

氏 名	まえ だ よし たか 前 田 能 崇
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 506 号
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	薬学研究科創薬科学専攻
学位論文題目	Oligopeptide-Mediated Helix Stabilization of Peptides and its Application to Prion Protein Peptides (オリゴペプチドによるペプチドのヘリックス構造の安定化とプリオンタンパクペプチドへの応用)
論文調査委員	(主 査) 教授 中川 照 眞 教授 半田 哲 郎 教授 加藤 博 章

論 文 内 容 の 要 旨

プリオン病, アルツハイマー病, パーキンソン病, 筋萎縮性側索硬化症等の中樞神経変性疾患は, タンパク質の α ヘリックス構造の減少および β シート構造の増加に伴って形成されるアミロイド線維が原因となって発症すると考えられている。これらの疾患の治療戦略の一つとして, 薬物を用いて疾患原因タンパク質の α ヘリックス構造を安定化させ, β シート構造の増加を阻害する方法が考えられている。タンパク質の α ヘリックス構造は, その構成アミノ酸残基による静電および疎水性相互作用等により安定化されている。これらはタンパク質分子内の相互作用であるが, 薬物とタンパク質との分子間においても同様の α ヘリックス構造の安定化作用が生じうると考えられる。本研究では, プロテアーゼによる分解を受けにくいとされるオリゴペプチドを用いて, 疾患原因タンパクモデルペプチドの α ヘリックス構造の安定化のためには, どのようなアミノ酸配列を有するオリゴペプチドが有効であるか検討した。本研究は中樞神経変性疾患の治療法を構築する際に有用な指標となると考えられる。

第1章 ペンタペプチド KIFMK によるナトリウムチャンネル不活性化ゲートペプチドの二次構造変化に関する研究

ナトリウムチャンネルの α サブユニットのドメインⅢとドメインⅣとを細胞質側で結ぶⅢ-Ⅳlinkerが不活性化ゲートとして機能し, その中の疎水性アミノ酸 IFM がナトリウムイオンの通過孔を塞ぐことにより不活性化が起こるとされている。Ⅲ-Ⅳlinker 中のアミノ酸残基と同配列を持つモデルペプチド MP-1A (Gly1484-Lys1495; Ac-GGQDIFMTEEQK-NH₂ (rat brain ILA)) を合成し, ペンタペプチド KIFMK との相互作用を NMR および CD スペクトルを用いて検討した。その結果, 80%CF₃CH₂OH (TFE) 中において, KIFMK の添加により MP-1A の形成する α ヘリックス構造の増加が確認された。また, MP-1A 中に存在する3個の酸性アミノ酸残基 (Asp1487, Glu1492, Glu1493) を中性アミノ酸残基にそれぞれ置換することにより, KIFMK の両端に存在する塩基性アミノ酸 Lys と MP-1A 中の Asp1487 および Glu1492 が静電相互作用することにより α ヘリックス構造を安定化していると判明した。

第2章 ナトリウムチャンネル不活性化ゲートに対するペンタペプチド KIFMK およびその関連ペプチドのヘリックス構造安定効果に関する研究

オリゴペプチドによるナトリウムチャンネル不活性化ゲートペプチドの形成する α ヘリックス構造の安定化作用に対するアミノ酸配列依存性を, 80%TFE 中において KIFMK および MP-1A 関連ペプチドを用いて検討した。その結果, オリゴペプチドの両端は Lys であること, この Lys 残基には含まれた3個のアミノ酸残基は IFM であること, また, ナトリウムチャンネル不活性化ゲートペプチドが IFMT 配列を有する場合, その α ヘリックス構造が最も効果的に安定化されることが判明した。

第3章 水性溶媒中におけるモデルペプチドに対するオリゴペプチドによるヘリックス構造安定化に関する研究

水性溶媒中においてオリゴペプチドによるモデルペプチドの α ヘリックス構造の安定化作用を確認するため, 水性溶媒中で α ヘリックス構造を形成すると考えられるモデルペプチド EK17 (Ac-AEAAAEEAAKAAAACA-NH₂) および

