

生体成分を検出するあるいは生体成分自体を用いたセンサはバイオセンサと呼ばれ工業・環境・医療などの計測分野で広く用いられている。近年、構造生物学および代謝工学をはじめとしたバイオテクノロジーの発展により、生物の物質認識機構が徐々に明らかになってきており、特異的にかつ高感度に検出できるバイオセンサを作製できるようになってきている。そこで本特集ではバイオセンサの最新技術および実際に企業での応用例を取り上げる。

(編集担当：中澤 光)†

## フルクトシルペプチドオキシダーゼの開発と 糖尿病診断への応用

一柳 敦

### 1. はじめに

世界の糖尿病患者数は増加の一途を辿っており、国際糖尿病連合 (IDF) の報告によると、糖尿病患者数は2017年の時点で4億2500万人であり、2045年には6億2900万人に達すると予測されている。糖尿病患者の増加が社会問題化する中、2010年に日本糖尿病学会は、血糖値とヘモグロビンA1c (HbA1c) が共に糖尿病型の値を示す場合には糖尿病と診断するよう糖尿病診断基準を改定した<sup>1)</sup>。このようにHbA1c測定の需要が高まる中、我々は、酵素を利用した正確・迅速・簡便なHbA1c測定方法の開発に取り組み、新規酵素フルクトシルペプチドオキシダーゼ (FPOX) と、プロテアーゼおよびペルオキシダーゼを組み合わせることでHbA1cを測定できることを見出した。本稿では、FPOXの発見とそれを用いたHbA1c測定法の開発について紹介する。

### 2. 糖尿病マーカーHbA1cとその測定法

ヘモグロビンは酸素の運搬に関与する赤血球中のタンパク質であり、二つの $\alpha$ サブユニットと二つの $\beta$ サブユニッ

トとで構成される。ヘモグロビン $\beta$ サブユニットのアミノ末端が血中のグルコースと反応して生じたものをHbA1cと言う。血中の総ヘモグロビンに占めるHbA1cの割合は過去1~2ヶ月の平均血糖値を反映する。そのため、HbA1cは糖尿病診断および糖尿病患者の血糖コントロールのマーカーとして受け入れられている。

酵素によるHbA1c測定法が登場する以前、HbA1cは主にHPLC (高性能液体クロマトグラフィー) 法、免疫法により測定されていた。HPLC法は、イオン交換樹脂を充填したカラムで検体を分画して得られたクロマトグラムから、HbA1cを含む画分のエリア面積を算出するため、精度の高い測定法である。一方で、専用の測定機器およびカラムが必要であり、測定に長時間を要した。免疫法は、抗原抗体反応によりHbA1cを測定する方法であり、HbA1c以外の様々な検査項目でも免疫法に基づいた測定試薬が開発されている。そのため、生化学自動分析装置に対応しており、検査センターや病院の検査室で多くの検体を一斉に測定するのに適した測定方法である。一方、免疫法では抗原抗体反応により反応液中に複合体を形成させる必要があり、この複合体が自動分析装置の反応セルを汚染することが懸念されていた。

そこで、酵素による正確・迅速・簡便なHbA1c測定法の開発を試みた。酵素反応を利用することで精度の高い測定系の構築が期待でき、また、複数の酵素反応を介してHbA1cを水溶性色素に変換するため、自動分析装置の反応セルを汚染する心配がないと考えたためである。



Development of Fructosyl Peptide Oxidase and Its Application to Diabetes Diagnosis  
Atsushi ICHIYANAGI  
2005年 東京工業大学大学院 総合理工学研究科 博士前期課程修了  
現在 キッコーマン(株)研究開発本部  
連絡先：〒278-0037 千葉県野田市野田399  
E-mail aichiyanagi@mail.kikkoman.co.jp

