

論文の内容の要旨

論文題目 分泌生産による 20 kDa ヒト成長ホルモンの各種受容体を介した細胞応答と
結合解析

氏 名 常 川 豊 吉

1970年代に急速に発展した遺伝子組換え技術は、多くの生物の遺伝子構造の解明に役立つと共に、その遺伝子を適当なベクターに組み込んで細胞に導入することにより種々のタンパク質の大量生産を可能にした。大腸菌は増殖が早く手軽に扱えることから、糖鎖を必要としないタンパク質の発現に古くから使用され、その発現機構に関してもこれまで多くの研究がなされている。

大腸菌を用いて目的タンパク質を生産する方法は、大きく菌体内発現法と分泌生産法とに分類することができる。菌体内発現法では、生産されたタンパク質が菌体内で活性型のタンパク質として本来の形に折りたたまれないことも多い。また、N 末端にはほとんどの場合メチオニンが付加されたアミノ酸配列となり、1 次配列自体が天然型のものとは異なってしまう。一方、分泌生産法では、目的タンパク質は N 末端にシグナル配列が付加された前駆体としてまず菌体内に発現される。その後、この前駆体はペリプラズムへの分泌過程においてシグナルペプチドが切断されることにより成熟体となり、天然型と同一のアミノ酸配列となる。ペリプラズム中ではフォールディングが正しく行われ、天然型と同じ高次構

造を形成することが出来る。

分泌生産法により大量調製が可能となったタンパク質の一つに分子量が 22 kDa のヒト成長ホルモン (human growth hormone : 22K-hGH) がある。Becker や Chang らにより OmpA や ST-II などのシグナル配列が 22K-hGH の分泌生産に適していることが見出され、天然型の高次構造を有する 22K-hGH の調製が可能となった。これにより 22K-hGH の分子特性に関する詳細な解析が可能となり、hGH 受容体との結合に関する検討がなされている。一方、この 22K-hGH が下垂体前葉にて発現される際に、これと共に分子サイズ 20 kDa のアイソフォーム (20K-hGH) が分泌されることが知られている。20K-hGH はオルターナティブスプライシングにより 22K-hGH の 32~46 番目に相当する 15 アミノ酸を欠失した構造をとっており、下垂体の全 hGH の 5~10% の割合で存在している。

これまで、20K-hGH に関しては、22K-hGH との構造上の違いから、22K-hGH と異なる性質を有することも示唆されていたが、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、生理作用や作用機序に関する確証のある知見は充分には得られていなかった。筆者らのグループでは、*B.amyloliquefaciens* の中性プロテアーゼ由来のシグナル配列を使用し、グルタチオンリダクターゼを共発現させた大腸菌を用いて、分泌生産法による高純度、天然型 20K-hGH の大量調製に成功した。

本研究は、高純度調製が可能となった 20K-hGH を用いて、20K-hGH の *in vitro* での生物活性、各種受容体との会合様式を詳細に検討することを目的としている。これまで筆者らのグループにより 20K-hGH は 22K-hGH と比較し同等の成長促進活性を有することがラットを用いた実験により確認されている。今回は特に 20K-hGH の臨床使用を考えた場合に検討が重要と思われる 3 つの受容体との相互作用、即ち hGH が結合しその主作用を発揮する hGH 受容体、副作用との関与が懸念されているヒトプロラクチン (hPRL) 受容体、及び hGH の *in vivo* での評価用動物として使用されるラットの GH 受容体を介した細胞応用及び会合様式に関する解析を実施した。

第 1 章では、20K-hGH の hPRL 受容体を介した作用に関する検討を行った。hGH は GH 受容体に結合し主作用を発揮すると同時に、PRL 受容体にも結合することが知られており、22K-hGH をヒトに投与した場合に、乳癌や男性の乳房女性化等の副作用発症と hPRL 受容体との関与が懸念されていた。しかしながら、これまで hPRL 受容体に対する 20K-hGH

