



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

遺伝子組換えによる体外診断薬用酵素の高生産系の
確立とその応用に関する研究

| | |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山本, 和巳 メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/20.500.12099/2260 |

| | | | |
|---------|--------------------------------------|----------|-------|
| 氏名（本籍） | 山本和巳（福井県） | | |
| 学位の種類 | 博士（農学） | | |
| 学位記番号 | 農博乙第15号 | | |
| 学位授与年月日 | 平成9年9月12日 | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 | | |
| 学位論文題目 | 遺伝子組換えによる体外診断薬用酵素の高生産系の確立とその応用に関する研究 | | |
| 審査委員 | 主査 | 岐阜大学 教授 | 河合 啓一 |
| | 副査 | 信州大学 教授 | 寄藤 高光 |
| | 副査 | 静岡大学 教授 | 田原 康孝 |
| | 副査 | 岐阜大学 教授 | 中村 征夫 |
| | 副査 | 岐阜大学 助教授 | 鈴木 徹 |

論文の内容の要旨

体外診断薬は、病因の探索、治療経過の把握など治療医学や、疾病予防、健康保持など予防医学の面からも広く用いられるようになり、医学分野における体外診断薬の重要性が急速に高まってきている。従来体外診断薬としては化学試薬が用いられていたが、近年優れた特異性を有する酵素を利用した診断薬が開発され、化学試薬に代わり広く普及してきている。現在、酵素を用いた体外診断薬は凍結乾燥酵素を用いた製剤化試薬が主に用いられているが、簡便性の点から調製が不要な液状体外診断薬が望まれるようになってきた。

本研究は、クレアチニン、尿酸並びにシアル酸を測定するための体外診断薬に用いられるクレアチニンアミドヒドロラーゼ、ウリカーゼ並びにN-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ(NALase)について、遺伝子組換え技術を導入することにより、これら酵素の遺伝子解析や組換え酵素の諸特性の解明など基礎的な知見を得るとともに、組換え酵素の大量生産技術と高純度化技術の確立を図り、さらに組換え酵素を用いた液状体外診断薬の実用化を目的に行ったもので、以下に示す結果を得た。

1) 遺伝子組換えによる体外診断薬用酵素の高生産系の確立

クレアチニン測定用クレアチニンアミドヒドロラーゼを生産する *Pseudomonas* sp. PS-7 の本酵素遺伝子の塩基配列を決定し、780塩基対、259アミノ酸よりなる構造遺伝子を見いだした。本研究において初めてクレアチニンアミドヒドロラーゼ遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列が明らかにされ、本酵素の構造や反応機構の解明に貴重な知見を与えた。さらにこのアミノ酸配列が既知の配列と有意な相同性が認められないことから本酵素はこれまで知られている酵素とは異なった構造をとっているものと推定された。また本ヒドロラーゼは亜鉛酵素で、本酵素分子中に存在している8個のヒスチジン残基のいずれかが亜鉛の結合に関与しているものと推察した。 *Escherichia coli* C600におけるクレアチニンア

ミドヒドロラーゼ遺伝子の発現について検討し、誘導物質無添加時において *Pseudomonas* の約30倍の酵素を生産させることに成功した。さらに熱処理を導入した簡便な精製操作で、高純度の酵素を高収率で得ることに成功した。

尿酸測定用ウリカーゼとして用いられている *Candida* の酵素に比べ、優れた特性を持つ *Bacillus* sp. TB-90 の本酵素遺伝子の塩基配列を決定し、本遺伝子が996塩基対、332アミノ酸よりなることを明らかにした。本研究において原核生物のウリカーゼ遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列を初めて明らかにした。本酵素には真核生物のウリカーゼで知られている保存配列と銅結合部位を形成している配列がともに認められないことから、原核生物のウリカーゼは真核生物の酵素とはかなり構造が異なっていることが示唆された。一方、原核、真核生物のウリカーゼに共通して認められる新しい保存配列が存在することを発見した。 *E. coli* JM109 において生産されたウリカーゼの性質は *Bacillus* の酵素と良く似ていたが、組換え酵素のサブユニットの分子量が *Bacillus* の酵素に比べ幾分大きいこと、また熱安定性が約10℃向上していること等の違いが認められた。C末端分析から、 *Bacillus* の酵素ではプロセシングによりC末端側の13アミノ酸残基が除去されていたが、組換え酵素ではこのプロセシングを受けていないことを明らかにし、 *E. coli* と *Bacillus* sp. TB-90 のプロセシング機構が異なっていることを示すとともに、このプロセシングを受けていないことが組換え酵素におけるサブユニットの分子量の増加と耐熱性の向上の原因と推察した。

