

氏 名	小 山 信 行
学位の種類	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 693 号
学位授与の日付	平 成 15 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Synthetic Studies on Biologically Active Peptides by Recombinant DNA & Bio-organic Methods (遺伝子組換え技術と生物有機化学的手法を用いた生理活性ペプチドの合成 研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 藤 井 信 孝 教 授 富 岡 清 教 授 伊 藤 信 行

論 文 内 容 の 要 旨

近年、ゲノム創薬研究の一環として、生体内にごく微量にしか存在しない生理活性蛋白質やペプチドの大量に調製可能な方法論の確立が望まれている。これら遺伝子組換え産物は、基礎医学研究に有用であるばかりではなく、創薬研究にも今や必要不可欠なものになってきている。著者は、組換え蛋白質の大量調製法と化学的翻訳後修飾法を基盤にした新しい生理活性ペプチドの合成システムの確立を目的にした研究を行った。

(1) 遺伝子組換え型 FGF 9 の大量調製法の確立と結晶化

まず、著者は、巨核球の増殖を促進し、血小板増加作用を有する組換え型ヒト線維芽細胞増殖因子 9 (FGF 9) の大量調製法を確立し、薬効評価への道を拓いた。大腸菌内で発現した FGF 9 のヘパリンへの高い親和性を利用した高純度、大量調製法を研究し、更に蒸気平衡法によって本物質の結晶化に成功した。

(2) 遺伝子組換え型生理活性ペプチドの新規合成システムの開発

次に、著者は、上記 FGF 9 の大量調製法を基にした生理活性ペプチドの新規合成システムに検討を加えた。蛋白質の場合と異なり、ペプチドを大腸菌内で直接発現させるとプロテアーゼによる分解が激しく、その合成が困難である。従って、生成した目的ペプチドを保護するために融合蛋白質の形で発現させるのが一般的である。融合蛋白質から目的ペプチドの特異的切り出しには、BrCN, factor Xa 等の化学的、酵素的な手法が用いられているが、BrCN の場合にはメチオニン残基を含むペプチドには用いることが出来ないし、factor Xa の場合には切り出し時の収率等に問題がある。著者は、S-シアノ化試薬の蛋白質中のシステイン残基に対する特異的反応性に着目し、蛋白質のフラグメンテーションに応用することとした(図 1)。すなわち、システイン残基を介してアミノ基側に目的ペプチドをカルボキシル基側に適当な保護蛋白質をつないだ融合蛋白質を遺伝子組換え法で作製すれば、上記試薬で N 末端側から目的ペプチドを特異的に切り出すことが出来る。本法についてモデルペプチドとして insulinotropin を選んで検討を開始した。insulinotropin は別名 glucagon-like peptide 1 (7-37) と呼ばれており、31 アミノ酸からなるペプチドである。保護蛋白質としては、大腸菌で安定に高発現し、その精製が容易なものが望ましい。そこで、FGF 9 と比較して、その発現量が 5 倍以上高い basic FGF 変異体 CS23 を用いることとした。組換え融合蛋白質 (insulinotropin-CS23) は、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーで効率良く精製することが出来た。次に融合蛋白質を S-シアノ化反応後、アルカリ条件下にて切断反応に付したところ、90% 以上の好収率で生理活性を有する、N 末端にメチオニンの付加した insulinotropin (Met-insulinotropin) を切り出すことに成功した。すなわち、システイン特異的 S-シアノ化反応が、組換え融合蛋白質を原料とする生理活性ペプチドの合成に適用できる有用な方法であることを明らかにした。メチオニン残基の除去に関しては、すでに確立された組換え蛋白質からの N 末端メチオニン除去法をペプチド合成に応用することとし、生理活性ペプチドの活性発現に必須の C 末端アミド化に関しても、S-シアノ化反応後の切り出しにアンモニアを用いる方法を適用することにより解決した。

(3) オーファン受容体リガンドペプチド合成への応用

次に、新たに発見された3つのオーファン受容体リガンドペプチド、prolactin-releasing peptide (PrRP: 31アミノ酸残基)、metastin (54アミノ酸残基)、apelin (36アミノ酸残基)の合成に本ストラテジーを適用し、その有用性を立証することとした(図2)。

