

論文の内容の要旨

論文題目 20K-hGH の分泌生産系の構築 及び hGH 受容体との会合様式の解析

氏名 内田博司

近年の遺伝子工学の進展により微生物を用いてヒト由来の生理活性蛋白質を生産することが可能になった。この微生物を宿主とした組換え蛋白質の生産法の一つとして分泌生産法がある。この方法において目的蛋白質はシグナル配列との融合体として発現され、分泌の過程でシグナル配列が切断されることにより天然型のN末配列を得ることができ、正しく折りたたまれて天然型の高次構造も形成される。しかし、細胞内で発現した蛋白質が細胞質外へ分泌されるためには、リン脂質二重膜からなる細胞質膜を透過する必要がある。大腸菌における蛋白質分泌の機構については Beckwith らの分泌欠損変異株を用いた研究、及び Wickner らや水島・徳田らの反転膜小胞を用いた研究により解析が進んでおり、膜透過反応には7つの Sec 因子が関与すること、およびエネルギーとして ATP とプロトン駆動力を必要とするという重要な知見が得られている。

現在、大腸菌の分泌生産系による製造が実用化されている蛋白質として 22 kDa ヒト成長ホルモン (22K-hGH) がある。研究が開始された当初、22K-hGH は分泌生産性が低くその改善が課題とされたが、Becker や Chang らにより適合性の高いシグナル配列が探索

された結果、OmpA や ST-II のシグナル配列を用いることにより工業的な生産性が得られることが見出され、今日ではこれにより調製された 22K-hGH 製剤が hGH 分泌不全性低身長症・ターナー症候群、軟骨異栄養症、及び慢性腎不全性低身長症を適応症として臨床的に使用されている。このように 22K-hGH については高純度の試料が大量に入手できるようになったため、その生物活性および受容体との会合様式など作用発現の機序についても詳細に解析されている。ところで、22K-hGH は下垂体前葉の hGH 産生細胞において hGH-N 遺伝子より発現するが、この遺伝子からは他にも選択的スプライシングにより 22K-hGH の 32-46 番目に相当する 15 個のアミノ酸を欠失した分子サイズ 20 kDa のアイソフォーム (20K-hGH) が発現している。この 20K-hGH に関しては下垂体中の存在量が全 hGH の 5~10%と少なく、高純度の天然型試料を充分に入手することが困難であったことから、これまでに生理作用や作用機序に関する確証のある知見は得られていなかった。

本研究は 20K-hGH の大腸菌分泌生産系を構築し、高純度の天然型構造を有する試料を大量に調製することにより、これまで確証が得られていなかった 20K-hGH の生物活性および hGHR に対する会合様式を解明し、また血中動態を測るための測定系構築を試みたものである。

第一章ではまず天然型 20K-hGH の分泌発現系を構築するために、既に 22K-hGH の分泌生産において効果が実証されている OmpA シグナル配列を用いて 20K-hGH を分泌することを試みた。しかし、一次構造上の差異は 15 アミノ酸の欠失のみにもかかわらず、同系による 20K-hGH の分泌生産性は極めて低かった。20K-hGH が 22K-hGH と比べて分泌生産性が低いことについては、20K-hGH が 22K-hGH よりも高い疎水度を有していることに要因があると考えられた。20K-hGH を効率的に分泌させるためにシグナル配列を検討した結果、*B. amyloliquefaciens* の中性プロテアーゼ遺伝子のシグナル配列が適していることを見出した。しかし、この分泌生産系を用いても未だ動物実験を行なうために充分量の試料を調製することは困難であった。そこで、宿主の分泌機能を増強するために各種 Sec 因子や細胞内酸化還元酵素を 20K-hGH と共発現させた。その結果、グルタチオン還元酵素や SecD/F、SecE/PrlA4、及び SecB がいずれも分泌生産性を 2 倍以上増加させることを見出した。このように多数の因子の共発現が効率を改善したことから、20K-hGH の分泌生産性が低い要因として律速となる過程が多段階存在することが推測された。グル

タチオン還元酵素を共発現させた分泌生産系により得られた 20K-hGH を精製し、その試料の N 末配列と分子サイズを解析したところ下垂体 20K-hGH と一致した。また、ジスルフィド結合の位置を同定したところ、22K-hGH から推測される相同部位と一致し、天然型構造を有していることが明らかになった。この天然型 20K-hGH を試料として生物活性を測定し、これまでは試料の純度や構造の不均一性から確証が得られていなかった下垂体抽出品や N 末メチオニル体を用いた結果と比較したところ、下垂体摘出ラットに対する成長促進作用は 22K-hGH と同等であり、従来報告が正しかったことを裏付けた。しかし、ラット脂肪組織における脂肪分解活性は従来報告とは異なり 22K-hGH と同等、むしろ低濃度では強いことが示された。さらにプロラクチン受容体 (PRLR) を介した作用は 22K-hGH の 30% と弱いことを定量的に示すことができた。これらの結果から、20K-hGH は 22K-hGH と同等の成長促進作用および脂肪代謝作用を有すること、また乳癌や白血病および浮腫などの副作用発症のリスクが少ないことが示唆された。

