

氏名	すえながまさと 末永正人
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第663号
学位授与の日付	平成14年1月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Studies on the Mass Production of <i>E. coli</i> -derived Recombinant Proteins for Clinical Use (医療用遺伝子組換え蛋白質の大腸菌による量産法に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 藤井信孝 教授 富岡清 教授 富士薫

論文内容の要旨

生体内で重要な役割を果たしながらごく微量にしか存在していない蛋白質を遺伝子組換え技術を用いて大量調製できるようになってきた。しかしながら、目的の蛋白質、特に医療用の蛋白質を調製するためには、1) 翻訳後の修飾、2) 不活性な封入体の形成、3) 蛋白合成開始コドンに由来するN末端へのメチオニンの付加等、さまざまな問題点が残されているのが現状である。著者はこれらの問題点を克服することを目的として研究を行い、以下に示す解決法を見いだした。

(1) 翻訳後修飾について

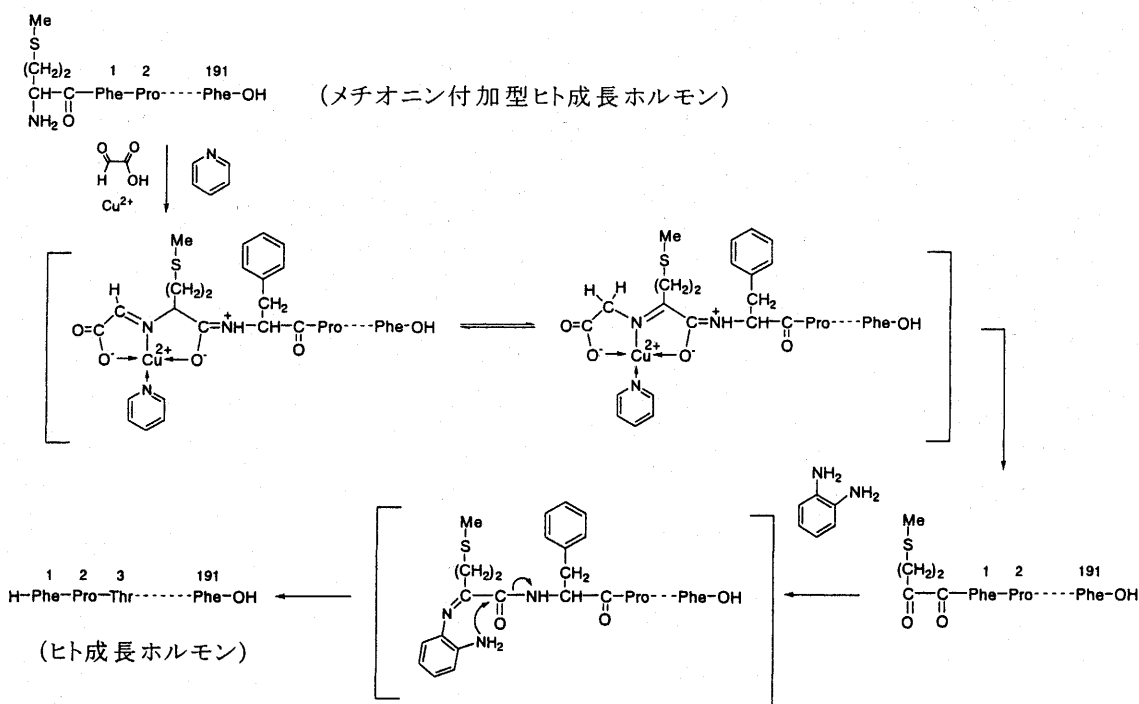
著者は、内皮細胞の増殖促進作用や創傷治癒作用などをもつ組換え型ヒト塩基性繊維芽細胞成長因子(FGF)の誘導体、CS23、の大量調製過程において、硫酸化セルロフアインカラムクロマトグラフィー工程で、CS23の前溶出画分より3つのサブフラクションを分取した。SDS-PAGE等通常の蛋白質化学的分析法では、CS23と区別できなかったが、マッピング分析および質量分析により精査したところ、CS23の26位、119位、135位のLySの側鎖が ϵ -N-アセチル化されていることが判明した。そこでこれらの分子種の分離除去法を設定してCS23大量調製法を確立し、薬効評価への道を拓いた。

(2) 不活性封入体からの活性化法について

ニューロトロフィン-3(NT-3)は、神経成長因子(NGF)を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法によって新たに発見された新規NGFファミリーのひとつであり、神経系の形成や機能維持に重要な役割を果たしていると考えられている。動物細胞を用いてNT-3を調製すると活性を有する蛋白質が得られるが、発現量が低い上に培地が高価でかつ培養に長時間を要する。大腸菌を用いると大量の蛋白質を生産することはできるが、不活性な封入体を形成するために活性化型への変換が必要となる。一般に、封入体を菌体から分離し、変性剤を用いて可溶化した後、希釈あるいは透析することにより、活性な蛋白質に変換することが可能である。しかし乍ら、NT-3の活性化をこの方法で行うと、ほとんどの蛋白質が不溶化して沈殿してしまい、活性なNT-3を得ることができない。そこで、著者は沈殿を阻止し、効率よく活性化を行う方法を検討した。その結果、封入体を変性剤で可溶化した後、NT-3の沈殿を防止するためにアルギニン添加剤として用いることにより、封入体から高収率で活性なNT-3が得られることを見出した。この方法で、NT-3の大量調製が可能となり、薬効評価のために必要なサンプルを量的に供給することができるようになった。

