

Title	Oxidative Folding of Peptides : Roles of Reaction Milieu and Prosequence in relation to the Formation of the Secondary Structure
Author(s)	久保, 茂
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42988
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	久 保 茂 ^{しげる}
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 9 7 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 10 月 14 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	Oxidative Folding of Peptides: Roles of Reaction Milieu and Prosequence in relation to the Formation of the Secondary Structure (ポリペプチドの酸化的フォルディング：2次構造の形成に関連した反応溶媒とプロ配列の役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小 林 祐 次 (副査) 教 授 前 田 正 知 教 授 今 西 武 教 授 小 林 資 正

論 文 内 容 の 要 旨

蛋白質やポリペプチドの機能は、その立体構造と密接に関わっており、生理活性の発現には天然型の高次構造を形成することが不可欠である。Anfinsen が蛋白質の立体構造はアミノ酸の配列順序により自動的にきまるといふ仮説を提唱して以来この40年間、高次構造の構築原理を解明しようとする試みは数多く成されてきた。しかし蛋白質の構造を決定する因子はあまりにも多く、かつ複雑で、その膨大な研究量にも拘わらずその原理は明らかとされていない。

蛋白質中のシステイン残基 (Cys) 間のジスルフィド結合 (S-S 結合) も高次構造の安定と形成に密接な関係があり、その形成過程を調べることにより立体構造構築原理の一端を解明しようとする研究も30年以上に亘って行われている。複数の S-S 結合を持つ蛋白質やペプチドにおいて、その形成過程は複雑である。例えばウシ膵臓トリプシンインヒビターの場合には、6 個の Cys を含んでいるので15種の S-S 結合の組み合わせが考えられるが、実際には、ある決まった道筋を通ってただ 1 種の天然型の S-S 結合を持つペプチドのみが定量的に生成する。しかし一方、in vitro において、複数の Cys 残基を持つペプチドを酸化して S-S 結合を形成させる場合、用いる溶媒など反応条件に依存して異なった S-S 結合の様式を持つ生成物の比率は大きく変わり、生理活性の低い非天然型の S-S 結合架橋異性体が主成分として生成する例も多い。最近では、有機化学や遺伝子工学の発展により、蛋白質やポリペプチドの大量合成が行われるようになってきたが、これらの場合にも天然型 S-S 結合を形成する必要があり、どの様な因子が S-S 結合に関与するのかを知ることは、この方面でも重要であり、いくつかの研究が成されている。

本申請者は、分子内に 3 対の S-S 結合を持つ μ -コノトキシンについて検討した。合成した 6 個の Cys 残基をもつ還元型ペプチドを酸化すると、多種類の S-S 結合架橋異性体が生じた。この反応経過を RP-HPLC により分析した結果、反応の初期段階で Cys15-Cys20 に非天然型の S-S 結合が形成し、その結果、多種類の S-S 結合架橋異性体が生じる事が判明した。この反応を適当な酸化還元試薬存在下で行うと、Cys3-Cys15、Cys4-Cys20、Cys10-Cys21 に S-S 結合を有する天然型の異性体をほぼ定量的に生成させる事ができた。ここで、酸化還元試薬の存在下での反応の場合にも、反応の初期段階で Cys15-Cys20 に非天然型の S-S 結合が形成する事から、酸化還元試薬は生成した非天然型の S-S 結合の掛け替え反応を促進したと考えられる。

