

## 論文の内容の要旨

論文題目「セレン含有アミノ酸およびペプチドの合成と酵素モデルとしての応用」

学位申請者 下平 伸吾

キーワード：セレン 酵素モデル 化学合成 酸化還元反応 触媒活性

セレンは毒性の強い元素として知られている一方で、生体内の必須微量元素であることが明らかにされている。生体内に含まれるセレンのほとんどがセレン含有アミノ酸（セレノシステイン）として存在しており、セレノシステインはいくつかのセレン含有タンパク質（セレノプロテイン）に直接組み込まれることから 21 番目のアミノ酸として注目を集めている。セレノプロテインはヒトでは 25 種類が存在していることが知られている。しかしながら、機能や作用機序の詳細が明らかとなっていないセレノプロテインも多い。これは、細胞内でセレノシステインがペプチド鎖に組み込まれる過程が複雑であり、セレノプロテインを遺伝工学的に合成することが困難であるからである。一方で、化学合成によってセレノシステイン含有ペプチド（セレノペプチド）を合成し、これをフォールディングさせてセレノプロテインを得ようとする研究も進められている。しかし、セレノペプチドはセレノシステインを含まない通常のペプチドと比較して合成が難しく、収率が低い。また、原料となるセレノシステイン誘導体は高価であり、大量に入手することが困難である。このような事情から、セレノプロテインに関する研究は他のタンパク質に比べて遅れているのが現状である。

本論文では、セレン含有アミノ酸であるセレノシステインとそれを組み込んだセレノペプチドの効率的な化学合成法を確立し、合成したセレノペプチドを酵素モデルとして応用することを目的としている。

第 1 章では、上に要約した研究の背景を詳しく述べ、最後に本論文の構成と目的を提示した。

第 2 章では、セレノペプチドの化学合成に必要となるセレノシステイン誘導体を安価かつ大量に合成する方法について検討を行った。化学合成には、固相法と液相法が存在するが、どちらの場合においても、アミノ基及び側鎖のセレン原子が特定の保護基で保護されており、カルボキシ基が無保護のセレノシステイン誘導体が必要である。そこで、安価に入手可能な L-セリンを原料とした 5 段階の反応によるセレノシステイン誘導体の効率的な

合成条件の確立を目的とした。検討の結果、*t*-ブトキシカルボニル(Boc)基で保護されたセレノシステイン誘導体の合成は通算収率 70%以上で達成された。一方で、9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)基で保護されたセレノシステイン誘導体では、セレン化の段階においてラセミ化が進行していることが確認された。しかし、セレン化した化合物を再結晶することで単一のエナンチオマーを得ることに成功した。さらに、各反応条件を最適化することによって Fmoc 保護体についても Boc 保護体と同等の収率で得られるようになった。これによってセレノペプチドの化学合成の原料となるセレノシステイン誘導体を効率的に合成する手法が確立された。

第 3 章では、2 章において合成した Fmoc-セレノシステイン誘導体を用いて液相法によるセレノグルタチオンの合成条件の検討を行った。現在のペプチド合成では固相法が主流として用いられている。しかし、セレノグルタチオンは  $\gamma$ -グルタミン-セレノシステイン-グリシンから成る 3 残基の短いペプチドであることなどから、大量合成するためには液相法が適していると考えられる。そこで、液相法の条件検討を行うことで効率的にセレノグルタチオンを合成し、得られたセレノグルタチオンを代表的なセレノプロテインであるグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の酵素モデルとして利用することを目的とした。検討の結果、セレノグルタチオンを 3 段階、通算収率 98%で合成することに成功した。さらに、得られたセレノグルタチオンと過酸化水素や種々のチオールとの反応を  $^{77}\text{Se}$  NMR にて追跡した結果、GPx の触媒サイクルに重要な中間体を初めて同定することに成功した。また、セレネニルスルフィドの不均化反応によりセレノグルタチオンが再生されることが確認された。このことから、GPx の活性中心に存在するトライアッド構造が、触媒サイクルにおける Se-S 結合の開裂によるセレノールの再生を加速していることが示唆された。一方で、セレノグルタチオンをミスフォールドしたウシ膵臓リボヌクレアーゼ A の天然構造へのリフォールディングに応用したところ、セレノグルタチオンは触媒的にミスフォールドタンパク質をリフォールディングできることが明らかになった。このことから、セレノグルタチオンがプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) の酵素モデル化合物としても有用であることが示された。

第 4 章では、新規環状セレノペプチドの合成及び GPx 活性評価についての検討を行った。以前の研究で、セレノシステイン、グルタミン、トリプトファン、アスパラギンから構成されるテトラッド構造が GPx の活性中心に存在することが示唆されている。そこで、テトラッド構造と GPx 様触媒活性の関連を明らかにすることを目的として、ペプチドの N 末端アミノ基と C 末端カルボキシ基がアミド結合によって結合した環状セレノペプチドの合成検討を行った。目的の環状セレノペプチドは分子内ネイティブケミカルライゲーシオンによって得られた。4 つのアミノ酸を含む環状ペプチド及び各アミノ酸欠損ペプチドの GPx

様触媒活性を測定することで、テトラッド構造の存在を支持する実験結果が初めて得られた。

第 5 章では、第 2 章から第 4 章で述べた研究結果について総括した。

本論文では、セレノシステイン誘導体及びセレノペプチドの効率的合成法を確立し、セレノペプチドが GPx や PDI の酵素モデルとして有用であることを示した。このようなアプローチは前例がほとんどなく、今後、セレノプロテインのモデル化合物の設計において重要な示唆を与えるものである。セレノペプチドは、タンパク質ミスフォールド病の治療薬としても今後、医学、薬学分野での応用が期待される。