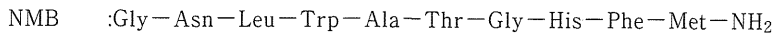
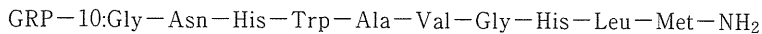


氏名(本籍)	向井秀仁(和歌山県)		
学位の種類	学術博士		
学位記番号	博甲第728号		
学位授与年月日	平成2年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	The study of bombesin-like neuropeptides from mammals. (哺乳動物由来ボンベシン様神経ペプチドの研究)		
主査	筑波大学教授	農学博士	安井恒男
副査	筑波大学教授	農学博士	村上和雄
副査	筑波大学教授	医学博士	山下亀次郎
副査	筑波大学助教授	理学博士	宗像英輔

論文の要旨

近年多くのペプチドが哺乳動物の脳、中枢神経系より単離され神経伝達物質の有力候補と目されているが、これらの生理作用、作用機序は不明な点が多い。このようなペプチドのなかにガストリン放出ペプチド (GRP)、そのC末端デカペプチド GRP-10、並びにニューロメディン B (NMB) がある。これらは既にカエル皮膚より単離されて



いたボンベシンと一次構造が類似していたため、ボンベシン様ペプチドと総称されており、その生理作用として胃幽门部からのガストリン分泌の促進が考えられている。しかしそれ以外にもインスリンをはじめとした多くのホルモン分泌刺激、膵臓腺房細胞からの外分泌の促進、各種培養細胞系において細胞を細胞周期の G₀期から G₁期への移行させるコンピーテンス因子としての増殖刺激、平滑筋収縮刺激、体温刺激、節食行動の修飾等多岐にわたる生物活性を持っているが、その真の生理作用や詳細な作用機序は未だ明らかではない。そこで本研究では哺乳動物におけるボンベシン様ペプチドの生理作用、生体内での作用機序の解明を目的とし、構造と活性の相関を子宮、胃、膀胱収縮並びにガストリン、インスリン、グルカゴン分泌刺激を指標に検討した。

(1)ペプチドの合成

(2), (3), (4)に示す構造活性相関の研究に用いたペプチドは、C末端がアミドの場合 p-メチルベンズヒドリルアミン樹脂を、遊離のカルボキシル基の場合クロロメチル樹脂を用いて固相合成した。合成終了後無水フッ化水素処理を行い側鎖保護基を除去するとともに樹脂からペプチド鎖を脱離、

酢酸で抽出後逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）を用いて精製した。精製したペプチドは分析用 RP-HPLC，薄相クロマトグラフィーによって単一なピークあるいはスポットを示すことを確認した。また酸分解並びに酵素分解しアミノ酸分析を行い，理論値と一致することを確認した。

(2)ラット各種平滑筋標本における GRP-10及び NMB の構造活性相関

(1)で合成したペプチドを用いたラット子宮，胃及び膀胱収縮における構造と活性の相関を検討した。その結果，GRP-10及び NMB によるラット子宮収縮には 4 位 Trp 残基及び C 末端 Met-NH₂が必須であること，またラット子宮，胃並びに膀胱収縮において GRP-10と NMB の収縮活性の差は 6 位の違いによるところが大きいこと，さらに GRP-10，NMB とも両者の C 末端ノナペプチドアミドが最大収縮活性を示すことが明らかとなった。また従来知られていた GRP 選択的な組織に加え，NMB 選択的な組織が存在することが示され，NMB 選択的な受容体の存在が示唆された。

(3)NMB 並びに GRP-10誘導体による膵-消化管ホルモン分泌刺激作用

NMB，GRP-10とそれぞれの 3，6，9 位置換アナログ，C 末端カルボキシル基誘導体並びに C 末端フラグメントによるガストリン，インスリン，グルカゴン分泌刺激活性を正常雑犬に後肢静脈よりワンショットでペプチドを投与することによって検討した。また NMB，GRP-10のイヌ単離膵に対するインスリン，グルカゴン分泌刺激活性を併せて検討した。その結果，ガストリン，インスリン，グルカゴン分泌において GRP-10は NMB の10倍以上の分泌刺激活性を持ち，それらの活性の差は主に 6 位アミノ酸残基の違いに起因していること，NMB，GRP-10のこれらホルモン分泌刺激には C 末端のアミド及びそれぞれ C 末端オクタペプチドアミド，ノナペプチドアミド構造が必要であること。GRP-10，NMB 両者ともそのノナペプチドアミドがそれぞれとほぼ同程度の分泌活性を持つこと，さらにガストリン，インスリン分泌刺激において [Leu³] GRP-10が GRP-10以上の分泌活性を持つアゴニストであることが示された。

