

氏 名 福 田 宏 之
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学 位 記 番 号 論 農 博 第 2256 号
 学位授与の日付 平 成 11 年 7 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 SYNTHESIS AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE PRO-
 TEIN FUNCTIONAL DOMAINS BY SOLID-PHASE STRATEGY
 (固相法によるタンパク質機能ドメインの合成と生化学的特性)

論文調査委員 (主 査)
 教 授 大 東 肇 教 授 上 野 民 夫 教 授 坂 田 完 三

論 文 内 容 の 要 旨

構造生物学およびコンビナトリアルケミストリーの劇的な発展に伴って、目的とするタンパク質の効率的調製法の開発が重要な課題となっている。タンパク質はほとんどの場合遺伝子組み換えによって調製されているが、クローニングからはじめると労力を要し、得られたタンパク質の純度や活性が一定しないという問題点も多い。本論文は、100 残基程度のタンパク質機能ドメインを固相法により効率的に化学合成し、フォールディングして構造および機能を解析することを目的としている。

まず、ウロニウム系の活性化剤 (HATU) を用いた Fmoc 法を、連続フロー型固相合成機で行うことが長鎖ペプチドの合成に最も適していることを確認するとともに、合成ペプチドを効率的に精製するための新しいアフィニティークロマトグラフィーを考案した。次にその応用として、アルツハイマー病の原因と考えられているアミロイドペプチドおよび細胞内情報伝達の鍵酵素であるプロテインキナーゼ C の調節領域部の合成を行い、それらの生化学的特性を解析している。その主な内容は以下の通りである。

第 1 章では、ペプチド固相合成法の開発の歴史と現状について概説し、本研究の目的および意義について述べている。

第 2 章では、固相合成によって得られたペプチドを効率的に精製できるアフィニティークロマトグラフィーの開発についてまとめている。本精製法は、N 末端をアセチル基でキャッピングするサイクルを用いて固相合成したペプチドの α -アミノ基に、最終段階でチオール基あるいはビオチンを導入し、アフィニティークロマトグラフィーにかけけるものである。ヨードアセトアミド基あるいはアビジンを固定化した担体に合成ペプチドを結合させ、他の不純物を洗浄した後、目的ペプチドを溶出することによって、高純度での精製が可能となる。本精製法を数十残基からなる複数のペプチドに適用した結果、いずれも目的ペプチドを主成分として効率的に精製できることを明らかにしている。

第 3 章では、合成が極めて困難とされているアミロイドペプチド ($A\beta$ 1-42) およびそのアスパラギン酸残基のペプチド結合が β 位に異性化した構造異性体 2 種 [$A\beta$ 1-42 (isoAsp 7), $A\beta$ 1-42 (isoAsp 23)] を、固相法により合成した結果を述べている。これらのペプチドは、HATU を活性化剤とした Fmoc 法により効率的に合成され、塩基性条件下での精製法を確立することにより、初めて高純度で得ることができた。 $A\beta$ 1-42 および $A\beta$ 1-42 (isoAsp 23) はアミロイドを形成するとともに、神経細胞に対する細胞毒性をも示した。特に $A\beta$ 1-42 (isoAsp 23) がもとの $A\beta$ 1-42 と比べて著しく強い凝集能を有することを初めて明らかにした。

第 4 章では、プロテインキナーゼ C gamma ($PKC\gamma$) の調節領域に存在する亜鉛フィンガー様配列の合成と機能解析を行った結果について述べている。 $PKC\gamma$ の 2 つの亜鉛フィンガー様配列を含む 116 残基からなるペプチド (γ -CIA-CIB) を、フラグメント縮合を用いることなく固相法により一気に合成し、複数の逆相系 HPLC カラムによって高純度で得ることに成功した。 γ -CIA-CIB のフォールディングを亜鉛イオンにより行った結果、ホルボールジブチレート (PDBu) に対して、ホスファチジルセリン存在下で強力に結合することが明らかになった。 γ -CIA-CIB の PDBu 結合におけるスキッチャード解

析から、結合定数はネイティブの PKC γ のそれと一致した。さらに、本ペプチドの亜鉛イオンによるフォールディングをエレクトロスプレー質量分析法によって解析した結果、 γ -CIA-CIB が特異的に 4 分子の亜鉛を配位して高次構造を形成していることを初めて明らかにしている。

最後に、本研究によって解明された点および結論がまとめられている。

論文審査の結果の要旨

現在タンパク質のほとんどは遺伝子組み換えによって調製されているが、クローニングからはじめると労力を要し、得られたタンパク質の純度や活性が一定しないという問題点も多く、決して万能な方法ではない。本研究において著者は、まず、長鎖ペプチドの固相合成法に関する基礎的研究を行った。次にその結果に基づき、合成難度の高いタンパク質機能ドメイン 2 種を実際に固相合成することにより、化学合成法がタンパク質の機能を解析する上で有用な一手段であることを示した。本研究の評価すべき点は次の通りである。

1. 合成ペプチドを効率的に精製するための新しいアフィニティークロマトグラフィーを開発した。本精製法により、低収率でしか得られないペプチドであっても高純度で得ることが可能となった。

2. アルツハイマー病の原因ペプチドとして注目されている A β 1-42、およびそのアスパラギン酸残基のペプチド結合が β 位に異性化した構造異性体 2 種 [A β 1-42 (isoAsp 7), A β 1-42 (isoAsp 23)] を、固相法により初めて高純度で得ることに成功した。これらのペプチドは実際にアミロイドを形成するとともに、神経細胞に対する細胞毒性も示したことから、アミロイド形成機構を研究する上で有用なモデルになりうるものである。特に 23 番目のアスパラギン酸残基が異性化した A β 1-42 (isoAsp 23) が、もとの A β 1-42 と比べて著しく強い凝集活性を示したことは興味深い。本知見によって、微量の A β 1-42 (isoAsp 23) の凝集が核となって、他のアミロイドペプチドの凝集を促進し、アミロイドが形成されるとする新しい仮説を提唱できた。

3. プロテインキナーゼ C γ の 2 つの亜鉛フィンガー様配列を含む 116 残基よりなるモデルペプチド (γ -CIA-CIB) の合成に成功し、亜鉛でフォールディングすることにより、ネイティブの酵素と同等のホルボールエステル結合能を示すことを明らかにした。合成ペプチドの純度ならびに構造は、質量分析、アミノ酸分析、トリプシン消化、HPLC によって確認している。フラグメント縮合を用いることなく一気に合成したペプチドとして、 γ -CIA-CIB は、現時点で最長の部類である。さらに、 γ -CIA-CIB の亜鉛イオンによるフォールディングをエレクトロスプレー質量分析法によって解析した結果、 γ -CIA-CIB が特異的に 4 原子の亜鉛を配位して高次構造を形成していることを初めて明確に証明することができた。

以上のように、本論文は、タンパク質の機能ドメインの化学合成が、そのタンパク質の機能を明確にするための有効な一手段になりうることを示したものである。このようなアプローチは、様々な酵素やレセプターの機能解析にも広く適用できるものであり、生物有機化学ならびに構造生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 11 年 5 月 20 日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。