IFM17 (Ac-AEAAAAEIFMKAAAAKA-NH₂) を合成し、オリゴペプチド EAAAK, KAAAE, EIFMK, KIFME との相互作用を検討した。その結果、リン酸緩衝液中においてオリゴペプチド EIFMK および KIFME によるモデルペプチド EK17 の α ヘリックス構造の安定化作用が確認できた。このことより、オリゴペプチドによるモデルペプチドの α ヘリックス構造の安定化には、モデルペプチドが α ヘリックス構造を形成していること、オリゴペプチドとモデルペプチドが共に疎水性度の高いアミノ酸残基を有していることが重要であると判明した。

第4章 プリオンタンパクモデルペプチドの二次構造に対する界面活性剤の影響に関する研究

プリオン病は、約250残基の正常なプリオンタンパク (PrP^C) の β シート構造が増加することにより生じる感染型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) が線維化して発症するとされている。PrP^C から PrP^{Sc} への変化に伴い β シート構造に変化すると考えられている PrP (129-154) 領域および PrP^C から PrP^{Sc} への変化を介在するとされる protein X の結合部位近傍に位置する PrP (192-213) 領域の構造的性質を調べるために、これらの領域のペプチドに対する種々の界面活性剤の影響を検討した。PrP (129-154) は、界面活性剤の種類および濃度に関わらず主に β シート構造を形成しており、PrP^C から PrP^{Sc} への変化を促進する領域であることがわかった。また、PrP (192-213) は、界面活性剤の種類に関わらず α ヘリックス構造の増加が観測され、Protein X との結合に対して構造の多様性を持ち合わせていることがわかった。

第5章 プリオンタンパクモデルペプチドに対するオリゴペプチドによるヘリックス構造安定化に関する研究

プリオンタンパクモデルペプチドとして PrP (129-154) および PrP (192-213) を用い、それらの領域中のアミノ酸配列を含み、両端に酸性もしくは塩基性アミノ酸を有するオリゴペプチドを作用させることによるモデルペプチドの二次構造変化を検討した。90% TFE 中において、PrP (129-154) の形成する α ヘリックス構造を安定化させるのに有効なオリゴペプチドは EFGNK と EYYEK であった。一方、PrP (192-213) については試みたオリゴペプチドは全て PrP (192-213) の α ヘリックス構造を不安定化させたが、特に KNFTK と KEVVK の作用が顕著であった。PrP (192-213) 領域の α ヘリックス構造の不安定化は PrP^C と Protein X との結合を抑制すると考えられる。よって、これらのオリゴペプチドは PrP^C の PrP^{Sc} への構造変化を阻害できると考えられる。

以上の研究により、オリゴペプチドによるモデルペプチドの α ヘリックス構造の安定化には、オリゴペプチドが3残基の疎水性度の高いアミノ酸配列を含み、その両端に塩基・匝もしくは酸性アジ酸残基を有すること、さらに、このようなオリゴペプチドとモデルペプチドとの疎水性相互作用が重要であると判明した。

また、著者は PrP^C から PrP^{Sc} への変化に際して β シート構造に変化しうる領域および Protein X の結合部位近傍領域のモデルペプチドに対して、各々の α ヘリックス構造を安定化および不安定化させるオリゴペプチドを見出した。これらのオリゴペプチドをリード化合物としたプリオン病の発症および病状の進行を効果的に抑制できる医薬品の分子設計が可能になると考えられる。また、プリオン病と同様に β シート構造の増加に伴って形成されるアミロイド線維が原因となって発症するとされるアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症等の中樞神経変性疾患に対しても、本研究の手法が応用できると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、タンパク質を構成するペプチドの α ヘリックス構造に対する合成オリゴペプチドによる安定化の条件を検討し、得られた知見をプリオンタンパクに適用することにより、プリオン病の原因とされる正常なプリオンタンパク (PrP^C) から感染型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) への変換を阻害しうるオリゴペプチドを見出したものである。

まず、ナトリウムチャンネルの不活性化機構を担う III - IV linker 中のアミノ酸残基と同配列を有するナトリウムチャンネル不活性化ゲートペプチド MP-1A (Gly1484-Lys1495; Ac-GGQDIFMTEEK-NH₂) とペンタペプチド KIFMK との相互作用を NMR および CD スペクトルを用いて検討した。その結果、80% CF₃CH₂OH (TFE) 中において、KIFMK により MP-1A の α ヘリックス構造の増加が確認された。また、MP-1A 中に存在する3個の酸性アミノ酸残基 (Asp1487, Glu1492, Glu1493) を中性アミノ酸残基にそれぞれ置換することにより、KIFMK の両端に位置する塩基性アミノ酸 Lys と MP-1A 中の Asp1487 および Glu1492 が水素結合および静電相互作用することにより α ヘリックス構造を安定化していることが判明した。

