原 著

PCR 法によるヒト骨形成タンパク質-2 (hBMP-2) の cDNA の単離・増幅

丸 岡 豊* 大井田 新一郎** 飯 村 忠 浩**
二 藤 彰***,**** 田 村 正 人**,**** 武 田 弘 資***
佐々木 哲** 榎 本 昭 二*

* 東京医科歯科大学歯学部口腔外科学第二講座 (主任: 榎本昭二教授)

** 東京医科歯科大学歯学部生化学講座 (主任: 佐々木哲教授)

*** 東京医科歯科大学歯学部口腔外科学第一講座 (主任: 天笠光雄教授)

**** 東京医科歯科大学難治疾患研究所機能・調節疾患研究部門分子薬理学講座 (主任: 野田政樹教授)

[受付: 平成4年9月2日]

Cloning of human bone morphogenetic protein-2 (hBMP-2) cDNA by PCR method

Yutaka Maruoka*, Shinichiro Oida**, Tadahiro Iimura**, Akira Nifuji***,****,
Masato Tamura**,****, Kohsuke Takeda***,
Satoshi Sasaki** and Shoji Enomoto*

* *Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University*
(Chief: Prof. Shoji Enomoto)

** *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University*
(Chief: Prof. Satoshi Sasaki)

*** *First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University*
(Chief: Prof. Teruo Amagasa)

5-45, 1-Chome, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

**** *Department of Molecular Pharmacology, Division of Functional Disorder Research,
Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University*
(Chief: Prof. Masaki Noda)

3-10, 2-Chome, Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan

[Accepted for publication: September 2, 1992]

Key words: PCR (Polymerase Chain Reaction)/hBMP (human Bone Morphogenetic Protein)/cloning/
cDNA (complementary DNA)/mature region

*,**,*** 〒113 東京都文京区湯島一丁目 5-45

**** 〒101 東京都千代田区神田駿河台二丁目 3-10

Abstract: In this study, we attempt to amplify the complementary DNAs (cDNAs) for human bone morphogenetic proteins (hBMPs), which have a strong activity of bone induction, from a cDNA library derived from a human osteosarcoma cell line MG63, using the polymerase chain reaction (PCR) method with two specific primers. Four recombinant clones, which encoded the mature region of hBMP-2, have been amplified. However, they did not contain termination codon at their 3'-terminus. PCR was performed again in order to ligate termination codon to one of the cDNAs. Sequence analysis revealed several mutations including one frameshift mutation. After elimination of the defected nucleotide moiety, a cDNA preparation encoding mature region of hBMP was obtained. It was confirmed that the amino acid sequence translated from this cDNA was identical to that of the mature region of hBMP-2.

緒 言

外傷、腫瘍などによって生じた骨欠損を機能的、審美的に修復し、患者の社会復帰を図ることは、歯科、口腔外科のみならず広く臨床的に重要な課題となっている。骨欠損部の修復方法としては、従来より新鮮自家骨移植が最良のものとされているが、採取量に限度があることと健全な部位に外科的侵襲を伴うという欠点がある。それに対し各種の生体親和性の高い、いわゆる生体材料が開発され、すでに臨床の場に供されているが、これらの材料には骨誘導能がなく、周囲からの骨伝導が期待できない部位を機能的、審美的に修復することは困難である。そのため骨誘導能を持つ生体材料の開発が急務とされてきた。

1965年、Urist¹⁾は脱灰骨基質の筋肉内移植による異所性骨誘導実験により、骨誘導を起こす物質の存在を示唆し、その活性がタンパク質分解酵素で消失することから、その未知の分化誘導因子はタンパク質であると考え、bone morphogenetic protein (BMP, 骨形成タンパク質)と命名した。以後多くのグループによって BMP を分離同定するための努力がなされてきたが、1988年、Wozney²⁾は遺伝子工学的方法の導入により、cDNA ライブラリーからヒト BMPcDNA の分離、精製に成功した。さらにこれを動物培養細胞に組み込み、純粋なリコンビナントヒト BMP (recombinant human BMP: rhBMP)として発現させ、BMP タンパク質の調製を可能にした。彼らはそれらを BMP-1, BMP-2A (のちに BMP-2), BMP-3, BMP-2B (のちに BMP-4)と名づけた。その後、BMP-5, BMP-6 [Vgr-1 (Vg-1 の哺乳類型)に同

