

ヒト BSF-2/IL-6 の遺伝子工学的生産

保	川	清
浅	越	弘
斎	藤	義
丸	尾	貴
三	宅	直
		俊
		子
		男

Production of Human B Cell Stimulatory Factor-2 (BSF-2/IL-6) Using a Genetic Engineering Technique

Kiyoshi YASUKAWA
Yoshihiro ASAGOE
Takashi SAITO
Naoko MARUO
Toshio MIYAKE

Human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) is one of the cytokines which has an important role in the regulation of growth and the differentiation of various types of cells. Recently, it has been reported that there is a relationship between its aberrant behavior and certain diseases. Beginning with the previously isolated cDNA clone encoding human BSF-2, we constructed two types of plasmids, from which the peptides containing BSF-2 were produced in *Escherichia coli* as human growth hormone (hGH) fusion proteins. This product was solubilized and cleaved using factor Xa, a specific endopeptidase, in order to liberate Glu-Phe-Met-BSF-2 or Ala-BSF-2. The liberated BSF-2 was then purified to homogeneity. These two recombinant products were indistinguishable from natural BSF-2 by B cell stimulatory activity.

1. はじめに

タンパク質は、遺伝暗号に基づいて生体内で作られ、生物現象を担う物質であるが、インシュリンのように医薬品としても位置づけられる。

従来から、抗腫瘍性等をもつような魅力的なタンパク質の存在が多々報告されてきたが、その大部分は、動物実験を経て医薬品として開発するレベル（グラム単位）の生産はおろか、正体（アミノ酸配列）を知るために必要なレベル（ミリグラム単位）の単離精製すら困難であった。しかし、遺伝子工学という新技術の普及により、微量なタンパク質の大量生産が可能となり、1980年には、

この分野の最先端を行く物質であるインターフェロンが「夢の新薬」として華々しく取り上げられた。そして現在、インターフェロン β は医薬品として認可されている。

インターフェロンのあとを追うように、生理活性をもつ微量タンパク質（サイトカイン）の研究が進められた。IL（インターロイキン）-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, BSF-2 (IL-6), TNF, M-CSF, GM-CSF, G-CSF, エリスロポイエチン等である。