20K-hGH の血中動態の測定には 20K-hGH の特異的抗体を取得が欠かせない。これまでに 20K-hGH の欠失領域近傍のアミノ酸配列を抗原として取得が試みられているがいずれも成功していなかった。第二章では分泌生産系の確立により大量に取得することが可能となった天然型 20K-hGH を抗原とすることで欠失部位近傍の微細な構造変化を認識する特異的抗体を取得することに成功した。さらに取得した抗体を用いて直接ヒト血清中の 20K-hGH 濃度を測定できる ELISA 法 (最小感度 10 pg/ml) を構築できた。

20K-hGH は hGHR との結合に関与する部位の一部を欠失しており、また hGHR を多量に発現している肝組織に対する結合親和性が低いことから hGHR に対する親和性が低いものと考えられていた。しかし、hGHR を介する成長促進作用が同等であったことから、受容体会合様式に違いがあることが予想された。第三章ではまず、hGHR を発現させた動物細胞に対する増殖刺激を調べ、hGHR を介する活性は 22K-hGH と同等であることを確認した。続いて、20K-hGH と同様の分泌生産法により調製した hGH 結合蛋白質 (hGHBP : hGHR の膜外ドメイン) を細胞表層上の hGHR 濃度を想定した濃度 (μM レベル) で 20K-hGH と会合させ、22K-hGH と同様に活性型である 1:2(hGH:hGHBP)複合体を形成することを見出し、20K-hGH の細胞増殖刺激が hGHR を介することを分子レベルで示した。また、hGH 過剰条件では 22K-hGH が自己阻害型である 1:1(hGH:hGHBP)複合体を

形成するのに対し、20K-hGH は 1:1(hGH:hGHBP)複合体を形成しないという会合様式に違いがあることも示した。さらに血中の hGHBP 濃度を想定した (nM レベル) における会合様式のゲル濾過解析により 22K-hGH は 1:1(hGH:hGHBP)複合体を優性に形成し、活性を消失するが、20K-hGH は hGHBP とは結合せずに活性を保持することが明らかになった。これらの結果から 20K-hGH は hGHBP を多量に放出している脂肪組織などに対する作用および血中半減期において 22K-hGH と違いを有していることが示唆された。

第四章では 20K-hGH における受容体結合部位の一部の欠失が会合様式に与える影響を解析し、何故 22K-hGH とは異なる会合特性を有するのかを推測した。まず、20K-hGH の2つの変異体を用いて、22K-hGH と同様のシークエンシャル・バインディングモデルに従うことを明らかにした。続いて実験的、及び計算科学的手法を用いて 20K-hGH の 1つ目と 2つ目に受容体に対する結合親和性（本研究ではそれぞれをステップ 1 親和性、及びステップ 2 親和性と定義）を求め、22K-hGH に対しそれぞれが 1/8 の低下、及び 8 倍の増加と変化していることを示した。このことは 20K-hGH では 15 アミノ酸の欠失により生じたステップ 1 親和性の低下をステップ 2 親和性の増加が補うことにより活性発現に必要な 1:2(hGH:hGHBP)複合体を 22K-hGH と同等に形成できることを意味し、ステップ 1 親和性が低いにもかかわらず同等の成長活性を有することの説明ができた。このステップ 2 親和性の増加については 15 アミノ酸の欠失により中間体である 1:1(hGH:hGHR)複合体の構造が変化し、hGHR 同士の親和性が増加したことに起因すると考えている。

結論として本研究において 20K-hGH の大腸菌分泌生産系と特異的測定系が構築され、20K-hGH の有用性をヒトにおいて解明するために必要な臨床試験が遂行可能となった。また、20K-hGH は 22K-hGH と同等の成長促進作用・脂肪代謝作用を有し、乳癌や白血病および浮腫などの副作用発症のリスクが少ないこと、また血中において hGHBP と結合せず、高濃度における活性低下が少ないという臨床的有用性を有していることが示唆された。しかし、20K-hGH を医薬品として開発するためにはさらなる製造法の改善が必要である。今後、20K-hGH の分泌生産性を向上させるための方策の一つとして Sec 因子群を同時に共発現することが考えられる。また、ステップ 2 親和性の向上については実験的に実証することが課題として残されている。現在、この仮説を実証するために hGHBP 同士の相互作用部位への変異導入やX線結晶構造解析を実施している。