論　文　の　要　旨

論文題目　Development of a salt-resistant luciferase and its application to endotoxin measurement
（耐塩性ルシフェラーゼの開発とエンドトキシン測定法への応用）

広島大学大学院　統合生命科学研究科
統合生命科学専攻　生物工学プログラム
氏　名　八幡　悟史（細胞工学研究室）

第 1 章　緒言

エンドトキシンは大腸菌や緑膿菌などのグラム陰性菌の細胞壁に存在する毒素であり、血液に混入すると発熱やショック症状を引き起こす。そのため、注射液や透析液などの血液と接触する医薬品では薬局方やガイドラインで管理基準が定められている。医薬品中のエンドトキシンを測定し、混入が無いことを管理することは、医療事故の防止のため、必要不可欠である。透析治療において、エンドトキシン濃度を 0.001EU/mL 未満に管理することで、患者の死亡率が最低であったことが報告されている。そのため、ガイドラインではエンドトキシン濃度を 0.001EU/mL 未満で管理することが定められている。エンドトキシンはカブトガニの血球成分から作製した試薬（以下リムルス試薬）を用いて測定されている。エンドトキシンとリムルス試薬の反応による、濁度や色の変化を光学的に測定する比濁法と比色法が用いられている。しかし、これらの測定法は感度と測定時間がトレードオフの関係であり、透析液の管理基準を測定するには 30 分以上測定時間が必要である。そこで、リムルス試薬の反応とルシフェラーゼの発光反応を組み合わせた生物発光法が開発された。この測定法は水中のエンドトキシンを高感度・迅速に測定可能である。しかし、塩化ナトリウムを含むサンプルの場合、ルシフェラーゼの発光反応が阻害を受け、測定結果は低値を示してしまう。そのため、ルシフェラーゼの発光反応を用いたエンドトキシン測定法は、サンプルが透析液の場合、使用に適していない。一方、ルシフェラーゼは変異によって、熱安定性や酵素活性を改良でき、また発光波長が変化することも知られている。しかし、塩化ナトリウムに対する抵抗性を上げるルシフェラーゼの変異は知られていなかった。そこで本論文では、塩化ナトリウム存在下で発光が阻害されにくい変異型ルシフェラーゼの創製と、この変異型ルシフェラーゼを用いた透析液中のエンドトキシン測定法の開発を目的とした。

第 2 章 塩化ナトリウムの阻害を受けない変異型ルシフェラーゼの開発

本章では塩化ナトリウムの阻害を受けにくい変異型ルシフェラーゼの開発を目的とした。まず、阻害成分を明確にするために、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、酢酸ナトリウムなどによる発光阻害を検討した。その結果、ルシフェラーゼの発光はナトリウムイオンではなく、塩化物イオンによって阻害されることがわかった。そこで、エラープローン PCR を用いて、ルシフェラーゼの遺伝子に変異を導入することで、塩化ナトリウムの阻害を受けにくい変異型ルシフェラーゼを創製した。ホタルルシフェラーゼの遺伝子全体に、1000bp 当たり 2 つの割合でランダム変異を導入した。得られた変異型ルシフェラーゼに関して、140 mM の塩化ナトリウム存在下で発光量を測定し、塩化ナトリウム非存在下に対して 60%以上の活性を維持する変異を検討した。約 20000 個の形質転換体から 2 つの変異型ルシフェラーゼが別々に得られた（Val288Ile、Glu488Val）。さらに部位特異変異を用いて、288 位と 488 位のアミノ酸を他のアミノ酸に置換することで、アミノ酸の効果を検討した。もっとも高い耐塩性を示した変異は、ランダム変異で得られた Val288Ile と Glu488Val であった。また、2 つの変異を組み合わせた二重変異体（ルシフェラーゼ CR）は単独の変異よりも耐塩性が向上し、140mM の塩化ナトリ

ウム存在下で塩化ナトリウム非存在下に対して95%以上の活性を維持した。また、様々な塩化ナトリウム濃度に対して、野生型のルシフェラーゼよりも高い活性を維持した。ルシフェラーゼ CR の発光波長は野生型ルシフェラーゼと差異は無く、最大波長は 556 nm であった。塩化ナトリウム存在下で ATP 測定を行った場合、広範囲の ATP 濃度に対して、高発光ルシフェラーゼ（ルシフェラーゼ FM）よりも、高い発光強度を示した。その結果、ルシフェラーゼ CR は耐塩性のルシフェラーゼとして利用できると結論した。

第 3 章　耐塩性ルシフェラーゼを用いた生物発光式エンドトキシン測定法の改良

本章では、ルシフェラーゼ CR を用いたエンドトキシン測定法を開発した。ガイドラインでは、透析液中エンドトキシンの測定値が塩化ナトリウム非存在下に対して 75～125%の範囲内であることが定められている。ルシフェラーゼ FM を用いた透析液中のエンドトキシン測定では、塩化ナトリウム非存在下に対して、33%の値を示した。一方、ルシフェラーゼ CR を用いた場合、塩化ナトリウム非存在下に対して 95%以上の値を得ることができた。生物発光法は、検出限界が 0.00025EU/mL であり測定時間は 20 分であった。今回開発した、新しい生物発光法は透析液のガイドラインに適合し、従来法よりも高感度・迅速に透析液中のエンドトキシンを測定可能である。

第 4 章　総括

本研究では、耐塩性ルシフェラーゼを開発し、エンドトキシン測定法へ応用した。第 2 章では、塩化ナトリウムの阻害を受けにくいルシフェラーゼの変異を 2 つ（Val288Ile、Glu488Val）発見した。さらに 2 つの変異を導入することで耐塩性ルシフェラーゼであるルシフェラーゼ CR を開発した。第 3 章では、ルシフェラーゼ CR を透析液中のエンドトキシン測定法に応用することで、透析液成分の阻害を受けない、エンドトキシンの高感度・迅速測定法を開発した。今後、透析治療の高度化によって、エンドトキシンの高感度・迅速測定法は必要不可欠になる。そのため、本論文で開発した、生物発光を用いた透析液中のエンドトキシン測定法が使用されると期待される。

参考論文

・ S. Yawata, K. Noda, A. Shimomura, A. Kuroda, Mutant firefly luciferase enzymes resistant to the inhibition by sodium chloride, Biotechnol. Lett., 43 (2021) 1585-1594.

・ S. Yawata, K. Noda, A. Shimomura, A. Kuroda, Improved bioluminescence-based endotoxin measurement method using a salt-resistant luciferase mutant, Anal. Biochem., 633 (2021) 114408.