

学位論文題名

Expression of cherry salmon insulin-like growth factor I
in *Escherichia coli*

(大腸菌内におけるサクラマス・インスリン様成長因子I型の発現)

学位論文内容の要旨

外洋におけるサケ、マスの捕獲は資源量保護の観点から年々厳しく制限されつつあり、現在、日本近海の在来サケ、マス種はその資源量拡大が望まれている。なかでも、高級魚であるサクラマスは最も資源量拡大が望まれている魚種である。しかしながら、サクラマスは稚魚生産の効率が悪く、これが資源量拡大の妨げとなっている。

サクラマス稚魚生産低効率の主な原因として、稚魚の成長不良による死亡があげられる。本研究では、この問題の解決に成長促進作用をもつ物質の利用を考え、その効果が期待される物質としてインスリン様成長因子I型（IGF-I）に着目した。IGF-Iは成長ホルモン（GH）のセカンドメッセンジャーとして高い成長促進作用を持つことで知られる低分子量蛋白質である。そして、現在までの研究において、IGF-IはGHの関与がない発生初期にも存在し、その時期の成長を促進していることが報告されている。発生初期より生体に存在し、高い成長促進作用をもつIGF-Iはサクラマス稚魚の成長を効率よく促進するものと考えられるが、サクラマスIGF-Iは今のところ得られておらず、この試みはなされていない。

IGF-Iをサクラマス稚魚生産へ応用するための研究は多量のサクラマスIGF-Iを必要とすることが予測される。ところが、IGF-Iは生体における含量が少なく、研究に十分な量のサクラマスIGF-Iを得るためには遺伝子工学的手法を用いた生産が必要であると考えられる。そこで、本研究では、サクラマス稚魚生産にIGF-Iを応用するため、サクラマスIGF-I cDNAのクローニングとその構造解析を行い、これをもとにサクラマスIGF-Iの大腸菌内での発現条件を検討した。

はじめに、サクラマスIGF-I cDNAのクローニングを行った。まず、サクラマス肝臓より精製したmRNAより、cDNAライブラリーを作成した。次に、他の生物のIGF-I cDNAを参考に合成したオリゴヌクレオチドと、mRNAから逆転写酵素により作成した一本鎖DNAを用いたポリメラーゼ、チェーン、リアクション法（PCR法）によりプローブを作成した。そして、これらを用いてスクリーニングを行ったところ、長さ4 kbp前後のcDNAを8つ得た。8つのcDNAは制限酵素地図の分析、部分的な塩基配列の決定より、同一mRNA由来であることが判明した。そこで、得られたcDNA中一番長いものについて塩基配列を決定した。翻訳領域の検索を行ったところ、サクラマスIGF-I前駆体のアミノ酸配列と思われる176アミノ酸配列を翻訳する528塩

基が見いだされた。このアミノ酸配列とヒトIGF-I前駆体のアミノ酸配列の比較を行ったところ、ヒトIGF-I前駆体のアミノ酸配列中のIGF-I部分と約80%の相同性を示す70アミノ酸配列が見いだされ、得られたcDNAがサクラマスIGF-I前駆体のcDNAであることが示された。