2018年12月6日受理

† Nakazawa, H. 平成29, 30年度化工誌編集委員(3号特集主査)  
東北大学大学院工学研究科 バイオ工学専攻

### 3. FPOX を利用した HbA1c 測定法の開発

#### 3.1 HbA1c のプロテアーゼ分解産物の解析

HbA1c は分子量約 65 kDa のタンパク質であるため酵素の基質としては大きく、HbA1c に特異的に作用する酵素を見つけ出すのは困難であると考えられた。そこで、次の三工程からなる HbA1c 測定法を考案した：(1) HbA1c をプロテアーゼで分解する工程、(2) HbA1c 特有の分解産物に作用するオキシダーゼで過酸化水素を生成させる工程、(3) ペルオキシダーゼにより過酸化水素を色素に変換する工程。そこで、各種機器分析法を利用して HbA1c のプロテアーゼ分解産物を同定することから着手した。

HPLC、アミノ酸分析および MS 解析等の手法により、HbA1c のプロテアーゼ分解産物を分析した結果、その主生成物にはフルクトシルジペプチド (F-ValHis) が含まれることが明らかとなった。F-ValHis は、HbA1c  $\beta$  サブユニットのアミノ末端と一致する特有の分解産物であり (図 1)、F-ValHis に作用するオキシダーゼである FPOX があれば、酵素による HbA1c 測定系を構築できることが強く示唆された。後にプロテアーゼを選抜した結果分かったことであるが、HbA1c の分解の程度はプロテアーゼの種類によって異なり、特に *Bacillus* 属由来中性プロテアーゼは HbA1c を F-ValHis まで効率よく分解できることが示唆された<sup>2)</sup>。一方で、プロテアーゼによっては、HbA1c の分解が十分進まないものも存在した。

#### 3.2 FPOX の探索

FPOX のスクリーニングは、土壌から分離した微生物や保存菌株コレクションなど、約 7,000 株の微生物を対象として、それら菌株の培養上清および菌体抽出液の FPOX 活

性 (図 2a) の有無を調べるという手法でおこなった。結果として、糸状菌コレクションから FPOX 活性を示す 21 株が選抜され、中でも *Coniochaeta* sp. NISL9330 の菌体抽出液からは最も高い FPOX 活性が検出された<sup>3)</sup>。なお、スクリーニングには多量の F-ValHis が必要であったが、自社内で高純度の F-ValHis を大量に合成することができたこともスクリーニングが成功裏に終わった要因の一つである。

#### 3.3 FPOX のクローニング

次に、FPOX のアミノ酸配列の解析および酵素特性の評価をおこなうために、*Coniochaeta* sp. NISL9330 由来 FPOX (FPOX-C) を精製した。培養して得られた菌体から FPOX-C を抽出し、三種類のクロマトグラフィーを利用して、SDS-PAGE による分析で夾雑タンパク質が認められない水準まで精製することができた。FPOX-C は分子量約 50 kDa の単量体酵素であった。続いて、精製 FPOX-C をトリプシン消化し、プロテインシーケンサーを用いて N 末端および内部アミノ酸配列の解析をおこなった。得られたアミノ酸配列情報から、縮重プライマーを設計して逆転写 PCR をおこない、部分的な cDNA 配列を決定した。さらに 3' RACE、5' RACE 等のクローニング手法を利用して FPOX-C 全長の cDNA を決定した<sup>4)</sup>。FPOX-C の推定アミノ酸配列には、N 末端付近にジヌクレオチド結合モチーフ (GXGXXG) が含まれた。FPOX-C の分光スペクトルからは、フラビン化合物を補酵素として包むことが示唆されていたため、FPOX-C は FAD 結合型酵素であると判断した。また、N 結合型糖鎖が付加するモチーフ (NXS または NXT) は一箇所のみ存在し、FPOX-C の機能発現に糖鎖が寄与する可能性は低いと予想された。実際に、FPOX-C は大腸菌を宿主として組換え発現することができ、その生産量は *Coniochaeta* sp. NISL9330 の生産量の約 67 倍であった<sup>4)</sup>。