じ], BMP-7 (osteogenic protein-1, OP-1 に同じ)と次々に単離され、最近 Celeste³⁾によって単離された BMP-8 を含め、現在までに8種の BMP が同定され、いわゆる BMP ファミリーを形成している。これらは BMP-1 を除いては、アミノ酸配列や基本構造に相同性が認められている。

hBMP-2 について述べると、はじめ396個のアミノ酸残基からなるタンパク質鎖として合成されるが、この全翻訳領域は、シグナル鎖とこれに続くプロ鎖領域 (pro-region) および成熟活性領域 (mature region) とからなる (Fig. 1)。生合成後、成熟活性領域にあるシステイン残基間に S-S 結合がつくられて二量体となり、潜在型として分泌され、その後加水分解酵素のはたらきでプロ鎖領域が除かれ、C末端側114個のアミノ酸よりなるペプチドの二量体が切り放され、成熟活性型の BMP としての生理作用を発現する。前駆体の N 末端側プロ鎖領域は BMP が二量体構造をとるために必須のものであり、また潜在型であるために重要であると考えられている⁴⁾。

このような BMP の構造は、アクチビン、ミュラー管退縮因子 (Müllerian inhibiting substance, MIS) などとともに、生物の形態形成、分化、増殖に関わるサイトカインの一種、TGF- β (transforming growth factor- β) ときわめて類似したものである。特に TGF- β の成熟活性領域にみられる9個のシステイン残基のうち7個までがその成熟活性領域に保存されていることから、BMP はいわゆる TGF- β スーパーファミリーの一員とされている。また、BMP は当初は骨誘導を起こさせる物質として注目されたが、現在では骨誘導のみならず個体発生の様々な局面で重要な役割を担

Fig. 1 Amino acid sequence of human bone morphogenetic protein-2 (hBMP-2) and three oligonucleotide primers designed.

Schematic diagram of domain structure of hBMP-2; Signal peptide (stippled zone), pro-region (open zone) and mature region (hatched zone) are shown. Three oligonucleotide primers (B1, B4 and B7) for PCR were synthesized.

っていることを示唆するデータが蓄積されてきている^{5,6)}。

現在、微量で強力な骨誘導活性を持つ BMP の臨床応用に向けて、様々な基礎実験がなされている。その多くはウシ長管骨から抽出した BMP の粗精製物をコラーゲン、アパタイト、脱灰骨などの担体とともにラットなどの動物に埋め込む実験として行われており、いずれも良好な骨誘導が確認されている。しかし、これらの系に用いられている BMP 標品には数種の BMP 画分が含まれており、個々の BMP の単独での作用は知ることができない。そこで著者らは遺伝子工学的手法を用いることにより、それぞれ純粋な rBMP を生産し、個々の BMP の骨誘導のメカニズムを解明するとともに、骨誘導能を持つ生体材料としての臨床応用を目的として研究を開始した。

一方、polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応, PCR) 法は、目的とする DNA 領域を含む 2 種のプライマーを用いて、*in vitro* で DNA ポリメラーゼにより鋳型特異的な DNA 合成反応をくり返すことによって、特定の塩基配列を持つ DNA 断片を数十万倍に増幅させる方法である⁷⁾。この技法は 1985 年に Mullis らによって開発されたが、はじめてヒト β グロビン DNA の増幅および鎌状赤血球貧血症の出生前診断に臨床応用され

た⁸⁾。PCR 法の特徴としては未精製の DNA でも鋳型として用いることができるので、cDNA を単離する際のライブラリー作製などの非常に煩雑な過程を省略できるという利点がある。微量の、また部分分解を受けたような DNA でも、それから目的とする塩基配列を持つ DNA 断片を増幅できるため、DNA 診断や法医学、考古学など様々な分野に広く応用され、特に分子生物学においてはいまや不可欠の技術となっている。またプライマーの設計を工夫することにより、増幅される DNA 断片の中に新たな塩基配列を組み込むことができ、このことを利用して人工的に変異部位を挿入したり、本来存在しなかった制限酵素部位を組み込むというような応用がなされている⁹⁾。