遺伝子工学的な大量生産をおこなうためには、目的タンパク質の遺伝子が単離（クローニング）されなければならない。この分野のターゲットになるようなタンパク

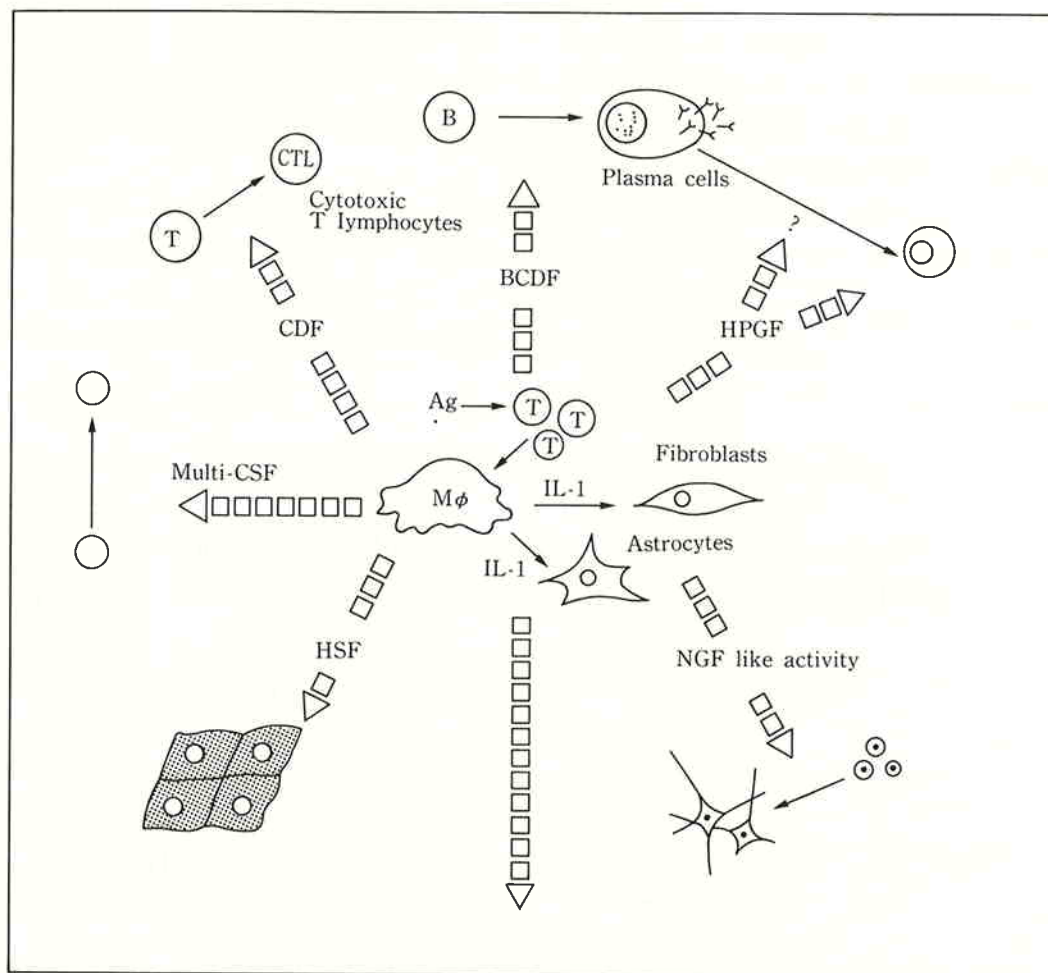


Fig. 1 Functions of BSF-2.

質の発見から単離精製，遺伝子の単離に至る一連の研究は大学等の研究機関でおこなわれ，遺伝子工学的な大量生産から企業が参加するのが一般的である。前者は多くの研究者の地道な基礎研究（インターフェロンで20年，BSF-2で15年）を要し，遺伝子の単離に至らず夢幻で終わるケースが大部分である。一方，後者は企業間の競争を生み出す。

しかし，微量で見事な生物活性を示すサイトカイン類は，有効な治療法の少ない慢性疾患の新薬としてやはり魅力的である。特に BSF-2 は，他のサイトカイン類と異なるユニークな活性が報告されつつある¹⁾²⁾ (Fig. 1)。

我々は，大阪大学細胞工学センター岸本教授より BSF-2 の遺伝子 (cDNA) を入手し，遺伝子工学的な生産に成功した³⁾⁴⁾。その過程を報告する。

2. BSF-2 の発見から遺伝子単離まで

著者（保川）は，昭和59年9月から昭和62年9月までの3年間，大阪大学で岸本教授，平野助教授の指導のもとで，BSF-2 に関する一連の仕事をおこなった⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾。なかでも，1年半の歳月を要した BSF-2 の遺伝子単離

が印象に残る。当時は，インターフェロンに続き，IL-1, IL-2 の遺伝子が単離され，脚光をあびた。さらに，BSF-2 の遺伝子単離が難航するなかで，前述のサイトカイン類の遺伝子単離が次々と報告された。BSF-2 の遺伝子もすでに単離されているかもしれないという不安の中，昭和61年6月，ついに遺伝子が単離され，その構造が決定された⁶⁾ (Fig. 2)。以下に，遺伝子単離の過程について説明する。

T細胞株 Na1 の培養上清 200 μ l より，種々のクロマトグラフィーを使用して，約 20 μ g の BSF-2 を均一タンパク質として精製した。これをリシルエンドペプチターゼで分解して，得られた各フラグメントの部分的アミノ酸配列を決定した。これに基づいて合成した17塩基よりなる DNA プローブを使用して，Na1 より作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ，BSF-2 の cDNA を有するクローンが単離された。

3. BSF-2 発現プラスミドの作成

我々は，単離された BSF-2 遺伝子入手して，大腸菌による BSF-2 の生産に着手した。



Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino-acid sequence of the BSF-2 cDNA.

