

特別講演

動物胚の受胎率向上を目指した遺伝子組換え FGF4 の開発

秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科 動物分子工学研究室 小林 正之

胎盤は胚の一部として形成され、妊娠を維持する上で必須な臓器である。マウスを用いた基礎研究により、線維芽細胞増殖因子 4 (FGF4) は初期胚を構成する内部細胞塊で発現すること、FGF 受容体 2 (FGFR2) を介してパラクライン的に極栄養外胚葉 (胎盤前駆細胞) に作用し、極栄養外胚葉の細胞増殖と細胞機能の完成に必要な不可欠であることが示された (Feldman ら, Science 1995; Arman ら, PNAS 1998; Tanaka ら, Science 1998)。すなわち、FGF4 は子宮への胚着床や胎盤形成に対して根源的に重要な細胞増殖因子であることが証明されている。本研究室では、FGF4 はマウスのみならず、他の動物種の胚着床や胎盤形成にも深く関与するのではないかと予測している。これらの発生生物学的知見と予測に基づき、FGF4 感作を介して動物胚に含まれる胎盤細胞を刺激し、胚の受胎を確実にする技術体系を着想するに至った。しかし、生体に含まれる FGF4 タンパク質はごく微量であり、基礎研究や産業に応用することは全く不可能であった。

そこで遺伝子工学的手法により FGF4 を大量生産するために、従来から共同研究をすすめてきた秋田県畜産試験場 (秋田畜試) にご協力いただき、情報として正確度が低いと判断したウシ・ブタ *FGF4* 遺伝子塩基配列の再解析から着手した (Sato ら, Anim Sci J 2012; Sugawara ら, Biosci Biotech Biochem 2013)。得られた塩基配列情報に基づき、ウシ (Sugawara ら, Anim Sci J 2013; Sugawara ら, Biotech Appl Biochem 2014) ・ブタ (Sugawara ら, Biosci Biotech Biochem 2013; Sugawara ら, Biotech Appl Biochem 2014; 菅原ら, 東畜会報 2014) に加えて、マウス (Hosoi ら, J Reprod Dev 2011; Sugawara ら, J Biosci Bioeng 2014) ・ヒト (Sugawara ら, Appl Biochem Biotech 2014) に由来する FGF4 タンパク質の大量生産技術を確立した。本講演では、大腸菌発現・遺伝子組換えウシ FGF4 の開発について紹介したい。

1. 黒毛和種牛・日本短角種牛・ホルスタイン種牛において共通し、しかも新規な塩基配列を示すウシ *FGF4* 遺伝子の発見

遺伝子組換えウシ FGF4 の開発に先立ち、出発材料となるウシ *FGF4* 遺伝子の塩基配列を検証した。黒毛和種牛 (3 頭)、日本短角種牛 (2 頭)、ホルスタイン種牛 (3 頭) から得たゲノム DNA を用いて、FGF4 タンパク質コード領域の全塩基配列を決定した。その結果、これら黒毛和種牛・日本短角種牛・ホルスタイン種牛の *FGF4* 塩基配列およびコードされるタンパク質の一次構造 (推定) は完全に一致した。既に報告されているウシ *FGF4* 塩基配列 (Yu ら, Gene 1995, GenBank accession no. U15969, 品種不明) と比較した場合、U15969 にはアミノ酸置換 (2 カ所)、アミノ酸挿入 (1 カ所)、アミノ酸欠失 (1 カ所) を導く塩基配列の変異を見出した。以上の結果は、黒毛和種牛・日本短角種牛・ホルスタイン種牛において共通し、しかも新規な塩基配列を示すウシ *FGF4* 遺伝子が広く分布している

ことを示唆する (Sato ら, Anim Sci J 2012)。

2. 生物活性を保持する大腸菌発現・遺伝子組換えウシ FGF4 タンパク質の開発

本研究室と秋田畜試が明らかにした塩基配列情報に基づき、分泌シグナルペプチドを除去し、His タグを含む 21 アミノ酸残基を N 末端に付加した、成熟型ウシ FGF4 (HisbFGF4, Pro³²-Leu²⁰⁶; 22 kDa) を大腸菌において発現させた。FGF ファミリータンパク質が共通して示すヘパリン結合特性を利用し、ヘパリンカラムクロマトグラフィーにより HisbFGF4 を精製することに成功した (1.5 mg/大腸菌培養液 1L)。また、大腸菌発現ヒト FGF4 (Sigma 社) と比較して、HisbFGF4 による初代ウシ線維芽細胞の増殖促進活性は有意 ($P < 0.05$) に強力であることが判明した。これらの結果より、生物活性を保持するウシ FGF4 タンパク質を、大腸菌により生産できることが示された (Sugawara ら, Anim Sci J 2013)。

3. 遺伝子組換え・安定型ウシ FGF4 タンパク質の開発

一方、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で冷蔵保存した場合、HisbFGF4 タンパク質の多くが Ser⁵⁴ と Leu⁵⁵ の間で切断されることにより、N 末端側が短縮化してしまうことに気がついた。そこで安定型ウシ FGF4 の生産を目指し、N 末端側をあえて短縮化したウシ FGF4 (Leu⁵⁵-Leu²⁰⁶, HisbFGF4L; 19 kDa) を生産してその生物活性を検証した。その結果、HisbFGF4L は大腸菌において発現すること、ヘパリンカラムクロマトグラフィーにより精製できることが判明した (7 mg/大腸菌培養液 1L)。また予測した通り、HisbFGF4L は PBS 中で冷蔵保存しても安定であった。さらに HisbFGF4L は、初代ウシ線維芽細胞に対して、N 末端短縮体が混在する HisbFGF4 とほぼ同等の細胞増殖促進活性を示すことも明らかになった。

次に、種々のタンパク質工学的改変がなされている HisbFGF4L は、FGFR を介して作用するか検証した。まず、初代ウシ線維芽細胞における FGFR2 の発現を検出した。その結果、*FGFR2* mRNA および FGFR2 タンパク質の発現が認められた。そこで FGFR 阻害剤 PD173074 とともに HisbFGF4L を作用させたところ、HisbFGF4L が示す細胞増殖促進活性は完全に消失することが示された。これらの結果は、N 末端側を短縮化した HisbFGF4L はタンパク質分子として安定であること、タンパク質工学的改変がなされている HisbFGF4L であっても、FGFR2 に例示される FGFR を介して生物活性を発揮することを示している (Sugawara ら, Biotech Appl Biochem 2014)。

4. 遺伝子組換え FGF4 がおよぼす胚発生への影響

現在、秋田畜試との共同研究により、遺伝子組換え FGF4 がおよぼすウシ胚の発生に対する影響について検討している。大腸菌発現ヒト FGF4 を用いた予備実験では、ウシ体外受精胚の体外発生率の向上効果・栄養外胚葉細胞数の増加効果が示されている。同様に、本研究室が開発した遺伝子組換えマウス FGF4 は、マウス胚の体外発生率を向上できることも示されている。

ウシ・マウスを例として、今後さらに FGF4 感作動物胚の特性を解明すると共に、受精卵移植した際の受胎率について検証する予定である。