



Title	ヒト上皮成長因子及びその受容体に関する研究
Author(s)	長谷川, 明
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35010
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・（本籍）	はせがわ 長谷川 明
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 7 1 4 2 号
学位授与の日付	昭和 61 年 3 月 12 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	ヒト上皮成長因子及びその受容体に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 池原 森男 (副査) 教授 北川 勲 教授 富田 研一 教授 田村 恭光

論文内容の要旨

遺伝子組み換え技術の確立、及び実用化にともない、目的とする遺伝子を単離することが可能となり、その塩基配列の決定法の確立により、遺伝子のもつ機能と、その遺伝子の一次構造との関係を解析することも行なわれるようになってきている。細胞における基本的かつダイナミックな遺伝子発現制御パターンを示す、増殖・分化の過程は、増殖因子とその受容体との特異的な相互関係を含むものであるが、この増殖因子、及びその受容体の遺伝子クローニングも活発に行なわれ、遺伝子レベルにおける解析が進んでいる。近年、増殖因子及びその受容体と発癌遺伝子との関連が、その一次構造上の類似性から示唆されるようになった。増殖因子とその受容体における情報伝達機構、及び遺伝制御を明らかにすることは、細胞の増殖・分化の機構解明にとってきわめて重要である。

上皮成長因子（EGF）は種々の培養細胞及び組織に作用し、その増殖・分化を促す他、様々な生物学的効果を示す 53 個のアミノ酸より成るポリペプチドである。その作用は細胞膜表面に位置する受容体（EGFR）を介して細胞内に伝達される。EGF は初め成熟雄マウス顎下腺より単離された。ヒト EGF は人尿より検出され、胃酸分泌抑制作用をもつ、ヒト β -ウロガストロンと同一物質であると考えられている。

ヒト EGF は尿中より微量しか（50～100 $\mu\text{g}/20\ell$ ）得られず、その生物学的作用機構の研究及び臨床への応用を目的とした研究には、大量にヒト EGF を得る必要があり、組み換え DNA 技術の利用を試みた。

β -ガラクトシダーゼとの融合タンパク質として産生させた後、in vitro で臭化シアン処理した際に、EGF 分子内での切断を避ける為、EGF 分子内に唯一個存在する 21 番目のメチオニンをロイシンに代え

た、〔21-Leu〕-ヒト EGF (B-h EGF) の人工遺伝子を設計し、その発現を試みた。その結果、全細胞性タンパク質の 10 % 以上、不溶性画分のタンパク質の 45 % に相当する量で発現されたことを確認した。この融合タンパク質を分離し、臭化シアン処理を行い得られたペプチドは、EGF が示す細胞増殖促進、及び $[^{125}\text{I}]$ -マウス EGF とのレセプターに対する結合競合阻害効果を調べ、精製マウス EGF と同様の活性を確認した。さらにマウス 3T3 細胞による DNA 合成促進効果、ヒト、K、B 細胞の膜画分を用いた自己リン酸化反応等の生物学的効果を確認した。以上の様に大腸菌内で産生された B-h EGF が種々の生物学的効果を示すことにより、EGF の多様な活性の機構解明、さらには臨床治療等の広範囲な研究に利用できるものと期待できる。

大腸菌内で外来性遺伝子を高度に発現させることを目的として、その発現効率に重要な影響を与える要因の一つと考えられるプロモーター領域の改変を行った。種々の大腸菌遺伝子のプロモーター領域の塩基配列の比較より、保存性の高い領域として -10 及び -35 領域がある。これらの領域における共通配列は、各プロモーターによって少しずつ異なり、これらの配列が転写効率を規定する一因とされている。RNA ポリメラーゼ II によって転写される真核生物遺伝子プロモーター領域にも共通配列が存在し、さらにその上流に転写効率を著しく上昇させる効果をもつ領域の存在が示された。このようにプロモーターの上流領域に転写に影響を及ぼす機能をもった配列の存在が示唆されたので、-50~-60 領域について、その発現に及ぼす影響を、大腸菌トリプトファンオペロンプロモーターのこの領域 (trp -50) について調べた。人工的に改変した種々のプロモーター配列を用いて、テトラサイクリン耐性遺伝子及び β -ガラクトシダーゼ遺伝子の形質発現実験を行い、この trp -50 領域が強く転写活性を増幅することを見出した。さらにこの trp -50 領域を利用した発現系での外来性遺伝子の発現を化学合成した B-h EGF 及びセクレチン遺伝子を用いて試み、これらの遺伝子が、 β -ガラクトシダーゼとの融合タンパク質として高度に発現されていることを確認した。これらの実験事実により、実際に外来性の遺伝子を発現させた場合にも trp -50 領域の発現促進効果が実証され、大腸菌における有用ポリペプチドの生産における普遍的な有用性が示唆された。

EGF の作用は、細胞膜表面に位置する受容体 (EGFR) を介して細胞内に伝達される。EGFR は多くの発癌遺伝子産物同様、プロテインキナーゼ活性を示し、そのアミノ酸配列がトリ赤芽球症ウィルス H 株 (AEV-H) がコードする発癌遺伝子産物 v-erb B と高度に類似していることが示された。ヒト EGFR 遺伝子はヒト類表皮癌細胞では正常細胞の約 30 倍増幅されており、さらにこれに関連して正常細胞には見られない異常な mRNA が発現されていることが示されている。そこで正常細胞におけるヒト EGFR 染色体遺伝子のクローニングを行ない、ヒト EGFR ゲノムにおけるエキソン-イントロン構成を調べた。その結果、EGFR タンパク質と、そのエキソン-イントロン構成は機能的なサブドメイン構造をもつことが示された。さらに AEV-H の v-erb B 遺伝子の 5' 領域を、それに対応するヒト EGFR 遺伝子内の領域の塩基配列と比較することにより、AEV ゲノム v-erb B 5' 非翻訳領域が、ヒト EGFR 遺伝子のエキソン部分のみならず、それに隣接するイントロン配列と高い相同性を示すことを明らかにした。このことより、AEV-ウィルスゲノムの発生機構に関する考察を示した。

またヒト類表皮癌細胞特異的な異常 mRNA とヒト EGFR 染色体遺伝子の塩基配列を比較すること

により、この異常 mRNA はヒト EGFR 染色体遺伝子上での DNA 再配列と異常 スプライシング により生じることを示し、このような異常 mRNA の発生と、その発癌との関連に対する仮説的な機構を示した。

論文の審査結果の要旨

同君は先づヒト上皮成長因子 (EGF) のアミノ末端より 21 番目の メチオニンをロイシンに変換した人工遺伝子を化学及び酵素的に合成し、このものを大腸菌内で発現するベクターを構築した。この際従来のプロモーター配列を種々変換し、トリプトファンオペロンの転写開始後の 50 塩基上流の A-T に富む領域に強い転写活性増強作用のあることを見出した。

次にヒト染色体遺伝子ライブラリーより EGF リセプター遺伝子をクローニングし、その構造を明らかにした。この配列を v-erbB のそれと比較することによりその 5' 非翻訳配列間に高い相同性を見出した。更にヒト表皮癌細胞 mRNA は EGF リセプター遺伝子の DNA 再配列と異常 スプライシング により生ずることを見出し、発癌機構に関する仮説を提出した。

以上の成果は学位論文請求に値するものと認める。