今回著者らは、BMP に対する遺伝子工学的アプローチの第一段階として、PCR 法を用いて hBMP の cDNA の単離、増幅を試みた。すでに著者らは同様の方法で、新生児マウスの全組織から得た cDNA-mRNA 混合物から、マウス BMP-2¹⁰⁾、マウス BMP-6¹¹⁾ の単離に成功しているが、今回はヒト骨肉腫由来細胞株 MG63 から得た未精製の cDNA-mRNA 混合物から、hBMP-2 と思われる 4 つの cDNA 断片を単離、増幅することができた。この塩基配列を決定したところ、それらはそれぞれ 1 カ所の塩基欠失部位、および数カ

所の置換部位があったものの, hBMP-2 の成熟活性領域をほぼ完全にコードしていることが明らかとなった。このうち1つの cDNA に, さらに PCR 法を用いて終止コドンが付加した。また, 塩基欠失部位はプロ鎖領域に相当する部分にあったので, この欠失部位を含む塩基部分をエキソヌクレアーゼを用いて削除した。塩基置換部もアミノ酸に翻訳すると, 成熟活性領域については本来の hBMP-2 と完全に一致していた。このようにして, 成熟活性型の hBMP-2 の遺伝子工学的生産に用いることのできる cDNA を得ることができたので報告する。

材料と方法

1. 鋳型 DNA の調製

ヒト骨肉腫由来細胞株 MG63 を 10% ウシ胎仔血清を含む DMEM 培地にて増殖させ, コンフルエントに達した後, PBS で洗い, グアニジウム・セシウムクロライド法¹²⁾により全細胞 RNA を抽出した。それをオリゴ dT セルロースカラム (Type III, Collablotative Res.) に 2 回通して mRNA を分離し, そのうちの 1 μ g をもとにランダムプライマーと逆転写酵素 M-MuLV reverse transcriptase (New England Biolabs, Inc.) を用いて cDNA を作製し, PCR 法の鋳型として用いた。

2. プライマーの合成

すでに報告されている hBMP-2 および hBMP-4 の塩基配列²⁾を参考にして, hBMP-2 および hBMP-4 の双方の増幅が可能なプライマーとして, B1, B4 を設計し (Fig. 1), MilliGen/Biosearch Cyclone plus DNA synthesizer を用いて合成した。

3. PCR 法による hBMPcDNA の増幅

50~100 ng の鋳型 DNA, それぞれ 200 ng の B1, B4 プライマー, そして 2 単位の Tth ポリメラーゼ (TOYOBO Co., Ltd.) を用い, 0.2 mM dNTPs, 1.0 mM Mg²⁺ を含む 50 μ l の反応液中において, 93°C, 1 分で変性, 53°C, 2.5 分でプライマーのアニーリング, 75°C, 2.5 分で伸長というステップを 30 サイクル行った。

4. クローニングベクターへの組み込み

この実験で用いた Tth ポリメラーゼは, PCR 法で増幅された cDNA 断片の 3' 末端に アデニンを付加する性質があり, また使用した合成プライマーは 5' 末端の塩基が脱リン酸化されている。そこで T4 DNA ポリメラーゼ, T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて 3' 末端の平滑化と 5' 末端のリン酸化を行った。さらにクローニングベクターへの組み込みを容易にするため, Bhat ら¹³⁾の方法により, 5' 末端が脱リン酸化された BamH I リンカー (10 mers) を T4 DNA リガーゼで cDNA の両端に連結した。その後 BamH I リンカーをプライマーとして 94°C, 1 分, 37°C, 2.5 分, 72°C, 2.5 分というステップを 25 サイクル行って DNA を増幅し, 続いて BamH I 消化し, これをクローニングベクター pBluescript SK (+) の BamH I 部位に組み込んだ。

5. 大腸菌へのトランスフェクション

塩化カルシウム法¹⁴⁾にて作成した大腸菌株 JM 109 のコンピテント細胞に, cDNA を組み込んだ pBluescript SK (+) のトランスフェクションを行った。アンピシリンを 100 μ g/ml 添加した培地上に, 2% X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside), および 0.1 M IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) を加えて 16 時間培養し, カラーセクションにて組み換え体コロニーを選別した。

6. 組み換え体の確認

培地上の単一コロニーを拾い, 液体培地で培養し, アルカリ法¹⁵⁾にて組み換えプラスミド DNA の少量調製を行い, さらにそれを制限酵素 BamH I で消化した後, 4.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて cDNA の大きさの確認を行った。

