

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)	氏名	八幡 悟史
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
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)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	黒田 章夫	
審査委員	教 授	加藤 純一	
審査委員	教 授	秋 庸裕	
審査委員	准教授	舟橋 久景	
審査委員	准教授	上野 勝	
〔論文審査の要旨〕			
<p>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。エンドトキシンの測定はカプトガニの血球成分から作製した試薬（以下リムルス試薬）を用いて行われている。広島大学ではエンドトキシン検査を高感度化するために、生物発光とリムルス試薬を組み合わせた方法を開発した。リムルス試薬による反応は、エンドトキシン特異的に活性化されるプロテアーゼカスケード系反応であることから、反応基質にプロテアーゼが認識切断するペプチドを付加したルシフェリンを使用することで、発光によるエンドトキシンの測定が可能になった。しかし、ルシフェラーゼの発光反応は塩化ナトリウムにより阻害を受けるため、塩化ナトリウムを含む透析液などの測定が困難になった。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を創成し、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。</p> <p>第1章では、生物発光を用いたエンドトキシン測定法の開発の意義について論じた。また、透析液中のエンドトキシンの測定には耐塩性ルシフェラーゼの開発が必要であることを記述した。</p> <p>第2章では、ルシフェラーゼの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。次に、エラープライム 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探索した。約 20,000 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、変異の効果を検討した。さらに、最適な二つの変異を組み合わせた二重変異体 (ルシフェラ</p>			

ーゼ CR) を創成した結果、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もほぼ阻害されなくなることがわかった (95%以上の活性を維持)。Val288Ile のアミノ酸置換の効果に関しては、ルシフェラーゼの活性中心と基質の距離が近くなることで塩に対する抵抗性が増加したのではないかと推論した。

第 3 章では、ルシフェラーゼ CR をエンドトキシン測定法に応用し、透析液中のエンドトキシンが測定できることを示した。ルシフェラーゼ CR を用いることで従来の測定方法よりも高感度かつ迅速に透析液中のエンドトキシンを測定可能であること、並びに本測定方法が透析液のエンドトキシン測定のガイドラインを満たすことを示した。

第 4 章では本論文を総括し、今後の透析治療の高度化に伴って必要とされるエンドトキシン測定法において、本論文で開発した生物発光を用いたエンドトキシン測定法が貢献できることを述べた。

以上、耐塩性ルシフェラーゼの創成と、それを利用したエンドトキシン検査の高感度化に成功したことから、本論文は高く評価できる。審査の結果、本論文は統合生命科学研究科学位論文評価基準を満たし、著者は博士 (工学) の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。