

酵母で発現させたリコンビナント α -フェトプロテインを用いたエストロゲン結合能の解析

学位論文内容の要旨

(要旨) 胎児期の主要な血清タンパクであり、また肝癌などの腫瘍マーカーである α -フェトプロテイン(AFP)は、化学構造やリガンド結合能でアルブミンと高い相同性を持つために胎児期においてアルブミンと同様の機能を果たしているのではないかと考えられているが、その生理的役割については不明な点が多い。AFPに特徴的なこととして、エストロゲンをリガンドとして結合し得る。ただしこの活性は齧歯類由来のAFPに限られ、ヒトをはじめとする他の動物種では認められない。従って、AFPのエストロゲン結合能は、動物一般にとっては必ずしも必要な生理活性ではないが、齧歯類においては必須な、あるいは特徴的なある生理的役割を担っていることが示唆される。エストロゲンはある種の乳ガンに対して増殖促進的に働くことが報告されている。この系において、エストロゲン結合能をもつAFPはエストロゲン依存性の腫瘍増殖を有意に抑制することから、AFPの抗ガン剤としての臨床応用の可能性に注目が集まっている。当研究室の西等はこの種属間のエストロゲン結合性の違いを利用しラットAFPのエストロゲン結合部位を同定した。すなわち、リコンビナントヒト→ラットキメラAFP分子を酵母で産生させ、ラットAFPのエストロゲン結合部位がアミノ酸配列423-506に限局していることを明らかにした。さらにわれわれは領域423-506中で、ラット→ヒト間の置換アミノ酸15ケを含む領域426-467が重要であることを明らかにした(未発表)。本研究ではこの15アミノ酸のどれがエストロゲン結合に直接関与しているかを知るためにヒト→ラットのアミノ酸置換を導入した16の変異ヒトAFPを作製し、エストロゲン結合型の変異ヒトAFPを得た。また、これらのエストロゲン結合性の変化からエストロゲン結合に必要なアミノ酸残基を同定することができた。

材料と方法 リコンビナントAFPの発現には酵母 20B12KR16と分泌型発現プラスミド pNW033を用いた。このプラスミドにヒトならびにラットAFP cDNAを挿入し、それぞれpNWHAFPおよびpNWRAFPとした。AFPにアミノ酸残基の変異を入れるためにPCR法を用いた重複伸長一点特異的変異導入法を行い、変異cDNA断片を作製してそれらを発現プラスミドのAFP cDNAの相当する部分に制限酵素部位を利用して挿入した。最終的には、アミノ酸置換を入れたプライマーを用いて27のPCR実験を行い、野生型を含む20のAFP発現プラスミドを作製した。これらプラスミドの塩基配列を決定し、これらが目的の構造を有することを確認したのち酵母を形質転換した。酵母の形質転換体の培地に分泌されたAFPをラジオイムノアッセイで測定しリコンビナントAFPの産生を確認した。酵母の培養液の上清を80%飽和硫酸アンモニウムとして塩析し、生じた沈殿を回収した。つぎにPhenyl-Sepharoseカラムを用いた疎水性クロマトグラフィーを行い、さらに抗AFPモノクロナル抗体(MAb) AFY-6を固相化したイムノアフィニティカラムで精製した。得られたAFPの8%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。AFPの定量はおもに固相法ラジオイムノアッセイで行った。エストロゲン結合アッセイでは、固相化した抗AFPモノクロナル抗体とリコンビナントAFPを結合させ、さらに [^3H] エストロゲンとを反応させて固相に結合した放射活性を測定した。

結果と考察 Phenyl-Sepharoseによる疎水性クロマトグラフィーは培地中のタンパクを硫酸アンモニウムで沈殿させた後透析なしで直接カラムにかけること、また溶出物を引き続き直接イムノアフィニティクロマトグラフィーにかけることができ、目的のタンパクの回収も良好であったので、この実験に大変有用であった。計22種類の野生型、及び変異型ヒト及びラットAFPを精製し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行ったところ、いずれもがそれぞれの天然型AFPと同様の泳動パターンと移動度を持っていることが確認された。これら精製したについてエストロゲン結合アッセイをおこなった。主な変異体における置換アミノ酸とそのアッセイ結果を下の表に示す。

	Positions of amino acid residues substituted														estrogen-binding (dpm)	
	426	429	430	431	433	436	437	438	440	448	450	451	457	461		467
Human AFP Wild-type	S	M	A	I	R	A	A	T	A	D	L	L	A	I	I	238
Mutant																
HM-A	A	I	D	L	G	V	S	I	S	E	R	S	L	Y	L	15,510
HM-I	V	S	I	S	E	R	S	L	Y	.	17,265
HM-H	V	S	I	S	E	R	S	L	.	.	1,030
HM-J	V	S	I	.	.	R	S	L	Y	.	12,898
HM-JH	V	S	I	.	.	R	S	L	.	.	1,927
HM-K	V	S	I	.	.	.	S	L	Y	.	2,938
HM-M	I	.	.	R	S	L	Y	.	3,875