図1

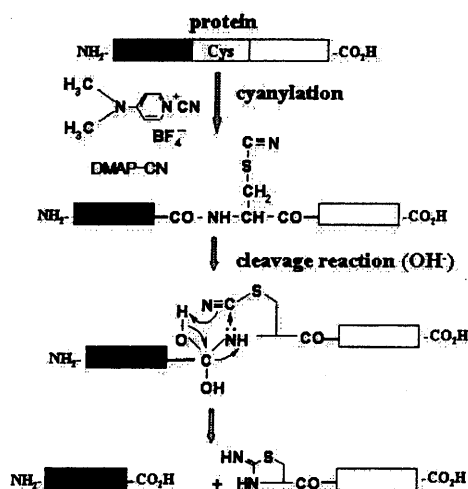
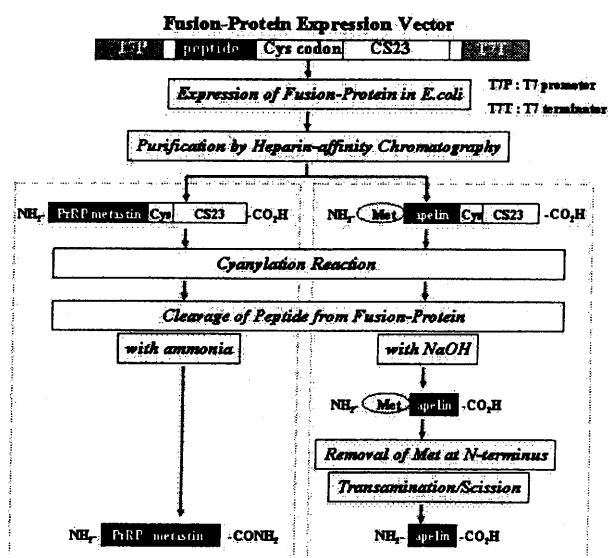


図2



PrRPとmetastinはそのC末端に活性に必須なアミド基を有するので、S-シアノ化反応後、切り出しにアンモニアを用いて調製した。組換え型apelinには、insulintropinと同様に余分なメチオニンがN末端に付加されていた(Met-apelin)。そこでS-シアノ化反応にてMet-apelinを切り出した後、アミノ基転移反応によってこのメチオニンの特異的に除去し、apelinを合成することに成功した。本システムによって大量に得られた3種のオーファン受容体リガンドペプチドが、その生体内での機能の解明に大いに役立っていることは意義深い。

以上、著者は、組換え蛋白質の大量調製法とS-シアノ化反応をベースとし、融合蛋白質からの目的ペプチドの切り出し法、N末端メチオニンの除去法、アンモニア処理によるアミド化法を組み合わせ、遺伝子組換え型生理活性ペプチドの新しい大量合成システムを開発することに成功した。本システムは、化学合成では問題の多いかなり大きな分子量のペプチドの大量調製に特に有効である。本研究は、遺伝子組換え蛋白質やペプチドを合成する際に有用な基礎的知見を提供するものと判断される。

論文審査の結果の要旨

ゲノム科学の進展に伴い、基礎医学研究の実験材料としてまた創薬研究のリード化合物として生理活性ペプチド・蛋白質の重要性が増している。低分子ペプチドの合成には化学合成法が有効であるが、中程度(50~100アミノ酸)のサイズのペプチド・蛋白質の生産には遺伝子組換え法がコストパフォーマンスの点から有利である。しかしながら遺伝子組換え蛋白質の合成においては、1) 不活性封入体の形成、2) 翻訳後修飾、3) 開始コドンに起因するN-末端メチオニンの付加、4) 蛋白質分解酵素による細胞内分解、5) 低分子ペプチドの合成の困難さ等の問題点を残している。

申請者は、特に細胞内蛋白質分解酵素に起因する低分子量ペプチドの大量調製の困難さの克服に焦点を宛てて、組換え蛋白質の大腸菌生合成システムと翻訳後化学修飾法を共役させることにより、効率的な生理活性ペプチドの合成システムの開発を目的とした研究を行った。

申請者はまず、遺伝子組換え繊維芽細胞成長因子(FGF 9)の大腸菌発現系の構築と細胞内封入体からの効率的精製法に検討を加え、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーを活用した高純度FGF 9の大量調整法を確立し、結晶体として得ることに成功した。

次に、FGF誘導体(CS23)を融合蛋白質として活用した低分子ペプチド・蛋白質の合成法に検討を加えた、すなわちCS23を融合蛋白質(保護蛋白質)として用いることにより、1) 菌体中での発現効率の向上、2) 低分子ペプチドの生合

成過程での分解抑制・3) ヘパリンアフィニティークロマトによる精製効率の向上を計り、遺伝子組換え低分子ペプチド・蛋白質の生産上問題となる三つの問題点を解決した。次に、融合蛋白質から目的のペプチド・蛋白質を高収率かつ高選択的に切り出すことが必要となる。この点に関して、申請者はシステインのチオール基に対する1-Cyano-4-(dimethylamino)pyridine tetrafluoroborateの特異的なS-シアノ化反応とその結果生成するS-シアノシステイン残基のアルカリ分解反応に着目して、融合蛋白質から低分子ペプチドの効率的な切り出しに応用することとした。本法はアルカリ分解の際に、アンモニアを用いることにより、C-末端アミド型構造を有する生理活性ペプチドの合成にも適用できることから簡便かつ有用性の高い方法である。さらに申請者は上記の方法をprolactin-releasing peptide, metastatin, apelin等の各種オーファン受容体のリガンドペプチドの合成に応用し、これらの新規ペプチドの生理的意義の解明研究に道を拓いた。

以上、FGF誘導体を融合（保護）蛋白質とする組換え蛋白質の効率的調製法（精製法）とS-シアノ化反応を鍵反応とする低分子ペプチドの切り出し法を共役させた申請者の遺伝子組換え型生理活性ペプチドの大量調製法は化学合成法に相補的な手法として利用価値の高い手法を提供すると判断される。よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成15年4月21日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。