

学 位 論 文 題 名

Studies of three-dimensional structure and activity of an insect growth factor, growth-blocking peptide

(昆虫成長因子 GBP の立体構造と活性に関する研究)

学位論文内容の要旨

宿主体内に卵を産みつけ寄生する内部寄生バチは、寄生後、その宿主の発育を制御し、自らの生育に適した環境を整えることが知られている。growth-blocking peptide (GBP)は、寄生バチであるカリヤコマユバチの宿主であるアワヨトウ幼虫から単離された25残基から成るペプチドであり、寄生された宿主幼虫体内でその濃度が上昇し、成長、蛹化を妨げる活性を持つことが知られている。最近の研究から、この GBP は、未寄生の幼虫内でも発現しており、寄生昆虫由来ではなく、宿主であるアワヨトウ幼虫の遺伝子由来の産物であることが分かった。また、低濃度では昆虫の培養細胞の増殖を促進し、高濃度で阻害する活性を持ち、細胞レベルでその成長をコントロールすることから、成長因子であることが明らかになった。現在まで、昆虫の成長因子は研究例が少なく、GBP の構造、機能の解明は重要な意義を持つ。また、数多くの研究例のある、哺乳類由来の成長因子との比較も興味深い。そこでまず、この GBP の溶液構造の解析を NMR 法で行った。

立体構造解析を行うための試料として、ペプチド合成機を用いて Boc 法により化学合成し、2 個のシステイン残基間 (Cys7, Cys19) をジスルフィド結合で架橋した。精製した試料を、重水及び軽水中に 1.5-3.0mM の濃度で溶解し、2 次元 ^1H NMR 測定をおこなった。DQF-COSY、TOCSY、NOESY のスペクトルを数点の温度 (4°C、10°C、30°C) で測定し、NMR シグナルの帰属を行った。また、凍結乾燥後の試料を重水に溶解することで、アミド交換速度の遅い残基を同定した。構造計算に必要な距離制限情報は、NOESY スペクトルから、二面体角情報は DQF-COSY スペクトルから求め、立体構造計算は、X-PLOR 3.1 を用いて行った。N 末端残基を除くすべての残基について、その NMR シグナルの帰属を完了した。また、NOE からの距離情報および重水素交換の情報に基づいて、二次構造を同定した。この結果、2 本鎖逆平行 β シート (Tyr11-Arg13, Cys19-Pro21) および、Type II β ターン (Val8-Tyr11) が同定され、25 残基と分子量が小さいにもかかわらず、二次構造を有していることが判明した。X-PLOR での立体構造計算は、NOESY スペクトルに基づく距離制限情報、水素結合に基づく距離制限情報、二面体角情報を用いて行った。この結果 N 末端及び C 末端の残基 (Glu1-Gly6, Phe23-Gln25)は、距離制限情報が少なく、構造が収束しなかった。これらの領域を除いた部分の、平均構造に対する 20 個の構造の RMSD は、主鎖の N,Ca,C 核に対して 0.89Å、すべての重原子に対して 1.72Åであった。全体の立体構造上の特徴としては、右巻きにねじれている 2 本鎖逆平行 β シートをつなぐループ領域が、5 つの残基からなっており、 β ターンを構成する領域と比較して収束が悪く、揺らい

でいた。最近の研究から、GBP は、昆虫由来の培養細胞 (Sf9) に対してだけでなく、ヒト上皮由来培養細胞に対しても増殖促進活性を持ち、その活性の強さは、ヒト上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) と同程度であることが明らかになった。また、EGF の C 末端ドメインに対して、GBP は一次構造上の弱い相同性を持つ。そこで、GBP とマウス EGF の立体構造を比較したところ、立体構造上も相同性を持つことが明らかになった。高い相同性を持つ β シートおよび β ターン領域の、GBP と EGF の主鎖間の RMSD は、1.98 Å であった。また EGF のこの領域には、残基置換の実験などからレセプターとの相互作用に重要とされるアルギニン残基があるが、この残基は GBP においても保存されていた。以前までの数多くの研究から、EGF はそのレセプター刺激に、N 末端ドメインと C 末端ドメインの両方から成り 3 組みのジスルフィド結合を持つ EGF 特有の立体構造を必要とすると考えられていたため、EGF の C 末端のみと立体構造上の相同性を持つ GBP が、EGF レセプターを刺激している可能性が高いという結果は、非常に興味深い。

さらに GBP の構造と活性に関してさらに研究を進めるため、GBP アナログを用いた実験をおこなった。GBP は末寄生の幼虫では 23 残基で発現しているが、寄生された幼虫では、25 残基で発現することがわかっている。また近年、アワヨトウと類縁の鱗翅目昆虫から次々と GBP と相同性が高いペプチドが見つかった。これらのペプチドは、GBP と極めて相同性が高いにも関わらず、その活性は、血球細胞活性化を刺激する、幼虫に麻痺を引き起こす、心臓の拍動を制御する、といった極めて広範囲の活性をもつ。これらのペプチドもすべて 23 残基である。そこで、末端残基の活性と構造への影響を中心に GBP アナログを合成した。まず Fmoc 法による合成で主鎖の Asp-Gly 配列が β 転位を起こしその活性が失われることが判明しているペプチドでは、その立体構造も大きく崩壊していた。このことは、GBP のレセプターとの結合にはその立体構造が重要であることを強く示唆している。また C 末端残基に関しては 23 残基と 25 残基の GBP では、幼虫の成長制御の活性では差が見られたが細胞増殖活性は有意な差が見られず、分子全体の立体構造にも顕著な差は見られなかった。さらに 22 残基のペプチドでは立体構造は維持しているものの活性は失われており、21 残基では立体構造、活性ともに失われた。これらの結果から、寄生された幼虫体内において発現される 25 残基型 GBP は、レセプターとの親和性を変化させるのではなく、体内での分解からの寿命を長くすることで、成長抑制活性を強くしていることが推測された。また、23 番の Phe 残基の側鎖はレセプターとの結合に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。C 末端と同様にフレキシブルな構造をとっていると考えられる N 末端側の残基に関しては、2 残基の削除によって構造に変化が無いものの活性は失われ、その活性への重要性が明らかになった。

