットｃＤＮＡの一部であることが明らかとなった。

【００８８】

明らかになった２９ｋＤａサブユニットｃＤＮＡの塩基配列を基に合成した２種のオリゴマー（下記配列番号１９、２０）を用いて、Ｋｗｉａｔｋｏｗｓｋｉ，Ｊｒ．，Ｔ．Ｊ．，Ｚｏｇｈｂｉ，Ｈ．Ｙ．，Ｌｅｄｂｅｔｔｅｒ，Ｓ．Ａ．，Ｅｌｌｉｓｏｎ，Ｋ．Ａ．ａｎｄ Ｃｈｉｎａｕｌｔ，Ａ．Ｃ．（１９９０）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８：７１９１－７１９２ の方法に準じてＰＣＲを利用して完全長ｃＤＮＡをクローン化した。

【００８９】
（配列番号１９）
ＡＴＧＴＧ　ＣＴＧＴＧ　ＧＣＧＴＣ　ＴＧＧ
（配列番号２０）
ＡＧＴＧＴ　ＧＣＣＣＧ　ＴＧＧＴＴ　ＧＴＴ
【００９０】
（ｂ）（６）で作製したウシ脳由来のｃＤＮＡプラスミド・ライブラリーを９６穴プレートに各ウェルに５０クローンとなるように希釈して一夜静置培養を行い、縦列１２列を１プールとして菌液を回収した。
【００９１】
この菌液　０．５μｌをＰＣＲ反応の鋳型ＤＮＡとし、これに１０×ＰＣＲ緩衝液５μｌ、１．２５ｍＭ　ｄＮＴＰｓ　８μｌ、１０　ＯＤ／ｍｌプライマー（上記配列番号２０、２１）各々１μｌを添加して、総量をＤＰＣ処理蒸留水にて４９μｌとした。　これを９５℃にて５分間加熱した後、５Ｕ／ｍｌ　ＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（Ｐｅｒｋｉｎ　ＥｌｍｅｒＣｅｔｕｓ社）０．２５μｌを添加して、９４℃にて１分間、５８℃にて１分間、７２℃にて２分間の反応サイクルを３５回行い、７２℃にて１０分間保温した。　２％アガロースゲル電気泳動による解析を行った。
【００９２】
電気泳動にてＰＣＲ反応産物（１０７ｂｐ）のバンドが確認できるプールについてさらにＰＣＲを行い、ＰＣＲ反応産物（１０７ｂｐ）のバンドが確認できるプールをＬＢ寒天培地にプレーティングし、各々のコロニーについてＰＣＲを行い、クローン化した。　クローン化した後に、培養を行いプラスミドＤＮＡをＣｓＣｌ及び超遠心を用いて精製し、挿入ＤＮＡ断片の一次構造配列を決定した（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社の自動シーケンサー、モデル３７０Ａ）。
【００９３】
この結果は、配列表の配列番号４に示す。　翻訳開始メチオニンはヌクレオチド７７番目と考えられ、５’非翻訳領域は７６ｂｐであった。　２９ｋＤａサブユニットｃＤＮＡの一次構造配列が明かになり、構造遺伝子のアミノ酸残基数は２３２、推定分子量は２６９０１．９４（翻訳開始メチオニンを含む）であった。　配列番号９が、配列表の配列番号４のアミノ酸番号３６より７２に、配列番号７が、配列表の配列番号４のアミノ酸番号９６より１１１に、配列番号８が、配列表の配列番号４のアミノ酸番号１１９より１４５に見いだされた。
【００９４】
（ｄ）　ＭＯＰＡＣによる過酸化脂質分解酵素３０ｋＤａサブユニットｃＤＮＡ　のクローニング
（ｂ）（５）で得られたｃＤＮＡ　５ｎｇをＰＣＲ反応の鋳型ＤＮＡとして、１０×ＰＣＲ緩衝液　５μｌ、１．２５ｍＭ　ｄＮＴＰｓ　８μｌ、１０　ＯＤ／ｍｌプライマー（下記配列番号２１、２２）各々１μｌを添加して、総量をＤＰＣ処理蒸留水にて４９μｌとした。
【００９５】
（配列番号２１）
ＡＡＲＧＡ　ＲＣＣＣＮ　ＧＡＹＧＴ　ＮＹＴ
（配列番号２２）
ＮＡＲＮＧ　ＧＲＴＴＮ　ＧＧＹＴＴ　ＫＴ
【００９６】
これを９５℃にて５分間加熱した後、５Ｕ／ｍｌ　ＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（Ｐｅｒｋｉｎ　ＥｌｍｅｒＣｅｔｕｓ社）０．２５μｌを添加して、９４℃にて１分間、５８℃にて１分間、７２℃にて２分間の反応サイクルを３５回行い、７２℃にて１０分間保温した。　２％アガロースゲル電気泳動による解析を行った。
【００９７】

ＰＣＲ反応産物（３６０ｂｐ）のバンドを電気泳動にて確認し、クロロホルムを用いてミネラルオイルを除いた後、ＳｕｐｒｅｃＴＭ０２（宝酒造）を用いて過剰のプライマー及びｄＮＴＰｓを除去した後フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（２５：２４：１）を加えて、激しく撹拌した後、１４，０００×ｇにて１０分間遠心し、上清４５μｌを新たな遠心チューブに移した。７．５Ｍ 酢酸アンモニウム ２５μｌ及びエタノール １５０μｌを加えて撹拌し、－８０℃にて３０分間放置した。

