

称号及び氏名 博士(農学) 藤原 真紀

学位授与の日付 平成19年3月31日

論文名 「Studies on Substrate Specificity of Fructosyl-Amino Acid Oxidases (糖化アミノ酸オキシダーゼの基質特異性に関する研究)」

論文審査委員 主査 川口 剛司  
副査 川崎 東彦  
副査 宮武 和孝  
副査 炭谷 順一

## 論文要旨

### 緒論

糖尿病は慢性の高血糖状態で、その治療には血糖コントロールが重要である。現在、糖尿病の診断方法として最も一般的なものは、グルコースオキシダーゼ法 (GOD 法) による尿糖試験紙・血糖値測定であるが、血糖値そのものは直前の食事内容に大きく影響されるため、測定する際には絶食等の食事調整が必要になる。糖尿病患者は血糖コントロールのために頻繁に血糖値を測定しなければならないが、上記のような測定法は、たびたび利用するには患者への負担が大きく、不向きである。そこで、食事等に影響されない指標として、ヘモグロビン A<sub>1c</sub> やフルクトサミンなどの血中の糖化タンパクの測定が行われている。糖化タンパクとは血中グルコース濃度に比例して、タンパクに非酵素的、不可逆的に糖が付加したもので、そのタンパクが分解されるまで糖を保持し続けるため、食事に左右されず、過去の血糖値を反映するよい指標となる。しかし、糖化タンパクの測定はその還元能を利用していたり、HPLC 法によっているため、それぞれ、特異性が低い、高価な機器が必要で、しかも多サンプルの処理には向かない等の欠点を持つ。これら既存の測定法の問題点を克服する方法として、特異性が高く、且つ安価な酵素を用いた測定法が考えられる。糖化タンパクを特異的に脱糖化し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を生成するオキシダーゼを用いれば、peroxidase 法等、既存の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定量法を利用して糖化タンパクを特異的に測定することができる。このような背景から多くの糖化アミノ酸オキシダーゼ (FOD) が主に糸状菌より単離された。血中の主な糖化タンパクとして Fructosyl lysine (FK) を持つ糖化アルブミンと、Fructosyl valine (FV) を持つヘモグロビン A<sub>1c</sub> が挙げられるが、糸状菌由来の FOD は多くの場合、FK のモデル化合物である N<sup>ε</sup>-fructosyl-N<sup>α</sup>-Z-lysine (FZK) と FV の両方に作用する。

そこで、FOD の遺伝子に変異を導入し、FK (FZK)、FV のどちらか一方にのみ作用する変異酵素を作製し、特異性の高い臨床診断薬として応用すると共に、FOD の基質特異性に関して分子レベルでの知見を得ることを目的として本研究を行った。

## 第一章 *Fusarium oxysporum* 由来糖化アミノ酸オキシダーゼ (FOD-F) の基質特異性の改変

### FOD-F 遺伝子への変異導入およびスクリーニング

dNTP の濃度にバイアスをかけ、且つ、 $Mn^{2+}$  を共存させることで *Taq* polymerase に塩基の取り込みミス誘発させた PCR にて FOD-F 遺伝子に変異を導入し、増幅した断片を発現ベクターに挿入、大腸菌を形質転換することで変異ライブラリーを作製した。この内、12,922 株を発色プレート上での 1st スクリーニングに供し、有望と思われる 164 株を取得した。この 314 株から無細胞抽出液を調製し、タイタープレート上での 2nd スクリーニングに供したところ、FV にほとんど反応しない 1 株が得られた。塩基配列を調べたところ、導入された変異は T885A と A1118G の 2 ヶ所であり、アミノ酸レベルでは K373R の 1 ヶ所で、このリジンからアルギニンへの置換のみで FV にほとんど作用しなくなることがわかった。