そのために、3種類のBSF-2発現プラスミド(pTAB-1, pGBS-1, pGBS-3, Fig. 3)を作成した。以下に、各プラスミドの特徴、及び作成手順を説明する。

(1) pTAB-1

pTAB-1は、BSF-2の直接発現を目的として作成されたプラスミドである。大腸菌発現ベクターpKK223-3(ファルマシア)のtacプロモーターの下流に、開始コドンATG、及び、シグナルペプチドが除去された成熟型BSF-2をコードする塩基配列が挿入されている(Fig. 3(a))。

pTAB-1の作成法は、Fig. 4に示した。まず、pBSF2.38(Fig. 2)の、塩基番号31のAlu I サイトとベクター由来のBamH I サイトを切断し、生じた約1000 bpのAlu I-BamH I断片を、pGEM4(プロメガ)のSma I, BamH I サイトに挿入して、pBSF2.38-1を作成した。次に、pBSF2.38-1の、塩基番号127のEcoR II サイトと、Hind IIIサイトを切断し、生じた約1000 bpのEcoR II-BamH I断片を、合成オリゴヌクレオチド(配列はFig. 3(a)を参照)とともに、pKK223-3のEcoR I, Hind IIIサイトに挿入して、pTAB-1を作成した。

(2) pGBS-1

pGBS-1は、BSF-2をhGH(ヒト成長ホルモン)との融合タンパク質として発現することを目的として作成されたプラスミドである。発現された融合タンパク質(hGH-BSF-2)は、配列特異的エンドペプチターゼであるfactor Xaにより、hGH由来のポリペプチドとGlu-Phe-Met-BSF-2(成熟型BSF-2のN末端にGlu-Phe-Met-が付加されている。)に分離されるようにデザインされている。pGBS-1は、trpプロモーターの下流に、開始コドンATG、及び、hGHポリペプチド、factor Xa認識配列(Ile-Glu-Gly-Arg), Glu-Phe-Met-BSF-2をコードする塩基配列が続く(Fig. 3(b))。

pGBS-1の作成法は、Fig. 5に示した。まず、pTAB-1のEcoR I サイトとSal I サイトを切断し、生じた約1000 bpのEcoR I-Sal I断片を、合成オリゴヌクレオチド(配列はFig. 3(b)参照)とともに、pUC9のBamH I, Sal Iサイトに挿入して、pUBS-1を作成した。次に、pUBS-1のBamH Iサイトを切断し、生じた約1000 bpのBamH I断片を、pGH-L9⁹⁾(大腸菌でのhGH発現プラスミド)のBgl IIサイトに挿入して、pGBS-1を作成した。