前述したように、GBP は固相法で合成する際、アスパラギン酸残基の β 転位が問題になり、一般に広く用いられている Fmoc 法での合成が行えない。そこで、大腸菌を利用した大量発現系を構築し、融合タンパク質として発現した GBP を酵素で切断し培地 1 L あたり 20mg 程度の GBP を得ることができた。この大量発現系により、比較的容易に変異を導入した GBP を産生できるようになり、またレセプターとの結合に関する研究を行う際に有用と考えられる、安定同位体ラベルを導入した GBP を用いた実験を行う事が可能になった。

本研究の結果から、新規の成長因子である GBP と研究例の多い EGF の立体構造上の関連性が明らかになった。また、N 末端及び C 末端残基のフレキシビリティの高い領域の活性への影響が明らかになった。本研究の成果は、研究例の少ない昆虫成長因子の基礎研究として重要なだけでなく、研究例が多いにも関わらず 2 量体化の機構が判明していない EGF レセプターに関する研究の前進に大きく貢献することが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 新 田 勝 利

副 査 教 授 山 岸 皓 彦

副 査 教 授 河 野 敬 一 (富山医科薬科大学薬学部)

副 査 助教授 出 村 誠

副 査 助教授 早 川 洋 一 (北海道大学地球環境科学研究科)

学 位 論 文 題 名

Studies of three-dimensional structure and activity of an insect growth factor, growth-blocking peptide

(昆虫成長因子 GBP の立体構造と活性に関する研究)

近年、構造生物学の発展によって数多くの生体高分子の立体構造が明らかになってきており、立体構造とその機能の関係の解明は生命現象の基本を明らかにする極めて重要な研究テーマの一つとなっている。本論文は新規の昆虫由来成長因子についてその立体構造と活性の関連について NMR 法を用いた解析を中心に研究したものである。大きく(1) NMR 法を用いた立体構造解析、(2) アナログを用いた立体構造と活性の相関、(3) 遺伝子工学的手法による大量発現系の構築、の3点について研究成果をまとめ、未知の点が多いこの成長因子の性質に関して重要な知見を得ることに成功している。著者は NMR 法を用いて、25 残基からなる昆虫由来成長因子である growth-blocking peptide (GBP) の立体構造解析を行った。その結果、この成長因子は2本の逆平行 β シートをコアの構造として、安定した立体構造を有していること、特に Tyr11 を中心とした疎水性のコアが立体構造の安定化に重要な働きを果たしていること、これに対して N 末端及び C 末端に揺らぎの大きい領域を有していること等を明らかにした。また、従来から研究例の多い成長因子である epidermal growth factor (EGF) の C 末端ドメインと GBP の間に立体構造上の相関性があることを示した。GBP は昆虫培養細胞のみならず哺乳類由来の培養細胞に対しても増殖活性があり、その受容体が EGF 受容体である可能性が指摘されていることから、この結果は極めて興味深いものと言える。さらに著者は、GBP の立体構造と活性に関しての知見を得るために、立体構造解析の結果を元に、その揺らぎの大き

い領域に注目し、N 末端および C 末端の残基を削除したアナログを化学合成し、これらのアナログの立体構造と細胞増殖活性との相関に関して研究を進めた。この結果、C 末端の 2 残基は細胞増殖活性には必須ではないこと、Phe23 を削除したアナログでは立体構造に大きな変化が無いにもかかわらず、細胞増殖活性が失われることから、Phe23 の側鎖が受容体との相互作用に直接関与している可能性が高いこと、N 末端残基に関しても揺らぎが大きい領域が受容体との相互作用に重要な働きを果たしている可能性が高いこと等を示した。さらに C 末端の残基が活性に影響を大きくは及ぼさないという解析結果を応用して、残基数が少なく、ラベル化、固定化が困難な GBP について、その活性を保ったままビオチンラベル化することに成功した。これは今後の応用研究に大きく貢献する結果と言える。また、GBP は β 転移を起こすことにより、通常よく用いられる Fmoc 法による固相合成が困難であるが、著者は大腸菌を用いた大量発現系を構築し、極めて高い効率で GBP を得ることに成功した。この系を利用して GBP の安定同位体ラベル体の作成をおこない良質な NMR スペクトルを得ることに成功した。この系を利用した NMR 法による相互作用解析や揺らぎの解析は、GBP の更なる性質の解明に極めて有用であると考えられる。

以上のように、申請者は、昆虫由来成長因子 GBP の立体構造と活性の関連に関して多くの重要な知見を得ることに成功しており、今後の関連の研究に対しても大きな貢献をしたと言える。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格があるものと認める。