7. cDNA の塩基配列の決定

目的の cDNA がトランスフェクトされた大腸菌を大量培養し, そこから少量調製のときと同じくアルカリ法にて調製したプラスミド DNA を, さらに塩化セシウム密度勾配遠心法にて精製した。シーケンシングプライマーとして, 著者らが合成した B1, B4 プライマーと pBluescript SK (+) 中に相補的な塩基配列を持つ P3, P5 プライマーとを用い, SEQUENASE (US Biochem, Corp.) を使った dideoxy 法¹⁶⁾により塩基配列を

Fig. 2 Comparison of nucleotide sequences of hBMP-2 and the recombinant clones obtained.
- : same nucleotide
* : deletion of nucleotide

Fig. 3 Construction of clones BH693 and BH1105.

BH693: hBMP-2 cDNA was inserted into Sma I site of Bluescript SK(+) plasmid vector.

BH1105: hBMP-2 cDNA was inserted into Sac II/Sma I site of Bluescript SK(+) plasmid vector. However, Sac II/Sma I site was lost during the insertion procedure.

Fig. 4 Procedure of elimination of the moiety including the nucleotide deletion.

hBMP-2の終止コドン(TAG)が含まれていなかったため、終止コドン付加の目的で新たなプライマー(B7: Fig. 1)を合成し、1カ所を制限酵素で切断した1 µgのクローンBH278(Fig. 2)のプラスミドDNAを鋳型としてB1, B7のプライマーを用いて再びPCR法を行い、増幅されたcDNA断片をpBluescript SK(+)に組み込み、前述と同様の方法にて塩基配列を決定し、クローンBH693を得た(Fig. 2, 3)。

9. 塩基欠失部位の削除

クローンBH693にはhBMP-2の塩基の967番目に相当する部位の欠失があった。この欠失はBMPのプロ鎖領域をコードする部分にあり、これ以降フレームシフトが起こるためアミノ酸への

決定した。

8. 終止コドンの付加

得られたcDNAにはB4プライマーの設計上、

Fig. 5 Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products synthesized at different Mg^{2+} concentrations.
lane 1: authentic size markers,
lane 2: 0.75 mM, lane 3: 1.0 mM,
lane 4: 1.5 mM

翻訳が違ってくるとともに、途中で終止コドンが出現するので、この部分を除去することにした。まず、5 μ g の BH693 プラスミド DNA を用い、Fig. 4 に示すように、cDNA の 5' 末端側を Sac II, BamH I で消化し、形成された 5' 突出部分をエキソヌクレアーゼ III により削除した。エキソヌクレアーゼ III を不活化した後、mung-bean nuclease, および Klenow fragment を用いて突出末端を平滑化し、T4 DNA リガーゼを用い、self circularization させてクローン BH1105 を得た (Fig. 2, 3)。

結 果

1. PCR 法による cDNA の増幅

hBMP-2 および hBMP-4 の cDNA に特異的にアニーリングするように設計した PCR プライマー B1, B4 を合成した (Fig. 1)。これらを用い、

Table 1 Nucleotide homology of four clones obtained (%).

	BH210	BH216	BH277	BH278
hBMP-2	98.6	99.1	98.8	99.1
hBMP-4	67.3	67.3	67.4	68.0

Table 2 Frequency of PCR errors; replacement and deletion.

	BH210	BH216	BH277	BH278
replacement	7	4	6	3
deletion	1	0	1	1

Table 3 Insertion of cDNAs into pBluescript SK(+) plasmid vector.
Ligation sites and the RNA polymerase promoters which control transcription of the inserted cDNA.

	Inserted site	Promoter
BH210	BamH I	T7
BH216	BamH I	T7
BH277	BamH I	T3
BH278	BamH I	T3
BH693	Sma I *	T3
BH1105	Sac II */Sma I	T3
BH1148	EcoRV*	T3
BH1153	EcoRV*	T3

*: Restriction enzyme sites were lost during the insertion procedure.

