

学位論文題名

大腸菌外膜エンドプロテアーゼ OmpT を利用した
融合タンパク質発現法による
生理活性ペプチド生産方法の開発

学位論文内容の要旨

生活環境の変化や社会環境の多様化に伴い、病気の原因が病原菌のような外因性のものから、循環器疾患や癌のような内因性のものへと移行してきている。そのため、内因性因子であるペプチドやタンパク質が治療薬として利用されるようになってきた。さらに今後も様々な生理活性ペプチドが医薬品として開発され、高齢化社会の健康医療を支えていくものと推測される。

ペプチドの大量生産には融合タンパク質発現法がよく用いられている。融合タンパク質発現法は保護ペプチドとよばれる β -ガラクトシダーゼのようなタンパク質と切断に必要とされる部位を含むリンカー配列を介して目的ペプチドを融合した形で安定的に発現させる方法である。発現された融合タンパク質から目的ペプチドを得るために保護ペプチドと切り離す際にはプロテアーゼがよく用いられる。この方法による生理活性ペプチドの生産コストのうち、融合タンパク質の切断に使用する酵素の占める割合は非常に高い。また、多くのプロテアーゼは哺乳類由来のものでありウイルス汚染あるいは狂牛病の原因因子である変性プリオンタンパク質の汚染も懸念される。そこでこの酵素切断に大腸菌由来の外膜タンパク質エンドプロテアーゼ OmpT (EC 3.4.21.87)を利用することにより、精製したプロテアーゼを反応系外から添加することなく、成熟型生理活性ペプチドを遊離して、安価で安全な生理活性ペプチド医薬品の製造が可能であると考え、本研究を始めた。

OmpT は主に連続する塩基性アミノ酸残基(アルギニンとリジン)の間を選択的に切断するプロテアーゼである。ところが2つの連続する塩基性アミノ酸残基の配列は本プロテアーゼによる切断にとって必要であるが、十分ではない。このように本酵素による切断には基質切断部位のアミノ酸配列だけでなくその周辺のアミノ酸配列も関与していることが推測される。しかし、どのようなアミノ酸配列があれば切断されるのか、その詳細は不明である。

本論文は OmpT の切断部位およびその周辺のアミノ酸残基に対する基質特異性を系統的に明らかにした。さらに OmpT をプロセッシング酵素として広範に利用するために、OmpT の Asp⁹⁷ にアミノ酸置換を導入して、PI'部位の基質特異性を変化させた変異酵素を作製し、それらの生理活性ペプチド生産への応用について検討したものであり、以下の5章から構成されている。

第1章は序論であり、本研究の背景と目的を明らかにした。

第2章では主に連続する塩基性アミノ酸残基の間のペプチド結合を切断する大腸菌 OmpT の

より正確な P1' 部位の基質特異性を 184 アミノ酸残基からなるグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 融合タンパク質 PRX を用いて系統的に見出した。GLP-1 融合タンパク質 PRX の切断部位は Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ であり、GLP-1 融合タンパク質 PRX は切断部位の P1' 部位の Arg¹⁴¹ を 19 種類のアミノ酸残基に置換した基質である。変性条件(4.0 M 尿素存在)下で OmpT は連続する塩基性アミノ酸残基の間だけでなく Arg¹⁴⁰-Asp¹⁴¹、-Glu¹⁴¹、-Pro¹⁴¹ 以外は Arg¹⁴⁰ の C 末側の部位で PRX を切断した。以上のことから OmpT により基質が切断される場合、基質の P1' 部位のアミノ酸残基をプロリンと酸性アミノ酸(アスパラギン酸とグルタミン酸)以外のアミノ酸残基で置換すると同じ部位での切断が可能であることを明らかにした。

第 3 章ではこれまでに P2 と P2' 部位以外の OmpT 切断部位周辺のアミノ酸置換の切断効率に対する影響は研究されていなかったため、184 アミノ酸残基からなる GLP-1 融合タンパク質を用いて変性条件(4.0 M 尿素存在)下で系統的に OmpT 切断部位周辺のアミノ酸残基の切断効率に対する影響を検討した。P4 と P6 部位が塩基性アミノ酸残基であれば、切断部位の切断率は高くなり、逆に酸性アミノ酸残基であれば、切断率は低くなることを明らかにした。また、合成デカペプチドを用いた反応速度論的な検討結果から、これは主に K_m 値の影響により触媒効率に変化するためであることが示唆された。さらに、P4 と P6 部位以外の部位でのアルギニン残基の切断効率に対する影響を調べた。その結果、P10 から P5' 部位までの領域において P2 および P2' 部位以外の部位をアルギニン残基で置換することにより、切断率が上昇することがわかった。また、 $\text{—アルギニン(P1)-アラニン(P1')—}$ を効率よく切断するアミノ酸配列 $\text{—アルギニン-アルギニン-アルギニン-アラニン-アルギニン(P1)-アラニン(P1')—}$ を新規に見出した。

