

学位論文題名

Study on the Functional and Structural Characteristics of Growth-blocking Peptide

(昆虫由来成長阻害因子 Growth-blocking peptide の活性と
立体構造に関する研究)

学位論文内容の要旨

昆虫由来成長阻害因子 Growth-blocking peptide (GBP) は、寄生バチであるカリヤコマユバチ *Cotesia kariyai* に寄生された鱗翅目昆虫のアワヨトウ *Pseudaletia separata* の幼虫から、幼虫の成長や蛹化変態を阻害する因子として発見された 25 残基からなるペプチドである。また、多種類の昆虫から GBP と相同性の極めて高いペプチドが発見され、その活性が幼虫に対する麻痺、心臓拍動の制御、異物を排除する血球細胞の活性化など多岐にわたることから、GBP ファミリーは多機能のサイトカインであることが明らかになっている。興味深いことに、GBP はアワヨトウの遺伝子由来産物であり、未寄生の幼虫では全長 23 残基からなる 23GBP が発現していることが明らかになっている。さらに、寄生を受けた幼虫では寄生の過程で感染するポリドナウイルスの影響で、終止コドンがチロシンに翻訳されることにより C 末端残基の長い 28 残基からなるペプチド(28GBP)として合成されること、28 残基として発現されたこのペプチドが血清中のプロテアーゼなどによって 25 残基(25GBP)まで分解を受けることが示唆されている。このように、GBP は寄生を受けることによって C 末端残基が伸長することが知られているが、GBP 受容体が完全には同定されていないため、それぞれのペプチドがどのように幼虫の成長阻害活性に影響を与えているかは明らかになっていない。そこで本研究では、長さの異なる 3 種類の GBP が幼虫の成長阻害にどのように寄与しているかを明らかにするため、活性及び立体構造についての解析を行った。

初めに、C 末端の長さの異なる 3 種類の GBP が幼虫の成長阻害にどのように影響しているかを調べるため、それぞれのペプチドの活性を幼虫の体重変化により評価した。その結果、それぞれの GBP はすべて濃度依存的に幼虫の成長を阻害することが分かった。さらに、3 種類の GBP の活性の比較を行うと、幼虫の血清中で非常に早く分解を受けるはずの 28GBP が最も強い活性を示すという興味深い結果が得られた。次に、C 末端残基の立体構造への寄与を調べるために 23, 28GBP の水溶液中での立体構造を NMR 法により決定し、以前に報告されている 25GBP の立体構造との比較を行った。その結果、それぞれのペプチドの二次構造を形成するコア領域の立体構造にはほとんど差異は認められなかった。また、伸長した C 末端残基部分はフレキシブルな構造をしており、得られた立体構造から 28GBP がなぜ強い活性を有するかについての知見を得ることはできなかった。

そこで、28GBP の伸長した C 末端残基が、何らかの生体分子と相互作用することにより活性や構造に影響を与える可能性について検討を行った。一般的に、生体膜結合能をもったペプチドは膜結合時にプロテアーゼによる分解の影響を非常に受けにくいことが知られている。そこで、GBP が生体膜と結合する可能性を調べるため、表面プラズモン共鳴(SPR)及び限外濾過膜を用いたモルカット法による検討を行った。生体膜モデルとして、SPR 法では中性脂質の dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)からなる二重膜を、モルカット法では

NMR 法で生体膜モデルとして用いられる界面活性剤 dodecylphosphocholine (DPC) からなるミセルを使用した。その結果、23, 25GBP と比較して 28GBP は生体膜と強く相互作用することが明らかになった。そこで、28GBP が生体膜とどのように相互作用しているかを明らかにするため、NMR 法を用いて DPC ミセル中における解析を行った。まず、DPC ミセル存在下、非存在下における 28GBP の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを比較したところ、フレキシブルな N 末端部分及びコア領域のシグナルについてはほとんど変化が見られなかった。一方、C 末端部分のシグナルは大きくシフトし、C 末端部分の立体構造の変化を示唆する結果が得られた。この結果を受け、28GBP の DPC ミセル中での立体構造解析を行った。その結果、DPC ミセル結合時には N 末端部分、コア領域の構造はほとんど変化を受けないが、伸長した C 末端部分は両親媒性の α ヘリックス構造をとることが明らかになった。

