

論文の内容の要旨

論文題目 糖尿病診断用酵素の遺伝子解析と蛋白質工学的改良に関する研究

氏名 阪上了一

グルコースのような還元糖と蛋白質のアミノ基との非酵素的な反応はグリケーション(糖化)と呼ばれ、糖尿病の合併症の進行や老化と関連付けられている。血糖値レベルの高い糖尿病患者においては、血中蛋白質の糖化度が増加することが知られており、糖化ヘモグロビンHbA_{1c}、糖化アルブミンGAといった糖化蛋白質が糖尿病の判定、病状管理・合併症予防の指標として利用されている。中でも重要性が高いHbA_{1c}は、ヘモグロビンのβ鎖N末端のバリン残基が非酵素的に糖化したものであり、測定には高速液体クロマトグラフィー(HPLC)や抗体を用いた免疫学的方法が用いられてきた。しかし、HPLC法は専用の機器を用いるため測定が高コストであり、機器間差・施設間差が大きく、免疫学的方法もコストや特異性、測定時に用いる自働分析機のセルの汚染などが問題となっている。これらを克服するために、糖化蛋白質に作用する酵素による測定法の開発が期待されており、多くの研究者が糖化アミノ酸、糖化ペプチドに作用する酵素フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ(FAOX)を探索・報告している。堀内らが、*Corynebacterium* sp. 2-4-1 から発見したFAOX-Cはフルクトシルグリシン(FG)やフルクトシルバリン(FV)などのα位のアミノ基が糖化された糖化アミノ酸に良く作用する一方で、ε位のアミノ基が糖化されたε-フルクトシルリジン(εFLys)に全く働かない特徴を持つ。これは他に報告されている糸状菌由来のFAOXとは異なる特徴であり、ヘモグロビンのβ鎖N末端バリン残基が糖化されたものであるHbA_{1c}を測定する上では非常に優れた性質である。そのため、本研究ではFAOX-Cの大量生産技術の確立、機能の改良を行うことで、HbA_{1c}酵素法診断技術開発上の課題を解決することを目指した。

FAOX-C 遺伝子のクローニングと大腸菌での発現

まず、生産菌を大量培養し、既報の方法によりFAOX-Cを精製した後、逆相カラムCapcell Pak C18により単一の蛋白質にし、N末端アミノ酸配列を決定した。また内部アミノ酸配列は各種ペプチダーゼにより分解して得たペプチドにより決定した。こ

これらのアミノ酸配列によりデザインした混合オリゴヌクレオチドをプローブとして、生産菌染色体の各種制限酵素処理断片に対してサザンハイブリダイゼーションを行った。制限酵素 *SacI* で処理した DNA 断片に対しては 1.05 kbp のバンドが、制限酵素 *PvuII* で処理した DNA 断片に対しては 6.96 kbp のバンドが複数のプローブで共通して得られた。それぞれの染色体断片によるライブラリーからコロニーハイブリダイゼーションにより、それぞれのポジティブクローンを得た。それぞれ単独の翻訳産物は FAOX 活性を有さなかったが、塩基配列解析により見出された重なり合う領域を除いて連結した DNA 断片上の ORF を大腸菌で発現させたところ、FAOX 活性を持つことがわかった。原株由来酵素と同様、FG や FV にはよく作用するが、 ϵ FLys には作用しないことが確認できた。

ORF は 1,116 塩基で、372 アミノ酸の蛋白質をコードしており、蛋白質の推定分子量は 39,042 である。FAD 結合モチーフ配列 GxGxxG が、N 末端領域に確認できた。今回クローニングした FAOX-C のアミノ酸配列は、糸状菌由来の FAOX との相同性が低く、基質特異性も糸状菌由来の他の FAOX と異なることが改めて確認できた。*Corynebacterium* sp. 2-4-1 の FAOX は、糸状菌由来の FAOX と比較して、ユニークな基質特異性と一次構造をもつことが明らかになった。一方、FAOX-C は *Agrobacterium* Ti plasmid pTi15955 由来の AgaE-like protein に対して 56% の相同性を示すが、AgaE-like protein も FAOX 活性を持つことが廣川らによって示された。

指向進化による FAOX-C の耐熱化

FAOX-C の生産性と ϵ FLys に作用しない基質特異性を損なわず耐熱性を向上させることを目指し、FAOX-C 遺伝子を鋳型に *in vivo* での遺伝子への変異導入とメンブレンアッセイとを組み合わせたスクリーニングを複数回繰り返すことによって指向進化 (directed evolution) を試みた。変異導入は XL1-red への形質転換により行い、得られた全コロニーからプラスミドを回収し、DH5 α に形質転換した。得られたコロニーをナイロンメンブレンに転写し、メンブレンを 55 で熱処理した後に、活性測定試薬を浸したアッセイ用メンブレンと重ね合わせ反応させ、コロニー部分が発色したクローンを選抜した。スクリーニングのラウンドを重ねるごとに熱処理の時間を長くすることで指向進化の選択圧を高めた。4 ラウンドの指向進化によって、得られた最も耐熱性が向上した変異型酵素 (FAOX-TE) では、5 カ所 (T60A, A188G, M244L, N257S, L261M) に変異が生じており、野生型酵素 FAOX-C では 37 以上で不安