(3) pGBS-3

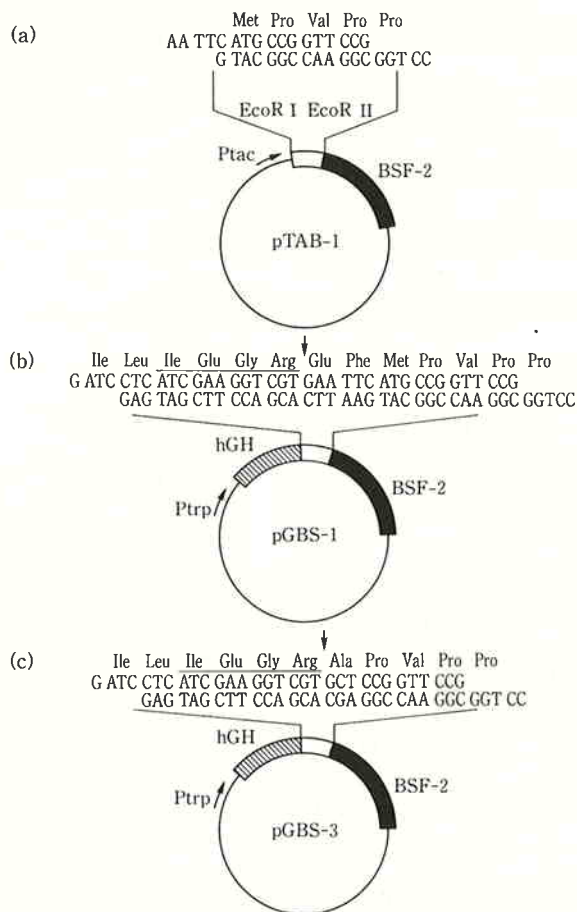


Fig. 3 Structure of plasmid (a) pTAB-1, (b) pGBS-1, (c) pGBS-3. The hatched box stands for the EcoR II-BamH I fragment of pBSF2.38 containing BSF-2 cDNA. The open box stands for the region derived from synthesized oligonucleotides. The sequence of these regions was described. The arrow indicates the cleavage site of the factor Xa, and the underline shows the factor Xa recognition site. The shaded box stands for the gene derived from hGH cDNA.

pGBS-3 は、pGBS-1 と同様に、BSF-2 を hGH との融合タンパク質として発現するように作成されたプラスミドである。pGBS-3 と pGBS-1 の異なる点は、factor Xa 処理後、pGBS-1 由来の融合タンパク質からは Glu-Phe-Met-BSF-2 が分離されるが、pGBS-3 由来の融合タンパク質からは Ala-BSF-2 が分離される (Fig. 3(c)) ことである。

pGBS-3 の作成法を以下に示す。pUBS-1 の BamH I サイトを切断し、生じた約 1000 bp の BamH I 断片を、M13mp8RF の BamH I サイトに挿入した。

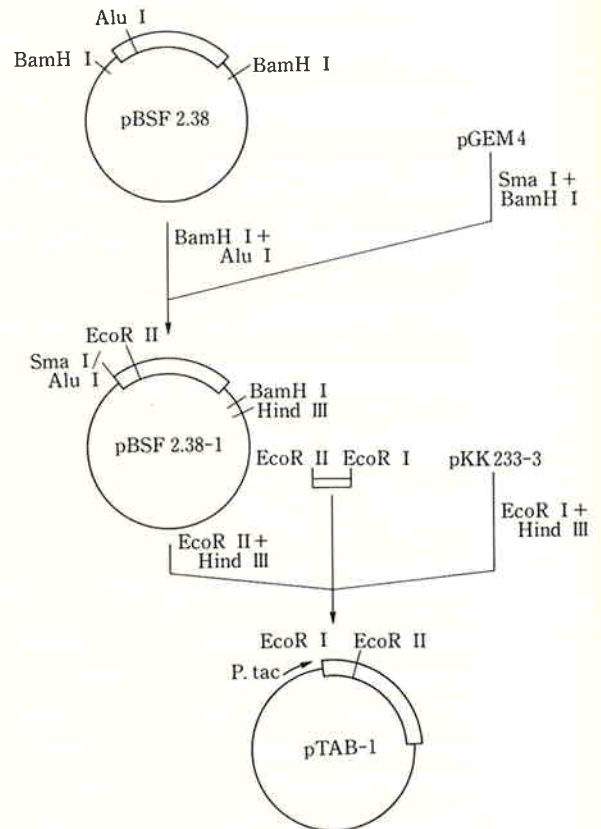


Fig. 4 Scheme for constructing pTAB-1.

