

Title	Erythroid Differentiation Factor (EDF) 遺伝子クローニングと動物細胞に於ける発現に関する研究
Author(s)	村田, 正弘
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36477
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	むら 村	た 田	まさ 正	ひろ 弘
学位の種類	工	学	博	士
学位記番号	第	8368	号	
学位授与の日付	昭和63年11月2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	Erythroid Differentiation Factor (EDF) 遺伝子クローニングと動物細胞に於ける発現に関する研究			
論文審査委員	(主査)			
	教授	岡田	弘輔	
	(副査)			
	教授	大嶋	泰治	教授 山田 靖宙 教授 菅 健一
	教授	高野	光男	教授 二井 将光

論文内容の要旨

Erythroid Differentiation Factor (EDF) はヒト細胞由来の分化誘導因子であり、赤芽球に分化する過程で癌化したマウス Friend 白血病細胞に作用して再び赤芽球に分化させ、ヘモグロビン合成を行なわせる活性を有する。EDF は赤芽球分化誘導の他に下垂体細胞からの FSH 分泌活性、骨細胞石灰化活性を有し、新規制癌剤として注目されている生理活性蛋白質である。

第1章においてはEDF遺伝子のクローニングを行っている。ヒト細胞THP-1からmRNAを調製し、λgt10ベクターを用いて 5×10^5 個の組み換え体ファージを調製し、得られた組み換え体ファージの中から、48merの合成DNAをプローブとしてEDFcDNAの分離に成功している。得られたEDFcDNFは全長1.8Kbで、塩基配列を決定した結果、EDFは426アミノ酸残基からなる前駆体のC末端116アミノ酸残基に相当し、EDFペプチドの直前に存在する5個のアルギニン残基の位置でプロセッシングを受け分泌されるとしている。またサザンブロッティングの結果から、EDF遺伝子は染色体上に唯一組存在することを証明している。

第2章では動物細胞を宿主としてEDFの大量発現を行っている。すなわちEDF前駆体をコードする遺伝子断片をSV40の初期プロモーターとポリ(A)シグナル間に挿入してPSD(X)/EDFプラスミドを作成し、葉酸還元酵素(DHFR)を指標としてハムスターCHO、DHFR⁻細胞に導入している。得られた形質転換細胞は細胞外に60U/mlのEDFを生産した。さらに形質転換細胞にメソトレキサート耐性を付与することにより、EDF2000U/ml生産株(1mgEDF/1)を育種するのに成功している。ハムスター細胞で生産させたEDFはヒト細胞THP-1細胞の生産するEDFと完全に一致する。

第3章では浮遊攪拌培養系でEDFの大量生産を行っている。ハムスターCHO細胞は付着細胞であるため、EDF高生産組み換え体を用いても大量培養が困難である。付着細胞を浮遊攪拌培養を繰り返して、選抜することによって、浮遊攪拌培養に適した細胞を得ている。最終的に世代時間24時間、最大細胞濃度 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ を得ている。以上の育種過程を通じてEDF生産性は安定に維持されていた。

以上の研究によってEDFの工業的生産を可能にしたものである。

論文の審査結果の要旨

本論文は新規制癌剤として注目されているヒト赤芽球分化因子(EDF)の遺伝子をクローン化し、ハムスター培養細胞中で高発現させる系を開発し、さらにハムスター培養細胞を浮遊攪拌培養に適するように育種した成果をまとめたもので、EDFの生産の基礎を確率したものである。成果の中には次の重要な知見が含まれている。

- (1) ヒト培養細胞THP-1のmRNAからクローン化したEDFcDNAは429アミノ酸残基からなる前駆体蛋白質をコードしており、そのC末端側の116個のアミノ酸残基からなるペプチドが切り出されてEDFになることを明らかにしている。切断点にはアルギニン残基が5個連続して存在し、プロセシングのシグナルになっていると推定している。
- (2) EDFをコードする遺伝子をSV40をベクターとしてハムスター培養細胞に導入することに成功し、ヒトEDFをハムスター細胞で生産させるのに成功している。さらにベクター中にマーカー遺伝子としてジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子を挿入しておき、同酵素阻害剤メソトレキサート耐性を付与することにより、EDF生産性を30倍以上も上昇させている。
- (3) ハムスター培養細胞は付着細胞であるが、浮遊培養に訓練を繰り返して、最終的には世代時間24時間、最大細胞濃度 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ の浮遊培養に成功している。付着培養で 10^{11} 個の細胞を得るには50 m^2 の表面積が必要であったが、育種株では200 l のジャーファメンターで可能になった。

以上のように本論文は細胞工学ならびに生物工学に対して貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。