MG63 の cDNA-mRNA 混合物の中から hBMP-2, 4 の cDNA の特異的増幅を試みた。PCR 反応液中の Mg^{2+} 濃度を検討したところ、終濃度 1.0 mM において目的とする領域を正確に増幅することができた (Fig. 5)。増幅された cDNA は、当初平滑末端化したのみでベクターへの組み込みを図ったが困難であったため、両端に BamH I リンカーを連結し、さらに PCR 法を行って増幅することにより、pBluescript SK(+) の BamH I 部位に容易に組み込むことができた。

得られた 4 つのクローン (BH210, BH216, BH277, BH278) の塩基配列とすでに報告されている hBMP のそれとを比較すると、hBMP-2 とのホ

```

hBMP-2: 275' LHKREKRQAKHKQRRLKSSCKRHP
          * * * * *
BH1105: 1"  LHKREKRQAKHKQRRLKSSCKRHP
          * * * * *
301' LYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPEPLADHLNSTNHAIVQTLVNSVNSKIPKAC
          * * * * *
26" LYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPEPLADHLNSTNHAIVQTLVNSVNSKIPKAC
          * * * * *
361' CVPTELSAISMILYLDENEKAVVLEKNYQDMVAEGCGGRX
          * * * * *
86" CVPTELSAISMILYLDENEKAVVLEKNYQDMVAEGCGGRX
          * * * * *

```

Fig. 6 Comparison of amino acid sequence of hBMP-2 to the translate of the clone BH1105.

モロロジーが最も高く、互いにわずかながら差異は認められるものの、これらのクローンはいずれも hBMP-2 をコードするものであると判断された (Fig. 2)。しかし、塩基の置換が最も多いものでは 7 カ所に、少ないものも 1 カ所に認められ、また塩基欠失部位も BH216 以外の 3 つのクローンで 1 カ所にみられた (Table 1~3)。

2. PCR 法を用いた cDNA の修飾

最初に著者らが用いた B1, B4 プライマーは、hBMP-2, 4 に最もホモロジーが高い部位を選んだため、成熟活性領域をコードする塩基が 3' 側で 2 つ不足しており、またアミノ酸への翻訳の際に必要となる終止コドン (TAG) が含まれていなかった。そこで成熟活性領域をすべてコードし、終止コドンを持つ cDNA に作り換えることを試みた。1 カ所を制限酵素で切断したクローン BH278 (Fig. 2) を鋳型として、終止コドン付加の目的でつくった B7 プライマー (Fig. 1) を B1 プライマーと組合せて用い、前述の方法で PCR 法を行った。得られた cDNA は pBluescript SK (+) の Sma I 部位に組み込んだ。このようにしてクローン BH693 が得られた。この cDNA の塩基配列を調べた結果、終止コドン (TAG) を持つことが確かめられた (Fig. 2, 3)。また、同じ cDNA を EcoRV 部位に組み込んだクローン (BH1148, BH1153) も得られた (Table 3)。

3. エキソヌクレアーゼを用いた塩基欠失部位の削除

エキソヌクレアーゼ III, mung-bean nuclease, Klenow fragment を用いた一連の削除反応で、約 200 塩基削除されたクローン BH1105 が得られた (Fig. 2, 3)。成熟活性領域をコードしている部位には依然として 2 塩基が置換されたままである

が、これらはアミノ酸に翻訳すると元のものと違いがなく、hBMP-2 の成熟活性領域のアミノ酸配列を完全にコードしていた (Fig. 6)。また、BMP の成熟活性領域にみられる 7 個のシステインの位置や、糖鎖が結合すると思われる領域にも違いは見い出されなかった。

考 察

1. PCR 法による単離、増幅について

本実験では未精製の cDNA-mRNA 混合物から PCR 法を用いて hBMP-2 の cDNA を単離、増幅することができ、またプライマー部分が新しい DNA 断片に取り込まれることを利用して、一度得られた cDNA 断片に必要な塩基を付加し、目的の cDNA を得ることができた。

このように、PCR 法はきわめて簡便でかつ有用な方法であり、その応用範囲はきわめて広い。しかし、以前から指摘されているように、今回の著者らの実験でも特に次の点が問題となった。

第一に、非特異的な DNA 鎖の増幅があげられる。これはコンタミネーションの程度をはじめ、反応サイクルの回数、鋳型 cDNA の濃度、dNTPs の濃度、プライマーのアニーリングの状態などの条件に左右されるが、プライマーが目的とする配列に正確にアニーリングするためには、プライマー自身の塩基配列のほか、反応温度、反応液中の Mg^{2+} 濃度などが影響を与えると思われる。著者らも様々な反応条件で PCR 法を行い、1.0 mM の Mg^{2+} 存在下で、93°C、1 分で変性、53°C、2.5 分でプライマーのアニーリング、75°C、2.5 分で伸長というステップが最適であるという結論を得た。さらにこのような条件で増幅され、単離さ