【００９８】

これを１４，０００×ｇにて１０分間遠心し、上清を除いた後、０．５ｍｌの７０％エタノールで沈殿を洗浄し、減圧下で乾燥し、５μｌの蒸留水に溶解した。ｐＣＲＩＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）に挿入した後、大腸菌ＤＨ５α Ｍａｘ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ ｃｅｌｌｓ（ＢＲＬ社）をトランスフォーメーションした。トランスフォーマントのプラスミドＤＮＡについてＭ１３ リバース ＣＡＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣ及びＭ１３（－２０）フォワード ＧＴＡＡＡＡＣＧＡＣＧＧＣＣＡＧを用いたＰＣＲによりクローン化を確認し、クローン化した後培養を行い、プラスミドＤＮＡをＣｓＣｌ及び超遠心を用いて精製し、挿入ＤＮＡ断片の一次構造配列をＭ１３ フォワードプライマー及びＭ１３ リバースプライマーを用いて決定した（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社の自動シーケンサー、モデル３７０Ａ）。

【００９９】

その結果、配列表の配列番号５のヌクレオチド番号１～３３６に相当する３３６ｂｐの配列が明かとなり、実施例３で明らかになった配列番号９の９アミノ酸（ＦＶＧＤＳＭＶＱＬ）および配列番号１１の１０アミノ酸（ＩＩＶＬＧＬＬＰＲＧ）が存在し、このＰＣＲ反応産物が過酸化脂質分解酵素３０ｋＤａサブユニットｃＤＮＡの一部であることが明らかとなった。

【０１００】

（ｅ）ＭＯＰＡＣによる過酸化脂質分解酵素４５ｋＤａサブユニットｃＤＮＡのクローニング

上記（ｂ）（５）で得られたｃＤＮＡ ５ｎｇをＰＣＲ反応の鋳型ＤＮＡとして、１０×ＰＣＲ緩衝液５μｌ、１．２５ｍＭ ｄＮＴＰｓ ８μｌ、１０ ＯＤ／ｍｌプライマー（下記配列番号２３、２４）各々１μｌを添加して、総量をＤＰＣ処理蒸留水にて４９μｌとし、９５℃にて５分間加熱した後、５Ｕ／ｍｌ ＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（Ｐｅｒｋｉｎ ＥｌｍｅｒＣｅｔｕｓ社） ０．２５μｌを添加して、９４℃にて１分間、５８℃にて１分間、７２℃にて２分間の反応サイクルを３５回行い、７２℃にて１０分間保温した。２％アガロースゲル電気泳動による解析を行った。

【０１０１】

（配列番号２３）

ＧＧＮＴＡ ＹＧＡＲＧ ＡＲＧＣＮ ＴＡ

（配列番号２４）

ＴＧＲＴＴ ＮＧＧＮＣ ＫＮＡＣＣ ＡＴ

【０１０２】

ＰＣＲ反応産物（６６０ｂｐ）のバンドを電気泳動にて確認し、クロロホルムを用いてミネラルオイルを除いた後、ＳｕｐｒｅｃＴＭ０２（宝酒造）を用いて過剰のプライマー及びｄＮＴＰｓを除去した後フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（２５：２４：１）を加えて、激しく撹拌した後、１４，０００×ｇにて１０分間遠心し、上清４５μｌを新たな遠心チューブに移した。７．５Ｍ 酢酸アンモニウム ２５μｌ及びエタノール １５０μｌを加えて撹拌し、－８０℃にて３０分間放置した。１４，０００×ｇにて１０分間遠心し、上清を除いた後、０．５ｍｌの７０％エタノールで沈殿を洗浄し、減圧下で乾燥し、５μｌの蒸留水に溶解した。

【０１０３】

ｐＣＲＩＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）に挿入した後、大腸菌ＤＨ５α Ｍａｘ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ ｃｅｌｌｓ（ＢＲＬ社）にトランスフォーメーシ

ョンした。 トランスフォーマントのプラスミドＤＮＡについてＭ１３ リバース ＣＡＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣ 及びＭ１３（－２０）フォワード ＧＴＡＡＡＡＣＧＡＣＧＧＣＣＡＧを用いたＰＣＲによりクローン化を確認し、クローン化した後培養を行いプラスミドＤＮＡをＣｓＣｌ及び超遠心を用いて精製し挿入ＤＮＡ断片の一次構造配列をＭ１３ フォワードプライマー及びＭ１３ リバースプライマーを用いて決定した（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社の自動シーケンサー、モデル３７０Ａ）。

【０１０４】

その結果、配列番号６のヌクレオチド番号１０２０～１６８３に相当する６６４ｂｐの配列が明かとなり、実施例３で明らかになった配列番号１４の１０アミノ酸（ＴＦＴＧＨＲＥＷＶＲ）が存在し、このＰＣＲ反応産物が過酸化脂質分解酵素４５ｋＤａサブユニット ｃＤＮＡの一部であることが明らかとなった。