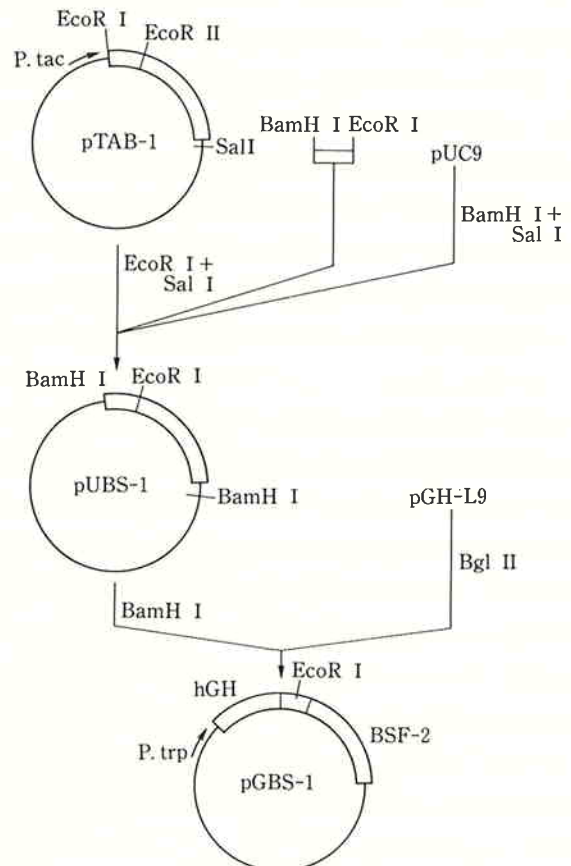


Fig. 5 Scheme for constructing pGBS-1.

このように作成した組み換え体ファージから1本鎖DNAを調製し、合成オリゴヌクレオチド (5'GAAG-GTCGTGCTCCGGTCCG 3') を用いて、GAATTCATG という塩基配列が GCT に変換されたファージを作成した。このファージの RF-DNA の BamH I サイトを切断し、生じた BamH I 断片を、pGH-L9 の BglII サイトに挿入して、pGBS-3 を作成した。

4. BSF-2 の発現

我々は、作成したプラスミドを大腸菌に導入し、大腸菌内での BSF-2 発現の有無を調べた。

その結果、pTAB-1 で形質転換された大腸菌からは、BSF-2 は発現されなかった。一方、pGBS-1 あるいは pGBS-3 で形質転換された大腸菌からは、hGH-BSF-2 融合タンパク質が発現された。

(1) pTAB-1

pTAB-1 で形質転換された大腸菌株、RB791, W3110, KY1436 をそれぞれ培養し、IPTG (イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド) で刺激した。しかし、SDS-PAGE においても、活性測定法においても、BSF-2 発現は検出されなかった。

そこで我々は、pTAB-1 から、SD 配列を変化させたプラスミド、cDNA の非翻訳領域を削除したプラスミド、他のプロモーターを使用したプラスミドをそれぞれ作成して、大腸菌に導入したが、BSF-2 発現は検出されなかった。

種々のヒトタンパク質の大腸菌での直接発現が報告されているのに、BSF-2 の直接発現が困難な理由として、発現された BSF-2 が大腸菌に毒性をもつこと、大腸菌由来のプラテアーゼで消化されること等が考えられる。

(2) pGBS-1, pGBS-3

pGBS-1 あるいは pGBS-3 で形質転換された各種大腸菌株をそれぞれ培養し、種々の条件での BSF-2 発現量を検討した。その結果、形質転換された RB791 を LB-Amp 培地で培養し、600 nm の吸収が0.4に達した時、100 μg/ml になるように IAA (インドールアクリル酸) を加え、4時間後に大腸菌を集めた。

pGH-L9 (hGH 発現プラスミド) で形質転換された RB791 を同条件で発現させると、SDS-PAGE で hGH の 22 kD のバンドが観察される (Fig. 6, レーン2)。一方、pGBS-1 あるいは pGBS-3 で形質転換された RB791 では、36 kD のバンドが観察され、これは hGH-BSF-2 の予想される分子量に相当する (Fig. 6, レーン3)。このバンドが hGH-BSF-2 であることは、