れたもののうち、予想された長さの cDNA 断片について塩基配列を調べてみると、BMP とは全く無関係の cDNA がつくられていた場合も少なくなく、塩基配列の確認は不可欠であると思われる。

第二に、PCR 法に用いる耐熱性 DNA ポリメラーゼの忠実性の問題である。Saiki ら⁷⁾や Keohavong ら¹⁷⁾は、Taq DNA ポリメラーゼのエラー率はおよそ 2×10^{-4} と報告しており、また Tindall ら¹⁸⁾によれば、1 塩基のみが置換されるエラーが最も多く、9,000 塩基について 1 回の割合で、フレームシフトは 41,000 塩基につき 1 回の割合で起こるとされている。著者らの行った PCR 法では、わずか 600 塩基余りの中で 3~7 カ所というかなりの高率で読み誤りが生じており、フレームシフトも 1 カ所生じていた。これは PCR 産物を何度も次の PCR 法の鋳型としてくり返し用いたことによるものと考えられる。このように、TaqDNA ポリメラーゼなどの耐熱性ポリメラーゼの忠実性は高いとはいえないが、Eckert ら¹⁹⁾は反応条件の改善によりエラー率を低下させることができると報告している。

第三に、これは PCR 法自体の問題ではないが、増幅された cDNA 断片は 3' 末端にアデニンが突出しているため、このままではクローニングベクターへの組み込みは困難で、平滑末端化の操作が必要になる。著者らは cDNA 両端に BamH I リンカーを連結し、さらにそれをプライマーとして PCR 法を行うことにより組み込みに成功した。しかし、今回得られた 4 つのクローンはそれ以前に 3 度にも及ぶ PCR 法を経ており、前述の耐熱性 DNA ポリメラーゼによるエラー発生の機会を増加させる結果になった。現在ではベクターの 5' 側にチミンを 1 塩基付加することにより、組み込みの効率を上げることに成功している(未発表)。

今回著者らはヒト骨肉腫由来細胞株 MG63 から得た cDNA-mRNA 混合物から、hBMP-2、hBMP-4 の 2 つの cDNA の増幅を試みたが、結果的に hBMP-2 のみしか増幅できなかった。クローン BH693 から調製した cDNA をプローブとして、株細胞 MG63 から抽出した mRNA に対し、ノーザンハイブリダイゼーションを行った

が、hBMP-2、hBMP-4 のメッセージはいずれもほとんど検出されなかった。この結果から、hBMP-2 のみしか増幅されなかった理由について、MG63 における hBMP-2 と hBMP-4 の mRNA の発現量の差によるのか、あるいは著者らの設計したプライマーのアニーリング効率の違いによるのかは区別できなかった。いずれにしても、PCR 法はこのような微量の DNA であっても、増幅が可能なきわめて有用な方法であるといえる。著者らはすでにマウス BMP-2¹⁰⁾、マウス BMP-6¹¹⁾を同様の方法にて単離したが、さらにその他の BMP ファミリーの cDNA の単離も試みている。

2. rhBMP の発現系について

BMP を始めとする TGF- β スーパーファミリーに属するタンパク質は、互いにその構造や性質がよく似ているため、それぞれを単離、精製するのは非常に困難である。そこで骨から個々の BMP を精製しようとするこれまでの試みに代わって、遺伝子工学的に rBMP を生産し、それぞれの BMP について調べる方法が研究の主流となりつつある。移植実験の結果では、rhBMP-2 のほか、rhBMP-4、5、7 に骨誘導能があることが確認されている²⁰⁻²²⁾。またこの rhBMP の臨床応用へ向けた実験としては、Toriumi ら²³⁾は rhBMP-2 を脱灰骨と共に離断後のイス下顎骨に埋入し、良好な骨誘導がなされたと報告している。

現在、外来の遺伝子を発現させる系としては、大腸菌、枯草菌、酵母、動物培養細胞、植物細胞、さらに最近では昆虫培養細胞も宿主として用いられている。特に大腸菌は培養が容易で生育も速く、取扱いやすい微生物であり、その菌体内発現系はタンパク質の大量生産が可能であるので、最も広く用いられている。しかしながら、原核細胞である大腸菌を用いた場合の欠点としては、生産されたリコンビナントタンパク質について糖鎖の付加などの翻訳後修飾が全く期待できず、また正しい立体構造の保持とこれに基づくジスルフィド結合の形成は不可能であるといわれている。

