

平成22年度県立大学地域貢献研究の研究成果について（中間報告）

研究テーマ	実用化を目指した低温反応性ウリカーゼの開発
研究期間	平成 22 ～ 22 年度
主たる研究者	【学部・学科】生物資源学部・生物資源学科 【職・氏名】准教授・日弁隆雄

○研究目的

生活習慣病の監視を日常生活での分析として行うための簡便で安価な分析方法の開発の一環として、尿酸値分析のための臨床検査薬としての尿酸酸化酵素ウリカーゼについて、熱安定性が高く長期保存に耐えると同時に、常温（25～30℃）における高い反応性をもつ好冷性変異体酵素を作製し、尿酸値センサへの応用について検討することを目的とした。

○研究成果

バイオセンサに用いられる生体成分の安定性がバイオセンサの保存安定性やデータの信頼性に直接関わることから、その安定性の向上は実用化に向けた重要な課題として関心が向けられてきた。我々が開発してきた新規低温反応性ウリカーゼは、熱安定性が高く、かつ常温（25～30℃）における高い反応性（好冷性）をもつという、センサー用途向けでは極めて優れた特性を有していた。しかしながら、長期保存の安定性を調べるうちに、溶存酸素による酸化の影響を受けて凝集し沈殿してしまうことが判明した。特に、電極上に固定化して使用するバイオセンサでは、酸化に対する不安定性は大きな問題となる。そこで、酸化に対して耐性を持つ新たな好冷性変異体を作製することにした。

ゲル電気泳動等による解析から、酸化に伴う本酵素の凝集は、本酵素の331アミノ酸残基のうち305番目のシステイン残基がサブユニット間で、いわゆるジスルフィド架橋を形成したため、酵素分子同士が共有結合したため、溶解性が低下し、凝集したことが原因であることが示唆された（図1）。

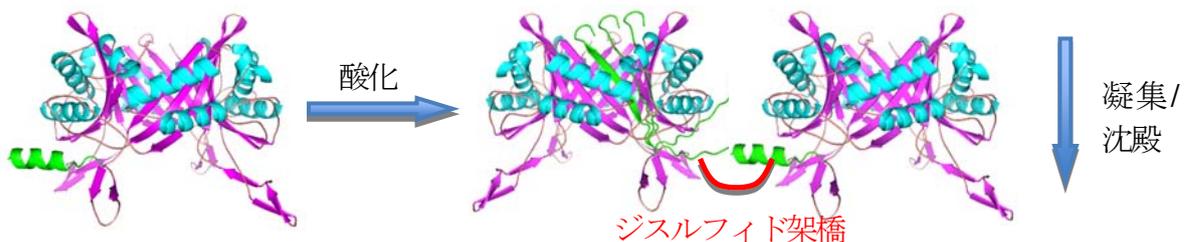


図1：酸化による凝集のメカニズム

この場合、最も直接的な凝集抑制方法は酸化されるシステイン残基305を酸化されない他のアミノ酸残基に蛋白質工学的に置換することである。しかし、この置換の場合、本酵素の熱安定性が低下することが判明した。そこで、このシステイン残基が存在するC末端配列領域の構造を安定化するため、好冷性変異体ウリカーゼの298番目のアルギニン残基をシステインに置換し、予めジスルフィド架橋を形成させることで、酸化と熱の両方に対して安定な変異体を作製することにした。この変異体では、トリプトファン279、プロリン287、アルギニン298をそれぞれロイシン、グリシン、システインの各残基に置換していることから、W279L+P287G+R298C三重変異体と以下呼ぶことにする。

まず、W279L+P287G+R298C 三重変異体の熱安定性および酸化に対する安定性について検討した。熱安定性については、55-75℃に 30 分間さらした後に残存した酵素活性の値を求めたところ、75℃でも 80%程度の活性を維持し、超耐熱性を示した。本酵素溶液を 1 日以上空気に触れる条件でも凝集は観測されず、酸化に対する耐性も獲得したことが確認された。