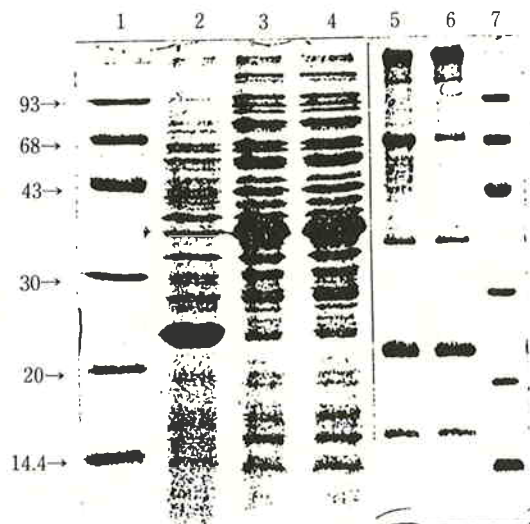


Fig. 6 SDS-PAGE analysis under reducing condition of the *E. coli* pellet proteins. Mw(kD) of standards are shown to the left. lanes 1, 7: marker. lanes 2-4: total proteins obtained from the *E. coli*, RB791 transformed with 2) pGH-L9, 3) pGBS-1, 4) pGBS-3. lanes 5, 6: factor Xa-treated extract obtained from the RB791 containing 5) pGBS-1, 6) pGBS-3.

抗 hGH 血清を用いたウエスタンブロット解析でも確認された。

5. BSF-2 の精製

大腸菌で発現された hGH-BSF-2 は不溶体として存在するため、可溶化して、さらに factor Xa で切断される形に、そして生物活性を有する形にリフォールディングこれなければならない。

我々は種々の条件を検討した結果、hGH-BSF-2 を尿素で可溶化後、透析で尿素を除いてリフォールディングしてから factor Xa で切断した。処理物は塩酸グアニジンで変性後、ゲルろ過により BSF-2 画分を集め、透析で塩酸グアニジンを除くと、生物活性を有する形にリフォールディングされた。さらにイオン交換クロマトグラフィーで精製した。

このようにして、我々は、1ℓ の培養液から約 5 mg の Glu-Phe-Met-BSF-2 あるいは Ala-BSF-2 を精製した。B細胞への抗体産生誘導を指標とした活性測定法では、我々の製造した BSF-2 は、天然から抽出した BSF-2 と同等の活性 (5×10^6 ユニット/mg) を示した。

以下に、BSF-2 精製の際の、可溶化の条件、factor Xa 処理条件、カラムクロマトの条件、及び、BSF-2 の活性測定法を説明する。

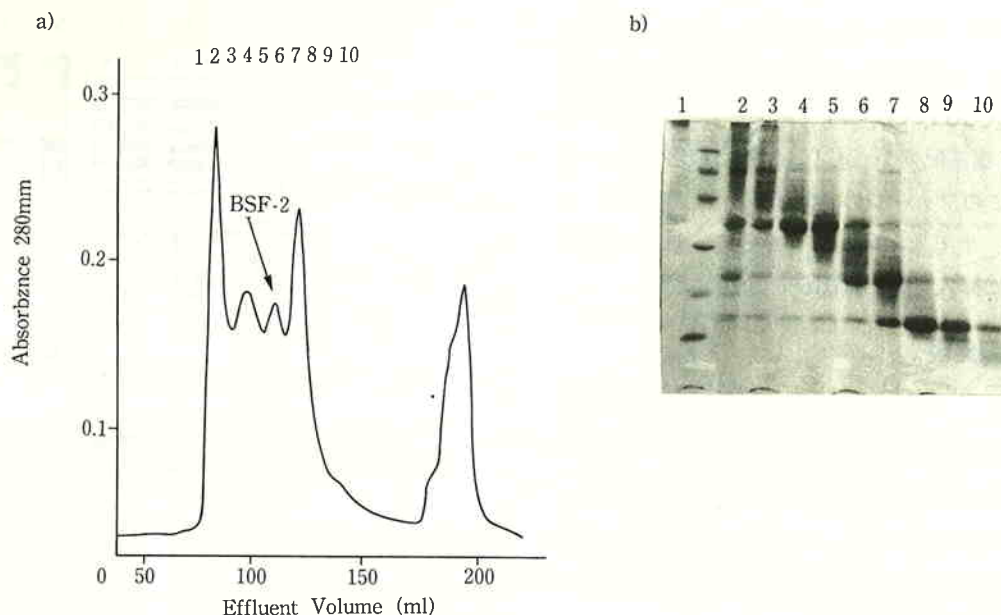


Fig. 7 (a) Gel filtration HPLC elution pattern of guanidine-denatured total extracts derived from pGBS-3 after factor Xa cleavage. (b) SDS-PAGE analysis of each fraction of gel filtration chromatography. The lane number means the fraction number.

