

無脊椎動物生理活性ペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストの開発

大谷 政博

広島大学大学院生物圏科学研究科

Development of agonists and antagonists of invertebrate bioactive peptides

Masahiro OHTANI

*Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8521, Japan*

要 旨

第1章 序 論

無脊椎動物の生理活性ペプチドは、ここ20年程の間に、節足動物や軟体動物を中心として多数同定されてきた。これらは神経伝達物質、神経修飾物質あるいはホルモンとして生体機能の調節に大きな役割を果たしていることが示唆されてきた。しかし、脊椎動物の場合に比べると、それらの生理・薬理学的研究は遅れていると言わざるを得ず、その原因の1つとして、神経ペプチドのアゴニストやアンタゴニストの開発がほとんどなされていないことが挙げられる。特に、アンタゴニストによる活性阻害実験は、ある物質が生理的に働いているかどうかを明らかにするのに最も有効な手段のひとつである。神経ペプチドの特異的なアゴニストやアンタゴニストが開発できれば、細胞、組織または個体レベルでそのペプチドが果たしている生理的な役割の解明が飛躍的に進むことが期待され、特に、ある情報伝達物質の特異的なアンタゴニストを得ることは、神経薬理学のみならず、神経生理学にとっても極めて大切である。アセチルコリンやセロトニンなどのいわゆる古典的神経伝達物質は、神経系を持つすべての動物でほぼ共通の物質が使われており、したがって、それらのアンタゴニストも、医学分野、製薬分野で開発されたものがある程度使用できる。しかし、神経ペプチドについては、無脊椎動物のものと脊椎動物のものとは大きく異なり、薬理作用から考えてその受容体も異なっていることは間違いない。したがって、神経生物学の発展のためには、無脊椎動物神経ペプチドの特異的なアゴニストやアンタゴニストの開発が望まれる。そこで、無脊椎動物の生理活性ペプチドのペプチド性アゴニスト及びアンタゴニストの開発を目的として研究を行なった。

第2章 生理活性ペプチドの同定とその活性

どのような生理活性ペプチドのアゴニストやアンタゴニストを開発すればよいかを決めるため、

まず最初に軟体動物とキョク皮動物において筋運動の制御などに関与していると思われる生理活性ペプチドの同定を行った。そして、これら同定ペプチドと既知のペプチドを比較検討して、対象とするペプチドを選ぶことにした。

最初に、キョク皮動物のマナマコ、軟体動物のハマグリとヨーロッパマイマイから、それぞれの動物の筋を生物活性検定系に用いて、生理活性ペプチドの単離・同定を行った。その結果、これらの動物から約30種類の生理活性ペプチドを発見した。ナマコのペプチドはそのすべてが新型のものであった。しかし、その中で、Sticho-MFamide-1,2と名付けた2種のペプチドだけは、他のキョク皮動物から同定されているSALMFamide関連ペプチド族の同族体といえるペプチドであることがわかった。したがってSALMFamide族の仲間キョク皮動物門に広く分布していると思われる。

ハマグリとヨーロッパマイマイから発見したpQVPLPRYamideとpQPPLPRYamideは明らかに同族体であり、C末端部にPLPRYamide構造を共通に持つ新規の興奮性ペプチド族のメンバーが軟体動物に広く分布していることが示唆された。そのほかの軟体動物ペプチドは、すべてが既知の軟体動物ペプチド族のメンバーと言えるものであったが、アミノ酸配列は新規なものであった。

第3章 合成ペプチドライブラリーからの活性物質単離法の確立

無脊椎動物生理活性ペプチドのアゴニストやアンタゴニストを開発するのに最も有効な手法を選択し、その手法を最適化する目的で予備的研究を行った。その手法としては、化学・医学などの分野で医薬品となるためのリード化合物を迅速に得る手段等として近年注目を浴びているコンビナトリアルケミストリーと呼ばれる手法を選び、これを用いて合成したペプチドライブラリーから活性物質の単離を試みた。