#### 3.4 HbA1c 酵素測定法の確立

大腸菌を宿主とした FPOX-C の組換え発現に成功し、組換え FPOX-C を安定供給できるようになったことで、プロテアーゼの種類や反応条件を検討することが可能となり、HbA1c 酵素測定法の精度向上に繋がった。最終的には、血液試料を *Bacillus* 属由来プロテアーゼで処理し、FPOX-C およびペルオキシダーゼの作用により発色させた反応液の吸光度と、試料の HbA1c 濃度との間に相関関係を確認することができた<sup>2)</sup>。このようにして確立した、FPOX-C を

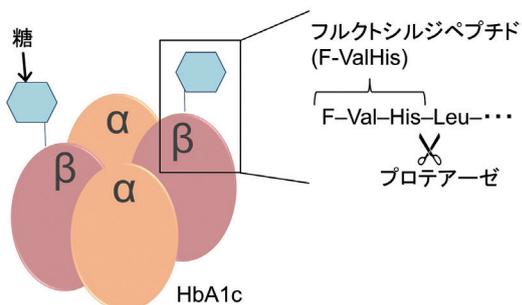


図 1 HbA1c  $\beta$  サブユニットのアミノ末端の構造

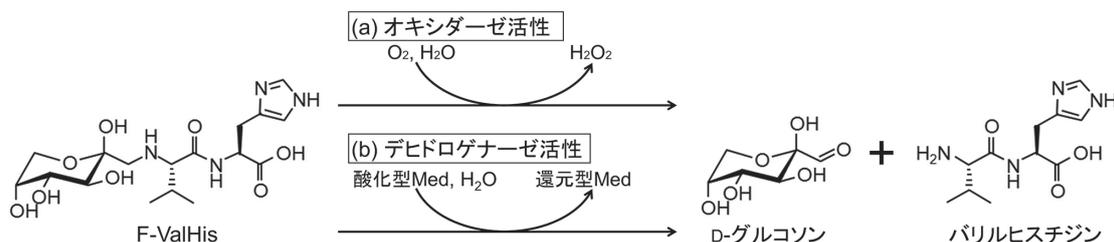


図 2 FPOX の反応スキーム。(a) はオキシダーゼ活性 (b) はデヒドロゲナーゼ活性を示す。図中 Med はメディエータを示す

用いたHbA1c酵素測定法の模式図を図3に示す。

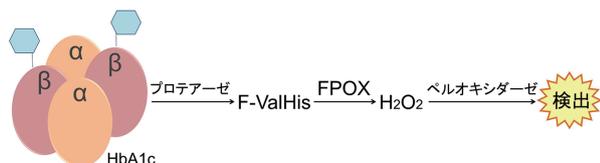


図3 HbA1c酵素測定法の模式図

#### 4. FPOXの改良

FPOX-Cの組換え発現に成功したことで、FPOX-Cの安定供給が可能となったことに加え、変異導入によるFPOX-Cの改良もおこなえるようになった。ここでは、バイオセンサ用途に関連するFPOX-Cの改良事例について紹介する。

##### 4.1 FPOXの安定性向上

血中グルコースの測定に用いられるグルコースセンサにはグルコースオキシダーゼ (GOD) が利用されている。グルコース測定のニーズが非常に高いことが実用化に至った主要因であるが、GODが非常に安定な酵素であることも、グルコースセンサの実用化を促したと言える。つまり、FPOXを利用したバイオセンサの開発には、FPOXの安定性向上が課題の一つとなる。

そこで、ランダムな突然変異を引き起こす大腸菌 XL1-Redへ、FPOX-C 遺伝子をサブクローニングしたプラスミドを導入し、改変型FPOX-C 遺伝子のライブラリを作製した。得られた多種多様な改変型FPOX-Cを組換え発現させ、熱を加えても失活しない改変型FPOX-Cの生産株を選抜した。選抜した生産株からプラスミドを抽出し、FPOX-C 遺伝子における変異箇所を解析したところ、R94K, G184D, F265L, N272D, H302R, H388Yの6種類のアミノ酸置換に熱安定性を向上させる効果があることが明らかとなった。これらのアミノ酸置換の蓄積および組み合わせの最適化により、FPOX-Cが失活する熱処理条件(50℃, 10分)でも酵素活性の90%以上が残存する、熱安定性が向上した改変型FPOX-Cを作製することができた<sup>5)</sup>。FPOXの耐熱性向上の課題には継続的に取り組んでおり、その後、60℃で30分処理しても酵素活性の80%以上が残存する改変型FPOX-Cの開発にも成功している<sup>6)</sup>。

