

Title	sisおよびerbBガン遺伝子の組換えカイコ核多角体病ウイルスによる発現ならびにその産物の生理活性に関する研究
Author(s)	森下, 馨
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37846
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 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	もり 森	した 下	かおる 馨
博士の専攻分野 の名称	博	士	(薬学)
学位記番号	第	9929	号
学位授与年月日	平成3年10月28日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文名	sis および erbB ガン遺伝子の組換えカイコ核多角体病ウイルス による発現ならびにその産物の生理活性に関する研究		
論文審査委員	(主査) 教授	富田 研一	
	(副査) 教授	今西 武	教授 岩田 宙造 教授 北川 勲

論文内容の要旨

ガン遺伝子は細胞のガン化を引き起こす遺伝子であり、現在までに30種類以上同定されている。ガン遺伝子産物の生理活性は明らかになりつつあるが、細胞ガン化における役割およびガン化のメカニズムはほとんど明らかになっていないのが現状である。その原因は、主にガン遺伝子産物の発現量が少なく、単離してその機能を研究することが困難であることにある。よって、遺伝子工学技術を用いてガン遺伝子産物を大量に産生し、その生理機能を解明することはガン化のメカニズムを研究する上で有用である。本研究では sis 遺伝子と erbB 遺伝子の2つを取り上げ、カイコ核多角体病ウイルス発現系を用いてガン遺伝子産物を発現し、産物の生理活性および単離方法について検討した。

v-sis 遺伝子は、simian sarcoma virus のガン遺伝子で、血小板由来増殖因子 (PDGF) の B 鎖とホモロジーが高く、その産物は PDGF 同様、細胞増殖促進活性を有している。sis 産物全長 (Met (1) - A1a (271)) をコードする遺伝子を sis、プロセッシングを受けた活性体 (Ser (112) - A1a (271) および Ser (112) - Pro (223)) をコードする遺伝子を sis1 および sis2 と命名して、発現を検討した。最初に、sis1 および sis2 (sis1 (2) と略す) 遺伝子産物を単独あるいはポリヘドリンとの融合産物として発現させた。融合産物においては、ポリヘドリンの N 端側 112, 70, 32 および 8 アミノ酸を含む sis1 (2) 産物を発現させて、ポリヘドリン部分の長さや産物の発現量を検討した。その結果、ポリヘドリン-sis1 (2) 融合産物の発現量は単独の sis1 (2) 産物の 3-6 倍であることが明らかになった。また、ポリヘドリン部分がわずかに 8 アミノ酸のポリヘドリン-sis1 (2) 融合産物においても、sis1 (2) 産物の 3 倍の発現量が得られることが判明した。

カイコ幼虫を用いて、ポリヘドリン部分が 8 アミノ酸の sis2 融合産物を発現させ、以下の方法で sis2

産物を精製した。すなわち、カイコ幼虫のホモジネートを調製し、6 M グアニジンで抽出し、SP-Toyopearl 1 陽イオン交換カラムで部分精製した後、コラゲナーゼ処理してポリヘドリン部分と sis 2 産物部分を切断した。アミノ酸配列分析を行い、目的のコラゲナーゼ切断部位で切断されていることを確認した。さらに、HPLC (phenyl-5 PW 逆相カラム) で精製して、単一の sis 2 産物を得た。この産物を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分析したところ、還元下、非還元下で分子量が同一であったことから、二量体ではなく単量体であることが判明した。得られた sis 2 産物は、単量体であるため、細胞増殖促進活性はなかったが、細胞遊走活性は有していた。

