

学位論文の要旨

論文題目 新規視床下部分泌性小タンパク質の合成法の確立

広島大学大学院総合科学研究科
総合科学専攻
学生番号 D134082
氏名 益田 恵子

論文の要旨

序論

Neurosecretory protein GL (NPGL) 及び *Neurosecretory protein GM (NPGM)* は、鳥類の視床下部漏斗部より初めて発見された新規遺伝子であり、脊椎動物に広く存在することから重要な生理機能を担うことが示唆されている。*NPGL* 及び *NPGM* は分泌性小タンパク質の前駆体をコードすることが示唆されており、成熟 *NPGL* 及び *NPGM* は約 80 アミノ酸残基からなり、活性や立体構造形成に重要な C 末端アミド化やジスルフィド結合を有していることが示唆される。しかしながら、内因性の *NPGL* 及び *NPGM* は同定されておらず、それらの生理機能も明らかになっていない。*NPGL* 及び *NPGM* の生理機能を解明するためには、行動薬理的及び形態学的解析等に用いるための大量のペプチドが必要であるが、最も一般的なペプチド合成法である固相法では 50 残基以上の長鎖ペプチドを合成することは極めて困難である。そこで本研究では、分子生物学的手法から有機化学的手法まで様々な手法を用いて、rat *NPGL* (r*NPGL*)、rat *NPGM* (r*NGPM*)、chicken *NPGL* (c*NPGL*)、chicken *NPGM* (c*NPGM*) の合成法を確立することを目的とした。

第 1 章 大腸菌を用いた組換え発現系による調製

初めに、長鎖ペプチドの調製が容易な大腸菌を用いた組み換え発現系による調製を試みた。その際、発現ベクターと宿主大腸菌株の組み合わせを検討した。また、大腸菌では C 末端のアミド化は生じないため、アミド化ドナーとなる Gly 残基を C 末端に付加したものを発現させ、その後アミド化酵素による C 末端のアミド化を試みた。

まず、発現効率の高い T7 プロモーターをコードする pETIK ベクターを用いて r*NPGL*-Gly の発現を試みた。その結果、最も一般的なプロテアーゼ欠損株である BL21 (DE3) 株において、r*NPGL*-Gly の高い発現が認められた。しかしながら、不溶性の封入体を形成していたため、封入体から r*NPGL*-Gly を精製した。次に、r*NPGM*-Gly は、低温ショックにより発現を誘導する *cspA* プロモーターと、バクテリア由来のシャペロンである Trigger Factor (TF) をコードする pCold TF DNA ベクターを用いて可溶化発現を試みた。その結果、ジスルフィド結合形成を妨げるチオレドキシ還元酵素とグル

タチオン還元酵素を欠損しており、ジスルフィド結合形成を促すイソメラーゼ DsbC を細胞質に発現するように改良された株である SHuffle 株において、rNPGM-Gly の可溶化発現が認められた。そして、可溶性画分から rNPGM-Gly を精製することができた。最後に、アミド化酵素により C 末端のアミド化を試みたが、酸化物や脱水物といった副生成物の混入を避けられなかった。

第 2 章 Intein の原理を用いた手法による調製

アミド化酵素を用いない手法で調製するために、Intein のタンパク質スプライシング (Extein-Intein-Extein からなる前駆体タンパク質から、Intein がスプライシングを生じさせて抜け落ち、両端の Extein が縮合される反応) の原理を用いた 2 通りの手法により、rNPGM の調製を試みた。

1 つ目に、目的ペプチドの C 末端に Intein を融合したタンパク質に、アンモニウム塩とジチオスレイトール (DTT) を添加して目的ペプチドの C 末端をアミド化する手法による調製を試みた。まず、大腸菌を用いた組み換え発現系により、rNPGM の C 末端に Intein を、N 末端に TF を融合したタンパク質を可溶化発現させた。次に、炭酸水素アンモニウムと DTT を添加して Intein を切り離し、プロテアーゼを用いて TF を切断した。しかしながら、C 末端がアミド化されているか否かは質量にして 1 の差であり、そのわずかな差の判別が困難であった。また、Intein の非特異的な切断も見られ、C 末端がアミド化されていない rNPGM の混入が懸念された。

2 つ目に、タンパク質スプライシングと同様の反応機構で、C 末端にチオエステル構造を有するペプチド (ペプチドチオエステル) と N 末端に Cys 残基を有するペプチド (Cys ペプチド) を縮合する手法である Native chemical ligation (NCL) 法による調製を試みた。rNPGM の 3 つの Cys 残基のうち N 末側から 2 番目の Cys 残基を縮合部位とし、N 末側の 27 残基をペプチドチオエステルとして、C 末側の 61 残基を Cys ペプチドとして、それぞれ調製を試みた。ペプチドチオエステルは、上述の Intein を用いた C 末端アミド化法と類似の手法により、Intein との融合タンパク質に 2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウムを添加して調製した。C 末側の 61 残基は、アミド化用レジンと、ペプチドの凝集を抑制するシュードプロリンジペプチドを用いた固相法により、確実に C 末端がアミド化されたものとして合成した。それらを NCL 法により縮合したところ、88 残基の rNPGM を調製することができた。調製に要する日数は約 10 日であり、収量は 3 mg であった。

第 3 章 マイクロウェーブを用いた固相法による調製

より簡便且つ迅速に、高収率で NPGL 及び NPGM を合成するために、近年注目されているマイクロウェーブを用いた固相法による合成を試みた。マイクロウェーブを用いると合成効率の飛躍的な向上が期待できるが、同時に副反応のリスクも高まるため、各種合成条件の検討を行った。

