

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 内 田 博 司

22 kDaヒト成長ホルモン (22K-hGH) は、大腸菌の分泌生産系による製造が実用化され、臨床的に使用されている。さらに、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。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20 kDaのアイソフォーム (20K-hGH) も発現している。20K-hGH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入手することが困難であり、生理作用や作用機序に関するこれまでの知見は少ない。本研究は20K-hGHの大腸菌分泌生産系を構築し、精製20K-hGHの生物活性と受容体との会合様式を明らかにし、血中動態の測定系を構築したもので序論と4章よりなる。

序論では、微生物を利用した有用蛋白質生産に関する一般的課題と、20K-hGHを分泌生産させる際の問題点が述べられている。

第一章では、天然型20K-hGHの分泌発現系の構築が述べられている。*Bacillus amyloliquefaciens* の中性プロテアーゼのシグナル配列を結合した20K-hGHは、大腸菌によって分泌可能であったが、この分泌生産系では充分量の試料を得ることは困難であった。そこで、宿主の分泌効率を改善するために各種Sec因子や細胞内酸化還元酵素を共発現させた。その結果、特にグルタチオン還元酵素の共発現が効率の良い20K-hGHの分泌に適していることを見出した。分泌生産系により得られた20K-hGHを精製し、ジスルフィド結合の位置が22K-hGHのジスルフィド結合部位と同じであり、天然型構造を有していることが示唆された。精製20K-hGHの下垂体摘出ラットに対する成長促進作用は、22K-hGHと同等であった。また、ラット脂肪組織における脂肪分解活性は22K-hGHよりも優れていた。一方、プロラクチン受容体 (PRLR) を介した作用は22K-hGHの30%であった。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が、乳癌や白血病および浮腫などの副作用発症のリスクが22K-hGHに比べ少ないことが示唆された。

第二章では、天然型20K-hGHを特異的に認識するモノクローナル抗体の取得について述べられている。さらに取得した抗体を用いてヒト血清中の20K-hGH濃度の測定系が構築されている。

第三章では、20K-hGHとその受容体hGHRとの結合様式について解析されている。これまで、20K-hGHはhGHRに対する親和性が低いと推測されていた。しかし、hGHRを発現した動物細胞に対する増殖刺激を調べ、22K-hGHと同等であることを明らかにした。また、hGH過剰条件では22K-hGHが自己阻害型の複合体を形成するのに対し、20K-hGHは形成しないことを示した。さらに20K-hGHは22K-hGHと異なり、血中の結合蛋白質 (hGHBP) とは結合せずに活性を保持していることが示唆され

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が 22K-hGH より優れている可能性が示唆された。

第四章では、20K-hGH の受容体との会合様式を詳細に解析した結果が述べられている。20K-hGH は 2 力所の受容体結合部位の内、欠失によって結合部位 1 の親和性が低下しているが、結合部位 2 の親和性は増加しているため、22K-hGH と同様二分子の受容体と結合し、同等の活性を示すことを明らかにした。

以上、本論文は 20K-hGH を大腸菌の分泌生産系によって効率よく生産させることに成功し、特異的測定系を構築し、これまで不明であった 20K-hGH の生物活性を明らかにしたものであり、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、本審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。