

学 位 論 文 題 名

STUDY ON AN ELASTASE-SPECIFIC INHIBITOR ELAFIN:
Total Synthesis, Structure-Activity Relationships
and X-ray Structural Analysis.

（エラスターゼ特異的インヒビター、エラフィンに関する研究：
全合成、構造活性相関およびX線構造解析）

学位論文内容の要旨

エラフィンはヒト由来の新規エラスターゼ特異的インヒビターである。セリンプロテアーゼの一つであるエラスターゼは、通常プロテアーゼインヒビターによりその機能が制御されているため、生体の防御のみに関与している。しかし、生体内の環境変化により、その制御機構が崩れてエラスターゼが過剰に作用する事で、自身の組織が破壊され、肺気腫、リウマチ性関節炎、アトピー性皮膚炎等の疾患が惹起される。代表的な内因性のインヒビターとしては $\alpha 1$ -プロテインアーゼインヒビターや $\alpha 2$ -マクログロブリンが知られているが、これらはエラスターゼのみならず他のプロテアーゼも同様に阻害する。この意味において、エラフィンは非常に興味深い物質と言える。エラフィンは 57 残基のアミノ酸で構成され、分子内に 4 組のジスルフィド結合を有するペプチドである。しかし、そのジスルフィド架橋構造は未解明であった。そこで、エラフィンのエラスターゼ阻害機構の解明を目的として、エラフィンの合成および活性や構造に関する研究を行った。

本論文では、エラフィンの合成に関する種々条件の検討やそのジスルフィド架橋構造の決定、また、その活性発現に重要な構造因子や、エラフィンとエラスターゼとの複合体の高次構造について述べられている。

第 1 章の序論に続く、第 2 章のエラフィンの合成に関しては、最大保護法を適用した液相法による保護ペプチドの構築とフッ化水素および酢酸第二水銀による二段階の保護基の除去により、高純度の還元型ペプチドを得る事に成功した。続くジスルフィド結合形成反応における条件を種々検討した結果、条件によっては顕著に認められる不活性型ペプチドの生成を抑制し、天然物と同等の阻害活性を示す活性型ペプチドを効率的に得る条件を見だし、高純度の合成エラフィンを得るための合成法を確立した。

第3章のジスルフィド架橋構造については、エラフィンをサーモライシンで消化し、得られた酵素消化物の質量分析およびアミノ酸配列分析で決定した。また、不活性型ペプチドの架橋構造についても同様に検討した結果、活性型ペプチドとは大きく異なる架橋構造を有する事を明らかにし、阻害活性の発現に天然型ジスルフィド架橋構造が必須であることを示した。

第4章の構造活性相関の研究に関しては、エラフィンのアミノ末端側のアミノ酸残基が、ジスルフィド結合形成反応に大きく影響を与えるものの阻害作用には全く影響を与えない事を明らかにした。また、分子内の2個のメチオニン残基の酸化により阻害活性が減少する事を見だし、メチオニン残基が活性発現に何らかの役割を果たしていることを示した。

第5章および第6章のX線構造解析に関しては、最初に、エラフィン-エラスターゼ複合体の結晶化条件を検討し、沈殿材としてメチルペンタンジオールを用いることで結晶化に成功した。次に、コンピューターグラフィクスで構造解析を行い、精度の高い最終構造を得た。その結果、エラフィンはエラスターゼとの間の規則的な水素結合やファンデアワールス相互作用によって、エラスターゼに対し適合性の高い構造を形成し、結合していることを明らかにした。また、エラフィンは、 β 構造により安定化されたコア部分と外側のループ部分で構成される渦巻き状の全体構造を有することを明らかにし、コア部分とループ部分の間がジスルフィド結合や水素結合ならびにファンデアワールス相互作用により結ばれることで、分子全体が非常に安定化されていることを示した。

以上の様な高次構造の情報から、エラフィンがエラスターゼに強く結合するが切断は受けないこと、即ち、エラフィンがエラスターゼを特異的に強く阻害することを見いだした。さらに、構造活性相関で得られた結果についても、高次構造から考察し、アミノ末端側の領域が活性発現に関与する様な規則構造をとらないこと、さらに、この領域が高次構造の形成に重要であることを示した。また、メチオニン残基の酸化で、その分子間、分子内の相互作用が影響を受け、その結果、活性が低下することを見いだした。

本研究で得られたエラフィンの合成条件の検討結果は、今後、より長鎖で複雑なジスルフィド結合を有するペプチドの合成に有用と考えられる。また、現時点では、エラフィンが哺乳類由来の唯一のエラスターゼ特異的インヒビターであることから、本研究で得られたエラフィンの構造や活性に関する情報は、生体内の環境変化の結果、エラスターゼによって惹起される疾患の発症機構の解明、さらには、その治療薬の開発に大きく寄与するものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 則 雄
副 査 教 授 戸 倉 清 一
副 査 教 授 荒 木 義 雄
副 査 教 授 堤 耀 広 (工学部)
副 査 助 教 授 坂 入 信 夫

学 位 論 文 題 名

STUDY ON AN ELASTASE-SPECIFIC INHIBITOR ELAFIN: Total Synthesis, Structure-Activity Relationships and X-ray Structural Analysis.

