

Title	ヒト短鎖M-CSFの再構成ならびに構造解析に関する研究
Author(s)	山西, 一也
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/38569
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏 名	やまにし かず や 山 西 一 也
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 0 8 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 年 2 月 3 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	ヒト短鎖 M-CSF の再構成ならびに構造解析に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 近 藤 雅 臣 (副査) 教 授 真 弓 忠 範 教 授 田 中 慶 一 教 授 宮 本 和 久

論 文 内 容 の 要 旨

M-CSF (マクロファージコロニー刺激因子; Macrophage Colony-Stimulating Factor) は、骨髄増血組織において多能性幹細胞から単球/マクロファージへの分化増殖に特異的に作用するサイトカインである。また、その生物作用は多岐にわたり主体にとってきわめて重要な蛋白質である。しかし、その構造は、転写レベルでの alternative splicing および翻訳後修飾により分子量的に不均一であり複雑な構造をとっている。

本研究では、天然 M-CSF の活性発現領域 (N 端 3 ~153 番目のアミノ酸) から成るヒト短鎖 M-CSF を医薬品開発を目的として、大腸菌に発現させ再構成法および精製法を確立するとともに構造解析を行った。また、活性発現のために重要であると考えられるシステイン残基の存在状態が天然に存在する M-CSF と同様であるかどうかを推定するために、動物細胞発現ヒト短鎖 M-CSF の構造解析を行った。

ヒト短鎖 M-CSF ([3-153] M-CSF) は、2-シストロン発現プラスミドを用い大腸菌に発現させたところ菌体破碎後不溶性画分に回収された。この不溶性画分を7M 塩酸グアニジン、2-メルカプトエタノールを含む50mM トリス塩酸、pH7.0バッファーを用い変性可溶化した後、再構成溶液 (0.5mM 還元型0.1mM 酸化型各グルタチオンおよび2M 尿素を含む50mM トリス塩酸、pH8.5) に対して滴下することにより100倍希釈し、2日間放置することにより再構成を完成させた。その効率は、精製品を用いた同条件における再構成から約77%であることが推定された。

[3-153]M-CSF は、再構成粗溶液から QAE-Zeta Prep カートリッジを用いた濃縮、硫酸塩析、TSK-gel Phenyl-5PW カラムを用いた疎水クロマトグラフィー、TSK-gel DEAE-5PW カラムを用いた陰イオン交換 HPLC によって63.8%の回収率で精製された。これは、菌体7.5g 湿重量から約11.5mgの [3-153] M-CSF が精製されたことを意味する。SDS-PAGE による分析から精製 [3-153] M-CSF は、分子量32kDa で2個のサブユニットがジスルフィド結合を介したホモダイマー構造を形成していることが判明した。また、M-CSF dependent cell line を用いた in vitro における活性は天然型 M-CSF と同程度であった。

次に [3-153] M-CSF の構造解析を行った。[3-153] M-CSF を還元アルキル化後、リジレンドペプチダーゼ消化し得たフラグメントをアミノ酸分析することにより [3-153] M-CSF のすべてのアミノ酸配列を確認した。

また、アミノ酸配列分析の結果 N 末端に開始コドン由来 Met の付いたものと Val で始まるものがほぼ等量で存在することが明らかになった。これは [3-153] M-CSF がホモダイマーのため N 末端の異なる 3 種類の M-CSF が存在することを示している。これらは疎水クロマトグラフィーである程度分離でき、活性の強さに差が認められなかった。また、分子内に存在するシステイン残基 14 個の存在状態を検討したところすべてジスルフィド結合に関与していた。その組み合わせは、[3-153] M-CSF をペプシン消化し得たフラグメントのアミノ酸配列分析により、Cys31-Cys31 の分子間結合および各 2 カ所の Cys7-Cys90, Cys48-Cys139, Cys102-Cys146 の分子内あるいは分子間結合であることを明らかにした。

続いて CHO 細胞発現ヒト短鎖 M-CSF ([-32-153] M-CSF) の構造解析を行った。[-32-153] M-CSF を還元アルキル化後、リジルエンドペプチダーゼ消化し得たフラグメントおよび [-32-153] M-CSF のペプシン消化フラグメントをアミノ酸配列分析することにより一次構造を決定するとともに、サブユニット中 2 カ所存在する N 型糖鎖結合部位の中で Asn122 にのみ糖鎖が付いていることを明らかにした。また、システイン残基の存在状態を調べたところ、大腸菌発現 [3-153] M-CSF と同様のジスルフィド結合を有することを明らかにした。さらに分子間ジスルフィド結合の数を決定するために、31 位 Cys を Ser に変換した変異体 Ser31 [-32-153] M-CSF を COS 細胞に発現させた。ゲルろ過 HPLC の結果、この変異体が培養上清中単量体の形で存在していることを明らかにした。さらにこの変異体が M-CSF レセプターに結合することから立体構造上大きな変化はないものと思われた。以上から、分子間ジスルフィド結合は 31 位 Cys を介した一箇所のみであることと考えられた。[3-153] M-CSF の構造は、動物細胞発現 M-CSF の構造との間に糖鎖を除き差異は認められなかった。また、活性の面からも、天然型 M-CSF との間に差が認められなかった。以上のことから大腸菌に発現させ、不溶性画分から再構成してきた [3-153] M-CSF の構造は天然に存在する M-CSF の core region における構造と同一であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

天然 M-CSF の活性発現領域から成るヒト短鎖 M-CSF を医薬品開発を目的として、大腸菌に発現させ再構成法および精製法を確立するとともに構造解析を行なった。また、活性発現の為に重要であると考えられるシステイン残基の存在状態が天然に存在する M-CSF と同様であるかどうかを推定するために動物細胞発現ヒト短鎖 M-CSF の構造解析を行った。以上の結果、大腸菌画分から再構成したヒト短鎖 M-CSF と動物細胞発現のそれとは糖鎖を除き差異はなく、活性の面からも天然型 M-CSF との間に差は認められないことを明らかにした。これらの研究成果は博士(薬学)を授与するに値するものと判定した。