

【20】

氏名(本籍)	小坂田 史 雄 (岡山県)
学位の種類	農学博士
学位記番号	博甲第423号
学位授与年月日	昭和62年3月25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	Structure-activity study of neurokinin A and neurokinin B on smooth muscles (ニューロキニンA, Bの平滑筋収縮における構造活性相関の研究)
主査	筑波大学教授 農学博士 安井 恒 男
副査	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 今 川 弘
副査	筑波大学教授 医学博士 山 下 亀 次 郎
副査	筑波大学助教授 理学博士 宗 像 英 輔

論 文 の 要 旨

ニューロキニンA (NKA) 及びニューロキニンB (NKB) は豚脊髄より単離同定されたアミノ酸10個よりなる所謂タヒキニンペプチドである。タヒキニンペプチドはC末端側にI-II-Phe-III-Gly-Leu-Met-NH₂という共通した配列を持つ一群のペプチドであり、平滑筋収縮、唾液分泌、血圧低下、及び新生ラット脊髄脱分極等の作用を持っている。

I II III

Neurokinin A	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
Neurokinin B	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
Substance P	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂

本研究の目的は、SP-Pタイプの受容体を持つモルモット回腸縦走筋 (GPI), 及びSP-Eタイプの受容体を持つ、ラット輸精管 (RVD) とラット十二指腸縦走筋 (RDN) を用い、ニューロキニン (NKs) の構造活性相関の研究を行い、それぞれのアミノ酸の活性発現時の役割や活性型コンホメーションを調べ、受容体の解析を行うとともに、アンタゴニストの合成やドラッグ

デザイン等の開発の可能性を検討することにある。

本研究ではペプチドは総て固相法により合成が行われた。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製後 6 N 塩酸で加水分解しアミノ酸分析により組成を調べ、またアミノペプチダーゼ M、及びカルボキシペプチダーゼ P 分解物のアミノ酸分析によりアミノ酸配列が確認された。合成ペプチドは HPLC で総て単一のピークを示し高純度のものが得られた。筋収縮は、タイロード液 (5 ml) を満たしたマグヌス管に筋をトランスドューサーで固定し増幅機を通して記録した。マグヌス管は 37 度に保ち常時 95% O₂ / 5% CO₂ で飽和した。GPI, RDN はペプチドによる筋の直接の収縮を、RVD は筋を電気刺激しペプチドによる収縮の増加をみた。

合成 NKs を用いて筋収縮活性を調べたところ、SP - P 受容体を持つ GPI に対して NKA, NKB の EC₅₀ はそれぞれ 9.9 nM, 4.8 nM で SP (2.2 nM) のそれぞれ 15%, 40% の活性しか持たなかった。しかも SP の最大収縮は NKs の 80% しかなく、GPI は NKs と SP は異なる受容体と作用していることが確認された。SP - E である RVD 及び RDN に対する EC₅₀ は NKA 1.7 nM, NKB 3.2 nM で SP (674 nM) より 40 - 400 倍強い活性を示した。このことにより NKs は SP - E 受容体に対する内因性のアゴニストと考えられた。そのため主に RDN と RVD の SP - E タイプの組織において NK - A と NKB の構造活性相関の研究が行われた。まず最小活性フラグメントを調べるため、N 末端よりアミノ酸を一つずつ欠いた C 末フラグメントを合成し、RDN, RVD, GPI の収縮活性が調べられた。

GPI では、NKA, NKB, とも C 末端ヘキサペプチドまで活性を維持するが NKA (NKB) 5 になると活性はなくなった。RVD と RDN は C 末端ヘプタペプチドまで活性を維持するが Asp⁴ が取れた C 末端ヘキサペプチドになると活性を喪失する。これより RVD と RD - N に存在する受容体は同じか、或いは非常によく似たものであることが示唆された。また RVD では測定できていないが、RDN においては Asp⁴ が取れても最大収縮が変化しないことから Asp⁴ は受容体に対して親和性を高めていると考えられた。NKA 7 と NKB 7 を比較すると、NKA 7 の方が活性が高いことより Phe⁵ (NKB) より Ser⁵ (NKA) の方が受容体に対して親和性が高く、この 2 残基の違いが NKA, NKB の活性の強さに影響していることが示唆された。これは NKs の N 末端 3 残基を総て Ala に代えた場合、NKA の方が NKB より強い活性を示したことから確認された。GPI では逆に NKB フラグメントの方が活性が高く、この筋に存在する NKs の受容体は RDN に存在する受容体と異なることが示唆された。さらに NKs の N 末端 3 残基が存在する方が、RDN, GPI 共に活性は高く、さらに N 端 3 残基を Ala に変えた NKs のアナログは天然の NKs と同等の活性を持っているため、N 端残基は受容体と直接作用するのではなく、分子の C 端側の構造を安定化し受容体と結合し易くしていると考えられた。

C 末端フラグメントの実験では NKs の Asp (I) と Val (III) が受容体の認識に寄与しているかどうかはわからなかった。これを調べるために NKs の Asp⁴ と Val⁷ を SP のアミノ酸に対応する Gln と Phe に置換した C 末端ヘプタ誘導体を合成し、RDN と GPI で活性が調べられた。

