

Title	組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子 : その物理化学的性状に関する研究
Author(s)	長谷川, 雅一
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38698
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	は せ がわ まさ かず 長 谷 川 雅 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 0 4 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 年 1 月 21 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	組 換 え 型 ヒ ト 顆 粒 球 コ ロ ニ ー 刺 激 因 子 — その物理化学的性状に関する研究 —
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 葛 西 道 生 (副査) 教 授 柳 田 敏 雄 教 授 村 上 富 士 夫

論 文 内 容 の 要 旨

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は、好中球系前駆細胞の増殖・分化を特異的に調節するサイトカインである。我々は、遺伝子組換え技術によりチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞による大量発現系を確立し、すでに組換え型ヒト G-CSF の医薬品としての開発に成功している。本論文は、その過程においてヒト G-CSF の、特に糖蛋白としての物理化学的性状について得られた研究成果をまとめたものである。

まず最初に、 ^{125}I ラベルしたヒト G-CSF を用いて、マウスおよびラットの血液細胞上のレセプターとの結合を調べた。スクッチャード解析の結果、これらの細胞上には平均100~500個のレセプターが発現しており、ヒト G-CSF と解離定数200~300pM で結合することがわかった。また、競合実験の結果から、マウス G-CSF レセプターに対してヒト G-CSF とマウス G-CSF は、ほぼ同等の親和性を示すことが明らかになった。

ヒト G-CSF は糖蛋白である。熱安定性におよぼす糖鎖の影響を調べたところ、弱アルカリ性付近で特に大きな差が見られ、シアル酸を含む糖鎖の有無がこの付近に pK を持つアミノ酸残基の周辺環境に影響を及ぼしている可能性が示唆された。この機序を明らかにするため、失活の反応中間体として水素イオンの解離を経由する2段階モデルを想定し、数値解析を行なった。その結果、糖鎖の有無が pK に直接影響を与えているのではなく、その後の中間体の失活速度を1/10に低下させていることが明らかになった。おそらくヒト G-CSF の糖鎖は、Cys17のSH基に対する活性酸素などの攻撃を、立体障害的に防いでいるものと思われる。

最後に、動物細胞による発現系の限界を、インターロイキン6 (IL-6) の不均一性を例にあげて述べる。組換え型ヒト IL-6 は、N末端のアミノ酸配列がAla1およびVal3から始まる不均一な集団で、一部のものにしかN型糖鎖が付加されていない。シグナル配列をヒト G-CSF のものと置換し、さらにAla1, Pro2を欠失させたところ、Val3から始まる均一なIL-6が得られた。また糖鎖の結合部位であるAsn46近傍でジルスフィド結合を形成しているCys45, 51をSerに置換したところ、N型糖鎖の付加される比率は増加した。これらは蛋白質翻訳後修飾にかかわる酵素群の、動的なバランスの上に成り立っている現象であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

白血球の一種である好中球は、外部から侵入したバクテリアなどに対する殺菌能を有し、外的に対して最初に動員される生体防御機構の要である。この好中球は造血幹細胞から分化してくるが、その分化・増殖を特異的に調節しているのが顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）と呼ばれるサイトカインである。本論文は、この生体微量成分であるヒト顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）を遺伝子工学的手法による大量に生産させる系を確立し、そのいくつかの特徴的な物理化学的性状を明らかにしたものである。

ヒト G-CSF はアミノ酸174個からなり、その133番目の Thr に短い O 型糖鎖が結合した糖蛋白である。まず、著者はチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO 細胞）に遺伝子工学的手法により作成した遺伝子を導入し、発現系を構築し、10mg/l の高発現量を示す産生株を樹立した。これにより産生される組換え型ヒト G-CSF は、天然型でみられたように Thr133 に O 型糖鎖が付加され、シアル酸の付加数もよく一致していることを示した。次に、レセプターとの結合実験を詳しく行い、マウスやラットを用いた種々の異なるヒト G-CSF の薬効評価の妥当性を、分子レベルで裏付けることに成功した。また、結合実験により、マウス G-CSF レセプターに対するマウスとヒト G-CSF の親和性が同等であることを証明した。次いで、ヒト G-CSF の糖鎖の熱安定性に対する寄与を詳しく検討した。その結果、糖鎖は熱安定性を大きく増加させるが、その有無による安定性の違いは pH の影響を強く受けること、それがアミノ酸糖鎖の pK ではなく、プロトン解離後の失活速度に影響を与えていることを、数値解析により明らかにした。

更に、医薬品として期待されているヒト IL-6 の発現系を同様に CHO 細胞を用いて構築したが、その産物は不均一であり、遺伝子工学的手法でもこれを解消することはできなかった。翻訳後修飾の多様性は、動物細胞による発現系の利点であるが、その限界でもあることを示した。

以上のように、本論文は動物細胞を用いて主要なサイトカインであるヒト G-CSF の大量培養系を確立し、医薬品としての利用を可能にし、その糖鎖タンパクとしてのユニークな物理化学的性状、特にその小さな O 型糖鎖の果たす役割の重要性を明らかにしたもので、学位論文として価値あるものと認める。