活性体部分のみをコードする遺伝子 (sis 1 (2)) を組み込んだ場合、二量体ではなく単量体の sis 産物が発現されたので、次に、全長の sis 遺伝子を用いて発現を検討した。カイコ幼虫に sis 産物を発現させて、そのホモジネートを調製し、細胞増殖促進活性を測定したところ、同活性が認められた。細胞増殖促進活性は感染開始 84 時間後ではほぼプラトーに達し、感染 96 時間後において、カイコ 1 匹あたり PDGF 20 μ g に相当する活性が発現された。また、ホモジネートを 80°C で 1 分間加熱して得られた上清画分から、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー、ヘパリン-セファロースクロマトグラフィー、逆相 HPLC を用いて、sis 産物を精製した。得られた sis 産物を SDS-PAGE で分析したところ、還元下で 15 kDa、非還元下で 30 kDa であったことから、二量体であることが判明した。sis 産物の細胞増殖促進活性は用量に依存しており、その用量反応曲線は PDGF のそれとほぼ一致した。また、この活性は抗 PDGF 抗体により中和された。よって、得られた sis 産物と PDGF の生理活性および抗原性は類似していることが明らかになった。

以上の結果から、カイコ核多角体病ウイルス発現系において、sis 遺伝子全長を用いて発現させれば、ジスルフィド結合による二量体形成が起こり、活性体が得られることが明らかになった。このことは、同発現系は大腸菌等の微生物発現系では起こらないジスルフィド結合形成が起こること、また、sis 遺伝子産物の二量体形成には活性体には含まれていない N 端部分が必要であることを示している。

v-erbB 遺伝子はトリ赤芽球症ウイルス (avian erythroblastosis virus) のガン遺伝子で、epidermal growth factor (EGF) レセプター遺伝子とホモロジーが高く、産物は EGF 結合部位を欠損した EGF レセプター様構造をとっており、同レセプター同様チロシンキナーゼ活性を有している。本研究では、v-sis 遺伝子と同様、v-erbB 遺伝子産物を単独あるいはポリヘドリンとの融合産物として発現させた。SDS-PAGE で分析した結果、ポリヘドリン-erbB 融合産物の band は認められたが、単独の v-erbB 産物の band は認められなかったことから、融合産物の方が発現量が高いことが判明した。また、SDS-PAGE 上のポリヘドリン-erbB 融合産物の band は幅広く、分子量に分布があり、不均一な糖鎖付加を受けていることが示唆された。糖鎖付加を阻害するツニカマイシン存在下でポリヘドリン-erbB 融合産物を発現させると、ツニカマイシンの濃度に依存して高分子量側の産物の発現量が減少した。よって、同産物は糖鎖付加を受けており、その糖鎖付加は不均一であることが示された。また、この結果は同発現系では微生物発現系とは異なり糖鎖付加が起こることを示している。

ポリヘドリン-erbB 融合産物を含む細胞可溶化液を [γ - 32 P] ATP とインキュベートして、リン酸化タンパク質を分析したところ、同産物はリン酸化を受けていた。次に、リン酸化された同産物を

6 N塩酸で加水分解して、2次元電気泳動によりリン酸化アミノ酸を分析したところ、リン酸化チロシンのみが検出された。よって、ポリヘドリン-erbB融合産物はチロシンキナーゼ活性を有していることが明らかになった。さらに、同産物のチロシンキナーゼ活性を確認するために、チロシン残基を含む合成ペプチドを用いて活性測定を行った。ポリヘドリン-erbB融合産物を含む細胞可溶化液により同ペプチドはリン酸化され、同産物がチロシンキナーゼ活性を有していることが明確になった。以上の結果から、同発現系を用いてチロシンキナーゼ活性を有するv-erbB産物を発現させることが可能であることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ガン遺伝子産物の生理活性を明らかにすることを目的として、sisおよびerbBガン遺伝子産物をカイコ多角体病ウイルス発現系を用いて、ポリヘドリンとの融合蛋白質として大量に発現、産生させ、活性体の単離、精製に成功した。しかもこの発現系を用いることによって、S-S結合や糖鎖付加などのプロセッシングが起り、微生物による発現系よりも有用であることを見出した。

以上の成果は、遺伝子工学や生化学の分野の研究ならびにガン化機構の解明に寄与するところ大であり、博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。