

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 阪上 了一

タンパク質のアミノ基に還元糖が非酵素的に結合する反応を糖化というが、糖尿病患者では血中タンパク質の糖化度が増加しており、これは病状の判定や管理のための安定した指標となる。ヘモグロビン 鎖N末端のバリンが糖化した HbA1c の量が最も重要で、機器分析や免疫反応による定量法があるが、簡便かつ定量性がよい酵素法の開発が強く期待されている。本論文は、この目的に利用可能な、糖化アミノ酸特異的に作用する、コリネ菌由来の酵素フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ(FAOX-C)の大量生産と酵素の熱安定化に関する研究をまとめたもので、5章からなっている。

第1章では、タンパク質の糖化、糖尿病との関係、FAOX-Cの諸特性に関し、研究開始時までの知見と問題点をまとめ、本論文の研究の目的と意義を述べている。

第2章では、本来の生産菌 *Corynebacterium* sp. 2-4-1 では生産量が少なく不安定であることから、FAOX-C をコードする遺伝子をクローン化し、大腸菌で大量生産することに成功した。FAOX-C を精製後、各種ペプチダーゼ消化によるペプチド断片のアミノ酸配列を決定し、5つの内部アミノ酸配列を得た。これより混合オリゴヌクレオチドをデザインし、サザンハイブリダイゼーションで生産菌 DNA の制限酵素断片長を求め、サブゲノムライブラリーを作製した。コロニーハイブリダイゼーションで得たクローンから、FAOX-C の遺伝子全長を得た。FAOX-C は 372 アミノ酸、分子量は 39,042 で、N末端近くに補酵素 FAD の結合モチーフ(GxGxxG)を認めた。糸状菌が生産するフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとは基質特異性が異なるが、配列の相同性も低く、本酵素との違いが明確になった。大腸菌でこの遺伝子を発現させることにより、元株と同一の基質特異性をもつ活性の酵素を大量に生産することができ、精製工程も大幅に改良された。

第3章では、FAOX-C を臨床検査に応用する上で障害となる、耐熱性の低さを、基質特異性を損なうことなく改良するため、変異処理と選抜を繰返す指向進化を試みた。ミューターXL1-red 株での複製により変異導入した FAOX-C 発現プラスミドを DH5 株に形質転換し、得られたコロニーをナイロンメンブレンに転写して、55 の熱処理を行った。これを、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て反応させ、コロニー部分が強く発色したクローンを選抜した。このようなスクリーニングで熱処理時間を長くすることにより選択圧を高めた。4ラウンドの指向進化によって得られた最も耐熱性が高い変異型酵素 FAOX-TE は、T60A, A188G, M244L, N257S, L261M の 5ヶ所のアミノ酸置換をもち、野生型 FAOX-C が 37 以上で不安定であるのに対して、45 でも安定である。基質特異性

などの他の性質は変化がなかった。変異は、1 ラウンド目に A188G, M244L の二重変異が起こり、2 ラウンド目に T60A、3 ラウンド目に L261M、4 ラウンド目に N257S が加わり、それにより 47 で 10 分後の残存活性が、30% 70% 80% 90% と向上した。単独変異での効果を調べると、T60A と M244L は耐熱化効果があるが、他はなかった。A188G を復帰させても影響は認められず、耐熱性に寄与していないことが分かった。N257S と L261M は単独では効果がないが、他との組合せで耐熱化に寄与していた。各変異点について全アミノ酸に置換しうる部位指定変異を導入したが、メンブレンアッセイのスクリーニングで耐熱化したものは、上記の置換のみであり、各変異が最適であると考えられた。

第4章では、クエン酸ナトリウムを沈殿剤とするハンギングドロップ蒸気拡散法により、耐熱化した FAOX-TE の結晶化に成功し、盤状および棒状の黄色結晶を得た。盤状結晶から得られた 1.8 の解像度の X 線回折データに基づく FAOX-TE の推定立体構造に対して、本酵素の分子的特性を検討した。構造は、既知のサルコシンオキシダーゼと似ており、その基質アナログであるジメチルグリシンとの複合体立体構造との比較から、FAOX-TE の FAD 結合ドメインや触媒ドメインを推定した。FAOX-TE の耐熱化効果に寄与した 4 つのアミノ酸置換はすべて触媒ドメインにあり、疎水性の高い領域で空間を埋めたり、水素結合生成、ヘリックス安定化など、それぞれの機構を推定した。

第5章では、全体の総括と今後の展望が述べられている。

以上、本論文は、糖化アミノ酸に特異的に作用する酵素の遺伝子を取得し、指向進化による耐熱性向上に成功し、さらに各変異の立体構造上で推定される役割を明らかにしたもので、学術上ならびに応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。