生体膜モデル結合時の立体構造解析により 28GBP の構造を決定することができたが、28GBP のどの部分で相互作用をしているかを明らかにすることは、その後のメカニズムを考える上で非常に重要である。そこで、 ^{15}N 緩和を用いた運動性の解析、H/D 交換実験、常磁性物質を用いたスピンラベル実験などの各種 NMR 実験を用いて 28GBP と生体膜モデルとの相互作用のより詳細な解析を行った。運動性の解析では DPC ミセルと結合することで C 末端部分の運動性が大きく減少することが明らかになった。一方で、N 末端部分は大きな運動性の変化は認められず、生体膜と結合した場合でも、高い運動性を有していることが分かった。また、H/D 交換実験、スピンラベル実験により 28GBP と DPC ミセルとの相互作用界面の推定を行ったところ、C 末端両親媒性ヘリックスの疎水性残基(Phe²³, Tyr²⁴, Leu²⁶, Ile²⁷)に加えて、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルではシグナルの大きなシフトがみられなかったコア領域の残基(Val⁸, Ala⁹, Tyr¹¹)でも相互作用していることが明らかになった。

28GBP が生体膜と結合をすることにより強い成長阻害活性を示すメカニズムについては以下の二つのことが推定される。一つ目は、28GBP の生体膜との相互作用によりプロテアーゼなどによる分解の影響を受けにくくなることである。28GBP が強く膜と結合することで、23,25GBP よりも長い間、高濃度で維持されるために強い活性を示している可能性がある。二つ目に、生体膜結合により生体膜上に存在すると予想される受容体と結合しやすくなる可能性が考えられる。膜結合により三次元から二次元へと GBP の受容体探索過程が変化すること及び、受容体近傍の濃度上昇により受容体認識が容易になることにより、活性が上昇する可能性がある。

前述したように、GBP の受容体はいまだ同定されていないため、GBP の構造機能相関をより詳細に解析しようと考えた場合の方法の一つに GBP 変異体解析があげられる。しかし、そのような変異体実験を行う場合には大量かつ多種類のサンプルを短時間に、安価に調製する必要がある。一般的に、ペプチドサンプルを調製する際に用いられる方法としては、化学合成法、大腸菌発現法の二つがあげられる。しかしながら、化学合成法を用いた場合には NMR 法などに用いられる安定同位体ラベル化には非常に高いコストが必要になり現実的ではない。また、大腸菌発現法の場合は、融合タンパク質として発現させるため、プロテアーゼなどを用いたタグタンパク質の除去など、精製過程が長時間かつ複雑になってしまう欠点があった。そこで、融合タンパク質の状態でも GBP としての立体構造と活性を保持し、短時間に、安価にサンプルの調整を行うことのできる大腸菌発現系の構築を試みた。

初めに、これまでの変異体解析の結果から GBP の N 末端側よりも C 末端側にタグタンパク質を付加した場合の方が活性を保持したまま GBP 分子を提示できる可能性が高いと考え、C 末端側にタグタンパク質としてチオレドキシンを付加したベクターを構築した。次に、融合タンパク質状態でも GBP の構造、活性を保持しているかの検討を行うために、大腸菌発現系で発現、精製した融合タンパク質に対して血球活性化活性測定、及び NMR 法を用いた解析を行った。その結果、融合タンパク質の状態でも単独の GBP の場合とほとんど変わらない構造、活性を保持していることが明らかになった。

この融合タンパク質発現系を用いることで、より安価で短時間に GBP の立体構造、活性

の解析を行うことが可能になった。特に、ランダムミューテーションなどの膨大な数のサンプル数に対して解析を行う際には非常に有効な方法であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 河 野 敬 一

副 査 客員教授 津 田 栄 (連携分野)

副 査 准教授 相 沢 智 康

副 査 教 授 出 村 誠 (生命科学院)

