

## 論文の内容の要旨

論文題目 アマドリ化合物分解活性を持つ酵素の研究とそれを用いた糖尿病診断法の開発

氏名 廣川 浩三

国内の糖尿病患者数は急速な増加を続け、予備軍を含めると1620万人(平成14年)に達している。糖尿病が病気として深刻なのは、慢性の高血糖状態を基盤として網膜症・腎症・神経障害などの合併症を引き起こすためである。したがって厳密な血糖値のコントロールが、糖尿病による合併症の発症・進展を阻止するためには、必要不可欠と言われている。HbA1cはヘモグロビン鎖N末端のVal残基にグルコースが結合し、アマドリ転位した糖化タンパク質である。全ヘモグロビンに対するHbA1cの割合は過去1~2ヶ月の平均血糖値を反映することから、糖尿病患者の血糖コントロールの指標として広く用いられている。現在、病院や検査センターでは、HPLC法と免疫法によりHbA1cが測定されているが、両方法とも改善すべき点が指摘されている。そのため、迅速・正確かつ汎用性の高いHbA1c酵素測定法の開発が期待されてきた。本研究では、糖尿病の診断に応用が可能な酵素に関する研究を行うとともに、新規なHbA1c酵素法の開発を目的とした。

糖化アミノ酸オキシダーゼ(FAOX)の研究は、1989年に *Corynebacterium* sp.から単離・精製されたことから開始した。分子量が約 44kDa の単量体であり、分子内に FAD を含む本酵素は、  
-糖化アミノ酸に作用し、アミノ酸・過酸化水素・グルコソンを生成する反応を触媒する。その後、同様の活性が糸状菌・酵母などからも見出されてきたが、FAOX の生体内における機能についてはほとんど論じられてこなかった。そこで我々は、糖化アミノ酸オキシダーゼの生理学的な機能に関する研究を行うことにした。原核生物由来の FAOX は、唯一 *Corynebacterium* sp.から取得され、クローニングされていた。そこで *Corynebacterium* sp.由来 FAOX と相同性の高い配列を検索したところ、*Agrobacterium tumefaciens* の機能未知タンパク AgaE-like protein が 54%の相同性を示すことがわかった。第二章では、AgaE-like protein を大腸菌で組み換え生産し、タンパク質の性質の検討を通して AgaE-like protein の生体内での機能について考察した。実験の結果、AgaE-like protein は -糖化アミノ酸を酸化的に分解する酵素であることが示された。他のグループによる遺伝学的な解析結果と併せ、AgaE-like protein の本来の機能はオパイン(*Agrobacterium* が植物に感染した後、自身の栄養源として植物細胞に作らせる一連の非タンパク性のアミノ酸)の一つである、santhopine(フルクトシルグルタミン)を代謝する酵素と考えられた。なお、原核生物のごく一部からしか FAOX が見出されないことから、FAOX は *Agrobacterium* から水平伝播によって伝達された可能性も示唆され、非常に興味深い。

第三～第六章では、新規 HbA1c 酵素法の開発を行った。我々が目指した測定法は、まず HbA1c にプロテアーゼを作用させ、鎖 N 末端からフルクトシルジペプチド (Fru-ValHis) を切り出し、次いで遊離した Fru-ValHis にフルクトシルペプチドオキシダーゼ (FPOX) を作用させ、生成する過酸化水素を発色系に導き測定する方法である。この方法は他のグループが開発を試みている方法と比べると、より特異性が高く、正確な測定ができるものと期待された。しかしこれまでに、Fru-ValHis に作用するような酵素(FPOX)は見出されていなかったため、第三章では FPOX 活性をもつ株のスクリーニングを行った。当研究室保有のカビ・酵母・バクテリア保存菌株および各種土壌サンプル中の微生物を対象に広範なスクリーニングを行った結果、8 つの属 - *Achaetomiella*, *Achaetomium*, *Chaetomium*, *Coniochaeta*, *Eupenicillium*, *Gelasinospora*, *Microascus*, *Thielavia* - に含まれる 21 株の菌体破碎液より FPOX 活性を見出すことに成功した。

そこでまず、生産量の比較的高い *Achaetomiella virescens* を選択し、この株が生産する FPOX について性質を調べた。SDS-PAGE 上で単一のバンドとなるまで精製した FPOX は、Fru-ValHis から ValHis への反応を触媒し、目的の活性を有することが確認された。