〔1〕 可溶化

hGH-BSF-2 融合タンパク質を発現した菌体を集め、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で懸濁し、超音波処理で破碎した。これを遠心分離して集めた沈澱を、50 mM Gly-NaOH (pH 9.0), 8 M 尿素に溶解し、60°C で1時間保温した。このようにして可溶化された抽出物を、室温で、初めに 1 M 尿素, 50 mM Gly-NaOH (pH 9.0), 2 mM GSH, 0.2 mM GSSG, 1 mM EDTA に対して透析をし、次に 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) に対して透析をした。

〔2〕 factor Xa 処理

このようにリフォールディングされた融合タンパク質に、50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ 存在下で、融合タンパク質 50 mg あたり10単位の factor Xa (ベーリンガー製) を加え、37°C で1昼夜反応を行った。処理物を SDS-PAGE にかけて、約80%の融合タンパク質 (38 kD) が、hGH ポリペプチド (16 kD) と Glu-Phe-Met-BSF-2 あるいは Ala-BSF-2 (22 kD) に切断されていることが観察された (Fig. 6, レーン5, 6)。

〔3〕 カラムクロマトグラフィー

factor X の処理をした反応物に硫酸を加え、80%飽和で硫酸塩析を行った。これを遠心分離して集めた沈澱を、50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 2 mM DTT, 6 M Gu-HCl, 0.1 M NaCl に溶解した。このサンプルを同じ

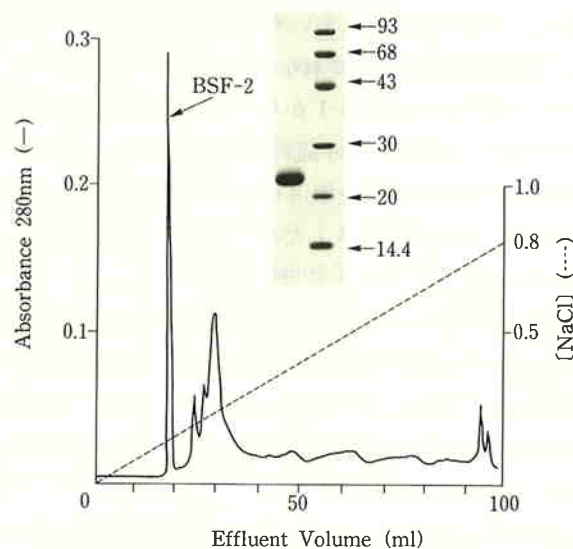


Fig. 8 Anion exchange HPLC elution pattern of purified Ala-BSF-2 synthesized in recombinant RB791, and SDS-PAGE pattern of the peak fraction.

グアニジン溶液で平衡化された TSK-G3000SW カラム (25 mm×600 mm) にかけて。溶出パターン及び各フラクションの SDS-PAGE のパターンは、Fig. 7 に示した。主に BSF-2 を含むフラクション6を、初めに 1 M Gu-HCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA に対して透析をし、次に 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) に対して透析をした。

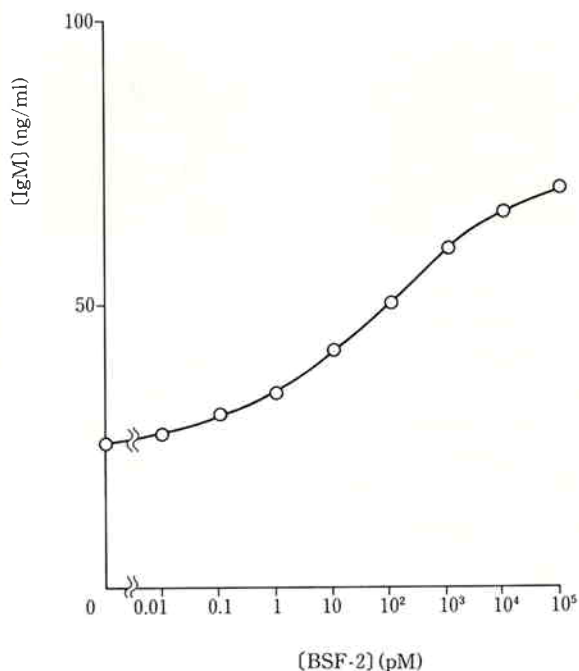


Fig. 9 Induction of IgM production by the recombinant Ala-BSF-2.