##### 4.2 FPOXの「デヒドロゲナーゼ化」

タンパク質工学的手法によるFPOX-Cの改良が可能となり、FPOX-Cの立体構造情報を活用できれば、より効率的にFPOXの機能改変をおこなえると考えられた。そこで、京都大学との共同研究により、耐熱型FPOX-Cの結晶化に着手し<sup>7)</sup>、その立体構造を決定した。耐熱型FPOX-Cの結晶構造を解明したことにより、その活性中心を構成するアミノ酸も同定でき、それらをターゲットにした部位特異的変異導入によりFPOX-Cの機能を改変するアプローチが採

れるようになった。

電気化学式バイオセンサでは、酵素およびメディエータを仲介して、測定対象化合物から電極まで電子を伝達させ、そのシグナルを検出する手法が用いられる。この手法に基づいてFPOXによるHbA1c測定をおこなう場合、F-ValHisの酸化により生じた電子はFPOXを經由してメディエータに渡ることになる(図2b)。この活性をF-ValHisに対する「デヒドロゲナーゼ活性」と表す。しかしながら、我々が見出したFPOX-Cは、F-ValHisの酸化により生じた電子を酸素に受け渡す「オキシダーゼ活性」(図2a)が高く、F-ValHis由来の電子をサンプル中の溶存酸素に優先して受け渡してしまうことが想定された。

そこで、耐熱型FPOX-Cの結晶構造を参考にして、その活性中心に変異を導入することで、デヒドロゲナーゼ活性を保持しつつオキシダーゼ活性を約1/200に減少させた改変型FPOX-Cを取得することに成功した<sup>8)</sup>。別の微生物由来のFPOXでも、部位特異的変異導入により、デヒドロゲナーゼ活性を保持しつつオキシダーゼ活性を減少させた例が報告されており<sup>9)</sup>、今後「デヒドロゲナーゼ化」したFPOXによるHbA1c測定用センサの開発が促進されることが期待される。

#### 5. おわりに

我々は、新規酵素FPOXを自然界から発見し、三段階の酵素反応によりHbA1c濃度を色素濃度として検出することで、世界初となるHbA1c酵素測定法を構築した。続いて、FPOXの組換え生産に成功したことにより、HbA1c酵素測定法に基づく臨床診断薬の販売へと繋げることができた。また、大腸菌を宿主としてFPOXの組換え生産に成功したことで、タンパク質工学的手法によりFPOXを改良する素地を整えることができた。これにより、バイオセンサに適した特性を有する改変型FPOXの開発も可能となった。今後、改変型FPOXを搭載したHbA1cセンサの開発が進み、実用化されることを期待している。

##### 謝辞

タンパク質結晶構造解析に関してご指導およびご助言頂きました、京都大学大学院薬学研究科 加藤博章教授、中津亨准教授に感謝申し上げます。

##### 参考文献

- 1) 清野裕ら：糖尿病, **53**, 450-467(2010)
- 2) Hirokawa, K. et al. : *Biotechnol. Lett.*, **27**, 963-968(2005)
- 3) Hirokawa, K. et al. : *Arch. Microbiol.*, **180**, 227-231(2003)
- 4) Hirokawa, K. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **311**, 104-111(2003)
- 5) Hirokawa, K. et al. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 775-781(2008)
- 6) WO2013/100006(2013)
- 7) Ichihyanagi, A. et al. : *Acta Cryst. F*, **69**, 130-133(2013)
- 8) WO2016/063984(2016)
- 9) Kim, S. et al. : *Biotechnol. Lett.*, **34**, 491-497(2012)