(3) 遺伝子組換え蛋白質のN末端に付加したメチオニンの化学的除去法について

下垂体性低身長症などの治療薬として広く使用されているヒト成長ホルモンを大腸菌に生産させると、蛋白合成開始コドンに由来するメチオニンがN末端に付加することが知られている。これにより、遺伝子組換え蛋白質は抗原性のみならず生理作用や生体内での安定性が天然型の蛋白質とは異なる原因となる。従って、N末端のメチオニンを除去することは遺伝子組換えヒト成長ホルモンを治療薬として開発するために必須である。従来、酵素的な方法等により除去されてきたが、酵素を用いると、その基質特異性が問題となり、その適用は制限されるのが現状である。著者は以下の図に示すようにグリオキシル酸、硫酸銅及びピリジンを用いてN末端メチオニン付加型ヒト成長ホルモンをジケトン体に変換した後、さらにフェニレン-1,2-ジアミンと反応させて化学的に、このN末端メチオニンを除去することに成功した。



本例は大腸菌の生産した遺伝子組換えヒト成長ホルモンの N 末端に付加したメチオニンの化学的かつ選択的除去に成功した最初の例である。

さらに著者は反応収率改善のため、種々の切断試薬および溶媒を検討した。その結果、切断試薬として 3,4-ジアミノ安息香酸を酢酸-ギ酸ソーダ緩衝液中でジケトン体と反応させることにより、切断収率を大幅に向上させることを明らかにした。さらに、この改良法を他の遺伝子組換え蛋白質、ベータセルリン、NT-3 及びインターロイキン-2 の N 末端に付加したメチオニンの除去反応に応用し、その有用性を立証した。

以上、著者は遺伝子組換え蛋白質の調製を行う際に生じるさまざまな問題点の解決法を詳細に検討し、それらを CS23, NT-3, ヒト成長ホルモンなどの遺伝子組換え蛋白質の大量調製に応用し、医薬品としての実用化への道を拓いた。

本研究で得られた知見は、遺伝子組換え蛋白質を医薬品として応用していく際に、有用な情報を提供するものとする。

論文審査の結果の要旨

近年、ヒトゲノムプロジェクトを頂点とする遺伝子解析研究の進展により、薬物標的あるいは薬物リードとなる蛋白質性化合物は飛躍的に増大することが予想される。しかしながら、従来、医療用蛋白質の大腸菌による大量調製法に関する系統的な研究は例が少なく、このことが医療用蛋白質の開発研究の隘路となっている。

著者は、ヒト型塩基性繊維芽細胞成長因子 (FGF) 誘導体、神経栄養因子、ヒト型成長ホルモン、ベータセルリン、インターロイキン 2 等の各種遺伝子組み換え蛋白質の大腸菌を宿主とする生産法に関する詳細な検討を通じてその問題点を明らかにするとともに、以下の様にその解決を計った。

1) 大腸菌による生合成過程で問題となる不必要な翻訳後修飾としてリジンの側鎖 ϵ -アミノ基に対するアセチル化の検出法を見出すとともに、アセチル化 FGF 誘導体の効率的精製除去法を見出した。

2) 数種のジスルフィド結合を有する遺伝子組換え蛋白質の生合成において菌体内に蓄積する不活性封入体蛋白質から正しいジスルフィド結合形成を伴う活性化法はしばしば大きな問題となる。著者はニューロトロフィン 3 (NT-3) を素材にして、詳細な再構成実験を行うことにより、レドックスバッファーを用いるグルタチオン酸化の条件下にアルギニンの添加が収率の向上に極めて有効なことを見出し、各種の医療用蛋白質の生産に幅広く応用できることを明らかにした。

3) 遺伝子組み換え蛋白質の生合成において、開始コドンに由来する N-末端メチオニンの付加は蛋白質の抗原性、生理活性、生体内安定性に大きな影響を与えることから信頼性の高い選択的除去法の開発が切望されていた。著者はグリオキシル

酸、硫酸銅、ピリジンによるアミノ基転移反応とその結果生成するジケトン体からのフェニレン-1,2-ジアミンによるアミノ基再生反応を組み合わせることにより N-末端特異的アミノ酸除去法を見出した。さらに数種の大腸菌由来の遺伝子組換え生理活性蛋白質の大量合成に本法を応用して、これらの医薬品としての実用化への道を拓いた。

以上、著者は大腸菌を宿主とする遺伝子組換え蛋白質の大量生産工程において大きな課題となっていた翻訳後アセチル化修飾、不活性封入体蛋白質からの生理活性蛋白質の再構築、N-末端メチオニンの選択的除去等の問題点に対して、有機化学、蛋白質化学を基盤とした解決法を見出した。本研究は、今後ゲノム創薬の進展とともに増大が予想される医療用遺伝子組換え蛋白質の実用化研究に有益な知見を提供すると判断される。よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成13年12月6日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。