シアル酸測定用NALaseは *E. coli* によるセルフクロニングにより生産されているが、クレアチニンの測定を妨害したり試薬の劣化を引き起こすカタラーゼやNADH酸化酵素等の宿主由来の酵素の混入が問題となっている。そこで、これら混入酵素を容易に除去できる新規NALase生産用宿主を探索した。その結果、 *Serratia liquefaciens* IF012979 が *E. coli* 用プラスミドベクターを使用できること、組換えプラスミドを安定に保持しかつNALaseを構成的に高発現すること等から、有用な遺伝子組換え用宿主であることを認めた。さらに *S. liquefaciens* と *E. coli* ではカタボライト抑制の機構が異なっていることを見いだした。これらの諸結果を基に、 *S. liquefaciens* におけるNALaseの高生産条件について検討したところ、 *E. coli* を宿主に用いた場合の7倍までNALaseの生産量を向上させることに成功した。また組換えNALaseは熱処理工程を含む簡単な操作で高度に精製され、宿主由来の混入酵素をほぼ完全に除去することができた。また組換えNALaseの耐熱性が *E. coli* の酵素に比べ約10℃向上していることを認めた。

2) 組換え酵素を用いた液状体外診断薬の開発

組換えクレアチニンアミドヒドロラーゼ、ウリカーゼ及びNALaseを用いて、それぞれ液状のクレアチニン測定試薬、尿酸測定試薬及びシアル酸測定試薬を調製し、これら液状酵素試薬の安定性、精度、正確性について検討した。その結果、いずれの液状酵素試薬とも長期間の保存安定性、同時再現性、直線性、妨害物質の影響並びに標準法または従来法との相関性について検討したところ、これらの液状酵素試薬が製剤化酵素試薬と同等またはそれ以上の性能を有していることが確認され、液状体外診断薬として実用化に成功した。

以上、本研究において、クレアチニン、尿酸及びシアル酸を測定するための体外診断薬に用いる原料酵素の開発に遺伝子組換え技術の導入を図り、これら酵素の遺伝子並びに組換え酵素について解析を進め基礎的な新知見を得るとともに、優れた特性を有する組換え酵素を用いた液状体外診断薬の実用化に成功、体外診断薬分野における遺伝子組換え技術

適用の有効性を実証した。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、医療の分野で疾病の原因探索、治療経過の観察などに使用されている体外診断薬の中で、クレアチニン、尿酸並びにシアル酸を測定する酵素試薬の開発を目指したもので、その内容は、緒論に続き、第一部では主に遺伝子組換えによる体外診断薬用原料酵素の生産について検討した結果を、第二部では組換え酵素を用いた液状体外診断薬の開発について、それぞれまとめたものである。

(1)クレアチニン測定用クレアチニンアミドヒドロラーゼを生産する*Pseudomonas* sp. PS-7の本酵素遺伝子の塩基配列を決定し、本遺伝子が780塩基対からなり259アミノ酸をコードしていること、また既知の配列と有意な相同性がないことを明らかにした。クレアチニンアミドヒドロラーゼ遺伝子の塩基配列は本研究で初めて明らかにされたもので、酵素の構造や反応機構の解析研究に貴重な知見を与えた。本遺伝子を挿入したpCNH5-13を保有する*E. coli* C600が*Pseudomonas*に比べ約30倍の高い酵素生産性を示すことを認め、また熱処理を含む4ステップの精製操作で高収率で高純度の組換え酵素標品を得ている。さらに組換え酵素の性質が*Pseudomonas*の酵素と同一であることを明らかにした。

(2)尿酸測定用として優れた特性を示すウリカーゼを生産する*Bacillus* sp. TB-90の本酵素遺伝子が996塩基対からなり332アミノ酸をコードしていることを明らかにし、原核生物のウリカーゼ遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列を初めて明らかにした。また*Bacillus*の酵素には真核生物ウリカーゼに見られる保存配列と銅結合配列が認められなかったが、原核及び真核生物の酵素に共通に認められる新しい配列を発見した。*Bacillus*のウリカーゼ遺伝子を挿入したプラスミドベクターpU06を導入した*E. coli* JM109は、*Bacillus*に比べ約8倍の酵素生産性を示した。この組換え酵素の性質は*Bacillus*の酵素と良く似ていたが、サブユニットの分子量が幾分大きいこと及び熱安定性が約10℃程向上していること等の違いが見られた。C末端分析の結果から、*Bacillus*のウリカーゼはC末端側13残基がプロセシングにより削除されるが、組換え酵素はこのプロセシングを受けていないことを明らかにし、組換え酵素の分子量の増加と耐熱性向上の原因と推察している。