【０１０５】

明らかになった４５ｋＤａサブユニットｃＤＮＡの塩基配列を基に２種のオリゴマー（下記配列番号２５、２６）を合成した。

（配列番号２５）

ＡＡＧＡＧ ＡＣＣＣＡ ＡＡＡＧＡ ＡＴＧ

（配列番号２６）

ＧＣＡＣＴ ＴＣＣＣＡ ＣＡＴＴＴ ＴＴＡ

このオリゴマーを用い、Ｋｗｉａｔｋｏｗｓｋｉ，Ｊｒ．，Ｔ．Ｊ．， Ｚｏｇｈｂｉ，Ｈ．Ｙ．， Ｌｅｄｂｅｔｔｅｒ，Ｓ．Ａ．，Ｅｌｌｉｓｏｎ，Ｋ．Ａ． ａｎｄ Ｃｈｉｎａｕｌｔ，Ａ．Ｃ．（１９９０）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８：７１９１－７１９２ の方法に準じ、ＰＣＲを利用して完全長ｃＤＮＡをクローン化した。

【０１０６】

（ｂ）（６）で作製したウシ脳由来のｃＤＮＡプラスミド・ライブラリーを９６穴プレートに各ウェルに５０クローンとなるように希釈して一夜静置培養を行い縦列１２列を１プールとして菌液を回収し、０．５μｌをＰＣＲ反応の鋳型ＤＮＡとして、１０×ＰＣＲ緩衝液 ５μｌ、１．２５ｍＭ ｄＮＴＰｓ ８μｌ、１０ＯＤ／ｍｌプライマー（配列番号２６、２７）各々１μｌを添加して、総量をＤＰＣ処理蒸留水にて４９μｌとし、９５℃にて５分間加熱した後、５Ｕ／ｍｌＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ Ｃｅｔｕｓ社）０．２５μｌを添加して、９４℃にて１分間、５８℃にて１分間、７２℃にて２分間の反応サイクルを３５回行い、７２℃にて１０分間保温した。 ２％アガロースゲル電気泳動による解析を行った。

【０１０７】

電気泳動にてＰＣＲ反応産物（４００ｂｐ）のバンドが確認できるプールについてさらにＰＣＲを行い、ＰＣＲ反応産物（４００ｂｐ）のバンドが確認できるプールをプレーティングし、各々のコロニーについてＰＣＲを行い、クローン化した。 クローン化した後、培養を行いプラスミドＤＮＡをＣｓＣｌ及び超遠心を用いて精製し、挿入ＤＮＡ断片の一次構造配列を決定した（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ 社の自動シーケンサー、モデル３７０Ａ）。

【０１０８】

配列表の配列６のような結果が得られた。 翻訳開始メチオニンはヌクレオチド８４３番目と考えられ、５’非翻訳領域は８４４ｂｐであった。 ４５ｋＤａサブユニットｃＤＮＡの一次構造配列が明かになり、構造遺伝子のアミノ酸残基数は４１０、推定分子量は４６６６７．６８（翻訳開始メチオニンを含む）であった。 配列番号１３が、配列表の配列番号６のアミノ酸番号２より２８に、配列番号１５が配列表の配列番号６のアミノ酸番号２２９より２４７に、配列番号１５が、配列表の配列番号６のアミノ酸番号３５５より３７１に、配列番号１６が、配列表の配列番号６のアミノ酸番号４０６より４１０にそれぞれ見いだされた。

【０１０９】

【配列表】

配列番号：１

配列の長さ：２３１

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

起源：

生物名：ウシ（Bos taurus）

配列：

Ser Gly Asp Glu Asn Pro Ala Ser Lys Pro Thr Pro Val Gln Asp Val
1 5 10 16
Gln Gly Asp Gly Arg Trp Met Ser Leu His His Arg Phe VaL Ala Asp
20 25 30
Ser Lys Asp Lys Glu Pro Glu Val Val Phe Ile Gly Asp Ser Leu Val
35 40 45
Gln Leu Met His Gln Cys Glu Ile Trp Arg Glu Leu Phe Ser Pro Leu
50 55 60
His Ala Leu Asn Phe Gly Ile Gly Gly Asp Ser Thr Gln His Val Leu
65 70 75 80
Trp Arg Leu Glu Asn Gly Glu Leu Glu His Ile Arg Pro Lys Ile Val
85 90 95
Val Val Trp Val Gly Thr Asn Asn His Gly His Thr Ala Glu Gln Val
100 105 110
Thr Gly Gly Ile Lys Ala Ile Val Gln Leu Val Asn Glu Arg Gln Pro
115 120 125
Gln Ala Arg Val Val Val Leu Gly Leu Leu Pro Arg Gly Gln His Pro
130 135 140
Thr Gln Leu Arg Glu Lys Asn Arg Arg Val Asn Glu Leu Val Arg Ala
145 150 155 160
Ala Leu Ala Gly His Pro Arg Ala His Phe Leu Asp Ala Asp Pro Gly
165 170 175

Phe Val His Ser Asp Gly Thr Ile Ser His His Asp Met Tyr Asp Tyr
180 185 190
Leu His Leu Ser Arg Leu Gly Tyr Thr Pro Val Cys Arg Ala Leu His
195 200 205
Ser Leu Leu Leu Arg Leu Leu Thr Gln Asp Gln Gly Gln Gly Gly Ala
210 215 220
Pro Leu Pro Glu Pro Ser Pro
225 230

