

氏名	二見 淳一郎
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博 甲 第 1924号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Study on Human Pancreatic-type Ribonucleases and Application to the Development of Humanized Immunotoxin (ヒト膵由来型リボヌクレアーゼに関する研究とヒト化した イムノトキシンの開発への応用)
論文審査委員	教授 山田 秀徳 教授 宍戸 昌彦 教授 齋藤 清機

学位論文内容の要旨

ヒト生体内において少なくとも6種類のファミリーを持つ分泌型酵素である膵由来型リボヌクレアーゼ (RNase) は単なる消化酵素としての機能に加え、生体防御・発生・分化に関わる様々な生理機能を示す。さらに細胞内のRNAの分解が細胞毒性に結びつくことから今後医療への応用が注目されているタンパク質である。本論文では、ヒトRNaseの生理機能の解明とタンパク質工学的手法の応用の両側面から行った研究成果を以下のステップに従い報告する。(1章)では遺伝子構造が不明であったRNase1およびRNase4のcDNAの単離および解析、(2章)では5種類のヒトRNaseファミリーおよびその共通のアンタゴニストであるRNaseインヒビター(1種類)の生体組織内での遺伝子発現パターンの解明と生理学的意義の考察、(3章)ではヒトRNase1の大腸菌を用いた大量生産系の構築と酵素機能の解析、(4章)ではヒト由来タンパク質のみからなる細胞特異的増殖阻害剤(イムノトキシシン)として設計したRNase1-bFGF融合タンパク質が示す細胞増殖の阻害メカニズムについてそれぞれ報告する。さらに、本研究過程で新たに得られた知見として、大腸菌を用いた組み換えタンパク質生産におけるタンパク質の簡便かつ効率的なフォールディングに関する方策を(5章)にまとめ、今後RNaseをヒト化したイムノトキシシンに広く利用するために改善すべき点であるヒトRNase1の安定化についての成果を(6章)にまとめた。

論文審査結果の要旨

ガンの標的化学療法を目指す研究の一つにイムノトキシンの開発がある。従来のイムノトキシンは植物またはバクテリアの毒素蛋白質を標的細胞へ誘導するキャリアー蛋白質につないだものであり、毒素ドメインがヒトの蛋白質ではないので抗原性や非特異的な毒性の問題があった。膵臓から分泌される消化酵素のリボヌクレアーゼ (RNase1) には毒性はないが、RNAを分解するので潜在的な毒と考えられる。一方悪性化したガン細胞はしばしば成長因子の受容体を過剰に発現しているので、成長因子をキャリアーとしてその細胞にRNase1を積極的に誘導し、細胞内に取り込ませれば、増殖を抑えることができると考えられる。本論文は、この観点からヒトRNase1とヒト塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) からヒト化したイムノトキシンを構築した研究結果をまとめたものである。

申請者はまず、6種類の存在が確認されているヒト膵臓型RNaseのうちRNase1とRNase4のcDNAをクローニングし、それらの遺伝子構造を明らかにした。さらにRNase1～RNase5の5種類のRNase及びそれらに共通のRNaseインヒビター (1種類) のDNAプローブを調製し、種々のヒト組織におけるmRNAの発現パターンを明らかにした。その結果、どの組織もいずれかのRNase及びRNaseインヒビターを必ず発現していることを明らかにした。このことは分泌性のRNaseの潜在的毒性から身を守るために細胞は内部にRNaseインヒビターを用意していることを示唆する。申請者はついでRNase1とbFGFの融合蛋白質を調製し、それがbFGF受容体を過剰発現する培養ガン細胞の増殖を μM のレベルで特異的に阻害することを明らかにした。このことはヒトRNaseがイムノトキシンの毒素ドメインとして十分機能することを示すものである。また、申請者はこの過程で大腸菌に不活性封入体として生産させた融合蛋白質の活性構造への効率的なフォルディング法も開発した。さらに申請者はRNaseインヒビターによる阻害の回避や安定化のための分子設計を行って、イムノトキシンの毒素ドメインとしてのRNaseの機能強化にも一部成功している。

以上のように本論文には、ヒト膵臓由来型リボヌクレアーゼに関して、またそれとヒト成長因子を融合させたイムノトキシンの開発に関して重要かつ独創的な知見が数多く示されており、学術上資するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位に値するものと認める。