

氏名(本籍)	しん 申	そん 松	ゆつぶ 曄	(韓国)
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	博甲第934号			
学位授与年月日	平成4年1月31日			
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当			
審査研究科	農学研究科			
学位論文題目	STUDIES ON SYNTHESIS AND STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS OF HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR (ヒト上皮細胞成長因子の合成と構造活性相関に関する研究)			
主査	筑波大学教授	農学博士	村上	和雄
副査	筑波大学教授	農学博士	近宗	干城
副査	筑波大学教授	農学博士	桑原	保正
副査	筑波大学教授	理学博士	宗像	英輔

論文の要旨

ヒト上皮細胞成長因子(h-EGF)は、胃酸分泌作用に対する強力な抑制物質としてヒト尿中より単離された、分子内に3ヶ所のジスルフィド結合を含むアミノ酸53残基から成るペプチド性細胞成長因子である。

これまでの生理化学的研究から、h-EGFは細胞膜表面の特異的な受容体に結合すると、受容体の自己リン酸化、チロシンキナーゼ活性の上昇を経て、細胞内蛋白質をリン酸化することにより、広範な細胞の増殖・分化を促進することが明らかになっている。また、近年、EGFの受容体は腫瘍ウィルスのチロシンキナーゼ型発癌遺伝子産物との間にアミノ酸配列レベルで極めて高い相同性を有していることが指摘され、発癌に関連して注目されている。

本研究ではこのh-EGFの生理学的な機能を明らかにする研究の一環として、合成化学的手法と培養細胞系を用いたバイオアッセイ系により、構造と活性の相関を検討した。

(A) h-EGFの液相合成

構造活性相関の研究上必要となるh-EGF及びその関連ペプチドを得るために、先ず本研究ではh-EGFの液相法による合成法の確立を試みた。

まず、53残基のペプチド鎖を9個のフラグメントに分割し、各保護フラグメントを個別に合成し、それぞれのフラグメントをC末端から水溶性カルボジイミド及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)を用いて縮合を繰り返す、順次ペプチド鎖を延長して保護ペプチドを得た。

縮合を完了した保護ペプチドは、t-ブチルオキシカルボニル(Boc)基の除去及び無水フッ化水

素処理を行い、粗ペプチドを得た。

次にジチオスレイトール (DTT) によって脱保護ペプチドを還元した後、ゲル濾過及び逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLG) を行い、還元型h-EGFを精製した。更に、空気酸化により分子内のジスルフィド結合形成を行った後、RP-HPLCにより再度精製し、最終的に純粋な標品を得た。精製の完了した合成h-EGFは、分析RP-HPLC、アミノ酸分析、質量分析及び酵素消化によって純粋な標品であることを確認した。

また、培養細胞株Balb/c 3T3及びNIH/3T3に対する細胞増殖活性を検討したところ、合成h-EGFは天然のh-EGFと同等な生物活性を持つことが確認された。

(B) h-EGFのアナログの固相合成

2次元核磁気共鳴によるEGFの構造解析並びにEGFファミリー間の一次構造の比較研究から、生物活性に重要な役割を果たすと推定される部位のアミノ酸を置換した各種アナログを固相法によって合成を試みた。

Boc-Arg (Tos) -OCH₂-PAM-樹脂を用いて、C末端側から順次Boc-アミノ酸をジシクロヘキシルカルボジイミド-HOBt法並びに対称酸無水物法により導入し、カップリング反応を繰り返すことにより目的とするアミノ酸配列を持つ保護ペプチド樹脂を得た。

こうして得られた各アナログの保護ペプチド樹脂に対して、2段階無水フッ化水素処理を行い、粗ペプチドを得た後、(A)のh-EGFの液相合成で述べた方法と同様に精製操作及び純度の確認を行った。

(C) h-EGFの構造活性相関

(B)で合成した各種アナログを用い、NIH/3T3培養細胞株におけるチミジンの取り込みを指標としてh-EGFの構造と細胞増殖活性との相関について検討を行ったところ、以下のような知見が得られた。

1) 13位のTyrを同じ芳香環を持つPheに置換した場合、天然型h-EGFと比較して同等の活性が認められたが、芳香環を持たないAlaに置換した場合は活性が著しく低下した。この結果から13位のアミノ酸には側鎖に芳香環が必要であることが示唆された。既に、NMRによる構造情報からN末端ドメインのβシート部分の芳香族アミノ酸 (Tyr²², Tyr²⁹) とTyr¹³の側鎖同士が著しく接近し、疎水性クラスターが形成されていることが知られている。Tyr¹³からAla¹³への置換によるこの疎水性クラスターへの影響が、活性の著しい低下をもたらしたものと予想される。

2) 37位のTyrをPheに置換したアナログは天然型h-EGFと同等の活性を示したが、Alaに置換したアナログでは著しい活性の低下が見られた。このことから37位のアミノ酸にも芳香環の存在が必須であることが示唆された。立体構造解析の研究から、Try³⁷の芳香環側鎖及びLeu⁴⁷の脂肪族側鎖が分子表面に露出していることが知られており、従ってTyr³⁷の芳香環はLeu⁴⁷の側鎖と共に受容体との相互作用に関与する可能性が考えられる。

3) Leu¹⁵を側鎖の小さなAlaに置換したアナログ、及びArg⁴¹を同じ塩基性アミノ酸であるLysに置換したアナログは、天然型h-EGFと比較して著しい活性の低下が見られた。これらの結果から、

15位のアミノ酸には大きな脂肪族側鎖が、41位のアミノ酸にはグアニジド基が活性発現に必要であることが示唆された。

審 査 の 要 旨

ヒト上皮細胞成長因子 (h-EGF) はアミノ酸53残基からなり、分子内に3個のジスルフィド結合を有する複雑な化学構造を持っている。そのためEGFの液相法による化学合成についてはこれまで、2、3の報告がなされているもののまだ確立したとは言えない状況にあった。本研究ではペプチドフラグメントの縮合反応に際してのラセミ化を極力抑えながら、ペプチド骨格を構築する簡便な方法で、天然物と同等な生理活性を有するh-EGFを簡便に合成することに成功した。さらに、h-EGFの構造活性相関を検討するために、アミノ酸の置換アナログを6種合成し、培養細胞の増殖を指標に活性発現に必須な化学構造についていくつかの新しい知見を得ている。これらの研究結果は、EGFならびにTGF- α などの、いわゆるEGFファミリーの生理機能の解明に意義を持つことが予想されし、細胞の増殖・生存など家畜生理学の基礎研究に大きく寄与し得るものと考えられる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。