

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590579

研究課題名（和文） 糖尿病検査試薬ケトアミノキシダーゼの多角的アプローチによる高機能化

研究課題名（英文） Improved function of ketoamine oxidase for clinical examination reagent of diabetes by use of multiple approaches

研究代表者

植田 正 (UEDA TADASHI)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：90184928

研究成果の概要（和文）：糖尿病の指標は空腹時の血糖値であるが、これは食事等の影響を受けやすい。その代替指標として、生体内で寿命の短い蛋白質にグルコースが結合した修飾蛋白質量を評価する方法が開発されている。その方法では酵素（ケトアミノキシダーゼ）を用いるが、この酵素の安定性を高めることで、臨床検査試薬として利用しやすくなるため、この研究ではこの酵素に種々のアミノ酸の置換を行ったが、有益な酵素の創製はできなかった。また、この酵素の立体構造が解析されていないということが、この一因と考えたため、この酵素の結晶化を行い黄色の結晶を得たが、結晶の形状が悪く解析には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：For prevention of diabetes, we should control of the concentration of glucose in our vessels. Since the concentration of glucose is affected by foods, the concentration of glycated proteins in vessels often became used as an indicator of the average of concentration of glucose. The ketoamine oxidase is crucial for the evaluation of the concentration of glucose from the glycated proteins. To improve the function of the ketoamine oxidase, we prepared many ketoamine oxidase mutants but did not obtain ketoamine oxidase mutant with improved function. Then, in order to obtain the basis for mutation design, we tried to analyze the three-dimensional structure of the ketoamine oxidase in vain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：蛋白質工学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：糖尿病、ケトアミノキシダーゼ、アミノ酸改変、X線結晶解析、安定化

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の評価として、血糖値の測定が広く用いられている。空腹時血糖の測定が一つの指

標となるが、血糖値は食事等の影響を受けやすい。Bunnら（Science1978）は糖化ヘモグロビンが糖尿病の指標となることを示し

たことから、最近、糖化ヘモグロビンの測定も臨床現場で実施されている。例えば、ヘモグロビンは生合成されて代謝されるまで、生体内で約2ヶ月の寿命を持つので、測定時から遡って約2ヶ月間の平均的な血糖値を得ることができる。従って、糖化ヘモグロビンの値は、直接血糖値を測定した結果と相補的に用いられ、被験者の血糖の状態を知ることができる。この有用性のため、糖化ヘモグロビン (HbA1c) の評価は世界中で行われている。また、他の体内寿命の短い蛋白質についても、糖化した蛋白質の評価が実施されている (Kouzuma et al., Clin Chim Acta 2002; 2004)。糖化蛋白質から、グルコースの量を評価する場合に、ケトアミノキシダーゼが必要である。この酵素が糖化アミノ酸に反応して、過酸化水素を発生するので、この過酸化水素を定量することによって、糖化アミノ酸量、すなわち一定期間の血中グルコースの量を知ることができる。従って、このケトアミノキシダーゼを安定化は長期間使用できる酵素が得られるので、臨床検査分野では有益である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、活性を保持したまま、アミノ酸変異を施すことにより長期間活性を保つ、ケトアミノキシダーゼを創製することである。蛋白質の安定化は、立体構造が明らかになった場合、種々の安定化の方策 (例えば、二面角における歪の解消、ヘリックスの N 末領域への負電荷アミノ酸残基の導入、ヘリックス C 末領域への正電荷アミノ酸残基の導入) が適用可能であるが、本研究開始段階では、ケトアミノキシダーゼ及びその類似体の立体構造が明らかとなっていないので、ケトアミノキシダーゼ X 線結晶解析と並行して一次配列を基にアミノ酸変異を施し安定化を目指す。

3. 研究の方法

(1) ケトアミノキシダーゼのアミノ酸の変異導入

ケトアミノキシダーゼ遺伝子 (野生型) を含むベクター pET22b (+) を鋳型としてアミノ酸置換するための種々のオリゴヌクレオチドを用いてメガプライマー法によりケトアミノキシダーゼ遺伝子改変ベクター

