



甲殻類ペプチドホルモンに関する生物有機化学的研究

東海大学工学部生命化学科 講師 片山 秀和

はじめに

生体内の恒常性の維持や細胞の分化などは、一般的に内分泌的な制御下におかれていることが多く、甲殻類動物もその例外ではない。例えば甲殻類の血糖値は、甲殻類血糖上昇ホルモン(CHH)によって調節され、脱皮は脱皮ホルモン(エクジステロイド)によって促進されることが知られている。本講演では、甲殻類動物の種々の生命現象に焦点をあて、その内分泌制御の分子機構の解明を目的として進めてきた演者の研究の一端を紹介する。

1. 甲殻類血糖上昇ホルモンファミリーペプチド：立体構造解析と構造活性相関

甲殻類の体液中に存在する主要な糖はグルコースであるが、グルコース濃度は甲殻類血糖上昇ホルモン(CHH)とよばれる72アミノ酸残基からなるペプチドホルモンによって制御されている。一方、甲殻類の脱皮は脱皮ホルモンにより促進されるが、脱皮ホルモンの生合成は脱皮抑制ホルモン(MIH)によって抑制的に制御されている。クルマエビ *Marsupenaeus japonicus* のMIHは77アミノ酸残基からなるペプチドホルモンであり、CHHと高い配列相同性を有することから、これらのホルモンはCHHファミリーを形成している。CHHは、多くの甲殻類動物において弱いながらもMIH活性を示すことが知られているが、MIHはCHH活性を一切示さない。このことは、ペプチドの一次構造上の特徴から説明することが困難であり、これらのホルモンの立体構造上の相違点に興味を持たれた。そこで、演者らはクルマエビMIHの立体構造解析を行うことにした。

大腸菌を宿主とした組換えタンパク質発現系により、組換えMIHを調製し、天然物と同様のコンホメーションを保持していることを円二色性(CD)スペクトルにより確認した。この発現系を利用して¹⁵Nおよび¹³C/¹⁵Nで標識した組換えMIHを調製し、種々の二次元および三次元NMRスペクトルの解析から、MIHの立体構造を決定することができた。MIHは5つの α -ヘリックスを有し β -構造を含まない立体構造であり、それまでに立体構造が報告されていた他のいずれのタンパク質とも立体構造上の類似性が見られなかった。

この立体構造を基にクルマエビCHHの立体構造を推定し、

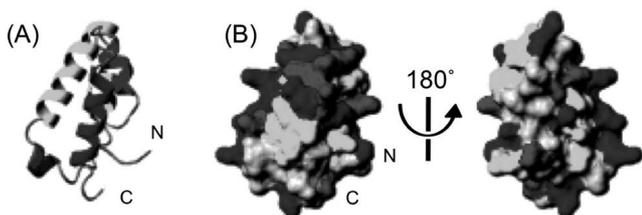


図1 クルマエビMIHの立体構造のリボンモデル(A)および表面構造(B)

それらの構造を特に分子表面の電荷および疎水表面の分布を中心に比較したところ、これらが顕著に異なる部位が見られた。CHHのC末端はアミド化されており、このアミド基がCHH活性に非常に重要であることを演者らは見出しているが、多くの甲殻類のMIHはアミド化されていない。表面構造が異なる部位がこのC末端近傍に位置しており、この周辺部位がホルモン機能に重要である可能性が考えられた。そこで、CHHおよびMIHの種々の変異体を調製し生物活性を比較したところ、予想通りこの領域に変異を入れたときに活性が顕著に低下することが見出され、CHHファミリーペプチドの機能部位をある程度特定することができた。このように、甲殻類のペプチドホルモンにおいて、立体構造に基づいた構造活性相関研究が行われたのはこれがはじめてのことである。

2. 甲殻類の造雄腺ホルモン：化学合成と構造・機能解析

甲殻類の性分化は、性ホルモンによる内分泌的制御下にあることが古くから知られており、オス特有の内分泌器官である造雄腺から分泌される造雄腺ホルモン(AGH)が存在するとその個体は機能的なオスへと性分化していく。AGHの化学構造は、オカダンゴムシ *Armadillidium vulgare* においてのみ決定されており、インスリン様ヘテロ二量体ペプチドであることが報告されている。甲殻類の性分化分子機構のより詳細な解析には、多量のAGHが必要になると考えられたが、AGHは生体内に微量しか存在していない。また遺伝子組換え技術による組換えタンパク質発現系では、ヘテロ二量体ペプチドの調製は一般的に困難である。一方、化学合成法は、インスリンファミリーペプチドの調製にも有効であり、これまでにいくつかのインスリン様ペプチドの合成も報告されている。そこで、化学合成によりオカダンゴムシAGHの調製を試みた。

オカダンゴムシAGHのA鎖には糖鎖が付加しており、その糖鎖が生物活性に重要である可能性がすでに報告されていた。また、AGHは他のインスリンファミリーペプチドとは異なる

