

氏名・(本籍)	きのさき まさ ひこ 木野崎 雅 彦
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	理第1142号
学位授与年月日	平成11年9月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
研究科, 専攻	平成5年3月31日 東北大学大学院理学研究科(博士課程後期3年の課程) 化学第二専攻退学
学位論文題目	欠失型肝細胞増殖因子の構造—括性相関についての研究
論文審査委員	(主査) 教授 藤井 義明 教授 清水 透, 古山 種俊

論 文 目 次

- 第1章 序論
- 第2章 dHGFのヘパリン結合および生物活性に関与するアミノ酸の同定
- 第3章 高比活性dHGF変異体の解析
- 第4章 総論

論 文 内 容 要 旨

第1章 序論

肝細胞増殖因子(HGF)は、最初成熟ラット初代肝細胞のDNA合成能を指標に肝再生中のラット血液に見出された増殖因子である。HGFは肝細胞をはじめとして様々な上皮細胞や内皮細胞肝増殖促進活性を示す。さらに構造が明らかにされると、今まで別の因子と考えられてきたスキッター因子腫瘍傷害因子(TCF)がHGFと同一分子であることが明らかとなった。このようにHGFは肝細胞増殖促進活性をはじめとし多様な生物活性を有するユニークなサイトカインである。

HGFには天然に幾つかのスプライスバリエントが存在する。欠失型HGF(dHGF)はそのうちの一つで、HGFの第1クリンクル中の連続した5アミノ酸 (FLPSS) がオルタナティブスプライシングにより欠失したものである。dHGFもHGF同様、生物学的に多機能である。しかしながらその一方で、HGFとdHGFはある細胞における感受性や溶解度などの物理化学的性質や抗原性など幾つかの点において違いがある。

HGFは分子量約80 kDaのヘパリン結合蛋白質であり、ジスルフィド結合したヘテロダイマー構造をとり、分子量52 kDa-56 kDaの α 鎖と、分子量30 kDa-34 kDaの β 鎖からなる。cDNAより推定されたアミノ酸配列を基にした構造解析により、HGFは大きく6つの領域からなることが予想された。すなわち α 鎖中の、アミノ末端塩基性領域とヘアピンループ構造を含んだアミノ末端領域と4つのクリンクル領域、それと β 鎖中のセリンプロテアーゼ様領域である。HGFの構造と機能の相関を調べるため、多くの変異体が作ら

れ解析されてきた。その結果、HGFとヘパリンとの結合に関してアミノ末端塩基性領域、ヘアピンループ構造あるいは第2クリングル領域が、生物活性発現にはアミノ末端領域と第1クリングルが重要であることが示された。最近これらの知見を基にしてHGFのアミノ末端領域と第1クリングル領域に計画的に一連の点変異を導入した研究が行われ、*in vitro*肝細胞増殖促進活性に必須なアミノ酸残基が同定された。

幾つかの研究が行われてきたにもかかわらず、HGFおよびdHGFのヘパリン結合に関与する残基を同定するためのシステマティックな研究はなされていなかった。さらにはdHGFに関しては、構造活性相関を調べるための研究は行われていない。そこでこれらの知見を得るため、dHGFにシステマティックに変異を導入し、その変異体のヘパリン結合性および生物活性について解析を行った。その結果、dHGFのヘパリン結合に関与する残基および生物活性に関与する残基を同定した。さらにはその過程で*in vitro*生物活性が3倍程度高い変異体を見つけ出した。この変異体は*in vivo*においても高い生物活性を示すことが明らかになった。

第2章 dHGFのヘパリン結合および生物活性に関与するアミノ酸残基の同定

dHGFのヘパリン結合部位を特定するために、アミノ末端領域と第1クリングル領域についてアラニンスキャニング解析を行った。ヘパリン結合に関与していると考えられるアミノ末端領域と第1クリングル領域に存在する全ての塩基性アミノ酸残基に置換を導入して解析した結果、アミノ末端領域の配列²RKRR、²⁷KIKTKKあるいは⁴²Rに変異を導入した変異体はdHGFよりも低い塩濃度で溶出されてきた。またさらに⁴⁵Rあるいは⁴⁷Kに変異を導入した変異体もわずかながらヘパリン結合能が低下していた。これらの結果より、²RKRR、²⁷KIKTKKおよび⁴²Rの配列がdHGFのヘパリンに対する結合に重要であることが示された。

