

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成13年度博士課程進学

氏名 片山 秀和

指導教官名 長澤 寛道

論文題目

クルマエビの血糖上昇ホルモン族ペプチドの立体構造と構造機能相関

甲殻類の眼柄中に存在する X 器官/サイナス腺系は、脊椎動物における視床下部/下垂体系に相当する重要な内分泌器官である。ここから分泌されるホルモンとして、甲殻類血糖上昇ホルモン(CHH)や脱皮抑制ホルモン(MIH)などが知られるが、この2つのホルモンはアミノ酸配列の類似性から CHH 族と呼ばれるペプチドファミリーを形成している。CHH 族ペプチドは、これまでに数多くの甲殻類動物のサイナス腺抽出物から単離され、その構造が明らかにされてきた。これらのペプチドはいずれもおよそ 70~80 アミノ酸残基からなり、その配列中で完全に保存されている 6 個のシステイン残基は分子内で 3 対のジスルフィド結合を形成している。

CHH はすべて、その C 末端がアミド基で修飾されているという特徴を有しており、一方 MIH の多くは C 末端が遊離のカルボン酸のままである。また、MIH は 12 残基目にグリシンが 1 残基挿入されること、および C 末端が若干伸長されることによって、総じて CHH よりも長いアミノ酸配列となっている。しかしながら、構造と活性の関係において MIH と CHH は必ずしも明確に分離しているわけではなく、CHH の中には弱いながらも脱皮抑制活性を有するものも報告されている。現在のところ、アミノ酸配列の情報のみから機能の相違を説明することは不可能である。そこで本研究では、MIH と CHH の機能の相違を立体構造レベルでの相違によって説明することを目指し、クルマエビ *Marsupenaeus japonicus* の CHH 族ペプチドを対象として、その立体構造と機能との相関に関して詳細に調べることを目的とした。

1. クルマエビ脱皮抑制ホルモンの組換え体と天然物の比較

クルマエビの MIH は 77 アミノ酸からなるペプチドであり、その組換えタンパク質の発現系はすでに当研究室の Ohira らによって確立されていた。組換え MIH は、天然物と同等の生物活性を有することが実験的に確認されていたが、その N 末端には天然物には存在しないアラニンが 1 残基付加した構造であった。この 1 残基の付加がコンホメーションの変化を引き起こしていないことを確認するために、その円二色性(CD)スペクトルの測定とジスルフィド結合架橋様式の解析を行った。

組換え MIH の CD スペクトルは、天然物のスペクトルと非常によく類似しており、ともに α ヘリックスに富むタンパク質に特徴的なスペクトルパターンを示した。これまでにいくつかの CHH 族ペプチドにおいて CD スペクトルが測定されているが、それらのスペクトルからも CHH 族ペプチドが α ヘリックスに富むタンパク質であることが示唆されており、本研究の結果はそれらの知見と矛盾しなかった。

次に組換え MIH と天然 MIH を各種プロテアーゼによって切断し、そのフラグメントの構造を解析することによってジスルフィド結合架橋様式の解析を行った。その結果、両者は同じ架橋様式 (Cys⁷-Cys⁴⁴, Cys²⁴-Cys⁴⁰, Cys²⁷-Cys⁵³) を有していることが明らかとなった。本研究は MIH のジスルフィド結合架橋様式の決定としてはじめての報告となったが、それはこれまでに報告されている CHH の架橋様式と一致した。

CD スペクトルとジスルフィド結合架橋様式の結果が一致したことは、組換え体と天然物が同様のコンホメーションを有していることを強く示唆するものである。そこで、この組換え MIH の立体構造を核磁気共鳴(NMR)法によって解析した。

2. 組換え脱皮抑制ホルモンの立体構造解析および機能部位の推定

組換え MIH の NMR を測定するにあたって、測定用溶媒を検討した。組換え MIH は中性付近では非常に溶解性が悪く、酸性条件では溶解性に優れているものの、その立体構造は大きく変化してしまうことが CD スペクトルから明らかとなった。そこで有機溶媒を添加することを検討した結果、アセトニトリルを 30%添加すると NMR 測定に十分な濃度で溶解し、そのコンホメーションも変化しないことがわかった。以上の検討をふまえて、NMR 測定用溶媒として 30%アセトニトリルを用いることにした。

安定同位体(¹⁵N、あるいは ¹³C/¹⁵N)ラベルした組換え MIH を調製し、その多核多次元 NMR スペクトルを測定した。まず、その主鎖の帰属を行い、CSI を用いて二次構造の予測を行った結果、CD スペクトルから予測された通り、 α ヘリックスに富む構造であることが明らかになった。続いて側鎖の帰属を行い、立体構造計算を行う際の原子間距離情報を得るために 3D NOESY スペクトルの帰属を行った。NOESY スペクトル中の NOE 強度から距離制限情報を、HNHA スペクトルと二次構造予測の結果から二面角情報を得た後に、ジスルフィド結合の距離情報を加えて、MIH の立体構造を DYANA を用いて計算した。

計算の結果、MIH は 5 つの α ヘリックスを含み β 構造を持たない構造であると決定された。この立体構造は、これまでに立体構造が明らかになっているどのタンパク質とも類似性が無く、まったく新規の折りたたみ様式であった。

クルマエビの CHH の一つである Pej-SGP-III の立体構造を、MIH の立体構造を基にコンピューターでモデリングし、その両者を詳細に比較した。その結果、MIH に特徴的である 12 残基目のグリシンを含むヘリックス($\alpha 1$)が CHH には存在せず、CHH は 4 つの α ヘリックスしか有していないことが示唆された。CHH と MIH のアミノ酸配列を詳細に比較すると、C 末端付近において顕著に配列類似性が低くなるが、 $\alpha 1$ は C 末端領域と立体構造上近傍に存在していたことから、この付近が機能を左右する部位であることが示唆された。