その結果、RDNではNKsあるいはSPはAsp (I) - Val (III) の組み合わせが最も活性が高く、SP-E型の受容体はこの2残基を認識していることがわかり、NKsがRDNのSP-Eタイプ受容体の内因性アゴニストであることがさらに強く示唆された。GPIにおいてNKsはAsp (I) - Val (III) とGln (I) - Phe (III) の組み合わせが共に同程度の活性を示したことから2種類の受容体の存在がさらに確認された。一つはSPC末端ヘプタペプチド (SP 7) が非常に高活性であることから、SP 7の構造に特異的な受容体であり、もう一つはNKsに対するものでN端部のアミノ酸総てが高活性に必要である。

C末端より5残基目のPheはすべてのタヒキニンに共通なアミノ酸であり、受容体との結合に最も重要であることが分かっている。またC末端アミドも活性発現には重要である。このことはNKsでDSAV及びNKA-OHを用いて確認された。

NKsやSPはどのような形で受容体と相互作用しているかを調べることはアンタゴニスト等を合成する上で有益である。SPはC末端がヘリックス構造を取り易いことが核磁気共鳴や円偏光二色性の研究から知られていた。そのためSP及びNKsのC末端より3残基目のGlyを α -ヘリックスを壊すProやSarに置換したアナログ及び α -ヘリックスを安定化するAlaに置換したアナログを合成しRDNとGPIで活性を測定した。Pro⁸-NKs, Sar⁸-NKsはRDNで活性が低下しAla⁸-NKsでは活性が低下しなかった。このことによりNKsはRDNの受容体と結合するとき、C末端側は特異的なコンホメーションを取っていることが示唆された。特にSar⁸-NKsで活性が低下することにより、8位Glyのアミドプロトンは分子内での水素結合を形成していることが示唆された。GPIでは、ProやSar置換NKsアナログ及びSPアナログは活性が低下しなかった。すなわちGPIでは、少なくともC末端側はヘリックス構造の様な形では受容体と結合しないと考えられる。先にGPIに2種類のタヒキニン受容体が存在することが示されたが、Pro⁸-NKs及びSar⁸-NKsは活性が低下しないことから、GPIに存在するNKs受容体はRDNに存在するものと異なることがここでも示唆された。

以上より、RDNに存在するSP-E受容体では、NKsはAsp (I) - Val (III) により認識され、C末端アミドより親和性が更に高められ、Phe⁶より収縮が引き起こされると考えられる。またC末端部は α -ヘリックス様の特異的なコンホメーションをとっていることが示唆された。一方GPIには少なくとも2種類の受容体が存在する。一つはNKsに対する受容体でAsp (I) - Val (III) の組み合わせとN末端3残基が高活性を現すのに必要である。もう一つはSPに対するものでSP 7の配列に非常に特異的である。2つの受容体ともタヒキニンがC末端部に特異的なコンホメーションをとる必要はない。この点でRDNのSP-Eタイプ受容体とは異なる。またどちらの受容体に対してもPhe⁶ (SPではPhe⁷) とC末端アミドは必要である。

これらの情報から著者はNKsがRDNのSP-Eタイプの受容体と、SPがGPIのSP-Pタイプの受容体と相互作用するときのモデルを提示した。

審 査 の 要 旨

ニューロキニンA、及びBは新しく発見されたペプチドであるため、ここで得られたニューロキニンに関する結果は総て新しいものである。本論文では構造活性相関の研究により、ニューロキニン及びサブスタンスPの構成アミノ酸の役割を明確にするとともにタヒキニン受容体の分類を行っている。

本研究に使用されたペプチド誘導体は市販されていないため総て合成されている。従って、合成から精製、構造確認、定量までかなりの時間と労力が費やされている。

ニューロキニンが発見される以前から他のタヒキニンペプチドに於いて構造活性相関の研究は行われていたが、このように構成アミノ酸の役割を明確に示し、またSP-E及びSP-E受容体の性質の解明を行った報告は今までに無く本論文が初めてである。

ニューロキシンの様な比較的小さなペプチドに活性部位、受容体認識部位、及び親和性部位が存在することが明確に示された例は無く、その点において重要な結果が得られている。ペプチドの構成アミノ酸の活性発現時における役割がわかるとアンタゴニストやさらに強い活性を持つアゴニストペプチドの開発を行うことができ、またタヒキニン受容体の分類等が可能となることは充分に考えられることである。特に、最近ニューロキニンとサブスタンスPが線条体などある種の組織では一つの神経細胞に存在することがわかっており、そこでのそれぞれの作用を調べるためには受容体選択性のアンタゴニストが必要になることは明白である。

本研究では活性測定のみ行われているが、各ペプチドの筋組織との結合実験を行うことも可能であり今後検討の余地がある。またラット輸精管に存在するSP-Eタイプの受容体がラット十二指腸に存在するものと同じものかどうかについてはさらに明らかにする必要がある。

将来、この研究から得られた情報のみならず合成されたペプチドが中枢でのタヒキシンの作用や受容体の研究に利用されることが期待できる。

よって、著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。