を作成した。次に、5'末端の NdeI と 3'末端の EcoRI を含むプライマーを用いて PCR (Polymerase Chain Reaction) を行った。その後、ケトアミノキシダーゼ遺伝子を NdeI と EcoRI の制限酵素で切断したのち、アガロース電気泳動法で反応が進行していることを確認した。この遺伝子をベクター pET22b (+) を NdeI と EcoRI で切断したものにライゲーションした後、このベクターで大腸菌 JM109 を形質転換した。このベクターにはアンピシリン耐性遺伝子が挿入されているので、アンピシリンを含む培地で生育コロニーを選別した。そのコロニーからアルカリ法によりプラスミドを抽出し、DNA シークエンサーを用いて目的に遺伝子配列が挿入されていることを確認した。

(2) ケトアミノキシダーゼの精製

前項で得た形質転換体をアンピシリンを含む LB 培地で 37°C で培養して、600nm の吸光度が 0.5-1 になった段階で、イソプロピル β -D-チオガラクトピラノサイド 0.2mM を添加して、20°C で 20 時間培養した。その後、上清を 50mM トリス緩衝液 pH 8 に対してリゾチーム破碎後、遠心分離して、上清を 70%w/v の硫酸アンモニウムで塩析した。沈殿物を再び 50mM のトリス緩衝液 pH 8 にけん濁させ、その緩衝液に対して透析した。次に、DEAE-Toyopearl (1.5 x 100 cm) を用いて分離した。溶出緩衝液は、50mM のトリス緩衝液 pH 8 から 0.5M NaCl を含む同緩衝液で行った。溶出画分の 280nm の吸光度をモニターした。溶出ピークの SDA-PAGE により、ケトアミノキシダーゼの分子量に単一のバンドが確認された。

(3) ケトアミノキシダーゼの劣化の評価

調製した野生型及び変異型ケトアミノキシダーゼを 50mM Tris-HCl 緩衝液 pH7 に対して十分透析した後、各濃度を 50 μ g/mL に調整した。これを 50 μ L ずつのプラスチックチューブに分注して、一定時間加熱後、氷冷し、沈殿物を卓上型遠心分離機で遠心分離した後 (12000rpm x 5min)、HPLC に接続し、50mM Tris-HCl 緩衝液 pH7 で平衡化した陰イオン交換樹脂 Resource Q (1 cm x 5 cm) カラムに、一定量を添加し、0-0.5M NaCl までの塩濃度勾配により溶出した。溶出は 450nm の吸光度 (補酵素フラビンの吸収) でモニターし

た。加熱前の各ケトアミノキシダーゼ量に対する、加熱後の各ケトアミノキシダーゼ量を比較し、残存量を評価した。

(4) ケトアミノキシダーゼの X 線結晶解析

リコンビナントケトアミノキシダーゼの野生型を精製し、水に対して十分に透析した後、種々のスクリーニングキットで沈殿条件を検討した。その後、沈殿条件の比較から、適当な pH、沈殿剤等の条件を選抜した。ラージスケールで pH や沈殿剤の濃度を少しずつ変動させて至適結晶化の条件を見いだした。反射データは九州大学内にある X 線結晶解析装置により得た。

4. 研究成果

(1) Gly-Pro 配列導入によるケトアミノキシダーゼの安定化の試み

私の研究室では以前 Pro 残基がその N 末側に位置するアミノ酸残基と不都合な相互作用をしている可能性が高いため、Pro 残基の N 末側に Gly 残基を挿入することで、蛋白質を安定にすることができることを示した (Ueda et al. Protein Eng. 1993; Motoshima et al. J. Biochem. 1995)。研究を開始した平成 20 年の春の段階では、ケトアミノキシダーゼ並びに類似の一次配列をもつ酵素の立体構造が解析されていなかったため、この戦略によりケトアミノキシダーゼの安定化を試みた。

