

学位論文の要旨

論文題目 微生物による臨床検査用酵素の生産に関わる研究

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学 専攻

学生番号 D123384

氏名 歌島 悠

臨床検査とは、超音波や画像診断、心電図等の身体のなかの様子やその動きをみる「生体検査」と、尿や便、血液の成分を測定したり、取り出した組織の状態を観察する「検体検査」に分類され、特に検体検査においては、検体中の成分を分析するために、臨床検査薬が利用される。「検体検査」では、酵素や色素等の化学反応によって検査を行う「生化学検査」や抗原抗体法により検査を行う「免疫学的検査」、血液中の成分を分析する「血液学的検査」のほかに、「細菌検査」や「遺伝子検査」などがある。「生化学検査」では、検体由来成分を酵素化学的若しくは、化学的に反応させ、分光光学的に分析を行う方法が主流であり、検査薬には酵素が広く利用されている。

臨床検査薬に使用される酵素には、グルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼなどさまざまな酵素が利用される。また、これらの臨床検査用酵素には、誤診断を防ぐために高い基質への特異性と高い反応性が求められ、さらに、臨床検査薬の長期間の保存に耐えるため、高い安定性が求められる。また、副反応を防ぐために、高い精製純度が求められる。

これらの臨床検査用酵素は、植物や動物組織、微生物から抽出、精製される。遺伝子組換え技術の進歩により、これらの酵素を微生物に組み込み、組換え発現させることで、目的の酵素を大量に発現させ、安価に酵素を精製することが可能となってきたが、植物や真菌などの真核生物由来の酵素は発現量やフォールディングの問題、糖鎖修飾などの問題から組換え発現が困難であり、植物体からの抽出や微生物の野生株を利用するなどにより製造されている。

真核生物の遺伝子組換え発現宿主としては、メタノール資化性酵母である *Pichia pastoris* や出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、麴菌 *Aspergillus oryzae* などの真菌や、タバコ培養細胞、CHO 細胞などの動物細胞や、昆虫ではカイコなども利用されているが、発現量の低さ、培養の困難さ、高額な産業利用ライセンスが必要であるなど、真核生物の遺伝子組換え宿主の産業利用には様々な課題がある。

独立行政法人酒類総合研究所で単離され、研究されている、担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 は、排水処理用の酵母として単離されたが、近年、宿主-ベクター系が開発され、さらに、キシロース添加により強力に誘導発現可能なキシラナーゼプロモーターも取得されたことにより、強力な異種タンパク質発現系が構築されている。さらに、*Pichia pastoris* や *Saccharomyces cerevisiae* が子嚢菌系(Ascomycete)の酵母に分類されるのに対して、*Cryptococcus* sp. S-2 は担子菌系(Basidiomycete)に分類される酵母であり、新たなタンパク質の発現系として利用の可能性はある。

本研究では、臨床検査用酵素として様々な検査に利用される西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(HRP)と血糖測定の用いられる糸状菌由来の GDH を対象とし、これらの酵素の組換え生産に取り組んだ。

第1章では HRP の *Cryptococcus* sp. S-2 での組換え発現を検討した。HRP は過酸化水素(H₂O₂)と色素などのメディエーターとの酸化反応を触媒する酵素であり、臨床検査において二次反応によく用いられる。例えば、悪玉コレステロールと呼ばれる LDL-C の分析においては、LDL コレステロールをコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼの反応によって生成された過酸化水素をペルオキシダーゼと色素の反応によりキノン色素を生成することにより、分光光学的分析を可能にしている。HRP の組換え発現に関する報告は、1990 年頃からあるが、大腸菌や酵母を用いた場合、その発現量は非常に低いことが確認されている。本研究では、宿主として *Cryptococcus* sp. S-2 を用