### Lys-373 置換体の作製と精製

上記スクリーニングに用いたランダム変異はランダムとはいうものの置換されやすい塩基には偏りがあり、得られた置換アミノ酸が最も基質特異性に影響を与えるアミノ酸とは限らない。そこで、最適置換アミノ酸を調べるために、Lys-373 部位が全てのアミノ酸に置換しうる mix primer を用いて Lys-373 部位に部位特異的ランダム変異を導入した。変異体 200 株から K373R 株と同等か、それ以上に FV に対する活性を失ったと思われる 34 株が得られ、置換アミノ酸を調べたところ、置換アミノ酸は 9 種類に集約されたが、置換されたアミノ酸に共通する特徴は見出せなかった。

作製した変異酵素のうち、粗酵素液の性質から、トリプトファン、メチオニン、スレオニン、バリン、アルギニン置換体について注目し、さらに詳しい性質を調べるためにこれらの精製を行った。培養液 4 liter から菌体を回収し、無細胞抽出液を調製後、DEAE-TOYOPEARL、Phenyl-TOYOPEARL に供することで、電気泳動的に均一な標品を得ることができた。比活性は約 25~45 倍に上昇し、回収率は 14~60 % であった。

### 変異酵素の諸性質

精製酵素を用いて kinetic パラメータを算出したところ、変異酵素の場合、基質が FZK の場合は  $K_m$  値が、FV の場合は  $K_m$  値と  $k_{cat}$  値が大きく変化していた。その結果、変異酵素は FV に対する活性をほとんど示さず、FZK に対する特異性が著しく上昇していた。また、様々な金属イオンの存在下で酵素活性を測定したところ、 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  存在下で、変異酵素で活性の著しい増大が見られ、特に FV に対する活性は数十倍に上昇した。そこで、 $Mg^{2+}$  存在下で kinetic パラメータの測定を行ったところ、K373W では基質が FZK の場合、 $K_m$  値が大きく変化することで反応性が回復し、wild type に近づいていた。一方、基質が FV の場合には  $k_{cat}$  値が大きく上昇することで反応性が回復するものの、依然 wild type との差は大きく、両基質間の比は wild type とは大きく異なったままであった。次に、糖化アルブミンの測定を想定して、臨床濃度での活性測定を行ったところ、変異酵素では FV に対する有意な活性を検出することはできなかった。また、 $Mg^{2+}$  を添加することで、

wild type 並みの酵素使用量で FZK のみを検出することができた。

#### 変異酵素の基質特異性と基質の構造

得られた変異酵素は FZK より FV に対する活性が低下していたが、両基質の構造の違いから基質のカルボキシル基の位置に注目した。切断点からのカルボキシル基の位置が異なる 3 種類の基質を新たに合成し、それぞれに対する kinetic パラメータを求めた。wild type の反応性に対する K373W の反応性を調べたところ、カルボキシル基が基質の切断部位に近接する FV、Fructosyl alanine ほど、変異導入によって大きく活性が失われ、カルボキシル基が切断部位から離れる FZK、 $\epsilon$ -Fructosyl-aminocaproic acid では失われる活性は相対的に少なかった。

#### Lys-373 の役割

本 FOD-F を含め、現在までに報告されている糸状菌由来糖化アミノ酸オキシダーゼには、C 末端側にサルコシンオキシダーゼとの有意な相同性が見られ、今回変異の導入された Lys-373 部位も多く FOD、サルコシンオキシダーゼ間で保存されている。このうち、*Bacillus sp. B-0618* 株由来のサルコシンオキシダーゼは、その基質アナログ、ジメチルグリシンを用いた X 線結晶解析が行われており、Lys-373 に相当するリジン残基はジメチルグリシンのカルボキシル基と結合している。FV とジメチルグリシンは切断点からのカルボキシル基の位置が等しく、FOD-F における Lys-373 は FV のカルボキシル基と結合している可能性が示唆された。

