



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 融合タンパク質発現法によるヒトカルシトニン前駆体の効率的生産方法の開発                                                                                                             |
| Author(s)    | 藪田, 雅之                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1997, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/41018">https://hdl.handle.net/11094/41018</a>                                                             |
| 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。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|               |                                                                                                       |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | やぶ た まさ ゆき<br>薮 田 雅 之                                                                                 |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (工 学)                                                                                             |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 3 2 9 9 号                                                                                         |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 9 年 5 月 7 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     | 融合タンパク質発現法によるヒトカルシトニン前駆体の効率的生産<br>方法の開発                                                               |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 吉田 敏臣<br>(副査)<br>教 授 関 達治 教 授 金谷 茂則 教 授 室岡 義勝<br>教 授 山田 靖宙 教 授 菅 健一 教 授 塩谷 捨明<br>教 授 卜部 格 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、融合タンパク質発現法によるヒトカルシトニン前駆体 (hCT [G]) の効率的生産を目指して、融合タンパク質の設計、切り出し酵素の改良および新規の切り出し方法の開発、融合タンパク質遺伝子の発現方法を検討し、融合タンパク質からのペプチド生産に有効な手法および概念をまとめたものである。

緒論では、有効タンパク質からのペプチド生産について現在の課題を述べ、効率的生産には、融合タンパク質の設計、切り出し酵素の改良および新規の切り出し方法の開発、融合タンパク質遺伝子の発現方法のそれぞれを検討する必要があることを述べている。

第1章では、(hCT [G]) 融合タンパク質に陽電荷を持つアルギニンを含むアミノ酸配列を挿入し、その等電点を変化させることで、封入体として多量に生産される (hCT [G]) 融合タンパク質が作成できることを示している。また、V8 プロテアーゼを用いて、融合タンパク質から (hCT [G]) を切り出すには、5 M 尿素存在下で反応を行う必要があり、その際には、尿素失活のため多量の V8 プロテアーゼが必要となることを示している。

第2章では、大腸菌による V8 プロテアーゼの生産方法を検討している。C末端領域を欠失させた V8 プロテアーゼ誘導体をサンドイッチ型の融合タンパク質とすることで、一旦不活性な状態の V8 プロテアーゼ誘導体を生産し、その後大腸菌 OmpT プロテアーゼを作用させて、再活性化を図る方法により、大腸菌にとって致死的な V8 プロテアーゼ誘導体が、効率よく生産できることを示している。

第3章では、V8 プロテアーゼ誘導体遺伝子をランダム変異処理して、尿素耐性を持つ3種類の V8 プロテアーゼ誘導体を得ている。得られた3種類の変異酵素についてそれらの変異部位および諸性質を調べている。

第4章では、第3章で得た3種類の変異を組み合わせて、5 M 尿素に対する安定性が、相加的に上昇した酵素が作成できることを示している。本酵素を用いることで融合タンパク質の切断に必要な酵素添加量を削減できることを示し、切り出し酵素の尿素耐性化が効率的な (hCT [G]) 生産に有効であることを示している。

第5章では、新規の温度感受性 *lac* リプレッサー遺伝子を取得し、その変異部位および諸性質を調べた後、これを (hCT [G]) 融合タンパク質生産へ応用している。

総括では、以上の結果を要約し、本論文の意義、今後の展望についてまとめている。

## 論文審査の結果の要旨

微生物プロセスは、種々の生理活性物質の生産に応用されているが、遺伝子工学的手法の導入によって異種起源の物質を取り扱えるようになり、生産物の多様化が進められるとともに革新的とも言えるほど生産方法の改良が行われ、生物生産プロセスの高度化が推進されつつある。種々の生理活性を示すヒト起源のペプチドが多数同定されているが、それらの医療への応用を可能にするために経済的生産プロセスの開発が望まれている。本論文は、ペプチドホルモンであるヒトカルシトニンの工業生産技術開発のための研究を行い、種々のペプチド生産プロセスに応用可能な技術の基盤となる研究成果をまとめたものであり、以下に要約するようにいくつかの新しい知見が示されるとともに二三の提案がなされている。

- (1) ヒトカルシトニン前駆体 (hCT [G]) の大腸菌を用いる生産にあたり、生産菌細胞内での分解をさけるため封入体として合成されるよう同ペプチドを含む融合タンパク質の遺伝子配列を設計している。すなわち融合タンパク質のリンカー部位に電荷を有するアミノ酸配列を挿入し、等電点を変化させて融合タンパク質を封入体として安定化させている。
- (2) 微生物生産によって得られた (hCT [G]) 融合タンパク質から (hCT [G]) を切り出すために必要な V8 プロテアーゼは大腸菌にとって致死性であるため、サンドイッチ型の融合タンパク質とし不溶化させ不活性な状態で生産することを提案し、大腸菌で大量生産できることを示している。さらに大腸菌に内在する OmpT プロテアーゼを用いて融合タンパク質の切断を行う新規の切断法を見いだしている。
- (3) V8 プロテアーゼ誘導体で (hCT [G]) 融合タンパク質を切断するためには、尿素存在下で反応させる必要があるが、そのために V8 プロテアーゼ誘導体の尿素耐性を向上させた変異遺伝子を取得している。遺伝子を解析し、最も耐性強化に有効な遺伝子配列を提案し実験によって確認している。
- (4) 微生物による上記タンパク質の合成を制御するために新規な温度感受性/*lac* リプレッサー遺伝子を取得し、その諸性質を調べた後、熱誘導が可能なプロモーターを利用する遺伝子発現系を設計している。その結果、培養温度を操作することで容易に遺伝子発現を制御でき、微生物生産を最適化できることを示している。

以上のように、本論文は、大腸菌によるペプチド生産における遺伝子操作的技術を用いた生物生産プロセスの上流操作設計に関する新しい提案を行っており、微生物工学に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。