

新規視床下部分泌性小タンパク質の合成法の確立

益 田 恵 子

広島大学大学院総合科学研究科

Synthesis of Novel Neurosecretory Proteins

Keiko MASUDA

Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

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、行動薬理学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性発現を試みた。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ヶ所、cNPGLは3ヶ所、cNPGMは2ヶ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、cNPGL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、熱産生に関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発揮し、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。