このサンプルを、10 mM Tris-HCl (pH 8.5) で平衡化された TSK・DEAE-5PW カラム (25 mm×200 mm) にかけて、0 M から 0.8 M まで NaCl の直線勾配をかけた。その溶出パターン及びピークの SDS-PAGE のパターンを Fig. 8 に示した。

〔4〕 活性測定

ヒトB細胞株 SKW-CL4, 1×10^4 を、一定濃度のサンプルを加えた 200 μ l の RPMI1640, 10% FCS 中で3日間培養した。上清中の IgM 濃度を ELISA で測定し、BSF-2 濃度を求めた⁵⁾。

我々の精製した Ala-BSF-2 の活性測定の結果を Fig. 9 に示した。

6. おわりに

BSF-2 は、生体で重要な役割を担っているだけでなく、その過剰産生は種々の免疫疾患の病因であるとも考えられつつある⁷⁾¹⁰⁾。したがって、BSF-2 の阻害剤もま

た、医薬品として魅力的である。

我々が遺伝子工学的に生産した BSF-2 は、それ自身の開発のみならず、BSF-2 様の活性を有する物質の開発、あるいは BSF-2 阻害剤の開発にも大いに役だつと考えられる。

最後に、BSF-2 遺伝子を分与していただき、御指導していただいた大阪大学・岸本忠三先生、平野俊夫先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Kishimoto, T. and Hirono, T.; *Ann. Rev. Immunol.*, **6**, 485 (1988)
- 2) 丸尾直子, 宮田堅司, 保川 清, 福永 剛, 三谷満昭; “日本薬学会, 第108年会講演要旨集”, 423 (1988)
- 3) Asagoe, Y., Yasukawa, K., Saito, T., Maruo, N. et al.; Bio/Technology submitted
- 4) 浅越義弘, 斎藤貴司, 保川 清, 丸尾直子, 三宅俊男, 三谷満昭; “日本農芸化学”, **62**, 63 (1988)
- 5) Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K. and Kishimoto, T. et al.; *Proc. natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 5490 (1985)
- 6) Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T. and Kishimoto, T. et al.; *Nature*, **324**, 73 (1986)
- 7) Hirano, T., Taga, T., Yasukawa, K., Nakajima, K. and Kishimoto, T. et al.; *Proc. natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 228 (1987)
- 8) Yasukawa, K., Hirano, T., Watanabe, Y., Muratani, T. and Kishimoto, T. et al.; *EMBO J.*, **6**, 2939 (1987)
- 9) Ikehara, M., Otsuka, E., Tokunaga, T. et al.; *Proc. natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 5956 (1984)
- 10) Kawano, M., Hirono, T., Matsuda, T., Taga, T. and Kishimoto, T. et al.; *Nature*, **332**, 83 (1988)

(著者については次頁)



著者
 氏名 保川 清
 Kiyoshi YASUKAWA
 入社 昭和59年4月2日
 所属 研究本部
 生物工学研究所
 第4研究室



著者
 氏名 浅越 義弘
 Yoshihiro ASAGOE
 入社 昭和62年4月1日
 所属 研究本部
 生物工学研究所
 第2研究室



著者
 氏名 齋藤 貴司
 Takashi SAITO
 入社 昭和62年4月1日
 所属 研究本部
 生物工学研究所
 第4研究室



著者
 氏名 丸尾 直子
 Naoko NARUO
 入社 昭和61年4月1日
 所属 研究本部
 生物工学研究所
 第4研究室



著者
 氏名 三宅 俊男
 Toshio MIYAKE
 入社 昭和56年4月1日
 所属 研究本部
 生物工学研究所
 第1研究室