の作用に関する詳細な報告は無く、20K-hGH のヒト生体内での作用メカニズムを考察する上では hPRL 受容体との結合様式や 22K-hGH との作用強度の違いに関する知見が必須であった。本研究では、hPRL 受容体を発現させた Ba/F3 細胞を用いた細胞増殖実験、及び同じく hPRL 受容体を発現させた CHO 細胞と Spi2.1 遺伝子プロモーター領域を用いた遺伝子転写活性化実験において、20K-hGH の作用は 22K-hGH よりも弱いことを示した。また、hPRL 受容体を介した細胞内シグナル伝達物質 (JAK2-STAT5) のチロシン残基リン酸化検討においても、20K-hGH のリン酸化能は 22K-hGH よりも低いことを示した。本結果により、20K-hGH はヒトに投与した場合において副作用等のリスクが低いと考えられる。

第2章では、20K-hGH と hGH 受容体との複合体形成メカニズムに関する検討を行った。20K-hGH は 22K-hGH と同じくシーケンシャルバインディングモデルに従い連続的に 2 つの hGH 受容体と結合し、1 : 1 複合体を経由して、最終的に 1 : 2 (hGH : hGH 受容体) 複合体を形成する。1 つめの hGH 受容体に対する 20K-hGH の親和性は 22K-hGH よりも約 10 倍低いことが報告されているにも関わらず、20K-hGH が 22K-hGH と比較し同等以上の hGH 受容体を介した作用を示すメカニズムがこれまで不明であった。20K-hGH が 1 : 2 複合体を形成する際には、hGH 受容体同士の結合が 20K-hGH と hGH 受容体間での結合親和性の低さを補っている可能性が示唆されていたが実験的な確証は得られていなかった。本研究では、hGH 受容体同士の結合領域に存在すると考えられる 15 個のアミノ酸を各々アラニンへ置換した変異型 hGH 受容体発現プラスミドを作製した。これらを Ba/F3 細胞株へ導入し、各変異型 hGH 受容体を介した 20K-hGH の作用 (細胞増殖活性) を解析した。その結果、hGH 受容体上のアミノ酸 Thr-147、Ile-149、His-150、Tyr-200 をアラニンへ置換した際に 20K-hGH の細胞増殖活性は 22K-hGH と比較し、特異的に低下することが判明した。これらの結果は、20K-hGH と hGH 受容体との 1 : 2 複合体形成においては、hGH 受容体同士の結合が、20K-hGH と hGH 受容体間での結合親和性の低さを補っていることを示している。

第3章では、20K-hGH のラット GH (rGH) 受容体を介した作用及び結合様式に関する検討を行った。ラットは hGH の *in vivo* での作用評価動物として頻繁に使用されており、hGH の成長促進活性、浮腫誘発性などに関する検討がなされている。20K-hGH のヒトでの作用を類推する上で、rGH 受容体に対する 20K-hGH の作用に関する解析は非常に重要

である。特に、rGH 受容体に対する 20K-hGH の親和性は 22K-hGH の 3~10%であるという報告がある一方で、下垂体摘出ラットにおける体重増加作用は同等であり、それらの相関に関する検討が必要とされていた。本研究では、分泌生産法により大腸菌を用いて作製した rGH 受容体細胞外領域と 20K-及び 22K-hGH との複合体形成を検討し、20K-hGH の rGH 受容体に対する親和性は 22K-hGH よりも低いことを確認した。また、rGH 受容体を発現させた培養細胞株を用いて、rGH 受容体を介した細胞増殖活性は 20K-hGH の方が低く、ラットの GH 受容体に対する親和性と相関すること、一方、遺伝子転写活性化能は 20K-hGH と 22K-hGH とで等しく、rGH 受容体親和性と相関しないことを見出した。このような違いは hGH 受容体や hPRL 受容体には見られないことから、rGH 受容体に特異的な現象である可能性がある。

結論として本研究において、大腸菌を用いた分泌生産系により多量且つ高純度にその製造が可能となった天然型 20K-hGH を使用することによって、これまでは不明であった 20K-hGH の生物活性と受容体に対する会合様式を解析し、20K-hGH の生体内における多様な作用のメカニズムを明らかにした。20K-hGH は 22K-hGH の 15 アミノ酸を欠失することにより、hGH 受容体や hPRL 受容体に対して異なる作用を有することが示された。これらの知見は今後の 20K-hGH の臨床的有用性を検討する際の土台となるものであり、医薬品としての応用が期待される。