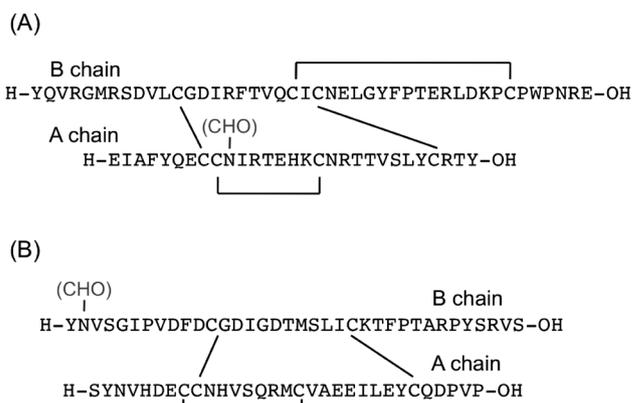


図2 (A) オカダンゴムシAGHの構造. (B) クルマエビIAGの構造. CHOは、糖鎖付加部位を示す

ジスルフィド結合架橋様式を有することが明らかにされていた。そこで、糖鎖付加部位を含むA鎖の一部を化学合成し、大腸菌発現系によって調製したB鎖からCペプチドおよびA鎖の一部までの配列を有するペプチドと縮合し、均一な糖鎖構造を有する種々のAGHプロペプチドを得た。しかしながら、*in vitro*におけるフォールディング反応と酵素的なCペプチドの除去によって得られた半合成AGHは、糖鎖の有無に関わらず生物活性を示さなかった。ジスルフィド結合架橋様式の解析から、これらの半合成AGHは天然型とは異なりインスリンと同様のジスルフィド結合を有していることが示され、図らずもAGHのジスルフィド異性体は活性を示さないことが明らかになった。一方、位置選択的なジスルフィド結合形成反応を用いた全合成によって、糖鎖を有するAGHに有意な活性が認められ、糖鎖を付加しないと活性が発現しないことが明らかになった。

オカダンゴムシAGHについて詳細な解析が進む一方、水産上の重要種である十脚目動物(エビ・カニ類)のAGHの構造解析の報告は無かった。近年、十脚目動物のオスの造雄腺で特異的に発現しているインスリン様遺伝子(インスリン様造雄腺因子、IAG)がクローニングされ、これがAGHであると期待されているがその直接的な証拠は得られていない。そこで、クルマエビ *M. japonicus* のIAGを標的として、化学合成によるIAGの調製と機能解析を行った。オカダンゴムシAGHと異なり、クルマエビIAGはB鎖にN-結合型糖鎖付加モチーフが存在している。そこで、糖鎖を有するものと有さないもの、およびインスリンタイプのジスルフィド結合を有するものとAGHタイプのジスルフィド結合を有するものの4種類のIAGを調製した。これらの *in vitro* における生物検定によって、インスリンタイプのジスルフィド結合架橋様式を有し、糖鎖を付加したIAGのみが有意なAGH活性を示すことが明らかになった。これらの結果は、IAGが十脚目のAGHであることを直接的に示すものである。またそれと同時に、IAGがオカダンゴムシ

AGHとは異なるジスルフィド結合を有することを示しており、甲殻類におけるインスリンファミリーペプチドの分子進化に興味を持たれるところである。

おわりに

甲殻類の内分泌現象の分子機構の解明を目指して、構造生物学的な手法から有機化学的なアプローチまで幅広い技術を用いながら研究を進めてきた。その結果として、CHHファミリーペプチドやAGHといったペプチドホルモンの構造と機能に関連する種々の発見をもたらすことができた。今後は、これまでに培った技術を利用して、あるいはさらに発展させることによって、甲殻類内分泌学のみならず様々な生命現象の分子機構の解明を目指していくつもりである。

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻生物有機化学研究室において大学院生時に行った研究、および東海大学工学部生命化学科において行った研究である。研究を開始する機会を与えていただき、また終始ご指導ご鞭撻を賜りました長澤寛道先生(現東京大学名誉教授)に深く感謝申し上げます。また、長澤先生には本賞にご推薦いただきました。改めて感謝申し上げます。東海大学において博士研究員として研究の場を与えていただきました中原義昭先生、ならびに北條裕信先生(現大阪大学蛋白質研究所教授)に厚く御礼申し上げます。研究を遂行するにあたり、多くの先生方、先輩方、共同研究者の皆様、学生たちのご協力がありました。すべての方々のお名前を挙げることはできませんが、特にお世話になりました相本三郎先生、川上徹先生(以上大阪大学)、田之倉優先生、永田宏次先生、作田庄平先生、永田晋治先生(以上東京大学)、長谷川由利子先生(慶應義塾大学)、園部治之先生(甲南大学)、大平剛先生(神奈川大学)、筒井直昭先生(岡山大学)にあらためて御礼申し上げます。最後になりましたが、本賞をいただけることになりましたこと、関係する学会の諸先生方に厚く御礼申し上げます。