ペプチドライブラリーからの活性物質単離法を確立するために、まず、約250万種類の5残基ペプチドからなるペプチドライブラリーをマルチペプチド合成機を用いて作り、無脊椎動物の筋を生物活性検定系として活性物質を単離することとした(図1A)。しかし、このライブラリーは無脊椎動物の筋に対しては活性を示さなかったため、脊椎動物であるウズラの直腸に対する効果を調べたところ、興奮性活性が見られた。したがって、ウズラ直腸を生物活性検定系としてこれから活性物質の単離を試みることにしたが、このライブラリーにはあまりにも多数のペプチドが含まれており、したがって1種類あたりのペプチドの量が非常に微量で、活性物質を単離するのは困難であると思われた。そこで、次に、N末端のアミノ酸残基を通常アミノ酸のいずれかに決定し、含まれるペプチド数を約13万種類に減らした19組のライブラリーを作成し、これらの活性を調べた。その結果、N末端にArgあるいはLysを持つライブラリーに収縮惹起活性が見られた(図1A, B)。これらのライブラリーから高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて活性物質の単離を試みたが、結局単離することはできなかった。よって、以後も同様に段階的にライブラリーを合成してゆき、最終的に数百種類のペプチドを含むライブラリーから、約20種類のニューロテンシンの構造に関連した活性ペプチドを単離した。このように、ペプチドライブラリーから実際に活性物質を単離することができたことにより、アゴニストやアンタゴニストの開発にこの手法を用いることが可能であることが示された。更に、C末端にWamide構造を持つ5残基ペプチドのライブラリーからは、同様の手法を用いてウズラ直腸に対して抑制活性を示すTFVAWamideなどの約20種のペプチドを得た。以上の研究により、ペプチドライブラリーからの活性物質の単離法として、数百万から数千万種類のペプチドを含むライブラリーから活性物質を探索する際には、各ポジションのアミノ酸残基を最も強い活性を示すものと次々に決定してゆき、最終的に、含まれるペプチド数が数

百種類以下のライブラリーからは、HPLCを用いた活性物質の単離が可能であることが明らかになった。この手法を「段階的同定法」と名付け、以後の実験においても用いた。

次に、無脊椎動物の筋に効果を示すペプチドライブラリーを探索する目的で、3残基と4残基のペプチドから成るライブラリーを合成して活性を調べたところ、C末端にWamide構造を持つ数種のライブラリーが軟体動物であるイガイの足糸前牽引筋に対して抑制性の活性を示したので、この筋とウズラ直腸あるいはモルモット回腸を活性検定系として活性物質の単離を行った。その結果、APGWamideのアゴニストやオピオイド活性を持つYGHWamideや(Trt)NQWamideなどの新規のペプチドが得られた。これらのうち、大塚製薬のグループや大阪大学蛋白質研究所の相本三郎教授らの協力によって開発した(Trt)NQWamideは、極めて強いオピオイド活性を持ち、しかも体内で分解されにくく、末梢系オピオイドペプチド受容体のアゴニストとしてモルヒネ以上に有用な薬となりうる可能性が考えられる。

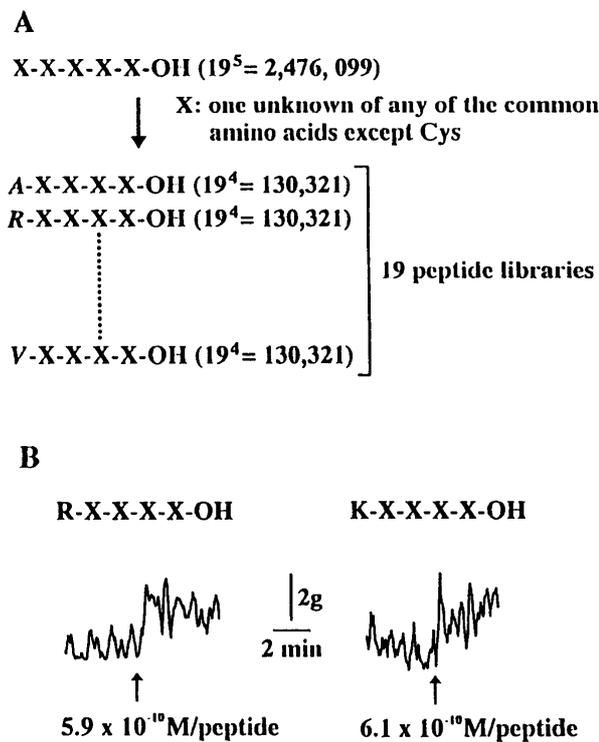


図1 XXXXXXとOXXXXの合成ペプチドライブラリー(A)とRXXXXとKXXXXのウズラ直腸の自動収縮に対する効果(B)。XはCysを除く19種類の通常アミノ酸の混ざりの残基、OはCysを除く通常アミノ酸のいずれかが結合した残基を示す。

