

氏名	奥村正樹
学位の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	甲理第128号(文部科学省への報告番号甲第373号)
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	2011年3月16日
学位論文題目	<b>Role of Propeptide Sequence of Peptide Hormone as Intramolecular Chaperone</b>
論文審査委員	(主査) 教授 尾崎幸洋 (副査) 教授 瀬川新一 教授 山口宏 日高雄二(近畿大学准教授)

ほとんどのタンパク質は正しい立体構造を持つてはじめて機能を発現する。遺伝子上では、そのアミノ酸配列の情報しか持たないタンパク質が、いかにして正しい構造に収斂しその機能を発現するのかという命題は、生命科学の本質の一つであり、生化学の立場からも、生物物理学の立場からも非常に重要な問題であり、タンパク質の大量生産による工業的利用や医学的利用にも直結する研究対象である。著者が研究対象として用いたプロウログアニリンは、ペプチドホルモンであるウログアニリンの前駆体タンパク質であり、そのペプチドホルモン領域は、N末端側に存在するプロ領域の存在が無ければ正しい構造にフォールディングする事ができず、このプロ領域が分子内シャペロンとして働いている事が明らかにされている。しかしながら、このフォールディング過程の詳細な経路や、プロ領域がいかにしてペプチドホルモン領域の構造を制御しているのかなどは未解明のままであった。このような背景の下で、筆者はタンパク質のフォールディング問題に取り組み、プロウログアニリンのフォールディング機構の詳細な解析を通じたプロ領域の役割の解明、生理活性を持つペプチドの人工設計および人工設計ペプチドのプロ領域付加による構造制御、効率的なタンパク質フォールディング試薬の開発およびその作用機構解明を行った。

## 論文内容の要旨

本論文は、三つの章から構成されている。第一章では、ペプチドホルモンであるウログアニリンの前駆体タンパク質であるプロウログアニリンのフォールディング機構の解析を行っている。筆者は、還元変性状態のプロウログアニリンを出発物質として、フォールディング反応を進行させ、種々の時間で酸により反応を停止させる事により、中間体をトラップし、存在する構造中間体の化学種とその存在比を決定した。その結果、本タンパク質は、まず成熟体領域のランダムなジスルフィド結合形成が起こる事、その後プロ領域のジスルフィド結合形成を含む構造形成が行われた後に、成熟体領域のジスルフィド結合を天然型に修復する事を明らかにした。さらに、中間体であるジスルフィド異性体を出発物質として同様の解析を行い、異性体2と名付けたジスルフィド異性体を経由して天然構造に収斂する事、さらに異性体2の構造は天然構造に比べ、より $\alpha$ ヘリックス構造に富む構造を持つ事を明らかにした。

第二章は、プロ領域の役割をさらに詳細に解明するため、プロ領域の分子内シャペロン機能を利用した人工タンパク質の創製例について述べられている。筆者は、プロウログアニリンと耐熱性エンテロトキシンのジスルフィド結合様式を参考に新たな人工ペプチドを複数設計したが、どのペプチドもペプチド領域のみでは単一の構造にフォールディングできなかった。しかし、プロウログアニリンのプロ領域を付加す

る事により、そのうち一つのペプチドを単一の構造に収斂させる事に成功した。プロ領域によって構造制御された人工ペプチドが生理活性を示す事から、プロ領域が生理活性を持つ構造を認識し、正しい構造に導くと考察した。

第三章は、立体構造形成に関わる生体内分子であるグルタチオンを基に、新奇に立体構造促進剤を開発、その機構について記述されている。筆者は、生体内において間違ったジスルフィド結合種の開裂、再結合を誘導する分子種であるグルタチオンに、タンパク質凝集抑制剤として汎用されているアルギニンの能力を付加する目的で、二種類のトリペプチドを作製した。その立体構造形成能力を変成タンパク質をフォールディングさせた時の収量、ジスルフィド結合の形成速度、二次構造形成速度の観点から、グルタチオンを用いた時と比較した。その結果、そのうちのアルギニルシステイニルグリシンが凝集抑制能に加え、ジスルフィド結合形成や交換反応を促進する事を見だし、アルギニン側鎖であるグアニジノ基の正電荷が硫黄原子上の負電荷を引きつける事がその要因であると考察した。

## 論文審査結果の要旨

本論文は、プロ領域を持ったタンパク質のフォールディング問題を、プロウログアニリンの構造形成およびプロ領域による人工タンパク質の構造制御の実験を行い、プロ領域の構造形成のための役割を明らかにしたものである。また、本論文は、これらの知見を基にジスルフィド形成および立体構造形成のための促進剤の開発に繋げたものである。

タンパク質のフォールディング機構は、現在までに明らかにされている例は非常に少なく、本論文のようにフォールディング中間体の存在比までを明らかにし、その機構を詳細に解明した事は非常に高く評価できる。また、人工的に設計したペプチドにプロ領域を付加する事により、目的の生理活性を持つ構造に導く事に成功した事は、タンパク質のフォールディング機構解明への知見になるだけでなく、タンパク質工学的な新たな機能性タンパク質創製技術の基礎となる事も期待できる。さらに、グルタチオンを分子改変した立体構造形成の促進剤を作製し、その効果と作用機序を明らかにした事も、基礎研究だけでなく取得が困難であったタンパク質の供給を可能にするものであり、今後のタンパク質研究や産業利用に道を開くものである。

以上のように、本論文の内容は、タンパク質フォールディング問題を解明する重要な知見を与えただけでなく、タンパク質の産業応用にも大きく寄与するものである。本論文の著者は、生化学的手法から物理化学的手法までを使い分け、上記のような結果を得る事に成功した。これは、著者の細心さと忍耐に裏打ちされた高度な実験技術により実現したものである。

本論文の第三章の内容は *FEBS J.* に論文として投稿され、電子版ではすでに公表され、冊子版は現在印刷中となっている。第一章から第二章までの内容は、現在投稿準備中である。また、著者はペプチド討論会で積極的に発表を行い、査読付プロシーディングとして *Peptide Science* に上記内容を含む4報を筆頭著者として報告している。さらに、国内特許1件、4回の国際学会および、16回の国内学会で本論文の内容を自ら報告し、研究助成および1件の賞を受賞している。審査委員は本論文の内容を中心に面接と公開の論文発表会を行い、著者が論文内容と用いた技法について十分な理解とともに関連する分野についても学識を有し、また将来の研究遂行に対しても十分な能力を持つ事を確認する事が出来た。以上の事より、審査委員会は本論文の著者が博士（理学）の学位を授与されるに足る十分な資格を有するものと判定する。