

学 位 論 文 題 名

Site Specific Introduction of carbohydrates to Insulin

(インスリンへの部位特異的糖鎖付加)

学位論文内容の要旨

インスリンは 21 個のアミノ酸より成る A 鎖と、30 個のアミノ酸より成る B 鎖が 2 本のジスルフィド結合で結びついたペプチドホルモンである。インスリン遺伝子はランゲルハンス島 β 細胞で転写され、プレプロインスリン、プロインスリンを経てゴルジ体で限定分解されインスリンに転換される。このホルモンはグルコースなどのインスリン分泌刺激により放出され、主に筋、脂肪細胞、肝においてインスリンレセプターと結合することで、(筋や脂肪細胞での) グルコース取り込み促進、脂肪の合成促進/分解抑制、(肝での) 糖新生の抑制、グリコーゲン合成促進などの働きをする。ところが、インスリン作用の相対的あるいは絶対的な不足によって引き起こされる糖質代謝異常を中心とする様々な代謝異常は糖尿病と呼ばれ、現在では世界人口の約 0.7% にあたる人が、日本でも 9.0% にあたる人が糖尿病であると言われており、今後更に増える可能性の高い病気である。糖尿病治療薬としては、インスリンが最も効果的な薬であるが、投与してから数時間しか効果がなく、年間使用量が患者一人当たり 0.5-1.0g にもなるため、患者の増加と共に益々インスリンの需要が増している。これらの糖尿病患者にとって、インスリンの投与量、回数を減らすことが強く望まれている。近年では長時間活性維持型インスリンの開発もいくつか試みられているが、水溶性が低いなど、問題点も多い。そのためにも、安全で長時間活性が維持するインスリンが求められている。

本研究で私は糖鎖の働きに着目した。糖鎖は水溶性を上げるだけでなく、特にシアル酸は結合したタンパクの生体内での半減期を長くすることが最近の研究で分かってきた。このことから、インスリンにシアル酸を含む糖鎖を付加することによって、インスリンの活性時間を長くできるのではないかと考え、研究を行った。

第 1 章ではこれまでのインスリン研究と、糖尿病治療の現状を簡単にまとめ概説した。

第 2 章では糖インスリンを合成するにあたっての糖鎖誘導体の設計と合成について述べた。当研究室で開発されたペプチド鎖への糖鎖導入法を用いるために、糖鎖にスペーサーを付加し、インスリンへの付加が可能であると考えられる糖鎖誘導体を合成した。

第 3 章ではインスリンへの糖鎖付加箇所の検討とインスリン遺伝子のデザインと大腸菌における発現、精製について述べた。多くの動物種間で高い相同性を示すインスリンのアミノ酸配列の特徴と立体構造、そしてインスリンレセプターとの結合部位を考慮し、糖鎖付加箇所を決定した。インスリンは大腸菌内で発現させた場合、封入体として得られる。そのため精製後に巻き戻しが可能なプロインスリンとして発現させた。また、精製を容易にするためポリヒスチジンタグを融合させ、ニッケルキレートカラムのみによる精製を行った。プロインスリンからインスリンへの

変換はヒスチジンタグとプロインスリンとの間にアルギニンを入れることで、プロテアーゼによりタグとプロインスリンC鎖を同時に除去することができた

第4章では酵素合成法による糖インスリンの合成とその構造検討、更には活性測定について述べた。大腸菌で発現させた3種類のインスリン変異体のうち2種類はこの方法により糖鎖を付加することに成功したが、そのうちの一方はグルタミンへの変異によって活性が大きく減少していた。結局、糖鎖付加は一種類のインスリン変異体にのみに行い、得られた糖インスリンはCDスペクトル、MALDI-TOF-Mass等によって解析した。また、糖尿病マウスを用いた糖インスリンの活性測定も行った。

第5章はインスリンレセプターへの糖インスリンの結合親和性について述べた。糖鎖を付加したことによるレセプターへの影響を脂肪細胞を用い、 ^{125}I ラベルされたインスリンをトレーサーとすることで親和性の評価を行い、考察した。

第6章は第1章から第6章までの総括を、またこれからの展望についても短く述べた。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	西 村 紳一郎
副 査	教 授	新 田 勝 利
副 査	助教授	門 出 健 次
副 査	助教授	出 村 誠
副 査	助教授	貞 許 礼 子

学 位 論 文 題 名

Site Specific Introduction of carbohydrates to Insulin

(インスリンへの部位特異的糖鎖付加)

本研究で著者は、シアル酸を含む糖鎖を初めてインスリンに導入することに成功し、またその生理活性を糖尿病モデルマウス等を用いて調べた。

第1章では、これまでのインスリン研究と、糖尿病治療の現状についてまとめている。インスリンの発見から始まり、インスリンの構造、生体内での発現、機能、更には糖尿病治療薬としてのインスリンとその現状について、短くはあるが、大変分かりやすくまとめられており、この分野において幅広く、なおかつしっかりと知識を身に付けたと評価できる。

第2章では、糖インスリンを合成するにあたっての糖鎖誘導体の設計と合成について述べている。糖インスリンを合成するにあたって、その方法とそれに必要な糖鎖誘導体の合成法を合理的に考えた上で実験を実施しており、なおかつ合成物の分析方法も適当であると評価できる。

第3章では、インスリンへの糖鎖付加箇所の検討、インスリン遺伝子のデザイン、そして大腸菌におけるインスリンの発現、精製について述べている。野生型インスリンへの糖鎖導入は不可能であるという知見から、インスリンのアミノ酸配列に変異を導入するという方法によって、先の問題を解決しようとしている。変異導入箇所については、様々な角度から総合的に判断し、決定したものであり、独自で問題を解決する能力があり、またここでもインスリンの構造、機能について広く知識を身に付けたことが伺うことができる。またインスリンの発現、精製法についても多数の文献から得た情報を元に、本人のアイデアを加えることによって、精製を容易にするという工夫がされている。

第4章では、酵素合成法による糖インスリンの合成とその構造検討、更には活性評価について述べている。発現、精製した3種類のインスリン変異体のうち1種類においてのみ、変異による構造変化が無く、また糖鎖付加が可能であったが、最終的に目的の糖インスリンを合成することができた。ま

た得られた糖インスリンは糖尿病を誘発させたマウスを用いてインスリン活性測定を行っており、目的物質を合成する能力、またその活性評価をするための適格な方法を考える力があると評価することができる。

第5章では、インスリンレセプターへの糖インスリンの結合親和性について述べている。糖鎖を付加したことによるレセプターへの影響を脂肪細胞を用い、 ^{125}I ラベルされたインスリンをトレーサーとすることで結合親和性の評価を行い、考察している。糖インスリンの活性が変化した原因を絞る方法として、最適な方法を用いていると考えられる。

第6章では、糖鎖を分岐型糖鎖へと応用し、インスリンへ付加、活性測定について述べている。同様の方法を用いたものであるが、応用力があり、結果に対する考察も十分に考えられた信用性があるものである。

第7章は第1章から第6章までの総括を、またこれからの展望について述べている。

これを要するに、本論文はインスリンへ初めてシアル酸を含んだ糖鎖を付加し、それによって、生体内でのインスリンの活性持続作用を延長させることに成功したことをまとめたものであり、これからの糖尿病治療へ非常に大きな貢献となる可能性を持っている。

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。