

Title	ヒト塩基性線維芽細胞成長因子の構造に関する研究
Author(s)	妹尾, 昌治
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/2601
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	せの 妹	お 尾	まさ 昌	はる 治
学位の種類	工	学	博	士
学位記番号	第	8917	号	
学位授与の日付	平成元年12月18日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	Structural Analyses of Human Basic Fibroblast Growth Factor (ヒト塩基性線維芽細胞成長因子の構造に関する研究)			
論文審査委員	(主査)			
	教授	柳田 敏雄		
	(副査)			
	教授	葛西 道生	教授	村上富士夫 助教授 森本 英樹

論文内容の要旨

塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) はヘパリンに特異的に結合し、種々の細胞の増殖分化を促進する146アミノ酸残基より成る微量タンパクである。本論文では、組換えDNA技術により大腸菌で産生させたヒト bFGF を大量に精製し、さらに修飾を加えた分子を用いて構造と機能に関する研究を行った。

bFGF はヘパリン・カラムからの溶出過程において、4つのピークを示すが、これらのピークに対応する画分はいずれも bFGF の分析結果と一致した。4つのピークは還元剤存在下で、1つのピーク (P1) に集約されたため、S-S結合による分子構造の変化が示唆された。そこで、部位特異的突然変異法によって Cys 残基を Ser に置換したムテインを作成して、S-S結合の可能性について調べた。69位と87位の Cys を Ser に置換することでピークは P1 に集約された。すなわち、この2個の Cys 残基が分子間あるいは分子内で結合して bFGF の構造に変化を起こすと考えられた。Cys⁶⁹ と Cys⁸⁷ を置換したムテインの生物活性は bFGF と同等であり、Cys⁶⁹ と Cys⁸⁷ は bFGF の構造的遷移性を担っており、生物活性およびヘパリン結合性には関与していないことが示された。

bFGF のカルボキシル末端は塩基性アミノ酸残基に富んでおり、この性質は FGF ファミリー間で共通していることから、この塩基性に富む領域が細胞表面の負に帯電したマトリックスへの吸着に関与していると考えられた。この関係を調べるために、カルボキシル末端あるいはアミノ末端を欠損した bFGF 分子を大腸菌で産生させ性質を検討した。カルボキシル末端の Phe¹³⁹-Leu¹⁴⁰-Pro¹⁴¹ を欠いた bFGF は、ヘパリンへの親和性がアミノ酸残基の欠損度に伴い弱くなることがわかった。この配列は FGF ファミリーにおいて保存されており、この配列が分子の安定化に大きく寄与している可能性が示

された。また、カルボキシル末端46アミノ酸残基を欠いても活性が認められ、さらにアミノ末端を40残基欠損した分子はbFGFと同等のヘパリン結合性と弱い生物活性を有していた。以上の結果から、bFGFのヘパリンへの結合性はAsn¹⁰¹～Pro¹⁴¹の構造に強く依存していることおよび、活性中心はAsp⁴¹～Ser¹⁰⁰に存在していることが示された。

論文の審査結果の要旨

本論文は、細胞成長因子の一つである塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) の構造と活性を遺伝子工学的手法を用いて解析し、その結果をまとめたものである。

本論文は大別して次の四つの内容からなる。まず第一番目は、遺伝子工学的手法を用いたヒトbFGFの作製に関するものである。bFGFは従来牛の脳より抽出されてきたが、非常に微量にしか抽出、精製できないため、それがbFGFの研究における大きな障害のひとつとなっていた。本研究では、ヒトのbFGFをコードするcDNAを大腸菌で発現させ、ヘパリン吸着カラムクロマトグラフィーにより大量に作製、精製できる系を確立した。この組換え技術を利用した系により、標準規模の試料調製で従来の生体材料から抽出する方法に比べ約1万倍量のヒト由来のbFGFを調製できるようにした。

次に、bFGFの一次構造中に存在する4個のシステインのbFGFの性質への関与を調べている。bFGFをヘパリンカラムで精製すると、4つのピークに分かれて溶出される。これらのピークは還元剤存在下で1つのピークに集約されることから、システイン間のS-S結合がこれに関与していることが示唆された。そこで、システインをセリンに置換した修飾型bFGFを調製し、ヘパリンカラムからの溶出パターンを調べた結果、Cys⁶⁹、Cys⁸⁷の2個のシステインがbFGFのS-S結合を担っていることが示された。さらに、他の2残基を含めbFGFのシステインは活性に必須ではないことも示された。Cys⁶⁹、Cys⁸⁷をセリンに置換したbFGFは酸性条件に対してより安定となり、血管新生、創傷治癒などへの医療分野での応用が期待される。

三番目は、組換え型bFGFを抗原としたモノクローナル抗体の作製に関するものである。bFGFは種差による構造の違いがほとんどなく、1次構造がよく保存されているため、生体材料から得られる微量のものを抗原としても抗体価が上がらず、一般に抗体の作製が困難であった。本研究では、この組換え型bFGFを大量に免疫することにより抗体価を上昇させ抗体を得ることに成功している。4種のIgG型モノクローナル抗体を作製し、エピトープを決定しているが、いずれもアミノ末端側40残基中に集中していることが示された。また、これらの抗体には中和活性が無いことから、bFGFの活性部位は40番目のアミノ酸よりC末端側に存在するとしている。さらに、これらの抗体を用いて0.5ng/mlのbFGFを検出できるEIA系を確立した。

四番目に、bFGFのヘパリン結合能に対する解析を行っている。C端近傍の塩基性アミノ酸に富んだ領域を欠損したbFGFを作製し、ヘパリンカラムを用いてヘパリンに対する親和性の変化を調べた。その結果、C端からのアミノ酸残基の欠損数に応じてヘパリンに対する親和性が弱くなることを見いだ

した。これは、C端がヘパリン結合能を担っていることを示している。FGFファミリーはC端近傍に塩基性アミノ酸に富んだ領域を含むという共通の特徴を持つが、ファミリー共通の性質としてこの塩基性領域がヘパリン結合能を担っていることを示唆している。さらに、C端側から46残基欠損しても活性が検出されることから、モノクローナル抗体の結果と合わせ、活性中心は40から100番目のアミノ酸配列に存在すると結論している。

bFGFは幅広い標的細胞を有し種々の生物活性を示すため、世界的に各地で研究が行われているが、本研究はいち早く遺伝子工学を応用することにより分子構造と活性の相関に関する解析を進めている。国際的にも先駆的な役割を果たしており、一連の研究をまとめた本論文は博士論文として価値あるものと認める。