これらの配列(ヘパリン結合ストレッチ)に考えられる全ての組み合わせで変異を導入したところ複数のストレッチに変異を持つ4つの変異体とも1ヶ所のストレッチのみに変異を持つ変異体に比べヘパリン結合能が低下していた。さらにこの4つの変異体のうち、3ヶ所全てのストレッチに変異を持つ変異体が最も低い相対ヘパリン結合能であった。またこれらストレッチにアラニン点変異を導入して解析したところ、²RKRR、および²⁷KIKTKKとも4つの塩基性アミノ酸残基中3残基がヘパリンへの結合に関与していることが明らかとなった。さらには、このヘパリンへの結合に関与しているアミノ酸を2残基アラニンに置換した変異体のヘパリン結合能の低下は相加的であった。これらの結果より、特定の幾つかのアミノ酸残基が相加的にヘパリン結合に関与していることが示唆された。また、アミノ末端領域に存在する10残基の極性を持つアミノ酸それぞれをリジンに置換した変異体を構築し、ヘパリン結合能を解析したところ、3種の変異体は相対ヘパリン結合能がそれぞれ上昇していた。これらのアミノ酸残基は³⁹C-⁶⁵Cのジスルフィド結合の近くに存在することから、これらの近傍にヘパリン結合サイトが存在すると考えられる。

同様にアミノ末端領域と第1クリングル領域についてアラニンスキャニング解析を行い生物活性発現に必須な残基の同定を試みた。その結果アミノ末端領域の⁵⁹DKARKと⁸⁹ENKDに変異を導入した変異体と第1クリングル領域の¹²⁷HEHと¹⁵⁹EVRYEに変異を導入した変異体は生物活性を失っていた。さらにこれらの配列にアラニン点変異を導入して解析したところ、アミノ末端領域の配列に変異を導入した変異体はいずれも活性を保持していたが、第1クリングル中の¹²⁸Eと¹⁶¹Rを置換した変異体は生物活性を失っており、このアミノ酸が生物活性発現に必須であることが示された。

第3章 高比活性dHGF変異体の解析

アラニンスキャニング解析の結果、生物活性が2倍以上あった変異体を精製して生物活性を精査したところ、アミノ末端領域に変異を持つ2種の変異体(#2と#27)の肝細胞増殖促進活性はdHGFと比べて最大

活性では変わらないものの比活性が約3倍高かった。さらにこれら変異体は腎上皮細胞であるOK細胞に対する増殖促進活性がdHGFに対して比活性1.5-3倍と高く、一方マウス前骨髄細胞であるNFS-60に対しては比活性1/3-1/8と低くなっていた。これら変異体は、dHGFに比べて酸性付近での安定性や熱安定性がdHGFと比べてやや劣るものの、予期しなかったような構造変化や、プロテアーゼによる切断は受けていなかった。

2種の変異体のうち1種(#2)の*in vivo*での作用を調べるため、精製品を正常ラットに投与して、その肝重量および肝機能の指標となるパラメーターの変化を調べた。その結果、#2はdHGFと比べて肝臓でのタンパク質合成能を反映する血中総タンパク質量やアルブミン量といったパラメータおよび肝臓での脂質代謝能を反映する遊離コレステロール量やHDL-コレステロール量といったパラメーターがdHGFに比べて有意に増加しており、平行性検定で解析した結果、その比活性は約1.5倍程度またはそれ以上高かった。また肝重量を増加させる作用もdHGFに比べて明らかに強かった。さらに、塩化第2水銀投与によって引き起こされる腎不全死に対する防御効果を指標として腎臓に対する作用を調べた。その結果#2はdHGFと比べて少ない投与量で同様の防御効果を示し、その効果は約2倍強いことが示された。