(3)シアル酸測定用N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ(NALase)は*E. coli*によるセルフクローニング系で生産されているが、混入酵素に起因する測定妨害や酵素試薬の劣化が問題となっている。そこで、混入酵素の除去が容易な新規NALase生産用宿主の探索を行い、*E. coli*用プラスミドベクターが使用可能で組換えプラスミドを安定に維持できること及びNALaseの生産性が高いこと等から、*Serratia liquefaciens* IF012979が優れたNALase生産用宿主であることを認めた。さらに熱処理工程を導入した4ステップの精製操作により高収率で混入酵素をほぼ完全に除去したNALase標品を得ることに成功した。この組換え酵素の性質は*E. coli*による組換え酵素とほぼ同様であったが、熱安定性が幾分向上していた。

(4)組換えクレアチニンアミドヒドロラーゼ、ウリカーゼ並びにNALaseを用いてそれぞれ液状試薬を調製し、その性能について検討した。その結果、いずれの液状酵素試薬とも長期間の保存安定性、同時再現性、直線性、妨害物質の影響などについて優れた性能を有していることを認め、液状体外診断薬として実用化に成功した。

以上記述したように、本論文は、体外診断薬用酵素の開発に遺伝子組換え技術を導入、原料酵素の遺伝子並びに組換え酵素について新たな基礎的知見を与えるとともに、組換え酵素を用いた体外診断薬用酵素試薬が極めて優れた性能を有していることを実証、酵素利用学分野の進展に大きく貢献するものと評価された。

以上、本論文審査委員会は、提出論文並びに基礎となる学術論文等について慎重に審議し、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値があるものと判定した。

[学位論文の基礎となる学術論文]

1. Cloning of the Creatinine Amidohydrolase Gene from *Pseudomonas* sp. PS-7
Kazumi Yamamoto, Masanori Oka, Toshiro Kikuchi, and Shigenori Emi
Biosci. Biotech. Biochem. 59(7)1331~1332, 1995
2. 新規耐熱性組換えウリカーゼを用いた液状尿酸測定試薬の開発
浅野茂樹、山本和巳、手嶋眞一、菊地俊郎、川村良久
臨床化学 23(3)214~220, 1994
3. Nucleotide Sequence of the Uricase Gene from *Bacillus* sp. TB-90
Kazumi Yamamoto, Yoshio Kojima, Toshiro Kikuchi, Tatsuro Shigyo,
Kohji Sugihara, Masachika Takashio, and Shigenori Emi
J. Biochem. 119(1)80~84, 1996
4. *Serratia liquefaciens* as a New Host Superior for Overproduction and Purification Using the *N*-Acetylneuraminase Lyase Gene of *Escherichia coli*
Kazumi Yamamoto, Bunsei Kawakami, Yoshihisa Kawamura, and Keiichi Kawai
Anal. Biochem. 246(2)171~175, 1997

[既発表学術論文]

1. Plasmid-Determined Cadmium Resistance in *Pseudomonas putida* GAM-1 Isolated from Soil
Hiroyuki Horitsu, Kazumi Yamamoto, Sayari Wachi, Keiichi Kawai, and Akira Fukuchi
J. Bacteriol. 165(1)334~335, 1986
2. Characterization of an Interspecific Fusant between *Candida utilis* and *Candida lipolytica*
Hiroyuki Horitsu, Kazumi Yamamoto, Yasuhiro Asai, Keiichi Kawai, Satoshi Futo, and Akira Fukuchi
Agric. Biol. Chem. 53(2)389~394, 1989
3. Purification, Molecular Cloning, and Expression of Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*
Mikiko Chihara-Siomi, Kazuhiro Yoshikawa, Noriko Oshima-Hirayama, Kazumi Yamamoto, Yukihiro Sogabe, Takuji Nakatani, Takaaki Nishioka, and Jun'ichi Oda
Arch. Biochem. Biophys. 296(2)505~513, 1992
4. Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene for NADH:FMN Oxidoreductase

from *Vibrio harveyi*

Yoshitaka Izumoto, Takashi Mori, and Kazumi Yamamoto

Biochim. Biophys. Acta, 1185, 243~246, 1994

5. 臨床検査試薬としてのリパーゼ：現状と問題点

手嶋眞一、山本和巳、川村良久

生物工学会誌 73(3)239~241, 1995

6. 臨床検査用遺伝子組換え酵素の最新動向

手嶋眞一、山本和巳、西矢芳昭

BIO INDUSTRY 13(1)20~28, 1996