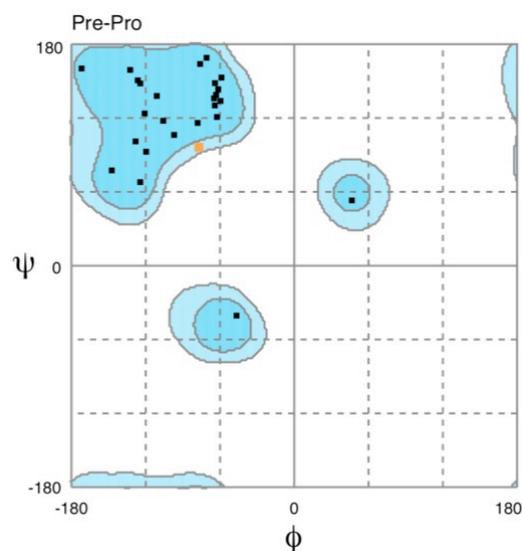
ケトアミノキシダーゼには Pro が 27 個存在するが、市販のソフトウェアも用いて構造を持たない部分に存在する Pro 残基 (Pro45、Pro89、Pro187、Pro249、Pro300、Pro359、Pro402、Pro413) に着目した。その理由は、 β ターン中の 2 番目にプロリン残基が存在するとその構造を安定化することが知られているからである。そこで、これらの 8 つの Pro の N 末端側のアミノ酸基を Gly に変異した変異体 (S45G、D88G、S186G、T248G、Y299G、H358G、R401G、D412G) の変異を持つ大腸菌 BL21 の形質転換体を実験方法に従って作成した。遺伝子操作が適正に実施されていること、アミノ酸変異が期待通りに挿入されていることは、塩基配列の解析などから確認した。

少量培養して SDS-PAGE で発現確認を行ったところ、D88G、H358G は培養後、大腸菌を

破碎して、遠心分離後、上清画分には存在しなかったため、アミノ酸変異の影響がケトアミノキシダーゼの安定性やフォールディングに影響したものと判断し、それ以外の 6 つの変異体について、大量発現した。1 L あたり 5-10mg の目的物を調製できた。SDS-PAGE、HPLC に接続した Resource Q カラムにより単一物であることも確認した。

そこで、野生型と 6 つの変異体を実験方法に従って、24 時間 40°C でインキュベーションして、加熱前と加熱後の残存量の比較を行った。野生型はこの条件で加熱すると 31% まで残存量が低下する。一方、変異型 6 種 (S45G、S186G、T248G、Y299G、R401G、D412G) いずれも残存量は 0.1% 以下に低下した。この結果から、Pro45、Pro187、Pro249、Pro300、Pro402、Pro413 の領域に Gly-Pro 配列を挿入してもケトアミノキシダーゼは安定化しないことがわかった。

平成 20 年 7 月 22 日にプロテインデータバンクにケトアミノキシダーゼと一次配列が類似した酵素フルクトシルアミノキシターゼの立体構造座標 (3DJJ) が公開されたので、この構造に基づきホモロジーモデリングを行って、ラマチャンドラプロット上で Pro がどのような二面角を有するかを調べた (下図)。



Pro 残基の N 末側に存在するアミノ酸残基の二面角を図中にプロットしたが、いずれも安定なコンフォメーション (図中の有色の領域) に存在することがわかった。この結果を踏まえて、変異体の不安定化の要因を考察すると、野生型において、Ser45、Ser186、Thr248、

Tyr299、Arg401、Asp412 の側鎖がケトアミノキシダーゼ内で元々有利な相互作用をしていた可能性がある。

(2) Cys 置換体によるケトアミノキシダーゼの安定化の試み

我々は Cys 残基と近接するアミノ酸残基を Cys にアミノ酸置換することによって、アレルギー蛋白質 Ph17 を安定化することに成功した (Ohkuri et al. J. Immunol. 2010 に報告済み)。そこで、フルクトシルアミノキシダーゼの立体構造を基盤にケトアミノキシダーゼの立体構造をホモロジーモデリングした。その結果、ケトアミノキシダーゼは 8 つの Cys 残基が存在することが示唆された。このうち活性に必要な補酵素であるフラビンが結合する部位に存在する Cys 残基を除いた 5 つの Cys 残基の近接するアミノ酸残基 (Phe172、Thr345、Arg348、Thr353C、Tyr354、Asp425) を Cys に置換した、F172C、T345C、R348C、T353C、Y354C、D425C の 6 種類の変異型ケトアミノキシダーゼをデザインした。いずれも実験方法に記載した方法で作成し、DNA 配列解析からデザインどおりの変異体を作成されていることを確認した。ケトアミノキシダーゼ遺伝子の変異を有するベクターで BL21 を形質転換した。それぞれの形質転換株を大量発現後、大腸菌を破碎して、遠心分離後、上清画分を実験方法に従い精製した。その結果、1L あたり 5-10mg の目的物を調製できた。SDS-PAGE、HPLC に接続した Resource Q カラムにより単一物であることも確認した。