(エラスターゼ特異的インヒビター、エラフィンに関する研究：

全合成、構造活性相関およびX線構造解析)

エラフィンはエラスターゼの特異的阻害剤である。エラスターゼは、通常はプロテアーゼ阻害剤によりその機能が制御されているため、生体の防御のみに関与している。しかし、生体内の環境変化により、その制御機構が崩れるとエラスターゼが過剰に作用する事で、自身の組織が破壊され、肺気腫、リウマチ性関節炎、アトピー性皮膚炎等の疾患が惹起される。代表的な内因性の阻害剤としては $\alpha 1$ -プロテイナーゼインヒビターや $\alpha 2$ -マクログロブリンが知られているが、これらはエラスターゼのみならず他のプロテアーゼも同様に阻害する。この意味において、エラフィンはエラスターゼのみに作用する非常に興味深い物質と言える。エラフィンは 57 残基のアミノ酸で構成され、分子内に 4 組のジスルフィド結合を有するペプチドである。しかし、そのジスルフィド架橋構造は未解明であった。本研究では、エラフィンのエラスターゼ阻害機構の解明を目的として、エラフィンの合成および活性や構造に関する研究を行った。

本論文では、エラフィンの合成に関する種々条件の検討やそのジスルフィド架橋構造の決定、また、その活性発現に重要な構造因子や、エラフィンとエラスターゼとの複合体の高次構造について述べられている。

第 1 章の序論に続き、第 2 章のエラフィンの合成に関しては、最大保護法を適用した液相法による保護ペプチドの構築とフッ化水素および酢酸第二水銀による二段階の保護基の除去により、高純度の還元型ペプチドを得た。続くジスルフィド結合形成反応における条件を種々検討した結果、不活性型ペプチドの生成を抑制し、天然物と同等の阻害活性を示

す活性型ペプチドを効率的に得る条件を見いだした。

第3章で述べているジスルフィド架橋構造については、エラフィンにサーモライシンで消化し、得られた酵素消化物の質量分析およびアミノ酸配列分析で調べた。また、不活性型ペプチドの架橋構造についても同様に検討した結果、阻害活性の発現に天然型ジスルフィド架橋構造が必須であることを示した。

第4章の構造活性相関の研究に関しては、エラフィンのアミノ末端側のアミノ酸残基が、ジスルフィド結合形成反応に大きく影響を与えるものの阻害作用には全く影響を与えない事を明らかにした。また、分子内の2個のメチオニン残基の酸化により阻害活性が減少する事から、メチオニン残基が活性発現に何らかの役割を果たしていることを示した。

第5章および第6章のX線構造解析に関しては、最初に、エラフィン-エラスターゼ複合体の結晶化条件を種々検討し、結晶化に成功した。次に、コンピューターグラフィクスで精度の高い最終構造を得た。その結果、エラフィンはエラスターゼとの間の規則的な水素結合やファンデアワールス相互作用によって、エラスターゼに対し適合性の高い構造を形成し、結合していることを明らかにした。また、エラフィンは、 β 構造により安定化されたコア部分と外側のループ部分で構成される渦巻き状の全体構造を有することを明らかにし、コア部分とループ部分の間がジスルフィド結合や水素結合ならびにファンデアワールス相互作用により結ばれることで、分子全体が非常に安定化されていることを示した。

以上の様な高次構造の情報から、エラフィンがエラスターゼに強く結合するが切断は受けないこと、即ち、エラフィンがエラスターゼを特異的に強く阻害することを見いだした。さらに、構造活性相関で得られた結果についても、高次構造から考察し、アミノ末端側の領域が活性発現に関与する様な規則構造をとらないこと、さらに、この領域が高次構造の形成に重要であることを示した。また、メチオニン残基の酸化で、その分子間、分子内の相互作用が影響を受け、その結果、活性が低下することを見いだした。

本研究で得られたエラフィンの合成条件の検討結果は、今後、より長鎖で複雑なジスルフィド結合を有するペプチドの合成に有用と考えられる。また、現時点では、エラフィンが哺乳類由来の唯一のエラスターゼ特異的インヒビターであることから、本研究で得られたエラフィンの構造や活性に関する情報は、生体内の環境変化の結果、エラスターゼによって惹起される疾患の発症機構の解明、さらには、その治療薬の開発に大きく寄与するものと考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。