

Title	ナマルバ細胞を宿主とする遺伝子工学的工法によるヒトエリスロポエチンの産生に関する研究
Author(s)	柳, 秀樹
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/36957
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	やなぎ 柳	ひで 秀	き 樹
学位の種類	工	学	博 士
学位記番号	第	8933	号
学位授与の日付	平成2年1月11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	ナマルバ細胞を宿主とする遺伝子工学的手法によるヒトエリスロポエチンの産生に関する研究		
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 高野 光男
	教授	菅 健一	

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は赤血球合成の一次調節因子であるヒト型のエリスロポエチンを遺伝子工学的手法を用いて生産することを目的としたもので、ヒトリンパ芽球様ナマルバ細胞を宿主とした高発現系の構築を行ったものである。

まず再生不良性貧血患者尿からヒト尿エリスロポエチンを純化し、そのアミノ酸部分配列を決定し、エリスロポエチン遺伝子クローニングに必要なオリゴヌクレオチドプローブを合成している。

ヒトエリスロポエチン生産性肝癌 Hp-1 細胞の cDNA ライブラリーおよびヒト胎盤遺伝子ライブラリーから、それぞれエリスロポエチン cDNA および染色体 DNA をクローン化している。

種々のエリスロポエチン発現ベクターを構築し、ナマルバ細胞中での発現を調べた結果、一過性発現効率は導入したベクターの構造に依存するが、外来 DNA が染色体に組み込まれた安定形質転換株における発現レベルは、導入した DNA が染色体に組み込まれた環境に依存するとしている。SV40初期プロモーターを利用した発現ベクターを用いて、エリスロポエチン高発現 ($1 \sim 2 \mu\text{g}/10^6$ 細胞/日) する安定形質転換ナマルバ細胞株を樹立している。この高発現細胞株は容易に無血清培地での培養が可能である。

最後に、ナマルバ細胞の生産するエリスロポエチンを精製純化し生物活性を調べている。すなわちヒト尿エリスロポエチンとの差は認められていない。ナマルバ細胞由来のエリスロポエチンとヒト尿エリスロポエチンの N-結合型糖鎖の構造を比較して、各糖鎖成分の量比は異なるが、ナマルバ細胞由来のエリスロポエチンに見出されるほとんどすべての糖鎖は天然の尿エリスロポエチンにおいても共通に存在することを明らかにしている。またナマルバ細胞由来のエリスロポエチンに結合する主な2種類の糖

鎖の構造を明らかにしている。

論文の審査結果の要旨

エリスロポエチンは腎臓の生産する糖蛋白質で造血幹細胞に作用し、赤芽球への分化を促進する。慢性腎不全による貧血症はエリスロポエチンの生産能低下に起因することが多く、同症に対する治療薬として注目されてきた。本論文においてはヒトエリスロポエチンをナマルバ細胞を宿主として生産することを目的としたもので次のような重要な結論を得ている。

- (1) 再生不良性貧血患者尿からヒト尿エリスロポエチンを純化し、そのアミノ酸配列を部分的に決定し、その結果にもとずいて遺伝子クローニングに必要なプローブを合成している。この合成プローブを用いてヒトエリスロポエチン産生肝癌 Hp-1 細胞の cDNA ライブラリーから cDNA と遺伝子 DNA をそれぞれクローン化している。
 - (2) エリスロポエチン cDNA を種々の発現ベクターに挿入し、ナマルバ細胞中での発現を調べた結果、一過性発現は発現ベクターの構造により影響を受けるが、外来 DNA が染色体に組込まれた後の発現、すなわち安定形質転換株の発現は、組込まれた染色体上での部位に強く依存することを示している。
 - (3) SV40初期プロモーターを利用する発現ベクターを用いてエリスロポエチンを高生産する安定形質転換ナマルバ細胞株を樹立している。この細胞株は $1 \sim 2 \mu\text{g}/10^6$ 細胞/日のエリスロポエチンを生産し、無血清培養が可能である。
 - (4) 上記ナマルバ細胞の生産するエリスロポエチンを純化精製し、その生物活性はヒト尿から純化したエリスロポエチンと差がないことを示している。
 - (5) ナマルバ細胞由来とヒト尿由来のエリスロポエチンの糖鎖構造を比較し、糖鎖の成分量比は異なるが殆どすべての糖鎖は共通であることを示し、主要な2種類については構造を決定している。
- 以上の成果は遺伝子工学の発展に寄与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。