

氏名	まつもと しんや 松本晋也
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第854号
学位授与の日付	平成7年5月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科食品工学専攻
学位論文題目	Studies on secretory peroxidase and production of recombinant glycoprotein in cultured tobacco cells (タバコ培養細胞の分泌性ペルオキシダーゼならびに組換え型糖タンパク質の生産に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 佐々木隆造 教授 大山莞爾 教授 内海 成

論文内容の要旨

遺伝子導入技術の確立により組換え型タンパク質を植物細胞で生産することが可能となってきた。本論文はタバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2) の有用動物タンパク質生産細胞系としての有効性について検討を加えたものである。タバコ培養細胞で生産した組換え型有用動物タンパク質を培地中に分泌させることができれば、その後の精製過程が容易になる。そこで、まず第1, 2章ではタバコ培養細胞におけるタンパク質の細胞壁透過機構を調べるために、タバコ培養細胞が培地中に分泌するタンパク質の構造、機能、分泌特性及び発現パターンについて検討を加えた。次に、タバコ培養細胞で生産した組換え型有用動物タンパク質の性質を明らかにするため、第3, 4章ではタバコ培養細胞で造血ホルモンであるヒトエリスロポエチンの生産を試み、その生産性、構造、*in vitro*, *in vivo* における生物活性を検討した。本論文の内容は次の通りである。

第1章ではタバコ培養細胞が培地中に分泌する3種のタンパク質に関する研究を行なった。分子サイズ(40kDa, 38kDa, 34kDa)よりこれらを40K, 38K, 34Kと命名し、性質及び発現パターンを検討した。その結果、これら3種のタンパク質はいずれも新規の塩基性ペルオキシダーゼであることを明らかにした。取得したモノクローナル抗体を用いて40Kを特異的に検出するアッセイ系を確立し、40Kの分泌パターンを検討した結果、40Kはタバコ培養細胞の成長期に顕著に分泌されることを明らかにした。また、40Kの発現はmRNAレベルでの誘導によることを示した。

第2章では取得したcDNAより40K, 38Kの構造を明らかにし、タンパク質構造と細胞外への分泌について検討した。その結果、40K, 38Kはシグナルペプチドを持つタンパク質であり、両タンパク質が分泌タンパク質であるという知見と一致した。40K, 38Kは現在までに知られている非分泌性植物ペルオキシダーゼと高い相同性を示し、40K, 38Kの構造中に細胞壁透過機構と関連づけられるような特徴的構造は見出せなかった。これらのペルオキシダーゼが細胞の増殖期ではなく細胞の成長期に培地中に分泌されることから、細胞の成長期に生じる細胞壁の間隙から培地中に放出されると推定した。

第3章ではエレクトロポレーション法でヒトエリスロポエチン (Epo) cDNA をタバコ培養細胞に導入し、Epo の生産を試みた。その結果、Epo cDNA のゲノムへの組込み、Epo cDNA の発現は十分に確認することができたが、Epo タンパク質の生産量は極めて少ないものであった。この理由として導入した Epo cDNA はシグナルペプチド部分を除去したものであることから、発現した Epo が細胞質内で不安定であるためであると推定した。

第4章ではシグナルペプチドを持つ Epo cDNA を *Agrobacterium* を介した方法でタバコ培養細胞に導入し、生産された Epo の生産量、構造及び *in vitro*, *in vivo* での生物活性を検討した。その結果、Epo はシグナルペプチド部分を持たない場合に比べ約100倍の生産量を示すことを明らかにした。また、生産された Epo は天然型 Epo と同じ様式でシグナルペプチドがプロセッシングされ、細胞膜を透過することが判明した。タバコ培養細胞で生産した Epo は *in vitro* においては天然型 Epo より高い比活性を示したが、*in vivo* での活性は非常に低かった。タバコ培養細胞で生産した Epo の糖鎖構造を解析したところ、糖鎖末端にシアル酸残基が存在しないことが明かとなり、*in vivo* での生物活性が欠如していたのは、肝臓でアジアロタンパクレセプターにより捕捉され、速やかに血流中より除去されたためと推定した。

論文審査の結果の要旨

糖鎖の付加など真核細胞特有の修飾を必要とするホルモンやサイトカインといった有用タンパク質は主に動物培養細胞で生産されている。一方、植物細胞は比較的安価に大量のバイオマスの取得が可能であり、かつ真核細胞特有の種々の修飾を施すことができることから有効な組換え型タンパク質生産細胞系となり得る可能性がある。本論文では植物細胞の組換え型糖タンパク質生産細胞系としての有効性を検討することを目的に研究を行なった。

その内容のうち特筆すべき点は以下の通りである。

1. タバコ培養細胞で培地中に多量に分泌される新規の塩基性ペルオキシダーゼ (40K, 38K) を見出し、そのタンパク化学的、酵素化学的性質及び cDNA より予想される一次構造を明らかにした。40K の mRNA 発現及び分泌パターンを解析し、40K の発現及び培地中への分泌は細胞の増殖期ではなく細胞の成長期に著しいことを示した。細胞の成長期には細胞壁の再構成が活発に行われており、この結果は細胞壁の再構成に 40K が関与している可能性を示している。また、培地中への分泌機構すなわち細胞壁透過機構については、細胞の成長期に生じる細胞壁の間隙からの放出であると推定している。

2. 赤血球前駆細胞の分化・増殖を促進し、赤血球造血過程に重要な働きをするエリスロポエチン (Epo) は糖タンパク質であり、その糖鎖は生物活性の発現に重要である。組換え型ヒト Epo をタバコ培養細胞で生産することを試みた。シグナルペプチド部分を除去したヒト Epo cDNA をタバコ培養細胞に導入したところ、mRNA は発現されていたが Epo タンパク質の生産量は極めて少ないことを明らかにし、Epo が細胞質で不安定であることを推定した。シグナルペプチド部分を持つ cDNA をタバコ培養細胞に導入した場合には、Epo タンパク質が大量に生産され、細胞へ分泌されることを示した。分泌された Epo タンパク質を精製単離し、その生化学的特徴を詳細に解析した。すなわち、タバコ培養細胞におけるシグナルペプチドの切断部位は動物細胞における部位と同一であること、タバコ培養細胞で生産した

Epo は *in vitro* においては動物細胞で生産した Epo より高い生物活性を持つことを証明した。一方、タバコ培養細胞で生産した Epo はその糖鎖末端にシアル酸残基を持たないことから、すみやかに血流中から除去され、*in vivo* での生物活性が非常に低いことを示した。

以上のように本論文は、タバコ培養細胞の分泌性ペルオキシダーゼの構造と分泌特性、並びにタバコ培養細胞で生産した動物性糖タンパク質の構造とその機能について詳細に検討を行なったもので、植物細胞の遺伝子工学、細胞工学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成7年4月17日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。