(4)GRP-10によるインスリン分泌刺激に対するアンタゴニストの検討

GRP-10の 4 位及び 6 位置換アナログ [Ala⁴] GRP-10及び [Ala⁶] GRP-10のガストリン，インスリン，グルカゴン分泌刺激活性を(3)の場合と同じ手法を用いて検討した結果，[Ala⁴] GRP-10はこれらホルモン分泌を刺激せず，また [Ala⁶] GRP-10はガストリン分泌のみを刺激した。そこでこれらペプチドを GRP-10とともに正常雑犬に投与し，GRP-10によるガストリン，インスリン，グルカゴン分泌刺激にどのような影響を与えるかを検討した。その結果，GRP-10の 4 位 Trp 残基は GRP-10によるガストリン，インスリン，グルカゴン分泌刺激に必須で，しかもこの部分が GRP-10とその受容体との親和性をもつことに必要な部分であること，[Ala⁶] GRP-10は GRP-10によるインスリン，グルカゴン分泌刺激に対するアンタゴニストであること，さらにこれがガストリン分泌に対してはアゴニストであることが明らかとなり，これらのことから GRP-10によるガストリン分泌刺激とインスリン，グルカゴン分泌刺激ではメカニズムが異なり，それはガストリン分泌刺激とインスリン，グルカゴン分泌刺激に關与する GRP 受容体が異なるためであることが示された。

(5)結論

哺乳動物の生体内には GRP-10選択的であるボンベシン様ペプチド受容体と NMB 選択的であるポ

ンベシン様ペプチド受容体が存在し、これら GRP-10 と NMB の選択性は主にそれぞれの 6 位アミノ酸 Val (GRP-10) - Thr (NMB) の違いに起因していること、同じ GRP-10 選択的である受容体でもガストリン分泌刺激に関与するものとインスリン分泌刺激に関与するものではタイプが異なることが初めて示された。

審 査 の 要 旨

本論文では哺乳動物由来のボンベシン様ペプチドである GRP-10 及び NMB の構造活性相関の研究を行い、ボンベシン様ペプチド受容体が複数存在することを明らかにし、加えてこれらペプチドの構成アミノ酸の役割を明確にしたうえで、さらにガストリン、インスリン、グルカゴン分泌刺激に対して GRP-10 より高い活性を持つアゴニスト及びボンベシン様ペプチドによるインスリン、グルカゴン分泌刺激に対するアンタゴニストをデザインしている。ボンベシン様ペプチドの活性部位及び親和部位がはっきりと示され、しかもボンベシン様ペプチドに複数の受容体が存在することを示したのは本論文がはじめてであり、これは神経ペプチドによる多様な生体制御機構を知るうえで、大きな情報を与えるものである。さらに選択的なアゴニストやアンタゴニストを開発したことは、ボンベシン様ペプチドの細胞内情報伝達系研究に道を開くばかりでなく、これらペプチドの生理作用を知るためにはなくてはならないものである。

本論文においてはボンベシン様ペプチドによるインスリン分泌刺激に選択的なアンタゴニストを開発しているが、ガストリン分泌刺激に対するアンタゴニストは未だ開発されておらず、開発を進めていく必要がある。本論文の構造活性相関の研究によって得られた結果は、この開発にも多くの示唆を与えることになろう。さらに最近、ボンベシン様ペプチドが複数の癌細胞の自動分泌因子として増殖を刺激していることがわかった。本論文において開発されたアンタゴニストはこのような癌細胞の増殖を抑制するかどうかにも興味を持たれ、また構造活性相関の結果は、制癌剤の開発にも示唆を与える可能性が考えられる。このように本論文によって得られた結果は、ペプチドータンパク質による生体制御機構の基礎研究に示唆を与えるばかりでなく、臨床応用の可能性も含んでおり、将来の発展が期待される。

よって、著者は学術博士の学位を受けるに十分な資格があるものとみとめる。