

氏 名	たか くら とも あき 高 倉 知 朗
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2599 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 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	Industrial Production and Characterization of L-Methionine γ -Lyase, A Potent Antitumor Agent (抗腫瘍性酵素 L-メチオニン γ -リアーゼの工業的製造と特性解明に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 江 崎 信 芳 教 授 清 水 昌 教 授 植 田 充 美

論 文 内 容 の 要 旨

L-メチオニンは必須アミノ酸であり、正常細胞も腫瘍細胞も L-メチオニンを要求するが、正常細胞に比べて腫瘍細胞の方が L-メチオニンに対する依存度が高く、血中の L-メチオニンを低濃度に維持できれば腫瘍細胞の生育を選択的に抑制できると考えられる。事実、L-メチオニンを不可逆的に分解する酵素、細菌の L-メチオニン γ -リアーゼ (METase) には抗腫瘍性が認められる。医薬品に実用できる METase を開発するためには、本酵素の特徴である多機能触媒性ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 酵素としての特性解明、および METase の工業的製造法、正確な活性評価法ならびにポリエチレングリコール (PEG) 修飾体の工業的製造法の確立、PEG-METase の血中動態の解明などが不可欠である。

本研究は、METase を抗腫瘍性医薬として実用するための基礎として、METase および PEG-METase の工業的製造法の確立ならびに特性解明を行ったものであり、その結果は以下のように要約される。

1. L-メチオニンおよびその誘導体の α , γ -脱離反応ならびに γ -置換反応の両者を包括する METase 反応モデルを構築した。得られた反応速度式を用いて L-メチオニンおよびその誘導体に対する反応速度定数を決定した。さらに工業プロセスへの適用を目的として、L-メチオニンを基質とする METase の簡便活性測定法を確立した。
2. *Escherichia coli* を宿主とする系で遺伝子組換え METase の高発現化を達成するため、転写翻訳の最適化を図った。その結果、*trc* プロモーターを用い、Shine-Dalgarno 配列と開始コドン間の配列を TATCGATACTAT とするプラスミドが最大 METase 活性を示すことを見いだした。500-L 培養槽を用いて遺伝子組換え *E. coli* を回分培養し、2.1 g/L の METase を得た。本菌における全可溶性タンパク質の43%が METase に相当することを見いだした。100-L 反応槽を用いる系において、細菌抽出液に PEG、硫酸アンモニウムならびに塩化ナトリウムを添加することにより、高純度の結晶を大量に高収率で取得することに成功した。再結晶を繰り返した後、カラムクロマトグラフィーを行い、医薬品に適用可能な高品質の METase を得ることができた。
3. METase を PEG 修飾すると比活性の大幅な低下を招くが、それは活性に必須な METase のチオール基が PEG 修飾されることに起因することを見いだした。各種チオール化合物で PEG-METase を処理すると、PEG が遊離して活性に必須なチオール基が再生され、比活性が上昇した。これによって高活性を有する PEG-METase を取得することができ、高品質な PEG-METase の工業的製造法を確立できた。
4. 静脈注射により PEG-METase をマウスに投与し、解析したところ、血中 L-メチオニン濃度はホロ型 PEG-METase の残存量に依存することを見いだした。血中では PEG-METase から PLP が脱離してアポ型に変換されるが、これは主に血清アルブミンと PEG-METase の相互作用によることを明らかにし、PEG-METase と PLP の同時投与によってアポ型酵素への変換を抑制できることを見いだした。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

L-メチオニンを不可逆的に分解する酵素、細菌の METase には抗腫瘍性医薬としての利用が期待されている。本研究は、

METase の動力的特性解明と活性評価法の確立、遺伝子組換え *E. coli* を用いた METase の工業的製造法の確立、高活性型 PEG-METase の特性解明と工業的製造法の確立、血中 PEG-METase の動態解析を行ったものであり、評価すべき点は次のとおりである。

1. L-メチオニンおよびその誘導体の α , γ -脱離反応ならびに γ -置換反応の両者を包括する反応モデルを構築し、METase の動力的特性を明らかにした。これらの成果をもとに、L-メチオニンを基質として最大反応速度を求める簡便活性評価法を確立することができた。これは医薬用酵素、特に多機能触媒性酵素の品質評価法として注目すべき成果であり、他の PLP 酵素の活性評価にも適用できることから、その意義は大きい。
2. 最適プロモーターの選択ならびに Shine-Dalgarno 配列と開始コドンの間の最適配列の作出を行い、遺伝子組換え METase の高発現化を達成した。遺伝子組換え *E. coli* 細胞の抽出液から一段階で高純度の METase 結晶を大量に高収率で取得することに成功し、METase の工業的製造法を確立した。METase を医薬として実用するための基盤として重要な成果といえる。
3. PEG-METase の比活性が低いのは、METase 活性に必須なチオール基が PEG 修飾されることに起因することを実証し、各種チオール化合物で処理することによって高活性型 PEG-METase を取得することに成功した。これは PEG-METase の医薬への実用化に当たり要請される、患者への負担軽減に繋がる重要な成果といえる。
4. マウス血中で PEG-METase から PLP が遊離してアポ酵素に変換されるが、それは主に PEG-METase と血清アルブミンとの相互作用によることを実証した。また、PEG-METase とともに PLP を同時投与すると、PEG-METase のアポ化を軽減できることを明らかにした。これは PLP 酵素を医薬として用いる際の一般的指針となるものであり、高く評価できる。

以上のように本論文は、METase および PEG-METase を医薬品として開発するための基礎として、その特性解明と効率的な工業的製造法を確立したものであり、応用生化学、応用酵素学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成18年2月13日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。