次に CHH と MIH の分子の表面電荷の分布や疎水性面の分布を比較した。その結果、やはり C 末端部位を含む領域でそれらが顕著に異なっていることが示唆され、この解析からも C 末端と 12 残基目のグリシンの近傍が機能部位であることが示唆された。

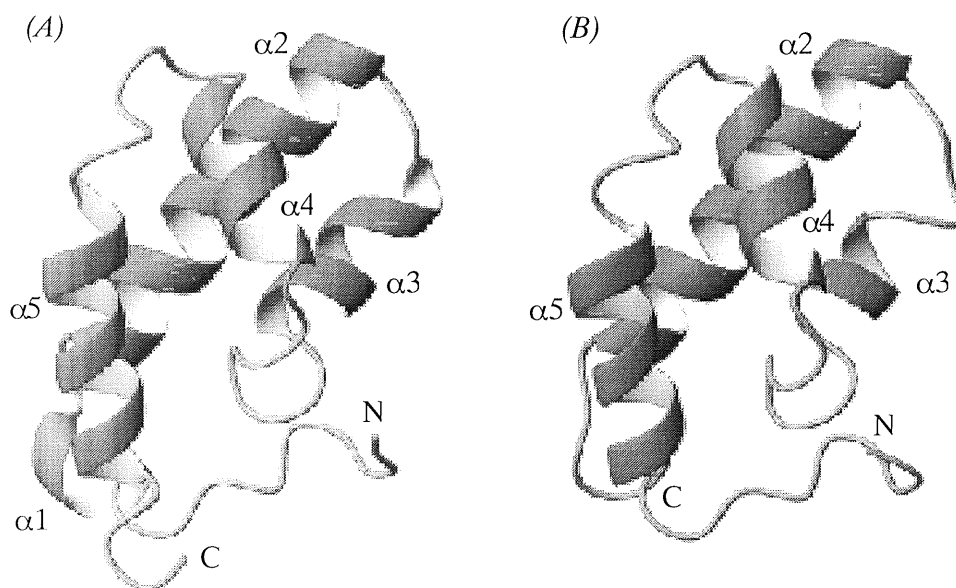


Fig. 1 (A) MIH の立体構造のリボンモデル。(B) モデリングされた CHH の立体構造のリボンモデル。N は N 末端を、C は C 末端を、 $\alpha 1-5$ は α ヘリックスをそれぞれあらわしている。

3. 甲殻類血糖上昇ホルモンにおけるカルボキシル末端アミド基の重要性

CHH の C 末端アミド基が、構造と活性にどのような影響があるのかを検討するために、大腸菌を宿主とした組換えタンパク質発現系を用いて、クルマエビの CHH の一つである Pej-SGP-I の組換え体を作製した。C 末端にグリシンが 1 残基付加したもの(Pej-SGP-I-Gly)と付加

していないもの(Pej-SGP-I-OH)の 2 種類を作製し、C 末端がアミド化した組換え体(Pej-SGP-I-amide)は Pej-SGP-I-Gly をアミド化酵素を処理することによって調製した。

これら 3 種類の組換え体の CD スペクトルを測定した結果、Pej-SGP-I-amide と他の 2 つとの間にヘリックス含量の差が見られた。次にこれらの生物活性を比較した結果、Pej-SGP-I-amide は他の 2 つと比較しておよそ 10 倍活性が強かった。以上の結果から、C 末端アミド基は高次構造の保持と生物活性に重要であることが示された。この結果は、先に述べた C 末端付近に機能部位が存在しているという仮説を支持するものである。

4. 甲殻類血糖上昇ホルモン族ペプチドの機能部位

上記の仮説の真偽を確かめるために、MIH の機能部位と推測された部位に変異を導入した数種の変異ペプチドを作製した。作製した変異ペプチドの CD スペクトルを測定した結果、天然型と同様のスペクトルを示したことから、これらが天然型と同様の立体構造を保持していると考えられた。そこでこれらの脱皮抑制活性をアメリカザリガニを用いた *in vitro* の生物検定系によって測定した。その結果、機能部位と予測された残基に変異が導入されたペプチドにおいて、脱皮抑制活性が有意に低下した。特に N13A、S71Y、I72G の各変異ペプチドにおいて、その傾向が著しかった。しかしながら、12 残基目のグリシン残基を欠損した変異体は、天然型と同程度の活性を有していた。

5. 総括

本研究において、クルマエビ由来 CHH 族ペプチドの一つである MIH の立体構造を決定し、その構造を基にホルモンの機能部位を推測した。その結果、CHH 族ペプチドの機能部位は C 末端近傍および $\alpha 1$ ヘリックスの C 末端側 (13-14 残基目付近) に位置している可能性が示唆された。今後は、より詳細な機能部位の解析が課題となる。これらのペプチドの活性と構造との関係を詳細に解析することは、甲殻類の分子内分泌学の基盤を築くだけでなく、この成果が水産増養殖などの応用面に活用されることが期待される。本研究の結果は、その端緒になったと考えている。

(参考文献)

1. Katayama, H., Ohira, T., Nagata, K. and Nagasawa, H., (2001) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**(8), 1832-1839.
2. Katayama, H., Ohira, T., Aida, K. and Nagasawa, H., (2002) *Peptides* **23**(9), 1537-1546.
3. Katayama, H., Nagata, K., Ohira, T., Yumoto, F., Tanokura, M. and Nagasawa, H., (2003) *J. Biol. Chem.* **278**(11), 9620-9623.