次に、得られたサクラマスIGF-I cDNAを大腸菌に導入することにより、サクラマスIGF-Iの発現を行った。大腸菌発現系において、IGF-Iは分子量が小さく塩基性を示すため、発現後菌体内で速やかに分解される可能性がある。そこで、菌体内での安定化のため、他の蛋白質との融合蛋白質として発現させるよう発現ベクターを作成することが必要である。今回、サクラマスIGF-IはrTNF-STHとの融合蛋白質として発現するようプラスミドを構築した。rTNF-STHはサイモシン β 4とTumor necrosis factorの融合蛋白質であり、Tacプロモーターにより大腸菌内で高発現することが知られている。そして、これに反応するモノクローナル抗体がすでに作成されており、発現の確認に有利である。作成した発現ベクターを大腸菌に形質転換した後IPTG存在下で培養し、集菌した後、SDS電気泳動分析、rTNF-STHのモノクローナル抗体およびヒトIGF-Iのポリクローナル抗体を用いたウエスタン分析を行った。その結果、発現ベクターにより形質転換された大腸菌は発現ベクターにより形質転換していない大腸菌に存在しない分子量約31kDaの蛋白質が発現していることが確認された。この分子量約31kDaの蛋白質はrTNF-STHのモノクローナル抗体、ヒトIGF-Iのポリクローナル抗体両方に反応した。rTNF-STH(23kDa)の分子量と予想されるIGF-I(7.5kDa)の分子量の和が30.5kDaであることから、この分子量約31kDaの蛋白質はrTNF-STH/IGF-I融合蛋白質であることが示唆された。

次に、発現している分子量約31kDaの蛋白質を大腸菌から精製した。菌体内で発現が確認された融合蛋白質はインクルージョンボディを形成しており、不溶性であった。そこで、この大腸菌を超音波破碎し、遠心分離することにより不溶性画分を回収した。次に、大腸菌の破碎残骸を除くため、回収した不溶性画分を蔗糖溶液に懸濁した後、遠心分離によりペレットを回収した。次に、回収したペレットから表面活性剤により膜蛋白質を除いた。そして、このようにして精製されたrTNF-STH/IGF-I融合蛋白質のインクルージョンボディをウレアにより可溶化した。この時点でrTNF-STH/IGF-I融合蛋白質の収量は20gの大腸菌から約30mgであった。このうちサクラマスIGF-Iは10mgである。次に、精製した31kDaの蛋白質がrTNF-STH/IGF-I融合蛋白質であることを確認するため、可溶化した融合蛋白質をSDS電気泳動とそこからのバンドの切り出し注出によりさらに精製し、アミノ酸分析を行った。結果として、この31kDaの蛋白質のアミノ酸組成はrTNF-STH/IGF-I融合蛋白質のアミノ酸配列を反映し、精製した31kDaの蛋白質がrTNF-STH/IGF-I融合蛋白質であることが確認された。

次に、この融合蛋白質からサクラマスIGF-Iを切り出すことを試みた。rTNF-STH/IGF-I融合蛋白質はプロテアーゼ Factor Xaが認識するアミノ酸配列がrTNF-STHとIGF-Iの間に入るよう、その発現プラスミド構築のさい考慮してある。そこで、Factor XaによりrTNF-STH/IGF-I融合蛋白質の切断を試みた。結果として、その融合蛋白質はrTNF-STH抗体に反応する23kDaの蛋白質とIGF-I抗体に反応する10kDaに分かれた。このうち10kDaの蛋白質はその分子量と、IGF-I抗体への反応からサクラマスIGF-Iであることが強く示唆された。

今回の研究によりサクラマス IGF-I の組換え蛋白質を得ることができた。今後、この組換え蛋白質はサクラマス稚魚生産の効率を上げるために貢献するものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 島 豊
副 査 教 授 角 皆 静 男
副 査 教 授 実 吉 峯 郎 (西東京科学大学)

学 位 論 文 題 名

Expression of cherry salmon insulin-like growth factor I in *Escherichia coli*

(大腸菌内におけるサクラマス・インスリン様成長因子I型の発現)

外洋におけるサケ、マスの捕獲は資源量保護の観点から年々厳しく制限されつつあり、現在、日本近海の在来サケ、マス種はその資源量拡大が望まれている。なかでも、高級魚であるサクラマスは最も資源量拡大が望まれている魚種である。しかしながら、サクラマスは稚魚生産の効率が悪く、これが資源量拡大の妨げとなっている。サクラマス稚魚生産低効率の主な原因として、稚魚の成長不良による死亡があげられる。申請者はこの問題の解決に成長促進作用をもつ物質の利用が有効であると考え、その効果が期待される物質としてインスリン様成長因子I型 (IGF-I) に着目した。

