

Title	Study on Conformational Analysis of Calcitonin and Calcitonin Analogue in Solution
Author(s)	小川, 潔
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46535
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	お 小 川 潔 <small>きよし</small>
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 19679 号
学位授与年月日	平成 17 年 4 月 15 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	Study on Conformational Analysis of Calcitonin and Calcitonin Analogue in Solution (カルシトニンとその類似ペプチドの溶液構造解析)
論文審査委員	(主査) 教授 小林 祐次 (副査) 教授 前田 正知 教授 馬場 明道 教授 小林 資正

論 文 内 容 の 要 旨

カルシウム代謝を調節するホルモンとして知られているカルシトニンは甲状腺より分泌され、骨、腎、腸管に作用し、血漿カルシウムの恒常性の維持にあずかっている。血清カルシウム低下作用は哺乳類の甲状腺より分泌されるカルシトニンよりも魚類、鳥類の鰹後腺より分泌されるカルシトニンの方が極めて強いことが知られており、一次構造上の共通項として 1) 32 個のアミノ酸で構成されている、2) N 末端部分の 1 番目と 7 番目の Cys 残基で S-S 結合を形成している、3) C 末端部位がプロリンアミドである、ことが挙げられる。

全てのカルシトニンはこのように一部共通な性質を持つにもかかわらず、種によって大きく生物活性が異なることに非常に興味を持たれる。これまでにこの生物活性の差を解明するために、アミノ酸の置換、フラグメント化、モデルペプチド等の合成的手法によるアミノ酸配列と活性に関して多くの研究がなされている。さらには Chou-Fasman 法による二次構造予測や CD 測定により二次構造と生物活性との関係についても考察されているが、これらの研究からは種による生物活性の差について明白な結論が得られていない。

こうした背景の中、申請者はカルシトニンの種差による生物活性の違いを立体構造決定から解き明かすことを試みた。まず始めに臨床現場で骨粗鬆症、Paget 病の治療薬として使われているエルカトニンに注目し、NMR とディスタシジオメトリーによる立体構造解析に着手した。前述したように魚類のカルシトニンの生物活性は非常に強く、エルカトニンはウナギカルシトニン (eCT) の誘導體で生物活性が同等であり、S-S 結合を CH₂-CH₂ に置き換えたカルバ体構造を有することから物性上安定であるという大きな利点がある。申請者はエルカトニンの構造決定に成功し、それに基づき天然型 eCT の立体構造解析を実施し、構造比較を行った。これら活性の高いエルカトニン、eCT の構造を明らかにすると同時に経口剤の創製を目指してヒトカルシトニン (hCT) の立体構造解析も行い、カルシトニンの構造活性相関について考察した。

エルカトニンならびに eCT は共に両親媒性ヘリックス構造をとっていることを世界で始めて実験的に証明し、両者の構造比較から N 末端部位での構造変化が認められたが、それは活性に影響を及ぼしていない。さらに両親媒性構造の側鎖を含めた詳細な比較を eCT と hCT について実施した。

これまでに Kaiser らは 8-22 の領域でヘリックスを有していると予想していたが、実際に得られた hCT、eCT の立体構造は 4-20 領域でヘリックス構造を有していることが明らかとなり、ヘリックス領域は Cys で形成される環状部位を含んでいることが新たに証明された。得られた hCT と eCT の溶液構造を詳細に比較し、カルシトニンの構造活

性相関について考察した。両者は共に Leu4-His20 の領域で α -helix 構造を有しており、ヘリックス領域の投影図において親水性領域では一様に親水性アミノ酸が配置されている。一方の疎水性領域では hCT の場合、Tyr12、Phe16、Phe19 の芳香環を有するアミノ酸が同一方向に位置していることが特徴づけられ、両親媒性構造を形成していることが明瞭である。この Tyr、Phe 残基の芳香環が同一な疎水性領域に位置し、立体的にかさ高い状態を形成していることがわかる。これはレセプターバインディングに対して立体障害を引き起こすと考えられ、Leu4-His20 の領域でヘリックス構造を形成しているが故に起こることである。これが eCT、サケカルシトニンと比べて hCT の生物活性の弱い原因と説明できる。一方、高活性を示す eCT は Leu4-Gln20 の領域で親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸が完全に分離した両親媒性構造を有している。ヘリックス投影図上で eCT は Leu4、Val8、Leu8、Leu12、Leu16、Leu19 残基で一様な疎水性面が形成されていることが特徴的である。よって Leu 残基が完全なる疎水性領域を形成し、一定方向に存在していることから両親媒性の分離の度合いが生物活性に重要であると結論できる。

論文審査の結果の要旨

小川潔君はカルシウム代謝を調節するペプチドホルモンであるカルシトニンの構造と活性の相関を解析した。カルシトニンの構造については、そのアミノ酸配列からの二次構造予測により両親媒性ヘリックスの存在が考えられ、そのヘリックスの長さや活性の強さの相関が考察されてきた。小川君は trifluoroethanol (TFE) の 40% 水溶液中でカルシトニンがヘリックス構造をとることを円偏光二色性測定により示した。次に、その溶媒条件を用いて二次元 NMR およびディスタンスジオメトリー法により、ヒトおよびウナギ由来のカルシトニンおよびそれらのアナログの溶液構造を決定した。それらのうち現在臨床現場で骨粗鬆症の治療薬として広く用いられているウナギ由来のカルシトニンのカルバ型誘導体であるエルカトニンは、活性の高いことが知られているウナギカルシトニンと比較すると、S-S 結合の置き換えによる構造の安定性といった利点はあるが、活性の強度やヘリックス構造に大きな相違のないことを示した。活性の低いヒトカルシトニンでは前二者、ならびに Phe、Tyr 基を Leu 基に置換したヒトカルシトニン誘導体と比較して、その両親媒性ヘリックスの長さには違いがないが、疎水性領域であるべき部位に一部親水性基を含み、さらに表面は芳香環による凹凸があり、前二者のように Leu 基の側鎖が一様に疎水表面を形成するといったことは無かった。これらの実験事実より小川君はカルシトニンの活性はそのヘリックスの長さではなく、側鎖の両親媒性の分離の度合いによることを示した。この発見は創薬への大きな貢献が期待される。以上により、小川君の本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認められる。