## 第二章 *Ulocladium sp. JS-103* 由来糖化アミノ酸オキシダーゼ (FOD-U) の基質特異性の改変

第一章にて FZK への特異性を高めた変異 FOD-F を取得することができたが、そのスクリーニング過程において、FZK より FV に対して高い活性を示す変異酵素はほとんど取得することができなかった。そこで FZK より FV に対して高い活性を示す FOD-U に変異を導入することで、FV 特異的な変異酵素を取得することを試みた。第一章と同様の方法で FOD-U 遺伝子にランダム変異を導入し、スクリーニングを行ったところ、1 株の有望株が得られた。塩基配列を調べたところ、アミノ酸レベルでは 4 ヶ所の変異が導入されていることがわかった。そこでそれぞれのシングルミュータントを作製し、その活性を調べたところ、R94W の 1 ヶ所の変異のみで FZK に対する活性が著しく低下することがわかった。Arg-94 部位に部位特異的にランダム変異を導入し、スクリーニングを行うことで新たにフェニルアラニン、ロイシン置換体を取得し、トリプトファン置換体と共に精製、諸性質の検討を行った。精製酵素を用いて kinetic パラメータを算出したところ、FV に対して最も高い特異性を示したのはトリプトファン置換体で、wild type の 14 倍であった。

### 総括

本研究ではランダム変異を導入することで、FZK、FV に対する特異性を高めた変異 FOD を作製した。これら変異 FOD は糖化アルブミンやヘモグロビン A<sub>1c</sub> などの糖化タンパクの簡便且つ迅速な測定法の開発に役立つものと考えられる。

## 審査結果の要旨

現在、糖尿病の診断方法として最も一般的なものは、グルコースオキシダーゼ法による血糖値測定である。この測定法では、直前の食事内容の影響が大きいため、測定するには絶食等の食事調整が必要になり、頻繁に血糖値を測定しなければならない糖尿病患者には重い負担となる。そこで、食事等に影響されない指標として、ヘモグロビンA<sub>1c</sub>やフルクトサミンなどの血中の糖化タンパクの測定が行われている。糖化タンパクとは血中グルコース濃度に依存して、タンパクに非酵素的、不可逆的に糖が付加したもので、そのタンパクが分解されるまで糖を保持し続けるため、食事に左右されず、過去の血糖値を反映するよい指標となる。しかし、現状の糖化タンパクの測定法は、特異性が低い、高価な機器が必要、多サンプルの検定には向かない等の欠点を持つため、新たな簡便で安価な測定法の開発が求められている。

糖化アミノ酸オキシダーゼは、糖化アミノ酸を特異的に脱糖化し、その際H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を生成する酵素であり、糖化アミノ酸をタンパクから遊離させるためにプロテアーゼを併用することで、既存のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の定量法を利用した測定が可能となる。このような背景から多くの糖化アミノ酸オキシダーゼ (FOD) が主に糸状菌より単離された。血中の主な糖化タンパクとしてFructosyl lysine (FK) を持つ糖化アルブミンと、Fructosyl valine (FV) を持つヘモグロビンA<sub>1c</sub>が挙げられるが、糸状菌由来のFODは多くの場合FKのモデル化合物である *N*<sup>ε</sup>-Fructosyl-*N*<sup>ε</sup>-Z-lysine (FZK) とFVの両方に作用する。本研究では、FODの遺伝子に変異を導入し、FK (FZK)、FVのどちらか一方にのみ高い特異性を有する変異酵素を作製し、臨床診断酵素として応用すると共に、FODの基質特異性に関して分子レベルでの知見を得ることを目的として行われたものである。

前半では、*Fusarium oxysporum* 由来糖化アミノ酸オキシダーゼ (FOD-F) の基質特異性の改変が試みられた。エラープローン PCR 法により FOD-F 遺伝子にランダムに変異を導入し、大腸菌を用いて発現変異ライブラリーを構築した。そこから2回のスクリーニングを経て、FVにはほとんど活性を示さない変異酵素を取得することに成功した。その変異遺伝子の塩基配列を調べたところ、導入された変異はT885A と A1118G の2ヶ所であり、アミノ酸レベルではK373Rの1ヶ所であることが分かった。さらに、この位置での最適置換アミノ酸を調べるために、Lys-373部位が全てのアミノ酸に置換しうる mix primer を用いて部位特異的ランダム変異を導入した。変異体 200 株から K373R 株と同等か、それ以上に FV に対する活性を失ったと思われる 34 株が得られ、置換アミノ酸を調べたところ、置換アミノ酸は9種類に集約された。

次に、作製した変異酵素のうち、特に特異性の高かったTrp、Met、Thr、Val、Arg置換体に注目し、詳しい性質を調べるためにこれらの精製を行い、電気泳動的に均一な精製酵素を得た。それぞれのkineticパラメータから、変異酵素の場合FZKに対してはK<sub>m</sub> 値が、FVに対してはK<sub>m</sub> 値と k<sub>cat</sub>値が大きく変化していた。その結果として、変異酵素はFVに対する活性をほとんど示さず、FZKに対する特異性が著しく上昇していた。また、様々な金属イオンの存在下で酵素活性を測定したところ、Ca<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>存在下で、変異酵素で活性の著しい上昇が見られ、特にFVに対

する活性は数十倍に上昇した。そこで、 $Mg^{2+}$ 存在下でkineticパラメータの測定を行ったところ、K373WではFZKに対しての $K_m$ 値が大きく変化することで反応性が回復し、wild typeの比活性に近づいていた。一方、基質がFVの場合には $k_{cat}$ 値が大きく上昇することで反応性が回復するものの、依然wild typeとの差は大きく、両基質間の比はwild typeとは大きく異なったままであった。糖化アルブミンの測定を想定して、臨床濃度範囲での活性測定を行ったところ、変異酵素ではFVに対する有意な活性を検出することはできなかった。また、 $Mg^{2+}$ 存在下でもFVは検出限界以下であり、wild type並みの酵素使用量でFZKのみを検出することが可能であったことから、臨床診断用酵素として応用できる可能性が示された。

変異酵素がFZKよりFVに対する活性が大きく低下した理由について、両基質のカルボキシル基の位置の違いに着目した。酵素による切断点からのカルボキシル基の距離が異なる3種の基質を新たに合成し、それぞれに対するwild typeとK373Wのkineticパラメータを求めた。その結果、切断点からのカルボキシル基の距離が近いほど変異導入によって大きく活性が失われ、遠いほど影響が少なかった。このことから、この変異を導入されたLys-373の役割に関して、FOD-Fと相同性があり既に基質アナログであるジメチルグリシンとの複合体のX線結晶解析が行われているサルコシンオキシダーゼと比較することによって考察した。その結果、Lys-373はFVのカルボキシル基と結合している可能性が示された。

後半では、FOD-F変異体とは逆にFZKよりFVに特異的なFODを作出することを試みた。もともとFZKよりFVに対して高い活性を示す*Ulocladium* sp. JS-103由来の糖化アミノ酸オキシダーゼ(FOD-U)を対象として、前述と同様の方法で目的の変異FOD-Uを取得し、FZKに対する活性の低下はR94Wの1ヶ所のアミノ酸置換によることが明らかとなった。さらに、Arg-94に部位特異的ランダム変異を導入しスクリーニングを行うことによって、新たに同様にFZKに対する活性が特異的に低下したPhe, Leu置換体を取得した。Trp置換体と共に精製、諸性質の検討を行い、それぞれのkineticパラメータを求めたところ、FVに最も高い特異性を示したものはTrp置換体でそのFVに対する活性はwild typeの14倍であった。

以上のように、本研究で作出された特異性の高い糖化アミノ酸オキシダーゼ変異酵素は、試料を適切に処理することによって糖化タンパク特異的に定量することが可能であり、臨床診断用酵素として応用できる可能性が示された。

以上の成果は、応用微生物学、酵素化学、応用分子生物学の分野だけでなく、臨床診断といった応用分野に大きく貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果とあわせて、博士（農学）の学位を授与することを適当と認める。