しかし、以下にも述べるように、酸化還元試薬存在下で反応を行っても、非天然型のS-S結合架橋異性体が大量に生成する場合もある。このような場合には、S-S結合形成の過程における中間生成物や天然型および非天然型を含めた生成物の構造を解析し、天然型異性体の形成を支配する他の因子を探る必要がある。たとえば、26残基中6個のCys残基を含む ω -コノトキシンの場合には、低い反応温度(5°C)や2M(NH₄)₂SO₄のような高い塩濃度で反応を行うことが、天然型異性体の選択性を上昇させるために必要であった。この反応においても、初期段階では μ -コノトキシンのように非天然型のS-S結合が形成し、ついで、その掛け替え反応により天然型異性体が生成した。ここで、反応温度や塩濃度は、掛け替え反応の際の天然型と非天然型S-S結合異性体の平衡に対して影響を及ぼしていた。CDスペクトルの結果から、温度や塩濃度に対して、天然型異性体の収率と構造変化の間に関連が認められた。NMRの解析結果から、塩の添加効果は、天然型異性体の形成の際に生ずる正電荷間の反発を減少させることであると推定できた。21残基中4個のCys残基を含むエンドセリン場合には、酸化還元試薬の有無に関わらず、75対25の比率で天然型と非天然型異性体が生成する。エンドセリンがcystine-stabilized α -helical motifを有していることから、 α -ヘリックスを安定化すると考えられているトリフルオロエタノールの反応溶媒への添加を検討した。CDスペクトルの結果より、トリフルオロエタノールの添加により還元型及び酸化型エンドセリンの α -ヘリックス構造が誘起されている事が判明した。酸化反応液をRP-HPLCで分析した結果、トリフルオロエタノールの添加により天然型異性体の収率が上昇していた。以上のように、天然型異性体の選択性の上昇には、反応条件が生成物の構造の安定性に及ぼす影響を検討することが重要であると結論した。

上述した様に、*in vitro*のS-S結合形成では、非天然型のS-S結合架橋異性体が大量に生成する場合もある。一方、*in vivo*の生合成では、天然型のS-S結合架橋異性体のみが産出される。この理由として、プロ配列の存在、生体内酵素の働き、あるいは非天然型異性体の代謝などが考えられる。プロ配列の寄与を検討してみることは、化学合成においても天然型異性体の選択性の上昇を招く配列のデザインを行う上での情報を得る事になると考えられる。そこで、エンドセリンのN末端にプロ配列の一部であるリジアルギニン(LysArg)ペプチドを延長したKR-エンドセリンとそのアナログのS-S結合形成を検討した。KR-エンドセリンの酸化反応では、天然型異性体の選択性が96%に上昇したが、8位アスパラギン酸(Asp)をアスパラギン残基(Asn)に置換したKR-エンドセリンでは選択性の上昇が認められなかった。CDスペクトルの結果から、(1)カルボキシル基が解離した状態では、エンドセリンより α -ヘリックス含量が増加した構造が誘起されている事、(2)Asp8AsnアナログやKR-エンドセリンの非天然型異性体では、カルボキシル基の解離による構造変化は認められない事が判明した。以上の結果とKR-エンドセリンの天然型異性体のNMRによる構造解析の結果から、Arg(-1)とAsp8の側鎖間に形成された塩結合により α -ヘリックス含量が増加した構造が安定化され、それにより酸化反応において天然型異性体の選択性が上昇したと結論した。生体内でも、プロエンドセリンの段階でArg(-1)とAsp8の側鎖間の塩結合が形成され、構造が安定化することにより天然型異性体のみが生成された可能性が高いと推定した。

論文審査の結果の要旨

蛋白質のアミノ酸配列と立体構造に関して Anfinsen のセントラルドグマが与えられているがどのような高次構造をとるかを予言するものではない。我々は近年の遺伝子操作を用いた大腸菌など細胞を用いた蛋白質の合成や、有機化学を用いたポリペプチドの合成の成功に続き、*in vitro*における立体構造の形成の過程を人為的に制御し天然型の立体構造を得る方法を探求してきた。久保君は生理活性ペプチドを化学合成し、その複数のシステイン残基間のジスルフィド結合の形成条件を検討した。その結果酸化還元試薬の共存により天然型のジスルフィド結合を得る場合も多くあるが、必ずしもそうでないことを示し、天然型および非天然型を含めたジスルフィド結合形成反応の生成物の構造の安定性と、反応条件がそれらに及ぼす影響を検討した。その結果、天然型の持つ立体構造を安定化する条件での酸化反応が天然型のジスルフィド結合様式を持つ生成物を得るために有利であることを示した。これらは予想された結果であるが系統だった実験による解析の初めの例であり、これらの知見は、今後の創薬における薬物設計に役立つのみでなく、蛋白質の高次構造安定化原理の解明に寄与するものである。以上より本研究は薬学博士の授与に十分値するものであると認める。