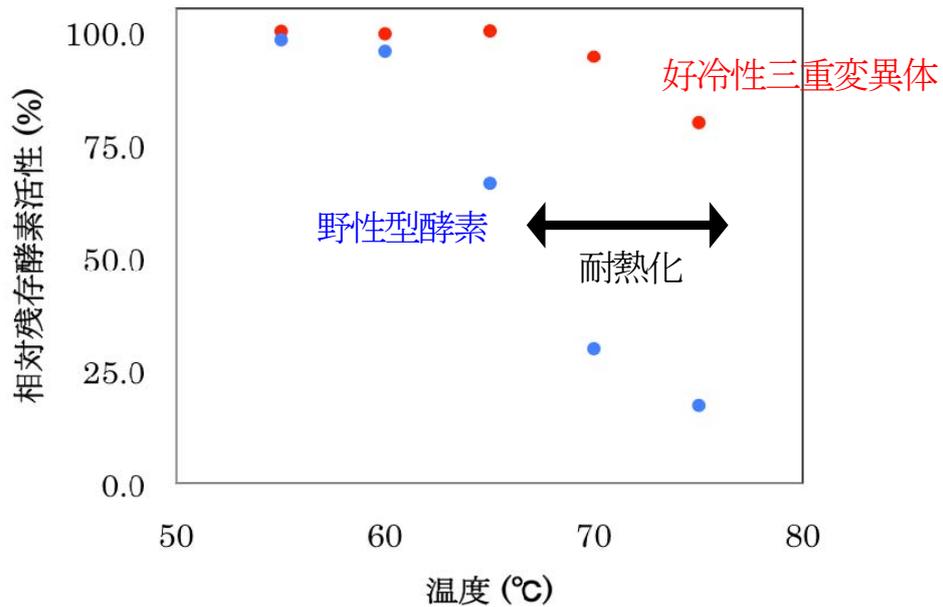


図 2 : 熱安定性の改善効果

さらに、酵素反応の至適温度を調べたところ至適温度は 25℃であり、野性型酵素の 50-55℃に比べて好冷酵素として十分な低温反応性を維持していることが明らかとなった (図 3)。従って、今回得られた W279L+P287G+R298C 三重変異体酵素は、バイオセンサ向け酵素として有利な性質である低温反応性を示しながら、同時に超耐熱性、抗酸化性をもつ有望な酵素であることが示された。

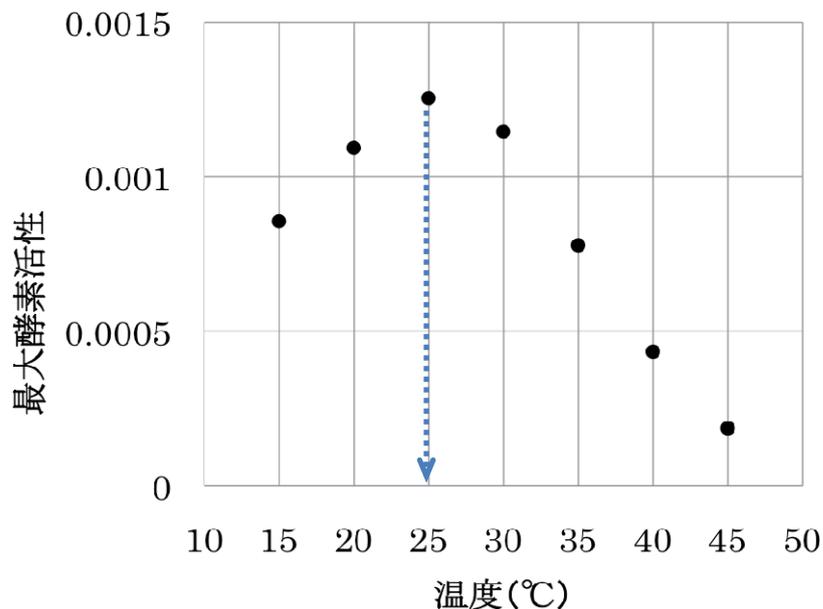


図 3 : 三重変異体酵素の反応至適温度

今後は、さらに本変異体の構造機能解析を進めるとともに、バイオセンサ構築について条件検討を行う予定である。