

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 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。本論文は、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測定法の開発を目的としたものである。

糖化アミノ酸オキシダーゼ(FAOX)は、 $\alpha$ -糖化アミノ酸に作用し、アミノ酸・グルコソン・過酸化水素を生成する反応を触媒する。第二章では、既知のFAOXと相同性の高い*Agrobacterium tumefaciens*の機能未知タンパクAgaE-like proteinの性質を調べた。検討の結果、AgaE-like protein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)を分解する酵素であることが示唆された。

次にHbA1c酵素法の開発を行った。まず第三章では、Fru-ValHisに作用するフルクトシルペプチドオキシダーゼ(FPOX)活性を示す株のスクリーニングを行った。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株の菌体破砕液よりFPOX活性を見出した。

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であった。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-C)及び*Eupenicillium terrenum*由来FPOX(FPOX-E)は共にFru-ValHis( $\alpha$ -糖化ペプチド)だけではなく、Fru-Val( $\alpha$ -糖化アミノ酸)にも

作用した。また、FPOX-C, -E 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されることが示された。この配列による分類は、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  $\alpha$ -糖化アミノ酸に対して特異性を示すグループ(FPOX-C, -E が含まれる)と、 Fru-Lys などの  $\beta$ -糖化アミノ酸に対して特異性を示すグループに相当することを示している。さらに、FPOX の発現に フェージベクターを用いた発現系(スリーパーシステム)を利用することによって、FPOX の高発現化が達成された。

第五章では、HbA1c の切断に適したプロテアーゼを得るために、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-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を得た。以上の結果より、次の新規な HbA1c 測定法を構築した。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方法である。現在普及している HPLC 法によって HbA1c 濃度を求めたヒト血液サンプルに対して、本酵素測定法を利用したところ、HbA1c 濃度と吸光度変化の間に高い相関が認められ、本測定法の有用性が示された。

以上、本論文は糖尿病診断に関連する酵素の研究を行い、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 測定法を提供したものであり、学術上ならびに応用上貢献するところ大である。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。