

氏 名	もり た しげる 森 田 滋
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2397 号
学位授与の日付	平 成 13 年 11 月 26 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	Improved methods for production of useful recombinant proteins in eukaryotes (真核細胞を用いた有用組換えタンパク質の効率的生産法の開発)

(主 査)
論文調査委員 教 授 清 水 昌 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 江 崎 信 芳

論 文 内 容 の 要 旨

大腸菌を宿主とする生産法で、複雑な立体構造を有する真核生物由来タンパク質をその活性を保持したまま生産することは困難であり、そのため真核生物を宿主とする生産技術の確立が望まれてきた。しかし、真核生物では異種遺伝子を高レベルで転写できるプロモーターや細胞外に効率よく分泌できるシグナル配列が見出されていない、などの問題を解決する必要があった。また、喘息は人口の2～4%に認められ、その数は増加傾向にあるが、発症にいたる分子機構には不明の点が多い。そこで、本研究のめざした目標は、活性型で高品質の遺伝子組換え型タンパク質医薬品を真核細胞系で効率よく生産する技術を確立するとともに、その活用を念頭において、喘息治療薬開発の標的となる有用タンパク質を見出すことにあった。内容は以下のように要約される。

1. *Fusarium* Sp. S-19-5 株のアルカリプロテアーゼ遺伝子のクローニングと *Acremonium chrysogenum* での発現

Fusarium sp. S-19-5 株が大量のアルカリプロテアーゼを分泌することに着目し、*Fusarium* アルカリプロテアーゼ遺伝子をクローニングし、プロモーター・シグナル配列を同定した。また、分類学上近縁にあり、DNA 規制の面で安全であることが保証されている *A. chrysogenum* にプロモーター配列も含んだ *Fusarium* アルカリプロテアーゼ染色体 DNA を挿入することにより、4 g/l 以上の著量の *Fusarium* アルカリプロテアーゼを分泌生産することに成功した。

2. *Fusarium* アルカリプロテアーゼプロモーターシステムを用いたヒトリゾチームの分泌生産

大腸菌や酵母では活性を保持したまま大量に生産することが困難なヒトリゾチームをモデルに *Fusarium* アルカリプロテアーゼプロモーターシステムの有用性を検証した。アルカリプロテアーゼプロモーター、プレプロ配列下流にヒトリゾチーム遺伝子を連結したプラスミドを *A. chrysogenum* に導入することにより、46 mg/l のヒトリゾチームを活性を保持したまま分泌生産することに成功した。糸状菌を用いた異種遺伝子分泌生産系に使用される宿主はほとんどが *Aspergillus* 属や *Trichoderma* 属であり、*A. chrysogenum* を宿主とし、*Fusarium* アルカリプロテアーゼの強力なプロモーター・シグナル配列を利用した異種遺伝子分泌生産系の構築は新たな宿主・ベクター系を提供するものである。

3. 新規喘息関連タンパク質の発見と真核細胞を用いた機能解析

喘息治療薬創製のための標的となりえる有用タンパク質を見出すために、気道過敏性亢進モデルマウス肺と正常マウス肺で発現が変動する遺伝子を Suppression subtractive hybridization 法により探索し、モデルマウス肺において顕著に発現の増加する遺伝子として gob-5, ECF-L を見出した。

In situ hybridization により、gob-5 は気道周囲の粘液産生を司る肺細胞に、ECF-L は肺胞マクロファージに発現を認めた。組換えアデノウイルスベクターを用いた gob-5 アンチセンス遺伝子気管内投与により、気道過敏性亢進、気道での粘液産生、好酸球浸潤が有意に抑制された。逆に gob-5 センス遺伝子投与によりこれらが有意に促進された。気管支上皮細胞株である NCI-H292 細胞に gob-5 遺伝子およびそのヒト型相当遺伝子である CLCA1 遺伝子を導入することにより、粘液産生が亢進することを認めた。これらより、gob-5 および CLCA1 タンパク質は喘息の主症状である気道過敏性亢進、気道上皮の粘液産生や気道への好酸球の浸潤に関与することを示した。ECF-L アンチセンス遺伝子導入によっても気道過敏

性の抑制がみられ、ECF-L も喘息の発症や進展に関与する可能性が示された。また、新たにヒト ECF-L 遺伝子をクローニングし、COS 細胞に導入することにより、ヒト ECF-L タンパク質がキチン分解酵素活性を有することを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本論文は、*Fusarium* sp. S-19-5 株の産生するアルカリプロテアーゼのプロモーター・シグナル配列を利用した新規分泌生産系を確立し、また、喘息関連タンパク質として gob-5, ECF-L を見出し、その機能解析を行った結果が述べられているが、評価すべき点は以下の通りである。

1. *Fusarium* sp. S-19-5 株のアルカリプロテアーゼ遺伝子のクローニングと *Acremonium chrysogenum* での発現

Fusarium sp. S-19-5 株の産生するアルカリプロテアーゼ遺伝子をクローニングし、そのプロモーター・シグナル配列も含めた塩基配列を明らかにした。また、*A. chrysogenum* で *Fusarium* アルカリプロテアーゼプロモーター・シグナル配列が効率よく作用することを明らかにし、*A. chrysogenum* を宿主として 4 g/l 以上の *Fusarium* アルカリプロテアーゼを生産することに成功した。この値は糸状菌を用いた異種遺伝子分泌生産系において過去最高値であり、この系の有用性を示すものである。

2. *Fusarium* アルカリプロテアーゼプロモーターシステムを用いたヒトリゾチームの分泌生産

Fusarium アルカリプロテアーゼプロモーターシステムを利用して、活性型のヒトリゾチームを分泌生産することに成功した。この系を利用した複雑な構造を有する有用タンパク質の大量生産が期待される。

3. 新規喘息関連タンパク質の発見と真核細胞を用いた機能解析

気道過敏性亢進モデルマウス肺で特異的に発現が変動する遺伝子として見出された gob-5, ECF-L はこれまで喘息との関連が全く報告されていない遺伝子である。組換えウイルスベクターを用いたアンチセンス遺伝子投与により、喘息様症状が改善されたことはこれらの遺伝子産物が喘息の発症や進展に関与することを示すもので評価できる。さらに gob-5 の場合は粘液産生に直接に関与することを細胞レベルで示した。ECF-L の場合は、新たにヒト型相当遺伝子をクローニングし、それがキチン分解酵素活性を有することを発現細胞を用いて示した。これらから、新たな作用機序を有する喘息治療薬創製の可能性が開かれた。ECF-L に関しては前述の糸状菌を利用した分泌生産系への応用も期待される。

以上のように、本論文は糸状菌を用いた新たな宿主・ベクター系を構築し、有用タンパク質生産への応用を計るとともに、その活用を念頭において、新規喘息関連タンパク質を見出し、その機能まで解析したものであり、応用微生物学および生化学に貢献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のあるものと認める。

なお、平成13年9月13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。