

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 片山 秀和

甲殻類の眼柄中に存在する X 器官/サイナス腺系は内分泌統御の中心であり、ここで多数の神経ペプチドホルモンが生産されている。そのうち、血糖上昇ホルモン (CHH) や脱皮抑制ホルモン (MIH) はアミノ酸配列の類似性から血糖上昇ホルモン族 (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 70-80 アミノ酸残基からなり、完全に保存された 6 残基のシステインは分子内で 3 対のジスルフィド結合を形成している。これまでに多数の CHH 族ペプチドが同定されてきた結果、さらに 2 つのタイプに分類されることがわかった。CHH はタイプ I に、MIH はタイプ II に分類される。タイプ I ペプチドはほとんどが 72 アミノ酸からなり、C 末端はアミド化されている。一方、タイプ II ペプチドはペプチド鎖が多少長く、12 残基目にグリシンが挿入されている。配列の比較からタイプ分けはできるが、どの残基が活性に重要なのかを推定することは困難であることから、立体構造レベルでの解析が必須と考えられた。本論文は CHH 族ペプチドの立体構造解析と構造機能相関を調べたもので、序論と 4 章からなる。

序論では、CHH 族ペプチドに関する過去の知見について概説した後、本論文の目的を述べている。

第 1 章では、MIH の大腸菌を利用した組換え体の発現および発現した MIH と天然 MIH の構造の比較について述べている。両者の CD スペクトルは非常によい一致を示したことから、同一のコンフォメーションをもつことが示唆された。このスペクトルから MIH は α ヘリックスに富む構造であることが示された。また、プロテアーゼ消化断片の解析結果から両者の 3 対のジスルフィド結合は同じ様式で架橋されていること、およびその架橋様式は CHH と同様であることが示された。組み換え体の収量は培養 1 リットル当たり約 3 mg であった。

第 2 章では、組換え MIH を用いて、各種の NMR スペクトルにより MIH の立体構造を解析したことを述べている。まず、NMR 測定溶媒を検討した結果、CD スペクトルが変化せず、高濃度に溶かせる溶媒として 30%アセトニトリルを選んだ。安定同位体 (^{15}N あるいは $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) 標識した組換え体を調製し、多核多次元 NMR スペクトルを測定した。まず、主鎖の帰属を、次に側鎖の帰属を、さらに NOESY スペクトルで帰属を行なった。これらに二次構造予測から得られた二面角情報、およびジスルフィド結合の距離情報を加えることによって MIH の立体構造を描き出した。その結果、MIH は 5 つの α ヘリックスを含み、 β 構造をもたない特異な構造であることがわかった。この折りたたみの様式はこれまでに例のない新しいものであった。この構造を基にして、類似の一次配列を有する CHH の構造を計算によって推測した。それらを比較することによって、活性に重要な部位が空間的には近接した 12 残基目の Gly および C 末端部を含む部分である可能性が示された。

第3章では、CHHのC末端部で保存されているアミド基が血糖上昇活性に必須であるかどうかを調べている。C末端にGlyを付加した組換え体を調製し、アミド化酵素によってアミド体を調製した。一方、C末端が遊離のCHHも別に調製した。これら3つのペプチドのCHH活性を測定したところ、アミド体は他の2つに比べて約10倍活性が強いことがわかった。以上の結果から、C末端アミド基は活性に重要であることが示された。

第4章では、第2、3章で推定されたCHH族ペプチドの機能部位が正しいかどうかを、MIHのいくつかの残基に変異を導入することによって、調べたことを述べている。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することがわかった。特に、N13A、S71Y、I72Gにおいて特に顕著であった。しかし、12残基目のGlyを欠失したペプチドは活性が低下すると予想されたが、実際は天然と同等の活性を示した。このことはMIH活性に必ずしもGlyが必要ではないことを示した。

以上、本論文はクルマエビの眼柄ペプチドのうちの主要なペプチドであるCHH族ペプチドのNMRを用いた立体構造解析とそれに基づいた機能部位の推定を行なったもので、これまでに誰もなし得なかった成果であり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の論文として価値あるものと認めた。