野生型ヒトAFPは $[^3\text{H}]$ -エストロゲンを結合しなかったが、ヒトAFPの配列426-467をラット型に置換したキメラ分子HM-Aは、加えた $[^3\text{H}]$ -エストロゲン50,000dpmのうち、15,510dpmを結合した。他の様々な置換を入れた16個のヒト変異体のうち、436A→V, 437A→S, 438T→I, 450L→R, 451L→S, 457A→L, 461I→Yの最少7残基置換の変異体HM-Jが12,898dpmを結合し、これらのいずれかをヒト型にすると結合活性が大きく損なわれた。したがって、これら7アミノ酸残基がラットAFPのエストロゲン結合部位を構成していると結論した。ラットAFPのエストロゲン結合領域内の436, 437, 438の3ケのアミノ酸残基をすべてヒト型に置換した変異体RM-P, および450, 451, 457, 461の4ケのアミノ酸残基をヒト型にした変異体RM-Rはことごとく結合活性が損なわれ、ヒト変異体の実験結果が支持された。野生型ラットAFPのエストロゲンに対する結合定数は $6.3 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ であり、ヒト変異体AFP・HM-Jは $4.7 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ であった。ヒトAFPは本来エストロゲンを結合しないが、このようにして作成したエストロゲン結合型ヒト変異体AFPがエストロゲン依存性の腫瘍に対する臨床応用を可能せしめると期待される。エストロゲンに対する親和力は、置換するアミノ酸残基を検討することで向上させることが可能と思われる。そのためにはX線結晶解析やNMRなどによるAFPの立体構造の情報が有益であろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 信 三
副 査 教 授 葛 巻 暹
副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

酵母で発現させたリコンビナント α -フェトプロテインを用いたエストロゲン結合能の解析

胎児期の主要な血清タンパクであり、また腫瘍マーカーである α -フェトプロテイン(AFP)は、化学構造やリガンド結合能でアルブミンと高い相同性を持つために胎児期においてアルブミンと同様の機能を果たしているのではないかと考えられているが、その生理的役割については不明な点が多い。AFPに特徴的なこととして、エストロゲンをリガンドとして結合し得る。ただしこの活性は齧歯類由来のAFPに限られ、ヒトをはじめとする他の動物種では認められない。エストロゲン結合能をもつAFPはエストロゲン依存性の腫瘍増殖を有意に抑制することから、AFPの抗ガン剤としての臨床応用の可能性に注目が集まっている。当研究室ではこの種属間のエストロゲン結合性の違いを利用し、リコンビナントヒト-ラットキメラAFP分子を酵母で産生させ、ラットAFPのエストロゲン結合部位がアミノ酸配列423-506に限局していることを明らかにした。今回の研究ではラット-ヒト間の置換アミノ酸15ヶを含む領域426-467が重要であることを明らかにし、またこの15アミノ酸のどれがエストロゲン結合に直接関与しているかを明らかにした。

リコンビナントAFPの発現には酵母20B12KR16と分泌型発現プラスミド pNW033を用いた。このプラスミドにヒトならびにラットAFP cDNAを挿入し、それぞれpNWHAFPおよびpNWRAFPとした。AFPにアミノ酸残基の変異を入れるためにPCR法を用い変異cDNA断片を作製してそれらを発現プラスミドのAFP cDNAの相当する部分に制限酵素部位を利用して挿入した。22個のプライマーを用いて27のPCR実験を行い、野生型を含む22のAFP発現プラスミドを作製した。これらが目的の構造を有することを確認したのち酵母を形質転換した。培地に分泌されたAFPを精製した。酵母の培養液の上清を80%飽和硫酸アンモニウムとして塩析し、生じた沈殿を回収した。つぎにPhenyl-Sepharoseカラムを用いた疎水性クロマトグラフィーを行い、さらに抗AFPモノクロナル抗体 (MAb) AFY-6を固相化したイムノアフィニティカラムで精製した。得られたAFPの8%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。AFPの定量はおもに固相法ラジオイムノアッセイで行った。エストロゲン結合アッセイでは、固相化した抗AFPモノクロナル抗体とリコンビナントAFPを結合させ、さらに [^3H] エストロゲンとを反応させて固相に結合した放射活性を測定した。

Phenyl-Sepharoseによる疎水性クロマトグラフィーは培地中のタンパクを硫酸アンモニウムで沈殿させた後透析なしで直接カラムにかけること、また溶出物を引き続き直接イムノアフィニティクロマトグラフィーにかけることができ、目的のタンパクの回収も良好であった。22種類の野生型、及び変異型ヒト及びラットAFPを精製し、SDS-ポリアクリルアミド

電気泳動を行ったところ、いずれもがそれぞれの天然型AFPと同様の泳動パターンと移動度を持っていることが確認された。これら精製AFPのエストロゲン結合アッセイをおこなった。

野生型ヒトAFPは ^3H -エストロゲンを結合しなかったが、ヒトAFPの配列426-467間の15個のアミノ酸をラット型に置換したキメラ分子HM-Aは、加えた ^3H -エストロゲン50,000dpmのうち、15,510dpmを結合した。他の様々な置換を入れた16個のヒト変異体のうち、436A→V, 437A→S, 438T→I, 450L→R, 451L→S, 457A→L, 461I→Yの最少7残基置換の変異体HM-Jが12,898dpmを結合し、HM-Aと同等の結合活性を示した。また436, 451, 457, 461の置換を有する変異体HM-Nも弱いが有意な活性を示した。これらアミノ酸がエストロゲン結合部位を構成すると結論した。

口頭発表に際し、葛巻、石橋、本間、小林の各教授よりエストロゲン結合部位と脂肪酸結合部位との関連、AFPのエストロゲン依存性腫瘍の増殖抑制機序、結合部位の構造上の特徴、結合定数、結合の脳の性分化などに於ける生理的意義、変異体の抗原性の変化などについてご質問がありましたが、申請者は概ね妥当な返答をいたしました。また、葛巻、石橋両教授に副査としてご審査いただき合格と判定されました。

因って本研究は博士（医学）の学位授与に値すると判断いたしました。