第4章 軟体動物神経ペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストの探索

第2章で同定したペプチドと既知の無脊椎動物生理活性ペプチドの中から、アゴニストやアンタゴニストを開発するのに最も適したペプチドを選択し、前述の「段階的同定法」を用いて選択したペプチドのリガンドを開発する目的で研究を行なった。そのペプチドとして、軟体動物神経ペプチ

ドであるAPGWamide及びイガイ抑制性ペプチド(MIP)を選んだ。その理由として、軟体動物において重要な働きをしていると考えられ、構造活性相関がある程度調べられており、更に、MIPはC末端部4残基で十分に活性を示すことがわかっており、APGWamideと共に短い神経ペプチドであることから、ペプチドライブラリーを用いた研究に適していることが挙げられる。

次に、APGWamideとMIPのアゴニストやアンタゴニストを開発する目的で研究を行なった。まず、これらの神経ペプチドの構造活性相関を更に調べる目的で、アミノ酸残基の1部を他の通常アミノ酸に置換したペプチドやペプチドライブラリーを合成し軟体動物の筋に対する効果を調べ、活性を示したライブラリーからは活性物質の単離を試みた。その結果、これらの神経ペプチドのアゴニストを多数単離し、更に、これらの実験により、APGWamideやMIPの活性発現にとって重要な残基や、活性の強さに関わっていると思われる残基についての情報が得られた。

最後に、アンタゴニストを開発する目的で、目的とするリガンドが得られる可能性のあるペプチドの構造を得られた情報に基づいて検討した結果、活性発現に重要と考えられるC末端部位にアミノ酸を結合させることによって、APGWamideやMIPの活性発現が抑えられかつ受容体との結合能が失われないリガンドが得られるのではないかと考えて、C末端に1個あるいは2個の通常アミノ酸を結合させ、C末端をアミド化したペプチドやペプチドライブラリーを合成し、これらの拮抗効果を調べた。その結果、APGWamideに対して拮抗効果を示す数種のアンタゴニストやMIPの多数のアゴニストを得ることができた。APGWamideのアンタゴニストのうち、APGWGNamideは、最も強い拮抗効果を示すと共に(図2)、APGWamideの生理的働きの解明のための試薬として用い得ることができると考えられた。

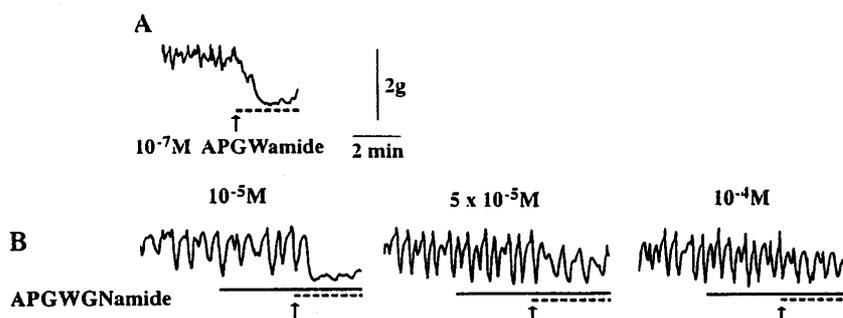


図2 セトウチマイマイのそ嚢の自動収縮におけるAPGWamideの効果(A)に対するAPGWGNamideの拮抗効果(B)。—: APGWGNamide を作用させている時間。---: APGWamide を作用させている時間。
↑: APGWamide を投与した位置。

第5章 総合考察

以上のように、本研究では、コンビナトリアルケミストリー法を用いて作ったペプチドライブラリーの中から、アゴニストやアンタゴニストを単離同定する方法を確立し、それを用いて実際にオピオイドペプチドの新規のアゴニストや無脊椎動物神経ペプチドであるAPGWamideとMIPの多数のアゴニスト及び若干のアンタゴニストを開発することができた。したがって、単離法や生物活性検定法を変えて「段階的同定法」を用いれば、ある生理活性ペプチドのアゴニスト・アンタゴニストや、新規で薬理的に有用なペプチドを更に多数開発できると思われる。また、「段階的同定法」

は、生理活性ペプチドの構造活性相関を調べる研究においても極めて有効な手段のひとつであると考えられる。

今後は、無脊椎動物の生理活性オリゴペプチドのアゴニストやアンタゴニストを多数開発し、これらを用いて生理活性ペプチドの筋組織やニューロンにおける作用機構や、それらペプチドの生理機能を明らかにしていきたい。