

氏 名	なか むら てつ お 中 村 徹 雄
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論農博第 2310 号
学位授与の日付	平成 12 年 5 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	Expression of Glycosylated Human Interferon-beta (INF- β) in High Levels in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells (チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞における糖鎖付加型ヒトインターフェ ロン β の高レベル発現)
論文調査委員	(主 査) 教 授 木 村 光 教 授 大 東 肇 教 授 伏 木 亨

論 文 内 容 の 要 旨

インターフェロンは、細胞をウイルス感染から保護する働きのある分泌蛋白質で、その中のインターフェロン・ベータ (INF- β) は、ウイルス感染あるいは合成二重鎖 RNA に暴露された繊維芽細胞によって分泌される分子量約24,000の糖蛋白質である。糖鎖の部分が生理活性に深く関係している。遺伝子組換えによって大腸菌 (*E. coli*) で発現された INF- β は糖鎖を持たず、その性状は生体内の正常な INF- β とは著しく異なり、比活性も低い。そのため正常に近い糖鎖付加型の組換え型 INF- β を産生する試みがなされてきたが、最終産物の収率が低く、いまだ実用化されていない。

市販の INF- β は、動物血清を含む培養液中で繊維芽球あるいはリンパ芽球から分泌されたものを精製したものである。この INF- β も最終製品の収率が低く、また、培養液中に含まれる動物血清のみならず、異常増殖している細胞由来の遺伝子情報の混入の心配がある。

以上の背景から、最も安全とされる哺乳動物細胞のチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) を宿主として、天然のものと同じ生理活性のある糖鎖を持つ INF- β を高い収率で得ることができる高生産性の発現ベクターを開発した。この発現ベクターの特徴は、薬剤選択領域にあり、遺伝子を転写するためのプロモーターのエンハンサー配列を削除し、更に翻訳開始コドン周辺の塩基配列を非コザック配列に改変したことにある。つまりこれらの遺伝子を人為的に弱体化させ薬剤耐性遺伝子の転写、翻訳を著しく低下させることにより、耐性遺伝子が宿主細胞の染色体 DNA 上に点在している転写効率の非常に高い領域に組み込まれた場合のみ、細胞は薬剤耐性となり、薬剤による選択の後も生存でき、生存した細胞のほとんど全てが高生産性のクローンとなることにある。更にメトトレキセート (MTX) で遺伝子増幅させ、より高生産性のクローンを得ることもできる。

1. ヒト INF- β 遺伝子発現ベクターの作製

ヒト INF- β 遺伝子を担う、560塩基対の cDNA をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で増幅し、増幅産物を pT7 Blue(R)T ベクターでクローンした。PCR に用いたセンス及びアンチセンス・プライマーには、それぞれ NotI と XbaI 制限酵素の切断部位をあらかじめ導入しておいた。次に、pT7 Blue(R)T ベクター内の挿入物を消化することによって、INF- β 遺伝子を得た。得られた INF- β 遺伝子を哺乳類発現ベクターである pNOW1 / CMV-A に組み込んで、ヒト INF- β の新しい発現ベクターである pNOW-hINF- β プラスミドを得た。

2. ヒト INF- β 遺伝子の CHO 内発現

ジヒドロ葉酸レダクターゼマイナスの CHO 突然変異体 (DG44細胞) を、DOTAP 試薬を使って pNOW-hINF- β プラスミドでトランスフェクトした。培養液上清中の INF- β の濃度が最も高かった形質変換体細胞を更に MTX で選択した。約30%の CHO クローンは、4日間培養の上清中に 1×10^4 IU / ml 以上の INF- β を分泌した。一番高かったクローンでは、培養液中の INF- β 濃度が 14.9×10^4 IU / ml に達した。更にジェネティシンと 500 nM の MTX で選択した。その濃度は培養4日目になると約 1×10^6 IU / ml に達し、しかもなお増加し続けていた。繊維芽球の培養液中に分泌される INF- β 濃度は、高々 2×10^4 IU / ml に過ぎないので、CHO 細胞による組換え型 INF- β の発現は極めて効率的といえる。特記すべき

点は、得られた CHO クローンが、動物血清を全く含まない培養液の中でも生育できることである。

3. 組換えヒト IFN- β の生化学的性状

得られた IFN- β 分子の大きさを SDS-PAGE で調べたところ、繊維芽球由来の正常 IFN- β と同様に分子量 24,000 の位置に泳動した。また、グリコペプチダーゼ F で消化し、糖部分を除去し泳動を行うと、19,000 の位置に推移した。次いで、N 未アミノ酸配列を調べたところ、遺伝子配列から予測されたように正常 IFN- β と同一の配列が得られた。その結果、CHO 細胞で生産された IFN- β は、正常 IFN- β と同じ蛋白質部分と糖鎖を有することが確認された。この発現ベクターにより、動物血清を使わないで培養し、従来の組換え型ヒト IFN- β より 50 倍以上の高生産の生理活性に関係する糖鎖を持つ IFN- β を得た。安全でかつ高生産性の組換え医薬品製造への道が拓けてきた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、哺乳動物細胞のチャイニーズハムスター卵巣細胞を宿主として、新しく開発できた発現ベクターを用いて、天然のものと同じ生理活性を持つ糖鎖付加型のヒトインターフェロン・ベータ (INF- β) の高生産性に関するもので、評価すべき点は以下のとおりである。

1. ヒト IFN- β 遺伝子を挿入した、効率のよい発現ベクター pNOW-hIFN- β プラスミドでチャイニーズハムスター卵巣細胞をトランスフェクトすることによって、培養液中に IFN- β を高濃度 (1×10^6 IU/ml) に分泌するクローンを得た。この値は、これまでに報告された組換えヒト IFN- β の培養液中濃度と比較して 50 倍以上高いものであった。
2. チャイニーズハムスター卵巣細胞によって生産される組換えヒト IFN- β は、繊維芽細胞由来の正常 IFN- β と分子量が同一で、またこれと同様に糖鎖を持っている。糖鎖はインターフェロンの生理活性に関係し、また流血中からの清掃率を低下させるために、糖蛋白質の薬理作用を持続させることで医薬品として必要であり、重要なものである。
3. 従って、今回得られたチャイニーズハムスター卵巣細胞によるヒト IFN- β 発現系によって、正常 IFN- β と同じ生理活性を持った糖鎖付加型の組換えヒト IFN- β を動物血清を使用することなしに、大量に生産することが可能となった。

近年医薬品の安全性の観点から、発現ベクターや宿主細胞自体の安全性や、宿主細胞 DNA の生産物への混入などが厳しく問われるようになってきている。従来のウィルス系の発現ベクターやがん細胞系の宿主細胞を用いた発現系の利用、さらには宿主細胞の生存能力が低いために DNA 混入が懸念される高密度培養法などでは、今後医薬品として新規に認可されることは難しいとされる。安全な宿主細胞、安全な発現ベクターを用い、低密度培養であっても高収率で高生産性のこの発現ベクターを開発・利用した本研究成果は、今後の組換え蛋白質生産に大きな改良をもたらすものと期待でき、生化学、細胞工学、細胞生物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 12 年 3 月 24 日、論文並びにそれに関連した分野にわたって試問した結果、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。