前述のように、hBMP-2 は合成された後、二量体の前駆体として分泌され、その後 C 末端側の成熟活性領域が遊離して作用を発現する (Fig. 1)。TGF- β 1 やアクチビン A では前駆体のプロ鎖領域

は、生理活性に不可欠な二量体構造をとるために必須のものであり、また潜在型であるために重要であると考えられていることから⁴⁾、同じ TGF- β スーパーファミリーに属する BMP に関しても同様と思われる。今回著者らが単離、増幅できた cDNA は、前駆体 N 末端側のプロ鎖領域をほとんど含んでいないし、大腸菌でリコンビナントタンパク質を生産させても、hBMP-2 としての作用は期待できない。しかし、例えばアルカリフォスファターゼのように二量体を形成するタンパク質の遺伝子の下流に融合させることで、生理活性のある二量体のタンパク質として発現・分泌させることは理論上可能である。さらに、大腸菌の系を用いて生産された rhBMP が *in vivo* において軟骨を誘導したという報告²⁾ や、BMP の活性には糖鎖の修飾は必須でないという報告²⁴⁾ もあり、活性型の hBMP の生産は大腸菌の系でも期待できるであろう。現在 rhBMP は動物培養細胞を宿主として生産されているが、膨大な労力と時間を要するという欠点がある。今回得られた cDNA は、それらの問題を解決するために役立つものと期待される。また著者らはこの cDNA をプローブとして、hBMP-4 および hBMP-6 のほぼ全長の単離

に成功しており(未発表)、これを用いて大腸菌、培養動物細胞、昆虫細胞などでより効率的なリコンビナントタンパク質生産系の確立に向けて探索を進めている。

結 語

1. 今回著者らはヒト骨肉腫由来細胞株 MG63 の mRNA-cDNA から、PCR 法を用いて hBMP-2 をコードする cDNA を単離、増幅することができた。

2. 得られた cDNA にさらに PCR 法を用いて終止コドンをつ加し、またエキソヌクレアーゼⅢ等を用いて欠失部位を除くことにより、アミノ酸に翻訳すると hBMP-2 の成熟活性領域と完全に一致する cDNA を得た。

本論文の一部は、第9回日本骨代謝学会総会(1991年、東京)、第33回歯科基礎医学会総会(1991年、鹿児島)、第64回日本生化学会大会(1991年、東京)、第36回日本口腔外科学会総会(1991年、大阪)、第1回硬組織研究技術談話会(1992年、岡山)、第46回日本口腔科学会総会(1992年、名古屋)において発表した。

抄録: 骨形成タンパク質(BMP)は骨誘導を起こさせる強力なサイトカインであり、骨誘導能を持つ骨補填材料への利用が期待されている。その臨床応用へ向けての遺伝子工学的アプローチの第一歩として、今回、著者らはヒト骨肉腫由来細胞株 MG63 より作製した cDNA-mRNA 混合物から、polymerase chain reaction (PCR) 法により、2種のプライマーを用いてヒト BMP-2 およびヒト BMP-4 の cDNA の増幅、単離を試みた。その結果ヒト BMP-2 の成熟活性領域をコードすると思われる塩基配列をもつ4つのクローンの増幅に成功した。このうちの1つの cDNA について、PCR 法により3'末端に終止コドンをつ加し、またプロ鎖をコードする領域に存在した塩基欠失部分の削除を行った。このようにしてつくられた cDNA には、なおいくつかの塩基の置換もあったが、成熟活性領域の塩基をアミノ酸に翻訳すると天然のものと全く同じであり、hBMP-2 の成熟活性部位の全領域をコードする cDNA を得ることができた。

文 献

- 1) Urist, M.R.: Bone: Formation by Autoinduction. *Science* **150**: 893-899, 1965.
- 2) Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M. and Wang, E.A.: Novel Regulators of Bone Formation: Molecular Clones and Activities. *Science* **242**: 1528-1534, 1988.
- 3) Celeste, A.J., Taylor, R., Yamaji, N., Wang,

- J., Ross, J. and Wozney, J.: Molecular cloning of BMP-8: A protein present in bovine bone which is highly related to the BMP-5/6/7 subfamily of osteoinductive molecules. *J. Cell. Biochem. Supplement* **16F**: W502, 1992.
- 4) Gray, A.M. and Mason, A.J.: Requirement for Activin A and Transforming Growth Factor- β 1 Pro-Regions in Homodimer Assembly. *Science* **247**: 1328-1330, 1990.
- 5) 大井田新一郎: 骨誘導因子(BMP と OIF). *THE BONE* **5**: 37-43, 1991.