【０１１０】

配列番号：２

配列の長さ：１１２

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

起源：

生物名：ウシ（Bos taurus）

配列：

Lys Glu Pro Asp Val Leu Phe Val Gly Asp Ser Met Val Gln Leu Met
1 5 10 15
Gln Gln Tyr Glu Ile Trp Arg Glu Leu Phe Ser Pro Leu His Ala Leu
20 25 30
Asn Phe Gly Ile Gly Gly Asp Thr Thr Arg His Val Leu Trp Arg Leu
35 40 45
Lys Asn Gly Glu Leu Glu Asn Ile Lys Pro Lys Val Ile Val Val Trp
50 55 60
Val Gly Thr Asn Asn His Glu Asn Thr Ala Glu Glu Val Ala Gly Gly
65 70 75 80
Ile Glu Ala Ile Val Gln Leu Ile Asn Thr Arg Gln Pro Gln Ala Lys
85 90 95
Ile Ile Val Leu Gly Leu Leu Pro Arg Gly Glu Lys Pro Asn Pro Leu
100 105 110 112

【０１１１】

配列番号：３
配列の長さ：４０９
配列の型：アミノ酸
配列の種類：ペプチド
起源：
　生物名：ウシ（Bos　taurus）
配列：

Val Leu Ser Gln Arg Gln Arg Asp Glu Leu Asn Arg Ala Ile Ala Asp
1 5 10 15
Tyr Leu Arg Ser Asn Gly Tyr Glu Glu Ala Tyr Ser Val Phe Lys Lys
20 25 30
Glu Ala Glu Leu Asp Met Asn Glu Glu Leu Asp Lys Lys Tyr Ala Gly
35 40 45
Leu Leu Glu Lys Lys Trp Thr Ser Val Ile Arg Leu Gln Lys Lys Val
50 55 60
Met Glu Leu Glu Ser Lys Leu Asn Glu Ala Lys Glu Glu Phe Thr Ser
65 70 75 80
Gly Gly Pro Leu Gly Gln Lys Arg Asp Pro Lys Glu Trp Ile Pro Arg
85 90 95
Pro Pro Glu Lys Tyr Ala Leu Ser Gly His Arg Ser Pro Val Thr Arg
100 105 110
Val Ile Phe His Pro Val Phe Ser Val Met Val Ser Ala Ser Glu Asp
115 120 125
Ala Thr Ile Lys Val Trp Asp Tyr Glu Thr Gly Asp Phe Glu Arg Thr
130 135 140
Leu Lys Gly His Thr Asp Ser Val Gln Asp Ile Ser Phe Asp His Ser
145 150 155 160
Gly Lys Leu Leu Ala Ser Cys Ser Ala Asp Met Thr Ile Lys Leu Trp
165 170 175

Asp Phe Gln Gly Phe Glu Cys Ile Arg Thr Met His Gly His Asp His
180 185 190
Asn Val Ser Ser Val Ala Ile Met Pro Asn Gly Asp His Ile Val Ser
195 200 205
Ala Ser Arg Asp Lys Thr Ile Lys Met Trp Glu Val Gln Thr Gly Tyr
210 215 220
Cys Val Lys Thr Phe Thr Gly His Arg Glu Trp Val Arg Met Val Arg
225 230 235 240
Pro Asn Gln Asp Gly Thr Leu Ile Ala Ser Cys Ser Asn Asp Gln Thr
245 250 255
Val Arg Val Trp Val Val Ala Thr Lys Glu Cys Lys Ala Glu Leu Arg
260 265 270
Glu His Glu His Val Val Glu Cys Ile Ser Trp Ala Pro Glu Ser Ser
275 280 285
Tyr Ser Ser Ile Ser Glu Ala Thr Gly Ser Glu Thr Lys Lys Ser Gly
290 295 300
Lys Pro Gly Pro Phe Leu Leu Ser Gly Ser Arg Asp Lys Thr Ile Lys
305 310 315 320
Met Trp Asp Val Ser Thr Gly Met Cys Leu Met Thr Leu Val Gly His
325 330 335
Asp Asn Trp Val Arg Gly Val Leu Phe His Ser Gly Gly Lys Phe Ile
340 345 350
Leu Ser Cys Ala Asp Asp Lys Thr Leu Arg Val Trp Asp Tyr Lys Asn
355 360 365
Lys Arg Cys Met Lys Thr Leu Asn Ala His Glu His Phe Val Thr Ser
370 375 380
Leu Asp Phe His Lys Thr Ala Pro Tyr Val Val Thr Gly Ser Val Asp
385 390 395 400
Gln Thr Val Lys Val Trp Glu Cys Arg
405 409