まず、rNPGL の合成において、レジンや縮合剤、各反応の温度や時間等について、比較検討を行った。その結果、レジンは、ペプチドの凝集を抑制する 100%ポリエチレングリコール製レジンが適していた。縮合反応は、反応性の高い HATU を用いて、ラセミ化のリスクの低い 50°C-5 分の条件が適していた。脱保護反応は、反応性の高い 40% ピペリジンにアスパルチミド形成を抑制する 0.1 M HOBt を用いて、50°C-3 分の条件が適していた。そして、同様の方法で rNPGM、cNPGL、cNPGM も合成することができたが、rNPGM の収率が低かった。

そこで、rNPGM の収率向上を試み、2 通りの手法を検討した。1 つ目に、疎水性ペプチドの凝集を抑制して溶解性を飛躍的に向上させる手法である *O*-アシルイソペプチド法による収率向上を試みた。*O*-アシル構造は中性条件下におくまで維持することができるため、合成時のみならず精製時にもその凝集抑制効果が期待できると思われた。しかしながら、*O*-アシルイソジペプチドを導入後は反応性の穏やかな脱保護条件に変える必要があったため、親水性の *O*-アシル型 rNPGM を合成することはできたものの、その収率は *O*-アシルイソジペプチドを用いずに合成した時を下回った。2 つ目に、部分配列を先に調製して収率向上を試みた。rNPGM の N 末端領域の 6 残基と中央部の 5 残基を先に調製し、アミノ酸と同じ要領で縮合させることで、合成効率向上のみならず合成時間短縮も期待できると考えた。しかしながら、rNPGM を合成することはできたものの、顕著な収率向上は認められなかった。

最後に、シュードプロリンジペプチドを用いて、rNPGL、rNPGM、cNPGL、cNPGM の収率向上を試みた。rNPGL と rNPGM は 5 ケ所、cNPGL は 3 ケ所、cNPGM は 2 ケ所をシュードプロリンジペプチドに置換して合成した結果、rNPGL と rNPGM は約 2 倍、cNPGM は約 5 倍に収率が向上した。いずれも合成及び精製に要する日数は約 5 日であり、rNPGL、rNPGM、cNPGL、cNPGM の収率はそれぞれ 20%、4%、12%、30% であった。

第 4 章 ジスルフィド結合の解析及び形成方法の検討

最後に、合成した NPGL 及び NPGM のジスルフィド結合形成を試みた。架橋の形成を試みる前に、Cys 残基を 3 つ持つ rNPGM の架橋位置を解析した。哺乳類培養細胞である Chinese Hamster Ovary 細胞に産生させた rNPGM や、第 1 章において大腸菌 SHuffle 株に産生させた rNPGM-Gly を用いて、プロテアーゼ消化と質量分析を行った。その結果、N 末側の 2 つの Cys 残基間で架橋されていることが明らかになった。

続いて、それぞれの架橋形成を試みた。いずれも疎水性が高いため溶媒組成を主に検討した結果、rNPGL、cNPGL、cNPGM は、50%アセトニトリル中でグルタチオンにより架橋させることができた。より疎水性の高い rNPGM は 50%アセトニトリル中でも溶解しなかったが、ジメチルスルホキシド酸化法により架橋させることができた。いずれも架橋及び精製に要する日数は約 4 日であり、rNPGL、rNPGM、cNPGL、cNPGM の収率はそれぞれ 30%、20%、36%、30% であった。

結論

本研究により、約 10 日間で、rNPGL 30 mg、rNPGM 5 mg、cNPGL 20 mg、cNPGM 50 mg を合成できる系を確立することに成功した。ラットやニワトリを用いた脳室内投与実験における必要ペプチド量は、単回投与では約 1 mg、2 週間の慢性投与では約 30 mg である。これまでは 1 mg の調製さえも極めて困難であったが、本研究により単回投与実験のみならず慢性投与実験も遂行できるようになり、NPGL 及び NPGM の生理機能の検定が初めて可能になった。そして現在、ラットやニワトリを用いた脳室内慢性投与実験により、NPGL 及び NPGM の生理機能が明らかになりつつあり、熱産生に關与する褐色脂肪組織の機能低下や、白色脂肪細胞や肝臓における脂肪蓄積に關与することが示唆されている。NPGL 及び NPGM は中枢に局在する因子であるが、褐色脂肪組織へ投射する交感神経の活動を抑制することにより、末梢での脂肪蓄積を制御している可能性が示唆されている。今後、合成した NPGL 及び NPGM が受容体探索にも用いられ、より詳細な生理機能や作用機序が明らかになると期待される。

本研究により、NPGL 及び NPGM を大量に合成することができ、上述のように活性も見られた。しかしながら、内因性の NPGL 及び NPGM が同定されていないため、合成物の活性や立体構造が天然物と同様であるかは明らかでない。内因性の NPGL 及び NPGM が同定され次第、二次構造や三次構造、活性の程度について比較解析を行う必要がある。また、代替ペプチドの開発も必要であると考えられる。確立した合成系はマイクロウェーブという特殊な技法を用いるため、専用の合成機が必要である。また、NPGL 及び NPGM の溶解性の低さは、扱いの難しさの原因となり再現性の高い解析結果を得る上で不都合である。天然物と同等の活性を發揮し、より合成や扱いが容易な代替ペプチドが得られれば、短期間に低コストで必要量を確保することができ、NPGL 及び NPGM の生理機能解析の飛躍的な進展に繋がるはずである。