OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Synthetic study of protein and selenoprotein based on selenium chemistry
Author(s)	武居, 俊樹
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69343
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名（　武居　俊樹　）	
論文題名	Synthetic study of protein and selenoprotein based on selenium chemistry (セレンを用いたタンパク質とセレノタンパク質の合成研究)

論文内容の要旨

セレノシステイン(Sec, U)を含むタンパク質(セレノタンパク質)は、セレンの持つ高い抗酸化能により活性酸素種の無毒化をはじめとした酸化還元反応に関わる。セレノタンパク質の生合成には、Sec導入のために特殊な伸長因子やmRNA上の配列が必要である。このため、組換え法により機能解析に充分な量のセレノタンパク質を得ることが困難となっている。化学合成法は、その供給法として有望視されているが、自在にSec含有ペプチドを合成できる段階にはない。筆者は、これまで化学合成により短いSec含有ペプチドの合成を行ってきた。そこで本論文では、より長鎖のセレノペプチドの合成を行い、適切な合成条件を確立するとともに、得られたペプチドを用いてセレノインスリンの合成を行った。また、近年、タンパク質合成の視点からセレノエステルの高い反応性が注目されている。そこで、セレンの有用性を拡張するため、ペプチドセレノエステルを用いた新たなセグメント縮合法の開発を行った。

1) セレノインスリンの化学合成

インスリンは21残基のA鎖と30残基のB鎖からなるヘテロ二量体タンパク質で、A鎖内に1つ、A-B鎖間に2つのSS結合を有する。インスリンの化学合成ではCysの保護基の除去と酸化反応を繰り返し、段階的に SS 結合を形成させるのが一般的だが、工程数が多く煩雑であり、しばしば低収率となる。そこで、分子間のSS結合の1つをSecが形成するジセレニド (SeSe)結合に置換したセレノインスリンをデザインし、SeSe結合形成の選択性を利用した合成戦略を立案した。その結果、合成した両鎖を用いた単純な酸化的フォールディングのみで天然の架橋様式をもつセレノインスリンを得ることに成功した。合成されたセレノインスリンは天然のインスリンと同等の生理活性を有し、かつ半減期が8倍の長寿命アナログであることも示された。

2) セレノエステルを用いたone-pot four segment ligation法の開発

タンパク質の化学合成は、全長配列をいくつかのペプチドセグメントに分割して調製した後、それらを化学選択的に縮合するセグメント縮合法により達成される。セグメント縮合法に共通する問題点として、セグメント縮合を繰り返す場合、縮合段階ごとに精製が必要になる点がある。精製段階は、カラムへのペプチドの吸着により収率が大きく低下してしまう。筆者らの研究室では、最近アリールチオエステルとアルキルチオエステルの反応性の差を利用して、3つのセグメントを連続的にワンポットで縮合する方法を開発した。そこでアリールセレノエステルの高い反応性に着目し、上記のワンポット法にセレノエステルを組み合わせたところ、4つのセグメントを連続的に縮合する手法の開発に成功した。この方法を用いて全長153残基からなるヒトスーパーオキシドディスムターゼの合成に成功した。

以上の成果は、セレノタンパク質の合成や機能解明の一助となるのみならず、タンパク質合成の発展にも寄与することができると考えられる。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　武居俊樹　）	
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	北條　裕信
	副 査　教授	梶原　康宏
	副 査　教授	高尾　敏文
	副 査　東海大学理学部教授	岩岡　道夫

論文審査の結果の要旨

セレンは、硫黄と同族のカルコゲンである。チオールに比べてセレノールは、酸化されやすく、また高い求核反応性を持つ。武居君はこのようなセレンの持つ特異な化学的性質をタンパク質の機能や化学合成研究に利用すべく、以下の２つの研究を行った。

１つ目の研究では、ジセレニド結合がジスルフィド結合よりも優先して生成する性質を利用して、３つのジスルフィド結合を分子内にもつインスリン誘導体の合成をおこなった。インスリンは、糖尿病の症状を緩和する必要不可欠な薬であるが、化学的に合成し研究を進めるには、分子内に３つあるジスルフィド結合を特異的に形成させることが必要である。そこで、セレノシステインを２カ所に入れ、選択的にジセレニド結合を形成させることで、残り２カ所のジスルフィド結合を特異的に形成させ、インスリンの合成に成功した。また、東海大学と東北大学との共同研究で、合成インスリンが天然のインスリンと同等の構造と活性を有していることを示し、また、インスリン分解酵素に対する分解耐性をもつという興味深い知見を得た。

２つ目はペプチドセレノエステルのタンパク質合成への応用研究である。まず、既知のチオエステル合成法を用いてＣ末端セレノエステルを持つペプチドを効率よく固相合成する方法を確立した。ついで、セレノエステルと芳香族チオエステルとの反応性に大きな差を見出すことに成功した。これにより、セレノエステル、チオフェニルエステル、アルキルチオエステルをもつペプチドとその反応性の差を利用し、Ｎ末端側からＣ末端側へと順次ワンポットで連結する新規な方法を開発した。この反応のオリジナルは、既知の銀を利用する保護ペプチドの連結反応であるが、セレノエステルを利用することにより、４つのペプチドセグメントを連続的に縮合することができるようになり、158 残基からなるスーパーオキシドジスムターゼの全合成に成功した。化学合成したこのジスムターゼには、亜鉛と銅を触媒部位に導入することで高い酵素活性を示すことを確認した。この実験により、アミノ酸 200 残基程度までであればタンパク質が比較的容易に合成できるようになったと考えられる。

上記の成果は、セレン含有ペプチドの合成、及びタンパク質の化学合成におけるセレンの利用に関して新たな知見をもたらしている。

よって本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。