

氏 名	にし や よし あき 西 矢 芳 昭
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学位記番号	論 工 博 第 3395 号
学位授与の日付	平成 10 年 11 月 24 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	PROTEIN ENGINEERING OF CREATININE-DEGRADING ENZYMES AND APPLICATION TO CLINICAL ASSAYS (クレアチニン分解酵素のタンパク質工学と臨床的測定への応用) (主査)
論文調査委員	教授 今中忠行 教授 砂本順三 教授 田中渥夫

論 文 内 容 の 要 旨

クレアチニンは、生体組織中に広く存在しているクレアチン、クレアチンリン酸の最終代謝産物として常に一定量代謝され尿中へ排泄されている。クレアチニン量は、外因性の影響或いは腎以外の影響を受けない。そのため、臨床検査において血清中のクレアチニン量の測定は腎機能の程度を知る最も良い指標となる。従来、臨床検査で用いられているクレアチニンの定量法は化学法が主であったが、感度及び精度に優れる酵素法が開発され、主流になりつつある。酵素法はクレアチニン分解酵素であるクレアチナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼを利用する。これらの酵素は、*Pseudomonas* 属、*Bacillus* 属などの細菌がクレアチニン代謝のため生産することが知られており、それぞれの特徴も精製酵素を用いて詳細に調べられている。しかしながら、酵素学的情報に比べ遺伝学的情報は乏しく、各酵素遺伝子のゲノム上での関係やそれぞれの発現調節に関する知見はなかった。

このような背景から、本研究はクレアチニン分解酵素とその遺伝子の機能を解析し、臨床的測定へ応用することを目的として行われ、以下に示す結果を得た。

1) クレアチニン分解酵素遺伝子群の解析

Arthrobacter 属細菌よりクレアチニン分解酵素遺伝子群及びその周辺遺伝子をクローニングし、全塩基配列を決定した。クレアチニン分解酵素遺伝子群はクラスターを成しており、この中には負の調節遺伝子 1 種及びトランスポーターと相同性の高いタンパクの遺伝子 2 種も含まれていた。それぞれの酵素遺伝子を有する発現プラスミドを構築し、組換え菌で高発現させた。また、それぞれの酵素を単一に精製し、諸性質を評価した。

2) サルコシンオキシダーゼのタンパク質工学

サルコシンオキシダーゼの機能解析をタンパク質工学的手法により試みた。まず、ランダム変異及び部位特異的変異により基質特異性を改変し、pHプロファイルとの関連を調べた。次に、ハイドロパシープロファイルでの構造予測を基に選択したシステイン残基を置換し、安定性を向上させることができた。種々の変異体の解析から、活性中心にシステイン残基が含まれること、N末端側に補酵素結合部位が、C末端側に基質結合部位がそれぞれ存在することが判明した。また、塩素イオンがサルコシンオキシダーゼと補酵素の相互作用に対し効果的であることを発見した。

3) 機能改変酵素の臨床的測定への応用

タンパク質工学で得られた変異型サルコシンオキシダーゼを臨床的測定に応用した。安定性が向上した変異体C265Sを使用した臨床検査試薬の性能より、その有用性を実証した。また、補酵素結合部位の変異処理により作成した塩素イオン依存性サルコシンオキシダーゼを用いた新規な血中塩素の測定法を開発し、臨床検体中の塩素濃度が迅速かつ正確に測定できることを確認した。

本研究の成果として、野生型サルコシンオキシダーゼ及び変異体C265Sは遺伝子組換え技術による工業スケールでの生産に成功し、現在クレアチニン測定用酵素として種々の臨床検査薬に役立てられている。

論文審査の結果の要旨

本研究では、細菌のクレアチニン代謝に関与する遺伝子群に注目し、各酵素遺伝子の特徴を明らかにするとともに酵素的性質を解析している。また、タンパク質工学的技術を用いてクレアチニン分解酵素の機能改変を行い、基礎的知見を得るとともに、改変酵素が臨床的測定へ応用可能であることを示している、主な成果は次の通りである。

(1) *Arthrobacter* 属細菌より、クレアチニン分解酵素遺伝子群及び調節因子の遺伝子を含む関連遺伝子を単離し、これらがクラスターを成すことを明らかにした。

(2) 各酵素（クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、サルコシンオキシダーゼ）を精製し、酵素化学的な諸性質を明らかにした。

(3) サルコシンオキシダーゼの基質特異性の改変がタンパク質工学的手法により可能であることを示した。

(4) システイン残基の置換により、サルコシンオキシダーゼの安定性が大幅に向上し、組換え菌の培養や酵素精製といった製造工程の段階でも安定化効果が認められた。

(5) サルコシンオキシダーゼのN末端側に補酵素結合部位、C末端側に基質結合部位がそれぞれ存在し、さらに塩素イオンが酵素と補酵素の相互作用に対し効果的であることを見出した。

(6) 改変酵素を生体内クレアチニン、クレアチンの測定に応用した。また、塩素イオン依存性の変異酵素を利用した血清中塩素イオンの酵素的測定法を開発した。

以上のように、本論文において微生物のクレアチニン分解系酵素及びその遺伝子群に関する基礎的知見が得られたとともに、酵素の機能改良に対するタンパク質工学の有用性が示された。また、酵素の機能を一次構造から予測し、有効な機能改変方法を構築した点は、学術上評価される。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。

また、平成10年10月26日、論文内容とそれに関連した事項についての試問を行った結果、合格と認めた。