

学位研究紹介

組換えヒト副甲状腺ホルモンの効率的生産法の開発

Efficient production of recombinant human parathyroid hormone

サントリー医薬開発研究所

鈴木雄司

Santory Institute for Medicinal

Research and Development

Yuji Suzuki

緒言

PTH (1-34) はヒト副甲状腺ホルモン (1-84) の活性本体と考えられており, 骨芽細胞に作用してサイトカイン生産を促し破骨細胞形成から骨吸収を亢進する一方, IGF・TGF- 等の産生を促し骨形成作用をも示す。適量を間歇投与すると骨量増加が見られ, 骨折や骨粗鬆症治療薬としての期待されたため, 遺伝子組換え法による PTH (1-34) の効率的生産法開発を試みた。

方法

1) 融合蛋白質の設計と発現

ベクターにはpBR322の一部を, プロモーターには大腸菌lactose オペロン (図1 lac P/O) を, 宿主には大腸菌W3001 [ompT-] 株を用いた。保護蛋白には大腸菌 galactosidaseアミノ酸番号1-97 (G-97S), 1-117 (G-117S), 1-139 (G-139S) の3種 (CysはSerに置換) を用い, リンカーを介してPTH (1-34) と融合させた。リンカーC末端にはKex2切断配列としてPTH前駆体由来の5アミノ酸 (図1下線部) を配し, N末端にはオリゴヒスチジン (His-His-His-His-Pro-Gly) を適宜挿入した (図1)。P₃, P₄のアミノ酸置換は合成primerを用いてPCR法により行った。融合蛋白質のGly⁻⁹からGln⁺⁶を別途合成・精製し, 合成ペプチド基質とした。融合蛋白質は形質転換菌体を37 で培養し, OD₆₆₀=1.0 の時点でIPTGを1mMとなるように添加して発現を誘導, さらに4時間培養して生産された。

2) Kex2反応初速度および速度パラメーター

反応溶液は3.0M urea, 50mM Tris, 50mM NaCl, 2.0

mM CaCl₂ をベースとし, 切断初速度測定には基質濃度を0.5mMとした。酵素学的パラメーター測定時の切断率は15%以下とし, 尿素によるKex2失活の影響は別途求めた失活速度から補正した。

3) PTH (1-34) 精製方法

菌体を破砕し, 融合蛋白質を含む不溶性顆粒を回収し, 可溶化・Kex2切断反応後希釈して1.5 M urea, pH6.3とし, 保護蛋白等を沈殿させ, 圧搾濾過し, 濾過液に PTH (1-34) を回収した (酸性沈殿法)。本上清を陽イオン交換クロマト (Poros50HS・NaCl濃度勾配), 逆相 HPLC (TSK ODS 80Ts アセトニトリル濃度勾配) にて精製後, 凍結乾燥した。

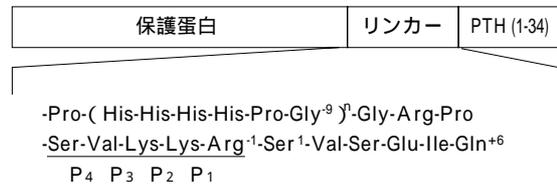


図1. 融合蛋白質模式図とその切断部位のアミノ酸配列。n はオリゴヒスチジン繰返し数, P₃, P₄ はアミノ酸置換部位, ーはKex2切断部位を示す。

結果と考察

1) 融合蛋白質生産性の改善

Kex2切断配列のみをリッカーにすると, 融合蛋白質生産性は低かったが (図2 lanes 1, 6, 13), オリゴヒスチジンを挿入することで改善され, 保護蛋白を G-117S, オリゴヒスチジンを1個挿入した場合に生産性が最大となり (図2, lane 7), Kex2反応溶液中の溶解度も0.65mM以上を示した。

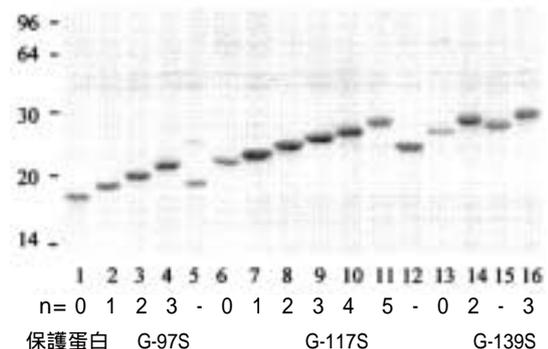


図2. SDS-PAGE 電気泳動による融合蛋白質の発現量比較。n はオリゴヒスチジン繰返し数を示す。

2) 切断部位の至適化

切断部位をKex2により切断され易くするために、P₃、P₄部位のアミノ酸置換を施した(表1)。P₃ Lys 置換体の初期切断速度はPhe, Hisで約1.4倍となった。P₄ Val置換体の初期切断速度は正電荷を持つArgで1.8倍に増加したが、負電荷を持つAspまたはGluでは切断されなくなった。