ペプチド生産時の融合タンパク質のプロセッシングへの大腸菌 OmpT の利用はアルギニン(またはリジン)-Xaa (Xaa は目的ペプチドの塩基性でない N 末端アミノ酸残基)での切断率が低いために限定されてきた。第 4 章ではこれを解決するために OmpT の基質特異性を変化することにより、様々なペプチドを生産するためのプロセッシング酵素として利用できる、特異的で効率的な OmpT 変異酵素を創り出すことを目的として検討を行った。OmpT の Asp⁹⁷ が基質の P1' 部位のアミノ酸残基と相互作用していることが立体構造解析の結果から示唆されていた。そのため、Asp⁹⁷ を 19 種類のアミノ酸残基に置換して、それらと 184 アミノ酸残基からなる GLP-1 融合タンパク質 PRX を用いてそれらの反応性を調べ、アルギニン(P1)-Xaa (P1') で特異的に切断する OmpT 変異酵素を見出した。GLP-1 融合タンパク質 PRX の P1 部位の Arg¹⁴⁰ の C 末側に N 末端アミノ酸残基がフェニルアラニンであるヒトモチリンをモデルペプチドとして連結したモチリン融合タンパク質 PRMT を野生型 OmpT と作用させてもモチリンは遊離されなかった。しかし、Asp⁹⁷ をメチオニンに置換した変異酵素(D97M)を用いたところ、モチリンを遊離することができた。また、 $\text{—アルギニン-アルギニン-アルギニン-アラニン-アルギニン-モチリン—}$ からなるアミノ酸配列を有するモチリン融合タンパク質 PMT を変異酵素(D97M)と作用させたところ、モチリン融合タンパク質 PRMT よりもモチリンを効率よく生成し、これからモチリンを精製することに成功した。さらに、 $\text{—アスパラギン酸-アラニン-アルギニン-アルギニン-アルギニン-アラニン-アルギニン-モチリン—}$ からなるアミノ酸配列を有するモチリン融合タンパク質 PMT7D を用いると変異酵素との反応において副産物の生成を抑えることができた。OmpT の Asp⁹⁷ をロイシンとヒスチジンに置換した変異酵素はそれぞれ融合タンパク質からヒト副腎皮質刺激ホルモン(1-24)とヒトカルシトニン前駆体を生成し、OmpT 変異酵素の汎用性を示すことができた。

第5章は総括である。Asp⁹⁷を置換した OmpT 変異酵素をプロセッシング酵素として利用した融合タンパク質発現法により、従来用いられてきた野生型 OmpT の場合よりも、多くの種類の生理活性ペプチドを医薬品として安全で安価に生産できる新規なペプチド生産系を本研究結果から示すことができた。本研究で得られた成果はそのまま生理活性ペプチド医薬品の実生産に応用可能である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 下 晋 一

副 査 教 授 棟 方 正 信

副 査 教 授 清 水 達 雄

副 査 助 教 授 大 井 俊 彦

副 査 教 授 田 中 一 馬

(北海道大学大学院医学研究科)

学 位 論 文 題 名

大腸菌外膜エンドプロテアーゼ OmpT を利用した 融合タンパク質発現法による 生理活性ペプチド生産方法の開発

組換え DNA 法による生理活性ペプチド生産の多くは融合タンパク質法によるものであり、発現された融合タンパク質から目的ペプチドを得るために保護ペプチドと切り離す際には酵素的切断法がよく用いられている。生理活性ペプチドの生産コストのうち融合タンパク質の切断に使用する酵素の占める割合は非常に高く、また多くのプロテアーゼは哺乳類由来のものでありウイルス汚染あるいは近年では狂牛病の原因因子であるプリオンの汚染が懸念されている。そこでこの酵素的切断に大腸菌由来 OmpT (EC 3.4.21.87) を利用することにより、精製したプロテアーゼを反応系外から添加することなく、融合タンパク質から成熟型生理活性ペプチドを直接遊離することにより、安価に安全な生理活性ペプチド医薬品の製造が可能であると考え、本研究を始めた。本論文は OmpT の切断部位およびその周辺アミノ酸に対する基質特異性を体系的に明らかにし、さらに OmpT をプロセッシング酵素として広範に利用するために OmpT の Asp⁹⁷ にアミノ酸置換を導入することにより P1' 位基質特異性を变化させた変異体を作製し、それらの生理活性ペプチド生産への応用について検討したものであり、以下の 5 章から構成されている。

第 1 章は序論であり、本研究の背景と目的を明らかにした。

第 2 章では主に連続する塩基性アミノ酸の間のペプチド結合を切断する大腸菌 OmpT のより精確な P1' 位基質特異性をグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 融合タンパク質 PRX を用いて体系的に見出した。融合タンパク質基質 PRR の切断部位は Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ であり、融合タンパク質基質 PRX は PRR の P1' 位 Arg¹¹¹ を 19 種類のアミノ酸に置換した基質である。変性条件 (4 M 尿素存在) 下で OmpT は連続する塩基性アミノ酸の間だけでなく Arg¹⁴⁰-Asp¹⁴¹, -Glu¹⁴¹, -Pro¹⁴¹ 以外の場合において Arg¹⁴⁰ の C 末端側で PRX