【０１１２】

配列番号：４
配列の長さ：８２０
配列の型：核酸
配列の種類：cDNA
起源：
生物名：ウシ（Bos taurus）
配列：

```
TGGTTTCTTC CCCCAGGACT GGCGCTAGAT TTCCCCCGCC TACTCTCGGC CTTCAGGAGC 60

GGAGGCGAGT GGCAAG ATG AGT GGA GAC GAG AAC CCA GCC AGC AAG CCC 108
                  Met Ser Gly Asp Glu Asn Pro Ala Ser Lys Pro
                  1               5                   10
ACG CCA GTG CAG GAC GTG CAG GGT GAC GGG CGC TGG ATG TCC CTG CAC 156
Thr Pro Val Gln Asp Val Gln Gly Asp Gly Arg Trp Met Ser Leu His
            15                  20                  25
CAT CGG TTC GTA GCC GAC AGC AAA GAT AAG GAA CCC GAA GTC GTC TTC 204
His Arg Phe Val Ala Asp Ser Lys Asp Lys Glu Pro Glu Val Val Phe
        30                  35                  40
ATC GGT GAC TCC TTG GTC CAG CTG ATG CAC CAG TGC GAG ATC TGG CGG 252
Ile Gly Asp Ser Leu Val Gln Leu Met His Gln Cys Glu Ile Trp Arg
    45                  50                  55
GAG CTC TTT TCC CCT CTG CAC GCA CTT AAC TTT GGC ATT GGC GGT GAC 300
Glu Leu Phe Ser Pro Leu His Ala Leu Asn Phe Gly Ile Gly Gly Asp
60                  65                  70                  75
AGC ACA CAG CAT GTG CTG TGG CGT CTG GAG AAT GGA GAG CTG GAA CAC 348
Ser Thr Gln His Val Leu Trp Arg Leu Glu Asn Gly Glu Leu Glu His
                80                  85                  90
ATC CGG CCC AAG ATT GTG GTG GTC TGG GTT GGT ACC AAC AAC CAC GGG 396
Ile Arg Pro Lys Ile Val Val Val Trp Val Gly Thr Asn Asn His Gly
```

```
            95                  100                 105
CAC ACT GCA GAG CAG GTG ACT GGG GGC ATC AAG GCC ATA GTG CAG CTG 444
His Thr Ala Glu Gln Val Thr Gly Gly Ile Lys Ala Ile Val Gln Leu
        110                 115                 120
GTG AAC GAG CGG CAG CCC CAG GCA CGG GTC GTG GTG CTG GGC CTG CTT 492
Val Asn Glu Arg Gln Pro Gln Ala Arg Val Val Val Leu Gly Leu Leu
    125                 130                 135
CCT CGG GGC CAG CAC CCC ACC CAA CTT CGA GAG AAA AAC CGA CGG GTG 540
Pro Arg Gly Gln His Pro Thr Gln Leu Arg Glu Lys Asn Arg Arg Val
140                 145                 150                 155
AAT GAG CTG GTA CGG GCA GCA CTG GCC GGC CAC CCT CGG GCC CAC TTC 588
Asn Glu Leu Val Arg Ala Ala Leu Ala Gly His Pro Arg Ala His Phe
                160                 165                 170
CTG GAC GCA GAC CCT GGC TTT GTG CAC TCA GAT GGT ACC ATC AGC CAC 636
Leu Asp Ala Asp Pro Gly Phe Val His Ser Asp Gly Thr Ile Ser His
            175                 180                 185
CAT GAC ATG TAC GAT TAC CTG CAC CTG AGC CGT CTG GGG TAC ACA CCT 684
His Asp Met Tyr Asp Tyr Leu His Leu Ser Arg Leu Gly Tyr Thr Pro
        190                 195                 200
GTT TGC CGG GCC CTG CAC TCC TTG CTT CTG CGT CTG CTA ACC CAA GAC 732
Val Cys Arg Ala Leu His Ser Leu Leu Leu Arg Leu Leu Thr Gln Asp
    205                 210                 215
CAG GGA CAG GGT GGT GCC CCC CTG CCG GAA CCC AGC CCC TAA GCATCTGTCT 784
Gln Gly Gln Gly Gly Ala Pro Leu Pro Glu Pro Ser Pro
220                 225                 230
TCCTACAACA TTAAATTTTC ATTTTTCAGT CAAAA 820
```

【０１１３】

配列番号：５

配列の長さ：３３６

配列の型：核酸

配列の種類：cDNA

起源：

生物名：ウシ（Bos taurus）

配列：

```
AAG GAG CCG GAT GTC CTG TTC GTG GGG GAC TCC ATG GTA CAG TTG ATG 48
Lys Glu Pro Asp Val Leu Phe Val Gly Asp Ser Met Val Gln Leu Met
1               5                  10                  15
CAG CAG TAT GAG ATA TGG CGA GAG CTT TTT TCT CCA CTT CAT GCA CTG 96
Gln Gln Tyr Glu Ile Trp Arg Glu Leu Phe Ser Pro Leu His Ala Leu
            20                  25                  30
AAT TTT GGA ATT GGG GGA GAT ACA ACA AGA CAT GTT TTA TGG AGA CTT 144
Asn Phe Gly Ile Gly Gly Asp Thr Thr Arg His Val Leu Trp Arg Leu
        35                  40                  45
AAG AAT GGA GAA CTG GAG AAT ATT AAA CCT AAG GTC ATC GTT GTC TGG 192
Lys Asn Gly Glu Leu Glu Asn Ile Lys Pro Lys Val Ile Val Val Trp
    50                  55                  60
GTA GGA ACA AAC AAC CAT GAA AAT ACA GCA GAG GAA GTA GCA GGT GGA 240
Val Gly Thr Asn Asn His Glu Asn Thr Ala Glu Glu Val Ala Gly Gly
65                  70                  75                  80
ATC GAG GCC ATC GTA CAG CTT ATC AAC ACA AGG CAG CCA CAG GCC AAA 288
Ile Glu Ala Ile Val Gln Leu Ile Asn Thr Arg Gln Pro Gln Ala Lys
                85                  90                  95
ATC ATT GTA TTG GGT TTG TTA CCT CGA GGT GAG AAG CCC AAC CCT CTC 336
Ile Ile Val Leu Gly Leu Leu Pro Arg Gly Glu Lys Pro Asn Pro Leu
            100                 105                 110     112
```