学 位 論 文 題 名

Study on the Functional and Structural Characteristics of Growth-blocking Peptide

(昆虫由来成長阻害因子 Growth-blocking peptide の活性と
立体構造に関する研究)

昆虫由来成長阻害因子 GBP は、寄生バチであるカリヤコマユバチに寄生された鱗翅目昆虫のアワヨトウの幼虫から、幼虫の成長や蛹化変態を阻害する因子として発見された 25 残基からなるペプチドである。また、多種類の昆虫から GBP と相同性の極めて高いペプチドが発見され、その活性が幼虫に対する麻痺、心臓拍動の制御、異物を排除する血球細胞の活性化など多岐にわたることから、GBP ファミリーは多機能のサイトカインであることが明らかになっている。GBP はアワヨトウの遺伝子由来産物であることが明らかとなっており、未寄生の幼虫では全長 23 残基からなる 23GBP が発現していることが確認されている。さらに、寄生を受けた幼虫では寄生の過程で感染するポリドナウイルスの影響で、終止コドンがチロシンに翻訳されることにより C 末端残基伸長型 GBP(28GBP)として合成されること、28 残基として発現されたこのペプチドが血清中のプロテアーゼなどによって 25 残基(25GBP)まで分解を受けることが示唆されている。このように、GBP は寄生を受けることによって C 末端残基が伸長することが知られているが、GBP 受容体が完全には同定されていないため、それぞれのペプチドがどのように幼虫の成長阻害活性に影響を与えているかは明らかになっていない。本研究は、GBP の C 末端残基伸長がアワヨトウの成長阻害にどのように影響を与えているかを明らかとすることを目的としている。

本論文において、寄生による GBP の C 末端残基伸長とその成長阻害活性との関係を、NMR 法を中心とした分光法や生化学的方法に基づいた研究から明らかにすることを目的として研究を行っている。C 末端の長さの異なる 3 種類の GBP ではその立体構造にはほとんど違いがないにもかかわらず、C 末端残基伸長型 GBP が最も強い成長阻害活性を有していた。次に、成長阻害活性の強い C 末端残基伸長型 GBP がその C 末端部分で生体膜と強く相互

作用することを明らかにし、生体膜モデル結合状態での詳細な立体構造の決定、さらに、C末端残基伸長型 GBP と生体膜モデルとの相互作用部位の特定を行った。これらの知見をもとに、生体膜相互作用による C末端残基伸長型 GBP の成長阻害活性上昇メカニズムを提案している。

また、筆者は、より迅速に GBP の構造機能相関を解析することを目的とし、GBP の大腸菌発現系の改良を行っている。一般的に大腸菌発現法でペプチドを生産する場合には、融合タンパク質として発現させるため、精製過程が長時間かつ複雑になる。そこで、融合タンパク質の状態でも GBP としての立体構造と活性を保持し、プロテアーゼなどを用いたタグタンパク質の除去を必要とせず、短時間に、安価にサンプルの調整を行うことのできる大腸菌発現系の構築を試みた。まず筆者は、これまでに報告されている変異体解析の結果から GBP の N末端側よりも C末端側にタグタンパク質を付加した場合の方が活性を保持したまま GBP 分子を提示できる可能性が高いと考え、C末端側にタグタンパク質としてチオレドキシンを付加したベクターを構築した。次に、融合タンパク質状態でも GBP の構造、活性を保持しているかの検討を行うために、大腸菌発現系で発現、精製した融合タンパク質に対して活性測定、及び NMR 法を用いた構造解析を行った。その結果、融合タンパク質の状態でも単独の GBP の場合とほとんど変わらない構造、活性を保持していることを示した。この融合タンパク質発現系を用いることで、より安価で迅速に GBP の立体構造、活性の解析を行うことが可能になり、今後さらに詳細な GBP の分子メカニズムについての知見を得ることが可能になると期待される。

これを要するに、著者は、アワヨトウ幼虫の寄生による成長阻害について GBP の C末端残基伸長による成長阻害活性の上昇についての新知見を得たものであり、構造生物学や生化学等に対して貢献するところ大なるものがある。

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あるものと認める。