第四章では FPOX cDNA のクローニングおよび大腸菌での発現を行った。第三章のスクリーニングによって得られた株のうち、*Coniochaeta sp.*, *Eupenicillium terrenum* を選択し、両株が生産する FPOX を精製した。次に精製 FPOX の内部アミノ酸配列を決定し、その情報をもとに全長の cDNA を取得した。FPOX cDNA は適当なプラスミドに挿入することで、大腸菌内で活性型酵素として発現させることが可能だった。組み換え生産した FPOX の基質特異性を確認したところ、*Coniochaeta sp.* 由来 FPOX (FPOX-CE) 及び *Eupenicillium terrenum* 由来 FPOX (FPOX-EE) は共に Fru-ValHis ( -糖化ペプチド) だけではなく、Fru-Val ( -糖化アミノ酸) にも作用した。また、FPOX-CE, -EE の予想アミノ酸配列は、既知の糸状菌由来 FAOX の配列とも相同性を示した。2 種の FPOX と 6 種の FAOX のアミノ酸配列を用いてアライメントを行った結果から、8 種の配列は保存性の高い 2 つのグループに分類できることが示された。この配列によるグループ分けは、酵素の基質特異性とも良く一致しており、2 つのグループは Fru-Val などの -糖化アミノ酸に対し高い特異性をもつグループ (FPOX-CE, -EE が含まれる) と、 Fru-Lys などの -糖化アミノ酸に対し高い特異性をもつグループに相当することを示すことができた。

ところで、大腸菌を宿主とした時のプラスミドによる FPOX-EE の発現量は 0.01 U/ml と、極めて低かった。この原因として、FPOX の活性が大腸菌に対し毒性をもつ可能性が考えられた。そこで第五章では、ファージベクターによる発現系 (スリーパーシステム) を用い、高発現化の検討を行った。この発現系は、宿主の増殖段階に目的遺伝子の発現が低レベルに保たれるため、毒性を示すタンパク質の生産に特に向いていると考えられたためである。実験の結果、FPOX-EE の発現量は 0.17 U/ml と高い値を示し、応用利用を目的とした生産が可能になった。次に、この FPOX が糖化タンパク質の定量に応用できるかどうかを検討した。ここでは HbA1c の鎖 N 末端に相当する糖化ヘキサペプチド *N*-(1-deoxyfructosyl)-ValHisLeuThrProGlu (Fru-hexapeptide) を用い、以下の HbA1c 測定系のモデル実験を行った。つまり Fru-hexapeptide の *Aspergillus* プロテアーゼ処理で生成する Fru-ValHis を FPOX と発色試薬

により検出できるかどうかの検討である。結果として Fru-hexapeptide の濃度に応じた吸光度の増加が確認され、Fru-hexapeptide は FPOX によって定量が可能であるということが示された。

しかしながら、*Aspergillus* プロテアーゼの切断効率は非常に悪く、実用的でなかった。そこで第六章では、HbA1c の切断に適したプロテアーゼを得るために、Fru-hexapeptide の切断効率を指標に、市販酵素についてスクリーニングを行った。その結果、効率良く Fru-hexapeptide を切断し Fru-ValHis を遊離させる作用をもつ、*Bacillus polymyxa* 由来の中性プロテアーゼが得られた。本プロテアーゼはさらに、HbA1c に直接作用し Fru-ValHis を遊離させることも示された。これらの結果から、我々は酵素による新規な HbA1c 測定法を以下のように構築した。HbA1c を溶血試薬で赤血球から遊離させ、中性プロテアーゼで切断し、生成する Fru-ValHis を FPOX とパーオキシダーゼを用いて発色系に導き測定する。ヒト血液の実サンプルを用いて HbA1c 値を新規酵素測定法により測定した結果、現在普及している HPLC 法で求めた HbA1c 値との間に良好な相関性が認められることがわかった。さらに、この方法は定義通りにヘモグロビン鎖 N 末端のみを測定し、かつ夾雑する糖化アミノ酸の消去反応を組み合わせることも可能であることから、実用性に優れた方法といえることができる。

以上本研究によって、我々は Fru-ValHis に作用するアマドリ化合物分解酵素(FPOX)を初めて見出し、その酵素活性を利用した迅速・簡便かつ特異性の高い新規 HbA1c 測定法を開発することに成功した。本研究で得られた成果が糖尿病の診断・治療に大きく貢献することを期待してやまない。