オリゴペプチドによるナトリウムチャンネル不活性化ゲートペプチドの α ヘリックス構造の安定化作用に対するアミノ酸配列依存性を、80%TFE中においてKIFMKおよびMP-1A関連ペプチドを用いて検討した。その結果、オリゴペプチドの両端はLysであること、このLys残基には含まれた3個のアミノ酸残基はIFMであること、また、ナトリウムチャンネル不活性化ゲートペプチドがIFMT配列を有する場合、その α ヘリックス構造が最も効果的に安定化されることが判明した。

次に、水性溶媒中においてオリゴペプチドによるモデルペプチドの α ヘリックス構造の安定化作用を確認するため、水性溶媒中で α ヘリックス構造を形成すると考えられるモデルペプチドEK17 (Ac-AEAAAAEAAAKAAAKA-NH₂) およびIFM17 (Ac-AEAAAAEIFMKAAAKA-NH₂) を合成し、オリゴペプチドEAAAK, KAAAE, EIFMK, KIFMEとの相互作用を検討した。その結果、リン酸緩衝液中においてオリゴペプチドEIFMKおよびKIFMEによるモデルペプチドEK17の α ヘリックス構造の安定化作用が確認できた。このことより、 α ヘリックス構造の安定化には、モデルペプチドが α ヘリックス構造を既に形成していることオリゴペプチドとモデルペプチドが共に疎水性の高いアミノ酸残基を有していることが重要であると判明した。

一方、プリオン病は、約250残基から成るPrP^Cの β シート構造が増加することにより生じるPrP^{Sc}が線維化して発症するとされている。PrP^CからPrP^{Sc}への変換に際して β シート構造に変化するとされるPrP (129-154) 領域およびPrP^CからPrP^{Sc}への変換を介在するとされるProtein X結合部位近傍に位置するPrP (192-213) 領域の構造的性質を調べるために、これらの領域のペプチドに対する種々の界面活性剤の影響を検討した。PrP (129-154) は、界面活性剤の種類および濃度に関わらず主に β シート構造を形成しており、この領域はPrP^CからPrP^{Sc}への変化を促進することが判明した。また、PrP (192-213) は、界面活性剤の種類に関わらず、濃度が上昇するに従って α ヘリックス構造の増加が観測され、Protein Xとの結合に対して構造の多様性を持ち合わせていることが判明した。

更に、プリオンタンパクモデルペプチドPrP (129-154) およびPrP (192-213) に対して、それらの領域中のアミノ酸配列を含み、両端に酸性もしくは塩基性アシ酸残基を有するオリゴペプチドを作用させることによる構造変化を検討した。90%TFE中において、PrP (129-154) の形成する α ヘリックス構造を安定化させるのに有効なオリゴペプチドはEFGNKとEYYEKであった。一方、PrP (192-213) については試みたオリゴペプチドは全てPrP (192-213) の α ヘリックス構造を不安定化させたが、特にKNFTKとKEVVKの作用が顕著であった。よって、EFGNKとEYYEKはPrP^Cの α ヘリックス構造を安定化することにより、また、KNFTKとKEVVKはPrP^CとProtein Xとの結合を抑制することにより、PrP^CのPrP^{Sc}への変換を阻害できると考えられる。

以上、本研究はペプチドの α ヘリックス構造の安定化作用を有するオリゴペプチドの条件を提示すると共に、PrP^CからPrP^{Sc}への変換を阻害するオリゴペプチドを見出し、プリオン病に対する薬物探索の方法論を確立するだけでなく、他のコンフォメーション病と称されるアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症等の中樞神経変性疾患に対する薬物探索においても重要な知見を与えることが期待できるものである。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値のあるものと認める。

さらに平成15年2月20日論文内容とそれに関連した事項につき諮問を行った結果優秀と認定した。