い、コドンの最適化、分泌シグナルの最適化、キシラナーゼプロモーターを用いた高密度培養により西洋ワサビペルオキシダーゼの高発現を検討した。検討の結果、野生型配列を導入した場合、遺伝子内部に潜在的に存在する poly(A)付加シグナルによって mRNA の転写が途中で停止し、不完全な mRNA が合成されていることを見出し、コドンの最適化により遺伝子内部に存在する poly(A)付加シグナルが除去され、完全長の mRNA が合成されることを確認した。さらに、N 末端に存在する分泌シグナルを *Cryptococcus* sp. S-2 由来のシグナルに置換し、C 末端に存在する液胞滞留シグナルを除去することによって、HRP の発現量を 13.2 倍に向上させることに成功した。さらに、キシロースを連続的に添加する高密度培養によって、HRP の発現量をさらに 27 倍向上させることで、培養液あたりの発現量を約 110 mg/L まで向上させることに成功した。この生産量は、これまでに論文などで報告されたレベルよりはるかに高いレベルであり、*Cryptococcus* sp. S-2 はタンパク質の異種発現宿主として非常に優れていることを確認した。また、本研究によって *Cryptococcus* sp. S-2 による異種タンパク質の組換え発現において、コドンの最適化、分泌シグナル配列の最適化、キシロース連続添加による高密度培養が有効であることを確認した。

第 2 章では、血糖測定に用いられる GDH を対象として、その酵素の取得と改変、さらに、大腸菌、麹菌 *Aspergillus oryzae* と *Cryptococcus* sp. S-2 での組換え発現に取り組んだ。GDH は血液中のブドウ糖と反応し、電子を放出するため、血糖値の測定を行う「自己血糖測定装置」に広く利用されている。糖尿病患者は、自己の血糖値をコントロールするために、食前、食後、就寝前など、一日に数回、自己血糖測定装置を用いて自身の血糖値を測定する必要がある。GDH には、血中のグルコース以外の糖類に反応しないように、基質に対する高い特異性が求められ、さらに、長期間の保存に耐えるため、高い安定性が求められる。本研究では、麹菌が生産する基質特異性に優れた FAD 依存型グルコースデヒドロゲナーゼ(FAD-GDH)を取得し、アミノ酸置換により耐熱性を向上させることに成功した。次に、改変型 FAD-GDH を麹菌で組換え発現することにより N 型糖鎖の修飾が起こり、その結果、さらなる耐熱性の向上がみられた。さらに、改変型 FAD-GDH は、コドンの最適化と分泌シグナルの置換、連続的なキシロースの流加による高密度培養によって、*Cryptococcus* sp. S-2 で大量に組換え発現可能であることを確認した。また、ケカビ由来の FAD-GDH についても、同様の手法によって *Cryptococcus* sp. S-2 で組換え発現可能であることを確認した。

以上により、真核生物由来の酵素遺伝子を酵素の種類や由来によらず、*Cryptococcus* sp. S-2 において組換え大量発現可能であることを示し、*Cryptococcus* sp. S-2 が異種タンパク質発現の宿主として非常に優れることを示した。

第 3 章では *Cryptococcus* sp. S-2 を産業的に利用しやすく、また、研究開発の対象としても扱いやすい微生物とするため、宿主-ベクター系の改良に取り組んだ。具体的には、ウラシルマーカを用いたマーカリサイクル系を構築し、栄養要求性マーカの追加と改良、*ku70* 遺伝子破壊による遺伝子ターゲティング効率の向上により遺伝子組換え操作を容易にし、産業利用しやすい宿主とするために、*Cryptococcus* sp. S-2 が細胞外に排出する多糖類の生産量を低減させた変異株の取得を行った。本研究によって、*Cryptococcus* sp. S-2 を産業的にも、研究対象としても利用しやすい微生物に改良することが出来た。

また、東洋紡株式会社においては、本研究成果をベースとした異種組換え発現系を用いた製品開発を進めており、本宿主-ベクター系を用いた臨床検査用酵素の組換え発現については、経済産業省から遺伝子組換え微生物の第二種使用許可を頂いている。これにより、*Cryptococcus* sp. S-2 の組換え菌の産業利用が可能となり、本技術の実用化がなされたことになる。

以上に示すように、本研究によって、臨床検査用酵素を *Cryptococcus* sp. S-2 を用いて組換え発現させるための基盤技術を構築し、宿主-ベクター系の整備、産業利用可能な宿主の取得が達せられた。本研究の成果によって、臨床検査において使用する酵素を微生物によって大量に組換え発現させることが可能となり、高純度で安価な、臨床検査用酵素を提供することが可能となり、広く医療の現場に貢献すると考える。