定であるのに対し, FAOX-TE では 45 °C でも安定であった. FAOX-TE の FV や FG に対する反応性は FAOX-C と比較して差はなく, εFLys に反応しない性質にも変化がなかった. 各ラウンドで得られた変異型酵素は, 1 ラウンド目が A188G, M244L の二重変異株であり 47 °C, 10 分間の熱処理での残存活性が 30%, 2 ラウンド目は A188G, M244L, L261M(47 °C, 10 分間の残存活性 35.5%) 及び T60A, A188G, M244L(47 °C, 10 分間の残存活性 70%) の 2 種, 3 ラウンド目は T60A, A188G, M244L, L261M(47 °C, 10 分間の残存活性 80%) であり, 4 ラウンド目に得られたのが FAOX-TE(47 °C, 10 分間の残存活性 90%) であり, ラウンド毎に耐熱性が向上し, 酵素生産性も損なわれず, εFLys に反応しない性質も保持した耐熱性 FAOX が得られた.

各変異点を解析したところ, T60A 及び M244L は単独での耐熱化効果が認められたが, 残りの 3 箇所は単独での耐熱化効果が認められなかった. また, M244L 単独変異株と A188G, M244L 二重変異株とでは, 熱処理による残存活性が同等であったことから, A188G 変異の耐熱化効果はほとんどないと考えられた. 一方, N257S と L261M は, 各ラウンドでの耐熱化効果から, 単独では効果がないものの変異点の組み合わせによって耐熱化に寄与していると考えられた. また, 各変異点について他のアミノ酸への置換の耐熱化効果を上記のスクリーニングと同様のアッセイ方法で検証したが, 耐熱化効果の認められなかった 188 番目以外は FAOX-TE での変異点最適であることが示された.

FAOX-TE の結晶化

耐熱性のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ FAOX-TE をクエン酸ナトリウムを沈殿剤として使用してハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化したところ, 黄色の盤状及び棒状の 2 つの型の結晶が得られた. 黄色の盤状結晶は 1.5M クエン酸ナトリウム, 0.1M MOPS (pH7.0) に最適化すると単独で得られるようになり, 得られた盤状結晶から SPring-8 のビームライン BL44B2 において 1.0 Å の波長のシンクロトロン放射光を用い X 線回折のデータ収集を行った結果, 1.8 Å の解像度の X 線回折データを $R_{\text{merge}} = 4.4\%$, completeness 98.4% で収集することが出来た. 結晶は, 空間群 C2 に属し, $a = 101.08$, $b = 63.36$, $c = 83.07$ Å, $\beta = 108.80^\circ$ の格子構造を持っていた. 非対称単位当たり 1 分子存在すると仮定して計算した V_M 値は $3.2 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ と計算され, これより見積もられる溶媒含量は 62% であった. 一方, 黄色の棒状結晶は 1.5M クエン酸

ナトリウム, 0.1M Tris-HCl (pH8.0) の条件で単独で得られ, 得られた棒状結晶からは 2.7 Å の解像度の回折像が得られ, 空間群 $P4_122$ または $P4_322$ に属し, $a = b = 119.09$, $c = 164.66$ Å の格子構造を持つことがわかった. また, 非対称単位当たり1分子存在すると仮定して計算した V_M 値は $3.6 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ と計算され, これより見積もられる溶媒含量は 66% であった. 回折データは, $R_{\text{merge}} 12.4\%$, completeness 100% で収集することが出来た. それぞれ再溶解した酵素液にも活性があることを確認した.

FAOX 耐熱化の立体構造からの検証

2種の結晶の内, 解像度の優れていた盤状結晶で水銀による重原子置換を行い, 多波長異常分散法 (MAD) により FAOX-TE の結晶構造が決定された. FAOX-TE の立体構造は, サルコシンオキシダーゼ (SOX) と類似しており, SOX とその基質アナログであるジメチルグリシンとの複合体の立体構造と重ね合わせることで, FAOX の基質の入り込む部位が推定でき, 全体の構造を FAD 結合ドメインと触媒ドメインの2つに分けることが出来た. FAOX-TE で起こった5ヶ所の変異のうち, 耐熱化効果の認められなかった G188A は FAD 結合ドメイン側にあったもの, 耐熱化効果の認められた4ヶ所は触媒ドメインにあった.

T60A は α ヘリックスの開始部分にあり, 溶媒に露出した位置にある. 溶媒に露出した位置にある α ヘリックス中の Ala が蛋白質の安定化に働くという報告があり, これも同様の例であろうと考えられた. 一方, M244L は疎水性の高い領域にありこの変換により空間を埋めるように働き耐熱化に寄与したのではないかと考えられた. また N257S は β シートをつなぐターンの部分にあり側鎖が同じく β シートをつなぐターンを構成する Val236 の主鎖のカルボニル基と水素結合していた. また, L261M も β シート中の同様に疎水性の高い領域にあり, 耐熱化に寄与していると考えられた.

図. FAOX-TEの立体構造と変異点