を切断した。P1 位が Arg¹⁴⁰ である場合に加えて、同様の結果は P1 位が Lys¹⁴⁰ である場合にも得られた。合成ペプチド基質を OmpT と反応させたところ、P1' 位がアスパラギン酸だと切断されなかったが、それ以外の基質は切断された。OmpT は切断部位が塩基性アミノ酸対である基質により高い基質特異性を示した。以上のことから OmpT により基質が切断される場合、基質の P1' 位アミノ酸をプロリンおよび酸性アミノ酸であるアスパラギン酸、グルタミン酸以外のアミノ酸で置換しても正確に切断が可能であると結論した。

第 3 章ではこれまでに P2 および P2' 位以外の OmpT 切断部位周辺アミノ酸の切断効率に対する影響は知られていなかったため、184 アミノ酸残基からなる GLP-1 融合タンパク質を用いて変性条件 (4 M 尿素存在) 下で体系的に OmpT 切断部位周辺アミノ酸の切断効率に対する影響を検討した。P4 および P6 位が塩基性アミノ酸のアルギニンまたはリジンであれば同切断部位の切断率は高くなり、逆に酸性アミノ酸であるアスパラギン酸またはグルタミン酸であれば切断率は低くなることが明らかとなった。また、合成デカペプチドを用いた反応速度論的な検討結果からこれは主に K_m 値の影響により触媒効率が変化するためであることが示唆された。さらに、P4 および P6 位以外の部位でのアルギニンの切断効率に対する影響を調べた。その結果、P10 から P5' 位までの領域において P2 および P2' 位以外の部位をアルギニンで置換することにより切断率が上昇することがわかった。また、-アルギニン (P1)-アラニン (P1')-を効率よく特異的に切断するアミノ酸配列-アルギニン-アルギニン-アルギニン-アラニン-アルギニン (P1)-アラニン (P1')-を見出した。

ペプチド生産時の融合タンパク質プロセッシングへの大腸菌 OmpT の利用はアルギニン (またはリジン)-Xaa (Xaa は目的ペプチドの塩基性でない N 末端アミノ酸残基) での切断率が低いために限定されてきたが、第 4 章ではこれを解決するために OmpT の基質特異性を変換することにより様々なペプチドを生産するためのプロセッシング酵素として利用できる特異的かつ効率的な OmpT 変異体の検討を行った。OmpT の Asp⁹⁷ が基質の P1' 位アミノ酸残基と相互作用していることが立体構造解析の結果から示唆されていたため、Asp⁹⁷ を 19 種類のアミノ酸に置換してそれらと 184 アミノ酸残基からなる GLP-1 融合タンパク質 PRX を用いてそれらの反応性を調べることにより、アルギニン (P1)-Xaa (P1') で特異的に切断する OmpT 変異体を見出した。融合タンパク質 PRX の P1 位 Arg¹⁴⁰ の C 末端側に N 末端アミノ酸がフェニルアラニンであるヒトモチリンをモデルペプチドとして連結したモチリン融合タンパク質 PRMT を野生型 OmpT と作用させてもモチリンは遊離されなかったが Asp⁹⁷ をメチオニンに置換した変異体 D97M を用いたところモチリンを遊離することができた。これによりモチリンの遊離には変異体 D97M を用いることが必要であることがわかった。また、-アルギニン-アルギニン-アルギニン-アラニン-アルギニン-モチリンからなるリンカーペプチドを有する融合タンパク質 PMT を変異体 D97M と作用させたところモチリンを効率よく遊離することができた。さらに、OmpT の Asp⁹⁷ をロイシンおよびヒスチジンに置換した変異体はそれぞれ融合タンパク質からヒト副腎皮質刺激ホルモン (1-24) およびヒトカルシトニン前駆体を遊離するのに有用であり、OmpT 変異体の汎用性を示した。

第 5 章は総括である。Asp⁹⁷ を置換した OmpT 変異体をプロセッシング酵素として利用して融合タンパク質法により医薬品として多くの種類の生理活性ペプチドを安全かつ安価に生産できる系を本研究結果から示した。また、ここで提示した OmpT 変異体をプロセッシング酵素として利用する新規な融合タンパク質法を今後開発する生理活性ペプチド医薬品の実生産に応用していく方向性を示した。

これを要するに、著者は、大腸菌を用いた組換え DNA 技術を利用した生理活性ペプチドの生産にお

いて、高発現させた融合タンパク質の封入体を OmpT で処理して効率よく生理活性ペプチドを生産する方法を開発した。これにより生理活性ペプチド生産の研究分野において多くの新知見を得たものであり、生物工学の進歩に寄与するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。