



Title	合成オリゴデオキシヌクレオチドを用いたセルレイン前駆体構造の解明
Author(s)	若林, 利明
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35065
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	若林利明
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 7103 号
学位授与の日付	昭和 61 年 2 月 7 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	合成オリゴデオキシヌクレオチドを用いたセルレイン前駆体構造の解明
論文審査委員	(主査) 教授 池原 森男 (副査) 教授 北川 勲 教授 富田 研一 教授 枝井雅一郎 教授 松原 謙一

論文内容の要旨

緒論

近年の分子遺伝学の発展はめざましく、生体内微量蛋白質の構造が遺伝子レベルで次々と解明されている。また、DNA の化学合成法の進歩はクローニングの技術と相俟って遺伝子の人工合成を可能とするに至った。

しかし、長鎖オリゴマーを合成する際の出発原料となるジ・トリヌクレオチドの合成法は 1975 年以来さして改良されておらず、特に縮合剤の安定性に最大の問題があるものと思われる。つまり、安定な縮合剤は縮合反応に長時間要し、逆に反応時間の短い縮合剤は非常に不安定であり、長時間保存することができない。

そこで、この問題を解決するため安定な縮合剤による反応を促進する方法を検討した結果、メチルイミダゾール (MeIm) に縮合反応を促進する作用のあることを見い出した。

さらに、トリヌクレオチドのより簡便な合成方法を検討するとともに、ブタ・ガストリン、コレシストキニン-パンクレオザイミン (CCK)、血管作動性小腸ペプチド (VIP)、カエル・セルレインのアミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチドの合成を行った。

次に、著者は合成オリゴヌクレオチドを用いて、ガストリン、CCK、セルレイン前駆体構造の解明を試み、セルレイン前駆体構造を初めて明らかにすることに成功した。さらに、ガストリン、CCK 前駆体構造との比較検討を行った結果、従来の仮説に加え、新しい仮説を提唱するに至った。

本章

第一章 オリゴデオキシヌクレオチドの簡易合成

一般にオリゴデオキシヌクレオチドを合成する際には官能基を保護する必要がある。しかし、3', 5'水酸基は反応性が著しく異なることが予想されるため、塩基部のみを保護したヌクレオシドを用い、トリヌクレオチドの迅速合成を試みた。その結果、優先的に5'水酸基が反応し、3'水酸基との反応生成物はシリカゲルカラムで容易に分離できることを見い出した。

次に著者は縮合剤に関する検討を行った。トリエステル法を用いたオリゴマー合成に際し、種々の縮合剤が開発されているが、反応性の高い縮合剤は不安定であり、逆に安定な縮合剤は反応が遅い。そこで、著者は反応促進剤により、安定な縮合剤を活性化し、短時間で反応を行う方法を検討した。

その結果、MeIm 6当量を安定な縮合剤であるトリイソプロピルベンゼンスルホニル-4、ニトロイミダゾリッド (TPSNI) あるいはトリメチルベンゼンスルホニル-4、ニトロイミダゾリッド (MSNI) 3当量に加えることにより、従来 14 時間以上も要した反応が 2 時間以内で完結することを初めて見い出した。

さらに、これまでの方法を用いてガストリン、CCK、セルレイン、VIP のアミノ酸配列に対応する 12 ~ 18 ヌクレオチドを合成した。

第二章 セルレイン前駆体構造の解明

Xenopus laevis の皮膚より mRNA を抽出し cDNA ライブライマーを作成した。合成オリゴマーをプローブとして組み換え大腸菌をスクリーニングした結果、109 個のクローニングを得た。制限酵素地図の異なる 3 つのクローニング (pXC 102, 202, 204) の塩基配列を解析した結果、いずれもセルレイン前駆体をコードしていたが N 端を含んでいなかったため、新たに cDNA ライブライマーを作成し、N 端までを含む 921 塩基よりなる cDNA クローニング (pXC 601) を得た。N 端より 26 アミノ酸は典型的なシグナルペプチドの構造を有し、セルレインが分泌性ペプチドであることを裏づけた。さらに、前駆体にはセルレイン構造が 4 個含まれており、マルチポリペプチドであることも判明した。また、前駆体中のセルレイン構造間のペプチド (ICS) は互いに高いホモロジーを示し、セルレイン前駆体はシグナルペプチド、セルレイン、ICS の 3 つの基本構造からなる全く新しい特異構造であることが判明した。

また、セルレインあるいは ICS を欠落した mRNA が存在すること、3' 非翻訳領域の異なる mRNA が存在することを明らかとした。

さらに、セルレイン mRNA は皮膚のみに存在し、胃、十二指腸、肝臓には存在していないことを明らかとした。

第三章 ヒト・CCK、ヒト・ガストリン前駆体とセルレイン前駆体との比較

ヒト・ガストリン、CCK 前駆体構造は阪大・細胞工学センター松原教室および薬学部池原教室と共同で解明することに成功した。

ガストリン、CCK、セルレイン前駆体構造を比較すると C 端の活性ペプチド部分以外には何ら類似性を見い出すことができなかったが、セルレイン前駆体の基本構造の一部に対応する DNA 配列と比較すると高い類似性が見られた。特に、セルレインとガストリンではアミノ酸レベルの類似性は 53 % であ

るが、DNA レベルでは約 70% となり、さらに、類似性の最高値を計算すると 80% にまで達した。これは共通の祖先遺伝子に由来している可能性を示唆するデータである。

しかし、ガストリン、CCK、セルレインの組織分布および前駆体から活性ペプチドが生成するプロセシング機構を比較すると、セルレインはガストリン、CCK とは全く異なるペプチドであり、別々の進化過程をたどった可能性が示唆された。そして、カエルにはセルレイン以外にガストリン、CCK 様ペプチドが、ホ乳類にはセルレイン様ペプチドが存在している可能性が示唆された。

結論

1. 3', 5' 無置換ヌクレオシドを使用したトリヌクレオチドの合成法を検討し、その実用性を証明した。
2. メチルイミダゾールが縮合反応を著しく促進することを見い出し、オリゴヌクレオチドの簡便な合成法を開発した。
3. セルレイン、ガストリン、CCK、VIP のアミノ酸配列に対応する 12 ~ 18 ヌクレオチドを合成した。
4. セルレイン前駆体構造を世界で初めて解明し、繰り返し構造からなるマルチポリペプチドであることを明らかにするとともに、多種類のセルレイン mRNA が合成されていることを明らかとした。
5. ガストリン、CCK、セルレイン前駆体構造を比較検討した結果、これら 3 種のペプチドが共通の祖先ペプチドに由来しているという従来の仮説以外に、セルレインとガストリンおよび CCK の前駆体は共通の祖先蛋白が存在せず、別々の進化過程をたどった可能性を提唱した。

論文の審査結果の要旨

同君は先ずデオキシオリゴヌクレオチドの新合成として、3', 5' 無置換ヌクレオチドを使用してトリヌクレオチドを合成する新方法を見出し、又メチルイミダゾールを添加することにより縮合収率を格段に上昇させた。

この方法を用いてセルレイン、ガストリン、CCK、VIP のアミノ酸配列に対応する 12-18 ヌクレオチドを合成し、これによりセルレイン前駆体の構造を繰り返し構造からなるマルチペプチドであることを明らかにした。

又、ガストリン、CCK、セルレインの前駆体の構造を比較検討した結果、これらは必ずしも同一の祖先蛋白から進化したものでない証拠を見出した。

以上の結果は博士号請求に値するものと考える。