

氏 名	ほん だ ごう いち 本 田 剛 一
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2132 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 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 and Characterization of Recombinant Human Thrombomodulin (組換えヒトトロンボモジュリンの発現とその性状)
論文調査委員	(主 査) 教 授 駒 野 徹 教 授 佐々木隆造 教 授 大山莞爾

論 文 内 容 の 要 旨

トロンボモジュリン(TM)は血管内皮細胞表面に発現しているトロンビン受容体である。TMはトロンビンと結合すると血液凝固作用を阻害し、新たにトロンビン/TM複合体を形成してプロテインC活性化反応を顕著に促進し、活性化されたプロテインCは強い抗血液凝固作用を発揮する。本論文はTMの構造と機能の詳細を解明することを目的として行ったものであり、主な内容は次のとおりである。

第一章ではTM遺伝子を単離・同定してその一次構造を明らかにし、その結果に基づいてTMのアミノ末端側よりアミノ末端領域(D1)、6個の上皮成長因子様構造(E123456)からなる領域(D2)、O型糖鎖付加部位に富む領域(D3)、膜貫通領域(D4)、細胞内領域(D5)の5つの領域からなる一回膜貫通型受容体の構造を有することを明らかにした。遺伝子工学的に作製したD1、D2、D12、D123、D23の各欠失変異体をCOS細胞にて分泌発現させ、それらの変異タンパク質を用い、トロンビンとの結合能及びプロテインC活性化能を検討した結果、両活性ともD2領域に存在することが判明した。これらの変異体は全て膜貫通領域や細胞内領域を欠如しているため、天然型TMで認められるようなリン脂質への結合性やリン脂質による活性増強は観察されなかった。

第二章ではD2領域内の6個の上皮成長因子様構造のうち、後半の3個からなる領域(E456)に最小TM活性領域が特定されることを明らかにしている。E4領域はプロテインCとTMとの結合並びにプロテインC活性化能に、E5領域はトロンビンとの結合にそれぞれ関与していた。さらに、E6領域とそれに続くD3領域の機能について詳細な検討を行うため、E6領域のカルボキシ末端から6、16、38アミノ酸を欠失させた変異体を作製し、プロテインC活性化能、抗凝固能、及びラットを用いた血中安定性などを検討した。その結果、E6領域は最大TM活性発現のために重要な領域であること、O型糖鎖が豊富に付加しているD3領域は*in vivo*でのTMの血中安定性に寄与している可能性があることを明らかにした。

第三章では細胞外領域のみからなる分泌型TM(D123)をCHO細胞で大量発現させる系を構築し、組換えTMタンパク質を取得した。これを用いてマウスのトロンビン誘導凝固モデル系で抗凝固効果を調べたところ、前投与したD123の量依存的にトロンビンによる致死からの回復あるいはフィブリン血栓

の減少が認められ、*in vivo* での組換え TM タンパク質の抗凝固効果を確認した。

第四章では TM 最小活性領域である E456 をカビで作製した高発現系で生産し、得られた E456 が動物細胞で産生した E456 と同様の活性を有していることを確認したが、糖鎖の付加に違いがあることを明らかにした。

第五章ではホモシスチン尿症と TM の疾患との関連について検討している。ホモシスチン尿症患者では血中のホモシステイン濃度が上昇しており、動脈硬化症や凝固疾患に陥りやすい。ホモシステインと TM との関連を *in vitro* で検討した結果、ホモシステインによってタンパク質レベルで TM 活性が失活し、それに伴って TM 遺伝子の発現誘導があることについて明らかにした。この結果から、ホモシスチン尿症患者が凝固疾患に陥りやすい原因の一つにホモシステインの TM への直接作用がある可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

TM は血液中のトロンビンと結合することでプロテインCを活性化し、強い抗血液凝固作用を発揮する。トロンビンのセリンプロテアーゼの基質特異性を変化させることで凝固作用を凝固阻害作用へと変換させる TM は、新規な抗凝固物質として重要視されその開発が期待されていた。本論文は、遺伝子工学的手法を用いて TM の構造と機能の解明を行い、さらに TM を多発現する系を構築してその発現産物が将来の医薬品として応用可能であることを示した研究であり、評価すべき点は次の通りである。

1. TM 遺伝子を単離・同定してその一次構造を決定し、アミノ末端側より、アミノ末端領域 (D1)、6 個の上皮成長因子様構造 (E123456) からなる領域 (D2)、O 型糖鎖付加部位に富む領域 (D3)、膜貫通領域 (D4)、細胞内領域 (D5) の 5 つの領域からなる一回膜貫通型受容体の構造を有することを明らかにした。遺伝子工学的に各種欠失変異体を作製し、これらの変異タンパク質を用い、トロンビンとの結合能、プロテインC活性化能を検討した。その結果、両活性とも D2 領域に存在することを明らかにした。

2. D2 領域内の 6 個の上皮成長因子様構造のうち後半の 3 個からなる領域 (E456) に最小 TM 活性領域が存在していた。そのうち E4 領域はプロテインCと TM との結合を促進して活性化する能力を有し、E5 領域はトロンビンと結合する能力を有していた。さらに E6 領域は最大 TM 活性発現のために重要な領域であり、D3 領域は *in vivo* での TM の血中安定性に寄与している可能性があることが明らかとなった。

3. 細胞外領域のみからなる分泌型 TM (D123) を CHO 細胞にて大量発現させる系を構築し、組換え TM タンパク質を生産した。これを用いマウストロンビン誘導凝固モデルで抗凝固効果を調べたところ、前投与した D123 の量依存的にトロンビンによる致死からの回復、並びにフィブリン血栓の減少が認められた。

4. TM 最小活性領域である E456 をカビの高発現系を用いて生産した。得られた E456 は動物細胞で産生したものと同様に活性を有したが、糖鎖の付加に違いがあることが明らかとなった。

5. ホモシスチン尿症患者では血中のホモシステイン濃度が上昇しており、動脈硬化症や凝固疾患に陥りやすい。ホモシステインと TM との関連を *in vitro* で検討した結果、ホモシステインによるタンパク

質レベルでの TM 活性の失活と、それに伴う TM 遺伝子発現誘導が明らかとなり、ホモシステイン尿症患者が凝固疾患に陥りやすい原因の一つにホモシステインの TM への直接作用がある可能性が示唆された。

以上のように、本論文は組換え TM を多発現し、その発現産物を用いて TM の構造と機能を明らかにしたもので、TM の生化学、分子生物学並びに遺伝子工学の発展に寄与するところが大い。

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 9 年 2 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。