IGF-Iは成長ホルモン (GH) のセカンドメッセンジャーとして高い成長促進作用を持つことで知られるポリペプチドである。そして、現在までの研究において、IGF-IはGHの関与がない発生初期にも存在し、その時期の成長を促進していることが報告されている。発生初期より生体に存在し、高い成長促進作用をもつIGF-Iはサクラマス稚魚の成長を効率よく促進するものと考えられるが、サクラマスIGF-Iは今のところ得られておらず、この試みはなされていない。

IGF-Iをサクラマス稚魚生産へ応用するための研究は多量のサクラマスIGF-Iを必要とすることが予測される。ところが、IGF-Iは生体における含量が少なく、研究に十分な量のサクラマスIGF-Iを得るためには遺伝子工学的手法を用いた生産が必要であると考えられる。そこで、本研究では、サクラマスIGF-I cDNAのクローニングとその構造解析を行い、これをもとにサクラマスIGF-Iの大腸菌内での発現条件を検討した。

はじめに、サクラマスIGF-I cDNAのクローニングを行った。他生物のIGF-I

I c DNAの構造をたよりにサクラマス肝臓由来c DNAライブラリーのスクリーニングを行ったところ、4089bpのc DNAを単離した。その全塩基配列を決定し、翻訳領域の検索を行ったところ、サクラマスIGF-I前駆体のアミノ酸配列と思われる176アミノ酸配列を翻訳する528塩基が見いだされた。このアミノ酸配列とヒトIGF-I前駆体のアミノ酸配列の比較を行ったところ、ヒトIGF-I前駆体のアミノ酸配列中のIGF-I部分と約80%の相同性を示す70アミノ酸配列が見いだされ、得られたc DNAがサクラマスIGF-I前駆体のc DNAであることが示された。

次に、得られたc DNAを用いて、大腸菌内におけるサクラマスIGF-Iの発現を行った。菌体内におけるIGF-Iの安定化のため、rTNF-STH(サイモシンβ4とTumor necrosis factorの融合蛋白質)との融合蛋白質として発現するようプラスミドを構築した。プロモーターとしてはTacプロモーターを使用した。作成した発現プラスミドを大腸菌に形質転換した後IPTG存在下で培養し、rTNF-STHのモノクローナル抗体およびヒトIGF-Iのポリクローナル抗体を用いたウエスタン分析を行った。その結果、rTNF-STHのモノクローナル抗体、ヒトIGF-Iのポリクローナル抗体両方に反応する分子量約31kDaの蛋白質が発現していることが確認された。rTNF-STH(23kDa)の分子量と予想されるサクラマスIGF-I(7.5kDa)の分子量より、この約31kDaの蛋白質はrTNF-STH/IGF-I融合蛋白質であることが示唆された。そこで、この31kDaの蛋白質を大腸菌から精製し、アミノ酸分析を行ったところ、そのアミノ酸組成はrTNF-STH/IGF-I融合蛋白質のアミノ酸配列を反映しており、これがrTNF-STH/IGF-I融合蛋白質であることが確認された。rTNF-STH/IGF-I融合蛋白質はプロテアーゼFactor Xaが認識するアミノ酸配列がrTNF-STHとIGF-Iの間に入るよう、その発現プラスミド構築のさい考慮してある。そこで、Factor XaによりrTNF-STH/IGF-I融合蛋白質の切断を行ったところ、切断に成功し、サクラマスIGF-Iを得ることができた。サクラマスIGF-Iの収量としては大腸菌20gから10mg得ることができた。

以上のように申請者は、産業上重要魚種であるサクラマスのIGF-Iの一次構造をc DNAより決定したばかりか、このポリペプチドの大腸菌発現系による精製にも成功している。今後、この研究成果はサクラマスの発生、成長におけるIGF-Iの機能の解明、そして、それをもとにしたサクラマス増養殖技術発展に大きく貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(環境科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。