

氏 名	こ 小 鋒
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 244 号
学位授与の日付	平成 13 年 3 月 26 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	工学科学研究科 材料科学専攻
学位論文題目	Human acidic and basic fibroblast growth factor: Cloning, expression and their interactions with heparin
審 査 委 員	(主査) 教 授 原 三 郎 教 授 伊 倉 宏 司 教 授 梶 原 莞 爾 助 教 授 森 肇 助 教 授 亀 井 加 恵 子

論 文 内 容 の 要 旨

ヒト酸性繊維芽細胞増殖因子 (aFGF) 及び塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) はヘパリン結合性の細胞増殖因子の 1 つであり、細胞表面のヘパラン硫酸鎖はそれら増殖因子の活性を制御する。FGF は細胞の分化・増殖を誘導するなどの生理学・生化学上重要な役割を担っていることから、創傷治癒における医療への応用などが期待されており、ヘパラン硫酸鎖による FGF の活性増強メカニズムの解明は重要な研究課題である。ヘパラン硫酸鎖と FGF の相互作用の原動力はヘパラン硫酸鎖の硫酸基の負の荷電であり、ヘパラン硫酸鎖と類似した構造であるがより高度に硫酸化されたヘパリンにも同様の作用がある。本論文は、FGF とヘパラン硫酸鎖の相互作用の分子機構を解明するために、化学的に修飾したヘパリンを作製し、FGF との相互作用の解析を行った。さらに、遺伝子工学の手法により大量に aFGF を生産するシステムの確立を目指した。

まず、ヘパリンが硫酸化された多糖であること、及びその硫酸基がタンパク質との相互作用に重要な役割を担っていることから、ヘパリン中の特定部位の硫酸基を選択的に脱離する化学反応を組み合わせ、あらかじめ設計した硫酸化パターンを有する各種ヘパリン誘導体を得る方法を確立した。また、ヘパリンの脱硫酸化に加えて、中性多糖に硫酸基を導入することにより、新規な硫酸化パターンを有する多糖の合成法を開発した。これにより、ヘパリンとタンパク質間の相互作用にどの硫酸基が寄与しているのかを明らかにすることが可能となった。

ヘパリンとタンパク質の結合における硫酸基の重要性を評価するために、表面プラズモン共鳴分析を適用した。ネイティブおよび先に調製した位置選択的脱硫酸化ヘパリンをキューベットに固定化し、FGF との結合における速度定数を求めた。さらに、固定化したネイティブヘパリンと FGF との結合に対する位置選択的脱硫酸化ヘパリンによる阻害を解析した。2 つの方法による結果は一致しており、ヘパリン中の 2 位、6 位及び N 位全ての硫酸基が aFGF との結合に必要であり、結合への寄与は 2 位、N 位、6 位の順であった。一方、bFGF との結合にたいしては、硫酸基の寄与の順番は aFGF の場合と同一であったが、ヘパリンの 6 位の硫酸基は結合に関与していないことが明らかとなった。以上より、ヘパリンの位置選択的脱硫酸化法は表面プラズモン共鳴分析法と組み合わせることにより、ヘパリンとタンパク質間の相互作用における硫酸基の関与を解明するのに有効な手段と考えられた。

ヒト aFGF および bFGF の cDNA の大量生産のために、ホストとしてカイコを用いた発現系を構築した。ヒト aFGF および bFGF の cDNA を持つ 2 種類の組換え体ハイブリッドバキュロウイルスを作製し、それ

らをカイコ幼虫に接種・感染させた。その結果、リコンビナントタンパク質は主に脂肪体に発現し、バキュロウイルス由来の gp67 タンパク質のシグナル配列を付加していたにも関わらず、体液には分泌されなかった。カイコがヘパリン硫酸鎖と類似の構造を持つ糖鎖を有しているかどうかは明らかにされていないが、発現した FGF が速やかに細胞表面上の硫酸化多糖と結合することにより体液への分泌が抑制された可能性が考えられる。リコンビナント FGF はヘパリンアフィニティークロマトグラフィーにより容易に精製することができ、いずれの FGF もカイコ幼虫 1 頭あたり、600～700 マイクログラムの発現量と見積もられた。得られたリコンビナントタンパク質の構造を解析したところ、aFGF はシグナルペプチドが期待通りの場所で切断されていたが、bFGF の場合はシグナルペプチドが期待通りの場所で切断されていたものとアミノ末端領域が欠落したものの両方が得られた。また、aFGF および bFGF のいずれも繊維芽細胞に対する増殖活性を持っていた。

さらに、トランスファーベクターを用いたトランスジェニックカイコの作製を試みた。ヒト aFGF の cDNA をフィブロイン L 鎖の第 7 エクソン内に導入し、作製したトランスファーベクターを初期 5 齢幼虫に接種した。それらの卵のゲノム DNA を解析することにより、遺伝子がターゲティングされたどうかを検出した。その結果、ゲノム中のフィブロイン L 鎖に FGF 遺伝子が相同組換えにより期待通りに挿入された可能性を見出した。以上の結果を通じて、FGF とヘパリンとの相互作用機構を明らかにし、また、FGF を大量生産する方法を確立したことにより、FGF を医療に用いることが可能となった。

論文審査の結果の要旨

本論文の前半ではヒト酸性繊維芽細胞増殖遺伝子 (aFGF) および塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) とヘパリンとの相互作用を明らかにした。その際、ヘパリンの硫酸基を位置選択的に脱離させる化学的方法を確立し、さらに硫酸基を導入する方法を新規に開発した。これにより、ヘパリンに予め設計した通りに硫酸基を配置することができるようになり、タンパク質とヘパリン間の相互作用にどの硫酸基が寄与しているのかを明らかにすることが可能となった。さらに、ヘパリンの位置特異的脱硫酸化法と表面プラズモン共鳴分析を組み合わせることにより、FGF とヘパリンの相互作用を詳細に解析し、タンパク質とヘパリン間の相互作用の解析に有用な方法であることを明らかにした。以上の研究は、新規な方法を開発した独創性の高い研究である。

さらに、後半では遺伝子操作法を用いた FGF の大量生産法を確立した。特に、リポフェクチンを用いて FGF 遺伝子をカイコに導入し、絹タンパク質フィブロインとの融合タンパク質として FGF を生産させる方法の可能性を示した事は、遺伝子組換え昆虫を作出する全く新しい技術を提供するもので、今後の発展が期待できる。

以上の様に、本論文は新規性と独創性が認められ、学術的に高い価値のあるものと認められる。なお、本論文の内容は下記の論文に公表されている。

- (1) Ryo Takano, Tomomi Nagai, Xiaofeng Wu, Xin-Yan Xu, Nguyen Tien Huy, Kaeko Kamei, and Saburo Hara, Sulfation of polysaccharides using monomethyl sulfate. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 19 (9) 1185-1190 (2000)
- (2) Xiaofeng Wu, Kaeko Kamei, Hideki Sato, Shin-ichi Sato, Ryo Takano, Masatoshi Ichida, Hajime Mori, and Saburo Hara, High-level expression of human acidic fibroblast growth factor and basic fibroblast growth factor in silkworm (*Bombyx mori* L.) using baculovirus vector. *Protein Expression and Purification*, 21(1) 192-200 (2001)