#2の組織分布を経時的に調べたところ、血中や腎臓中には投与後5分ではdHGFより移行しにくい傾向があったが、その後はdHGFより消失されにくく60分後にはdHGFより高い濃度残っていた。また肝臓には投与後5分ですでにdHGFより高い濃度存在して、その後投与後60分までdHGFより高い濃度残存していた。

第4章 総論

本研究の結果を考察して以下にまとめた。

- 1) dHGFのヘパリン結合に関与するアミノ酸残基を同定した。それら残基のヘパリンへの結合に対する関与は相加的である。dHGFは少なくとも9残基の1次配列上はなれた塩基性アミノ酸がフォールディングすることによりクラスターを作りヘパリンとの結合に関与しており、そのサイトはヘアピン構造中に存在する2つのジスルフィド結合付近に存在する。また今回同定されたアミノ酸残基は恐らくHGFでもヘパリン結合に関与していると考えられる。
- 2) dHGFの生物活性発現に必要な残基を同定した。今回同定されたアミノ酸は第1クリングル領域にあり、先にHGFで生物活性発現およびレセプターへの結合に必要な残基として同定されていたものと同じであった。しかしながらHGFで活性発現に必要な残基として同定されていた他の残基に変異を導入しても生物活性を保持していたことから、HGFとdHGFでは活性発現に関与している残基が異なることが示唆された。
- 3) *in vitro*および*in vivo*ともに比活性の高い変異体を見出した。この変異体はdHGFより*in vitro*で肝細胞、腎上皮細胞に対する強い増殖促進活性を示し、さらには*in vivo*でもより強い肝機能亢進作用、腎不全防御作用を示した。この変異体は肝臓への移行が早く、血中、腎臓、肝臓での消失が遅かった。この性質と*in vitro*の強い増殖促進作用によって*in vivo*でも高い生物活性を示したものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

肝細胞増殖因子(HGF)は、肝細胞をはじめとして種々の細胞に対する増殖促進活性、スキャッター活性、抗腫瘍活性など多様な生物活性を有する調節因子である。HGFには天然に幾つかのスプライスバリエントが存在し、その中、欠失型HGF(dHGF)は5個の連続したアミノ酸が欠失したものである。dHGFもHGFと同様に生物学的に多機能であるが、幾つかの点において違いが報告されている。生物作用を示すためには、HGFやdHGFは先ず細胞表層にあるヘパリンに結合し、それから、その受容体に結合すると考えられている。

dHGFの構造活性相関を調べるために、dHGFのアミノ酸配列に組織的に変異を導入し、その変異体のヘパリン結合性および細胞の増殖活性について解析を行い、以下のことを明らかにした。

- 1) 少なくとも9残基の塩基性アミノ酸がフォールディングによりクラスターを作ることによりヘパリン結合サイトを形成し、ヘパリンに結合する。そのサイトはヘアピン構造中に存在する2つのジスルフィド結合付近に存在する。また同定されたアミノ酸残基はHGFでもヘパリン結合に関与していると考えられた。
- 2) アミノ酸の変異により、dHGFの生物活性に必須なアミノ酸は、HGFと必ずしも同じではないことが明らかになった。すなわち、HGFで活性発現に必須な残基として同定されていた残基に変異を導入しても、dHGFは生物活性を保持していることが分かった。
- 3) ヘパリン結合性の低下した変異体で、*in vitro*および*in vivo*ともに高い生物活性を示す変異体が見い出された。この変異体は、dHGFより*in vitro*で培養肝細胞、腎上皮細胞に対して強い増殖促進活性を示し、さらには個体レベルでもより強い肝機能亢進作用、腎不全防御作用を示した。この変異体は肝臓への移行が早く、血中、腎臓、肝臓での消失が遅い性質を持っており、実用的な有用性を示していた。以上の結果は、本論文の著者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有していることを示している。したがって、木野崎雅彦提出の論文は、博士(理学)の学位論文として合格と認める。