【０１１４】

配列番号：６

配列の長さ：２１３３

配列の型：核酸

配列の種類：cDNA

起源：

生物名：ウシ（Bos taurus）

配列：

GCGGCCGCGA CGGCCGTTGA GTGAGAGACA CGGGAGGAGG GGGGGACAGG CCGGGTAGGG 60

CGCTGCCCTC GCTCCCCTCC TCCCTGGCCC GGGTTCTGGG GGTGCCAGGG CCGCCGCGGC 120

TCCACCCGCG GCCTTCCCCG GGAAGGGATC GCCTTCCTCC CTTGGTGACT TAGCAAGAAA 180

AGTATTCTTG GGTAGGAAGG GCGTGGGGAG CAGGTCGCTC TCAGATCTTG GGGAGAGGGT 240

TCGGCTCTCC TCTCCCTGTC CGCGGGAGAG AAGCTCCGCA GTCCCCACCC CGCCCCGCGG 300

CTGGCGCTCA GGGACCGGGC TCAAGCCTCC TCGGCACTGT CCACCGGCCT GCAGGCGTTC 360

TGTCCCCCAC CTGTCCTTAG GATGGAGTTG ACCTGAGAAG GATGGTCCAG CCTTTCCCTG 420

GCCCCCCTAT GCGGTGGTTC AGCCCCTGCA CCCACTGAGG AGGAGCGGCC TGACCCCACC 480

GAACCATCCG CAGCATCCAC CCACCAAATC CGGCAGGATT TTCTTTTCTG CCGTCGGCTC 540

CTTCAACGGG AGCTGCCTTT TGACGTTGTA ACACTGAGCT TCGAGGCCCT CAGCCATTCT 600

CCTTCGAATC TCCCCACTCG TATAGGAAAC GCAGTGCCTG CCTTAACCTC CCAGGTGGAA 660

TGAACCTTAC TTGTTGAATA TCTCCTGGTT ACACGTTGGA TTCACTTGTG AAAGAATCAT 720

TTTCCCCTGC GTGAAAGCCA CTTAGTGGCT TATTAATTAT AAATCCAGGG GTTGCAAAGC 780

TTTTTGATTT TCCAGAGGAG GGACATAACC ACTATATCGA ATAAGCTTGA TATTACAGCC 840

AAA ATG GTG CTG TCC CAG AGA CAA CGA GAT GAA CTA AAT CGA GCT ATA 888

Met Val Leu Ser Gln Arg Gln Arg Asp Glu Leu Asn Arg Ala Ile

1 5 10 15

GCA GAT TAT CTT CGT TCA AAT GGC TAC GAA GAA GCA TAT TCA GTT TTT 936

Ala Asp Tyr Leu Arg Ser Asn Gly Tyr Glu Glu Ala Tyr Ser Val Phe

20 25 30

AAA AAG GAA GCT GAA TTA GAT ATG AAT GAA GAA TTA GAT AAG AAA TAT 984

Lys Lys Glu Ala Glu Leu Asp Met Asn Glu Glu Leu Asp Lys Lys Tyr

```
                35                  40                  45
GCT GGT CTT TTG GAA AAA AAA TGG ACA TCT GTT ATT AGA TTA CAA AAG     1032
Ala Gly Leu Leu Glu Lys Lys Trp Thr Ser Val Ile Arg Leu Gln Lys
        50                  55                  60
AAG GTT ATG GAA TTA GAA TCA AAG TTA AAT GAA GCA AAA GAA GAA TTT     1080
Lys Val Met Glu Leu Glu Ser Lys Leu Asn Glu Ala Lys Glu Glu Phe
    65                  70                  75
ACG TCG GGT GGA CCT CTT GGT CAG AAA AGA GAC CCA AAA GAA TGG ATT     1128
Thr Ser Gly Gly Pro Leu Gly Gln Lys Arg Asp Pro Lys Glu Trp Ile
80                  85                  90                  95
CCC CGT CCA CCA GAA AAA TAT GCA TTG AGT GGT CAT AGG AGT CCA GTC     1176
Pro Arg Pro Pro Glu Lys Tyr Ala Leu Ser Gly His Arg Ser Pro Val
                100                 105                 110
ACT CGA GTC ATT TTC CAT CCT GTG TTC AGT GTT ATG GTC TCT GCT TCA     1224
Thr Arg Val Ile Phe His Pro Val Phe Ser Val Met Val Ser Ala Ser
            115                 120                 125
GAG GAT GCT ACA ATT AAG GTG TGG GAT TAT GAG ACT GGA GAT TTT GAA     1320
Glu Asp Ala Thr Ile Lys Val Trp Asp Tyr Glu Thr Gly Asp Phe Glu
        130                 135                 140
CGA ACT CTT AAG GGG CAT ACA GAC TCT GTA CAG GAT ATT TCA TTC GAC     1368
Arg Thr Leu Lys Gly His Thr Asp Ser Val Gln Asp Ile Ser Phe Asp
    145                 150                 155
CAC AGT GGC AAG CTT CTG GCT TCA TGT TCT GCA GAT ATG ACC ATT AAG     1416
His Ser Gly Lys Leu Leu Ala Ser Cys Ser Ala Asp Met Thr Ile Lys
160                 165                 170                 175
CTA TGG GAT TTT CAG GGC TTT GAA TGC ATC AGA ACC ATG CAT GGC CAT     1464
Leu Trp Asp Phe Gln Gly Phe Glu Cys Ile Arg Thr Met His Gly His
                180                 185                 190
GAC CAC AAT GTT TCT TCA GTA GCC ATC ATG CCC AAT GGA GAT CAT ATA     1512
```