表1. アミノ酸置換による融合蛋白質切断速度の変化

Substitution at P ₃		Substitution at P ₄	
P ₄ - P ₃ Val-Xaa	Relative activity(%)	P ₄ - P ₃ Xaa-His	Relative activity(%)
Ciy	100	Ciy	6
Aia	92	Aia	45
Val	130	Val	100
Ile	79	Ile	51
Leu	128	Leu	16
Phe	141	Phe	108
Pro	0	Pro	36
Trp	126	Trp	58
		Met	95
		Cys	9
Ser	92	Ser	31
Thr	110	Thr	30
Asn	98	Asn	88
Gln	102	Gln	74
Tyr	121	Tyr	85
His	143	His	131
Lvs	100	Lvs	128
Arg	128	Arg	179
Asp	38	Asp	0
Gku	89	Gku	0

置換前の融合蛋白質切断活性を100%とした(下線)。

P₄-P₃のアミノ酸配列がVal-Lys, Val-His, Arg-Hisである融合蛋白質 F-I, F-II, F-IIIと、切断部位を模倣した合成ペプチド基質 P-I, P-II, P-III, P-IV (P₄-P₃ = Asp-His) を用いて酵素学的パラメータを求めた(表2)。両基質ともVal-Lys Arg-His置換により k_{cat} が約2倍に増加した。P₄ Val Asp置換の影響はP-IVを基質とし尿素非存在下で求められた。 k_{cat} の低下は約1/2であったが K_m が約80倍に増加しており、P₄の電荷がKex2の基質認識に大きく影響していることがわかった。ペプチドホルモンは前駆体が塩基性アミノ酸連続部位でプロホルモン変換酵素により切断されて生じる。複数のそのような部位から特定個所だけが切断される現象には、各部位の立体構造に加え、近傍のアミノ酸側鎖も関与すると思われる。 k_{cat} が最大を示したF-IIIを基質としてKex2反応条件の至適化を行った結果、0.5mM 融合蛋白質, 2.7M urea, 50mM TrisHCl pH 7.8, 2.5mM CaCl₂, 5.0 μg/ml Kex2 が適切であった。

表2. Kex2によるアミノ酸置換体切断の酵素学的パラメーター

基質	P ₄ -P ₃ アミノ酸配列	K_m	K_{cat}		K_{cat} / K_m
		(mM)	(sec ⁻¹)	(sec ⁻¹)	(mM ⁻¹ sec ⁻¹)
	urea (M)	3.0	0	3.0	0
F-	Val-Lys	120	28	0.23	
F-	Val-His	170	45	0.26	
F-	Arg-His	190	61	0.32	
P-	Val-Lys	6.3	47	110	17
P-	Val-His	6.5	25	98	15
P-	Arg-His	13	54	240	18
P-	Asp-His	500	45	0.09	

3) PTH (1-34) の精製

融合蛋白質F-IIIは不溶性顆粒として蓄積され、その生産性は約10g/L-cultureと高く、Kex2反応液の融合蛋白質純度は80%以上であった(図2A)。切断後、高分子量不純物は酸性沈殿法により大半が沈殿除去され(図2C)、PTH (1-34) は清澄な上清に回収された。融合蛋白質設計は、生産性向上同様、精製も考慮して行う必要がある。微量混在するPTH (1-34) 誘導体や保護蛋白分解物は、陽イオン交換クロマト(図2D)・逆相HPLC(図2E)によって除去され、純度 99.5%以上のPTH (1-34) を得ることができた。精製工程の回収率は約40%と高く、培養液 1 Lあたり0.8gの精製PTH (1-34) が得られる事が示された。

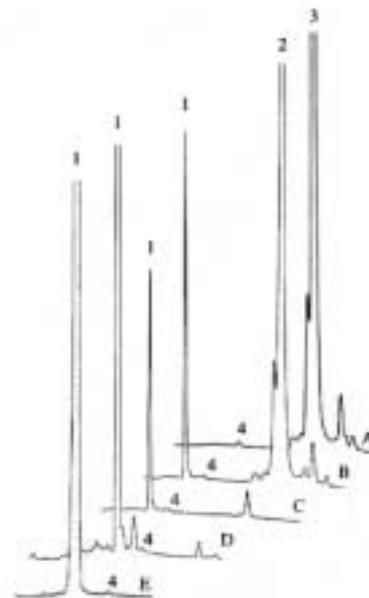


図2. 精製各工程でのPTH (1-34) の逆相HPLC分析
A: 可溶性後, B: Kex2反応後, C: 酸性沈殿上清
D: 陽イオン交換クロマト後, E: 逆相HPLC後
1: PTH (1-34), 2: 保護蛋白-リンカー, 3: 融合蛋白質

参考文献

- 1) Suzuki, Y., Yabuta, M. and Ohsuye, K. (1998) High-level production of recombinant human parathyroid hormone 1-34. Appl. Environ. Microbiol. 64, 526-529
- 2) Suzuki, Y., Ikeda, N., Kataoka, E. and Ohsuye K. (2000) Effect of amino acid substitution at the P3 and P4 subsites of fusion proteins on Kex2 protease activity. Biotechnol. Appl. Biochem. 32, 53-60