そこで、野生型と 6 つの変異体を実験方法に従って、40℃でインキュベーションして、加熱前と加熱後の残存量の比較を行った。その結果、T345C、T353C、Y354C は野生型とほぼ同一の残存量を示したが、D425C、F172C、R348C においては、野生型より明らかに残存量が低下した。そこで、T345C、T353C、Y354C については、30℃で 2 週間インキュベーションして野生型の残存量と比較したが、優位な残存量の差が得られなかった。これまでの研究から SS 結合が形成された場合には、かなりの安定化が見込まれることから、いずれの変異体においても期待どおりの SS 結合が形成していないことが予想される。今回の変異体のデザインはホモロジーモデリングによるものであったことから、安定化を目指した

変異については、ケトアミノキシダーゼの正確な立体構造が必要であることが強く示唆された。

(3) ケトアミノキシダーゼの X 線結晶解析

これまでの研究結果を踏まえて、ケトアミノキシダーゼの X 線結晶解析を実施することにした。リコンビナントケトアミノキシダーゼを十分に精製したものをサンプルとして用いた。最初にケトアミノキシダーゼを水に溶解し、15mg/mL の溶液を調整した。市販のスクリーニングキット Crystal Screen Kit I/II それぞれ 48 条件、Wizard I/II それぞれ 48 条件で、ハンギングドロップ蒸気拡散法により、20℃で結晶化を実施した。その結果、ほとんどの条件で蛋白質の沈殿が観測された (9 割程度)。

次に市販のスクリーニングキットである、Classics 96 条件、JCSG 96 条件、PACT 96 条件で、ハンギングドロップ蒸気拡散法により、20℃で結晶化を実施した。結晶化を行った。この際、蛋白質濃度を前回のスクリーニングの結果を踏まえて 7.5mg/mL に下げて結晶化を試みた。ほとんどの条件で蛋白質の沈殿が観測された (9 割程度)。

さらに、各スクリーニングキットで条件を絞り込み、再現性を調べた結果、蒸気核酸法により、沈殿剤にポリエチレングリコール、イソプロパノールを用いた条件で、有色の結晶が得られた (下図)。その後、その結晶に X 線をあて、反射データを解析すると蛋白質の結晶であることがわかったが、分解能の悪い結晶だったので、この反射データからケトアミノキシダーゼの立体構造を解析することはできなかった。今後は結晶を細かく砕いて、それをシードとして、ケトアミノキシダーゼ過飽和溶液に加えるなどして結晶



化を実施すると単一で良質な結晶を得ることができる可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

末吉 彩、大栗誉敏、黒木暁彦、植田 正
Gly-Pro 配列導入によるケトアミノキシダーゼの安定性評価、日本薬学会第 130 年会、平成 22 年 3 月 30 日、岡山市桃太郎アリーナ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 正 (UEDA TADASHI)
九州大学大学院・薬学研究院・教授
研究者番号：9 0 1 8 4 9 2 8

(2) 研究分担者

大栗 誉敏 (OHKURI TAKATOSHI)
九州大学大学院・薬学研究院・助教
研究者番号：7 0 3 4 6 8 0 7
(2008-2009)

(3) 連携研究者

阿部 義人 (ABE YOSHITO)
九州大学大学院・薬学研究院・准教授
研究者番号：6 0 3 1 5 0 9 1

塩井 誠次郎 (SHIOI SEIJIRO)
福岡大学・R I センター実験施設・助教
研究者番号：8 0 4 2 5 3 1