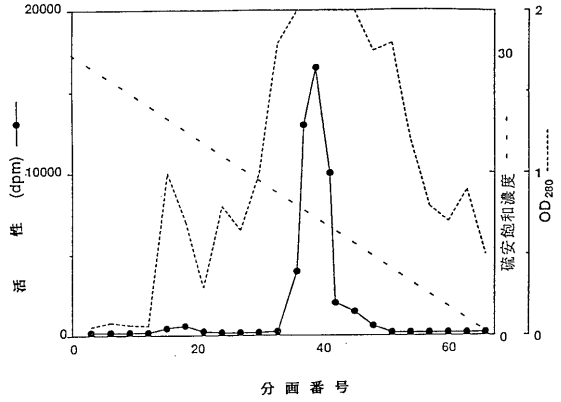
```
Asp His Asn Val Ser Ser Val Ala Ile Met Pro Asn Gly Asp His Ile
            195                 200                 205
GTG TCT GCC TCA AGG GAT AAA ACT ATA AAA ATG TGG GAA GTG CAA ACT     1560
Val Ser Ala Ser Arg Asp Lys Thr Ile Lys Met Trp Glu Val Gln Thr
        210                 215                 220
GGC TAC TGT GTG AAG ACA TTC ACA GGA CAC AGA GAA TGG GTA CGT ATG     1608
Gly Tyr Cys Val Lys Thr Phe Thr Gly His Arg Glu Trp Val Arg Met
    225                 230                 235
GTG CGG CCA AAT CAA GAC GGC ACT CTG ATA GCC AGC TGT TCC AAT GAC     1656
Val Arg Pro Asn Gln Asp Gly Thr Leu Ile Ala Ser Cys Ser Asn Asp
240                 245                 250                 255
CAG ACT GTG CGT GTA TGG GTC GTA GCA ACA AAG GAA TGC AAG GCT GAG     1704
Gln Thr Val Arg Val Trp Val Val Ala Thr Lys Glu Cys Lys Ala Glu
                260                 265                 270
CTT CGA GAA CAT GAG CAT GTG GTA GAA TGC ATT TCC TGG GCT CCT GAA     1752
Leu Arg Glu His Glu His Val Val Glu Cys Ile Ser Trp Ala Pro Glu
            275                 280                 285
AGC TCA TAT TCT TCC ATC TCT GAA GCA ACA GGA TCT GAG ACT AAA AAA     1800
Ser Ser Tyr Ser Ser Ile Ser Glu Ala Thr Gly Ser Glu Thr Lys Lys
        290                 295                 300
AGT GGC AAA CCT GGG CCA TTC TTA CTG TCC GGA TCC AGG GAC AAG ACT     1848
Ser Gly Lys Pro Gly Pro Phe Leu Leu Ser Gly Ser Arg Asp Lys Thr
    305                 310                 315
ATC AAG ATG TGG GAT GTC AGT ACT GGC ATG TGC CTT ATG ACC CTG GTG     1896
Ile Lys Met Trp Asp Val Ser Thr Gly Met Cys Leu Met Thr Leu Val
320                 325                 330                 335
GGT CAT GAT AAC TGG GTA CGT GGA GTT CTG TTC CAT TCT GGG GGG AAG     1944
Gly His Asp Asn Trp Val Arg Gly Val Leu Phe His Ser Gly Gly Lys
                340                 345                 350
```

```
TTT ATT TTG AGT TGC GCT GAT GAC AAG ACC CTG CGC GTG TGG GAT TAC     1992
Phe Ile Leu Ser Cys Ala Asp Asp Lys Thr Leu Arg Val Trp Asp Tyr
            355                 360                 365
AAG AAC AAG CGA TGC ATG AAG ACC CTC AAT GCG CAT GAA CAC TTT GTT     2040
Lys Asn Lys Arg Cys Met Lys Thr Leu Asn Ala His Glu His Phe Val
        370                 375                 380
ACC TCC TTG GAT TTC CAT AAG ACG GCC CCA TAT GTG GTT ACT GGC AGT     2088
Thr Ser Leu Asp Phe His Lys Thr Ala Pro Tyr Val Val Thr Gly Ser
    385                 390                 395
GTA GAT CAA ACA GTA AAG GTG TGG GAG TGT CGT TGA TTG AGT CTC         2133
Val Asp Gln Thr Val Lys Val Trp Glu Cys Arg
400                 405                 410
```