- 6) Rosen, V. and Thies, R.S. : The BMP proteins in bone formation and repair. *Trends Genet.* **8** : 97-102, 1992.
- 7) Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. : Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239** : 487-491, 1988.
- 8) Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. : Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* **230** : 1350-1354, 1985.
- 9) Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M. : Recombinant DNA, 2nd edn., pp. 79-98, W.H. Freeman and Company, New York, 1992.
- 10) 二藤 彰, 大井田新一郎, 田村正人, 下川仁弥太, 石崎 明, 山口 聡, 内田哲馬, 丸岡 豊, 百瀬文雄, 佐々木哲 : 骨形成因子関連遺伝子群の PCR 法による cDNA クローニングとその発現. *日骨代謝誌* **9** : 269, 1991.
- 11) Oida, S., Nifuji, A., Tamura, M., Maruoka, Y., Iimura, T. and Sasaki, S. : PCR amplification and cloning of a mouse bone morphogenetic protein (BMP) cDNA. *Jpn. J. Oral Biol.* **34** : 612-615, 1992.
- 12) Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J. : Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease. *Biochemistry* **18** : 5294-5299, 1979.
- 13) Bhat, G.J., Lodes, M.J., Myler, P.J. and Stuart, K.D. : A simple method for cloning blunt ended DNA fragments. *Nucl. Acids Res.* **19** : 398, 1990.
- 14) 村松正實, 他 : ラボマニユアル遺伝子工学 (村松正實編), 増補版, pp. 113-116, 丸善, 東京, 1990.
- 15) 村松正實, 他 : ラボマニユアル遺伝子 (村松正實編), 増補版, pp. 51-55, 丸善, 東京, 1990.
- 16) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** : 5463-5467, 1977.
- 17) Keohavong, P. and Thilly, W.G. : Fidelity of DNA polymerase in DNA amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 9253-9257, 1989.
- 18) Tindall, K.R. and Kunkel, T.A. : Fidelity of DNA Synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA Polymerase. *Biochemistry* **27** : 6008-6013, 1988.
- 19) Eckert, K.A. and Kunkel, T.A. : High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucl. Acids Res.* **18** : 3739-3744, 1990.
- 20) Wang, E.A., Rosen, V., D'Alessandro, J.S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D.I., Hewick, R.M., Kerns, K.M., Lapan, P., Luxenberg, D.P., McQuaid, D., Moutsatsos, I.K., Nove, J. and Wozney, J.M. : Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 2220-2224, 1990.
- 21) Cox, K., Holtrop, M., D'Alessandro, J.S., Wang, E.A., Wozney, J.M. and Rosen, V. : Histological and ultrastructural comparison of the *in vivo* activities of rhBMP2 and rhBMP5. *J. Bone. Mineral Res.* **6** : S155, 1991.
- 22) Sampath, T.K., Özkaynak, E., Jones, W.K., Sasak, H., Tucker, R., Tucker, M., Kusmik, W., Lightholder, J., Pang, R., Corbett C., Oppermann, H. and Rueger, D.C. : Recombinant human osteogenic protein (hOP-1) induces new bone formation with a specific activity comparable to that of natural bovine osteogenic protein. *J. Bone Mineral Res.* **6** : S155, 1991.
- 23) Toriumi, D.M., Kotler, H.S., Luxenberg, D.P., Holtrop, M.E. and Wang, E.A. : Mandibular Reconstruction with a Recombinant Bone-Inducing Factor. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg.* **117** : 1101-1112, 1991.
- 24) Sampath, T.K., Coughlin, J.E., Whetstone, R.M., Banach, D., Corbett, C., Ridge, R.J., Özkaynak, E., Oppermann, H. and Rueger, D.C. : Bovine Osteogenic Protein Is Composed of Dimers of OP-1 and BMP-2A, Two Members of Transforming Growth Factor- β Superfamily. *J. Biol. Chem.* **265** : 13198-13205, 1990.