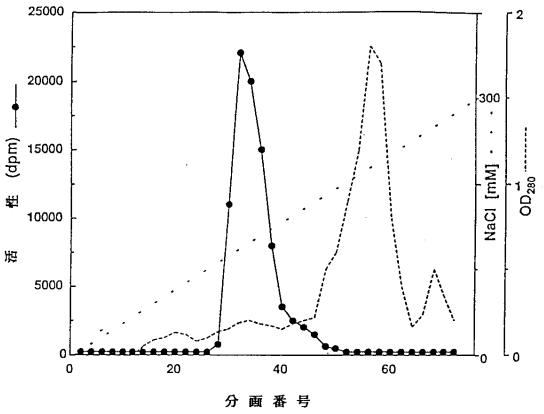
【図面の簡単な説明】

【図１】ブチルトヨパールカラムクロマトグラフィーを示す図面。
【図２】ＤＥＡＥセファロースＣＬ－６Ｂカラムクロマトグラフィーを示す図面。
【図３】ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーを示す図面。
【図４】ｍｏｎｏ　Ｑ　ＦＰＬＣカラムクロマトグラフィーを示す図面。
【図５】ゲル濾過の結果を示す図面。
【図６】ＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分子量測定の結果を示す図面。
以　　上

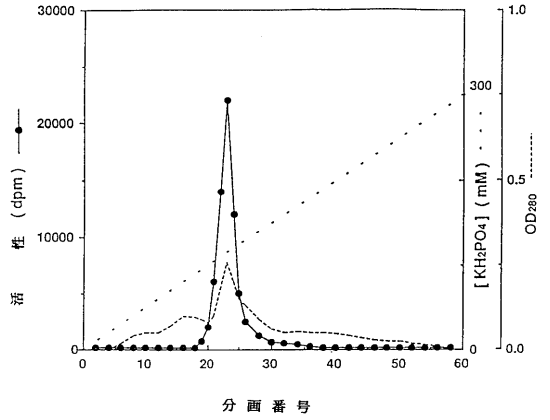
【図１】


活 性 (dpm)
硫安飽和濃度
OD280
分 画 番 号

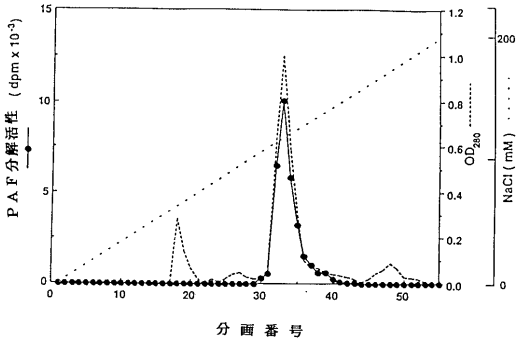
【図２】


活 性 (dpm)
NaCl [mM]
OD280
分 画 番 号

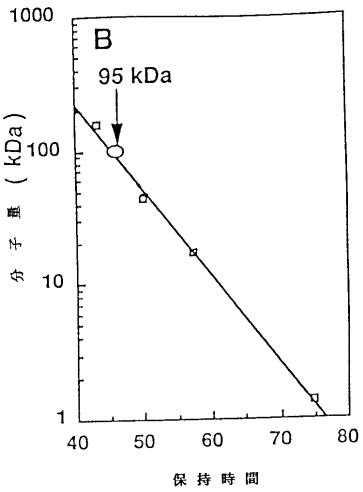
【図３】


活 性 (dpm)
[KH2PO4] (mM)
OD280
分 画 番 号

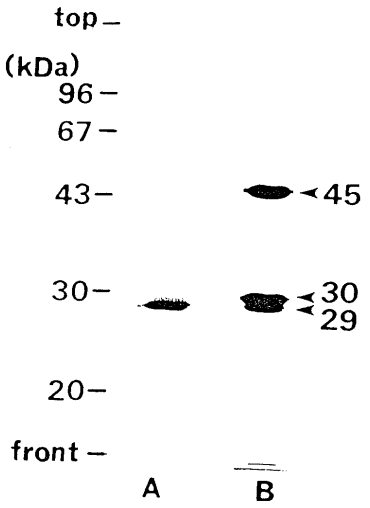
【図４】


PAF分解活性 (dpm x 10-3)
OD280
NaCl (mM)
分 画 番 号

【図５】


1000
B
95 kDa
100
10
1
分子量（kDa）
40
50
60
70
80
保持時間

【図６】


top
(kDa)
96
67
43
45
30
30
29
20
front
A
B

フロントページの続き

(72)発明者 新井 洋由
東京都荒川区西尾久４－１２－１１ 田端スカイハイツ１０１５

審査官 七條 里美

(56)参考文献 Eur.J.Biochem., 1988, Vol.172, p.117-120
Eur.J.Biochem., 1991, Vol.200, p.187-193

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
C12N 9/16
C12N 15/00
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed