

## 審査の結果の要旨

氏名 柴田 健志

### 1) はじめに

エンドセリン (ET) は、非常に強力な血管収縮作用を有する内因性ペプチドであり、その作用を阻害することは、高血圧症をはじめいくつかの病態の改善につながることが期待されている。ヒトの ET 受容体はこれまでに A 型 (ET<sub>A</sub>) と B 型 (ET<sub>B</sub>) が同定されている。RES-701-1 は協和発酵工業 (株) 東京研究所における ET<sub>B</sub> 選択的受容体拮抗剤探索研究の中で見出された、放線菌の培養上清由来のペプチド性化合物である。RES-701-1 は 16 アミノ酸より成っており、N 末側には、N 末 Gly のアミノ基と 9 位 Asp の側鎖カルボキシル基との間のアミド結合により形成される特異な環状構造を有している (Fig. 1)。

RES-701-1 が、当初報告の無かった ET<sub>B</sub> 選択的な結合活性を示すことと、ペプチド性化合物として非常に興味深い一次構造を有することから、柴田健志はその化学合成、三次元構造解析、誘導体合成などの検討を行った。

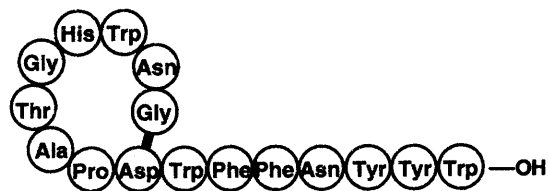


Fig. 1: Structure of RES-701-1

### 2) RES-701-1 の化学合成と三次元構造

RES-701-1 の環状構造部分(1-10)と、別途合成した C 末端側のフラグメントとを固相上で縮合するという手法により、RES-701-1 の合成を試みた。得られたペプチドは質量分析において、微生物由来の RES-701-1 と全く同一の分子量であることが確認されたが、微生物由来の RES-701-1 に比べて 1000 倍以上も弱い ET<sub>B</sub> 結合活性しか示さなかった。

本合成と <sup>1</sup>H-NMR による立体構造解析から、微生物由来の RES-701-1 は 11-16 位の C 端部分が N 末側の環状構造の「輪」の内部を貫通した立体構造を有していることが明らかとなった。

### 3) RES-701-1 の C 端アミノ酸置換誘導体

RES-701-1 は、ET と同様に C 末端に Trp 残基を有しており、ET-1 においてはこの C 末 Trp 残基が活性発現に必須であることが報告されている。そこで、RES-701-1 における C 末端 Trp の役割を明らかにするために、各種アミノ酸置換体を合成し、その受容体結合活性を調べた。予想に反して Trp の除去によっても ET<sub>B</sub> 受容体に対する結合活性は大きくは減弱せず、Phe、Tyr、β-ナフチル-L-アラニン、D-Trp など、芳香族系のアミノ酸残基への置換によっても、ほぼ同程度の結合活性を有していることが分かった。一方で Gly や Ala への置換は、より大幅に活性を減弱させた。さらに、C 末端カルボキシル基の受容体結合における役割を調べる目的で、C 端メチルエステル体、ベンジルエステル体、アミド体、デカルボキシル体を合成した。ET<sub>B</sub> に対する結合活性はベンジルエステルを除いてほぼ保たれたが、メチルエステルのみが ET<sub>A</sub> に対しても強い結合活性を示すことが分かった。

### 4) RES-701-1 とエンドセリンとのハイブリッドペプチドおよびその直鎖状誘導体

柴田健志は、RES-701-1 の特異な環状部分構造に、ET 類の C 末端配列を付加した、RES-701-1(1-10)/ET-1(12-21)ハイブリッド型ペプチド (12, Fig. 2) を設計、合成し、その受容体結合活性を調べた。その結果、ハイブリッドペプチド 12 は、RES-701-1 よりもさらに強い ET<sub>B</sub> 結合活性を示した。しかも、ET-1 は ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> 両受容体に対してほぼ同程度の親和性を有するのに対し、ハイブリッドペプチドは

RES-701-1 の有する ET<sub>B</sub> 受容体特異性を保持していた。このハイブリッド型ペプチドが高い受容体結合活性を示した理由は、RES-701-1 由来環状部分ペプチドが C 末側ペプチド鎖と相互作用し、C 末側ペプチド鎖の立体構造を安定化したことであると推察している。

RES-701-1 は、その環状構造が活性発現に必須であり、同一配列を有する直鎖状ペプチドには有意な受容体結合活性は認められないが、上記 RES-701-1/ET-1 ハイブリッドペプチドは、直鎖状にしても、非常に強い ET<sub>B</sub> 結合活性と選択性を保持していることが分かった (13 (KT7421), Fig. 2)。そこで、この直鎖状ハイブリッドペプチド KT7421 をもとに多種の誘導体を合成し、その受容体結合活性と、受容体発現細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を指標にアゴニスト/アンタゴニスト活性を調べた。

まず、ET<sub>B</sub> 選択的結合ペプチドの代表例として、KT7421 に関して ET 受容体発現 COS-7 細胞に対する作用を調べたところ、ET<sub>A</sub> に対しては高濃度で ET-1 の作用を阻害するアンタゴニストとして働くのに対し、ET<sub>B</sub> に対しては低濃度で単独で Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を引き起こすアゴニストとして働いていることが分かった。ET<sub>B</sub> アゴニストが ET<sub>A</sub> アンタゴニスト活性を併せ持つ例はこれまでに報告がない。

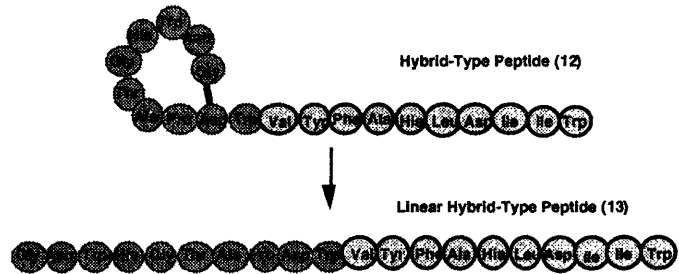


Fig. 2 Structures of RES-701-1, ET-1 and their hybrid peptides.

ET-1 の誘導体に関する報告を参考にし、受容体選択性の変化やアゴニスト/アンタゴニストの変換を意図して、17、18 位を置換した誘導体の合成と評価を行った。18 位 Ile を Leu に置換すると、ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> 非選択的な受容体結合特性を示すようになった。この[Leu18]体は ET<sub>B</sub> に対してアゴニストとして働くことが明らかとなったが、さらに 17 位 Asp を Thr に置換した[Thr17, Leu18]体はアンタゴニストとして働くことが判明した。合成した誘導体を受容体選択性の面から見ると、[Thr17, Leu18]体、[Thr17, Cha18]体は ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> 非選択的 (ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> に対する IC<sub>50</sub> 値 < 10)、[Ser17, Met18]体、[Thr17, Thi18]体は ET<sub>B</sub> 選択的 (ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> に対する IC<sub>50</sub> 値 > 10) であった。アゴニスト/アンタゴニスト作用に関しては、ET<sub>A</sub> に対しては作用の強弱はあるが全てアンタゴニストとして作用し、ET<sub>B</sub> に対してはアンタゴニストであるものも数種存在することが分かった。ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> 両受容体に対する選択性と ET<sub>B</sub> に対してアゴニストかアンタゴニストかの 2 つの観点から、柴田健志は以下の 4 タイプの誘導体を創製したと言える。すなわち、1) 弱い ET<sub>A</sub> アンタゴニスト活性を持つ ET<sub>B</sub> 選択的アゴニスト、2) 弱い ET<sub>A</sub> アンタゴニスト活性を持つ ET<sub>B</sub> 選択的アンタゴニスト、3) 強い ET<sub>A</sub> アンタゴニスト活性を併せ持つ ET<sub>B</sub> アゴニスト、4) ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> 非選択的アンタゴニスト、の 4 種である。

##### 5) RES-701-1 の環状部分構造を利用した生理活性ペプチドの立体構造安定化

ET-1(12-21)に RES-701-1 の環状部分ペプチドを結合させた場合、受容体結合活性が大幅に向上し、さらに直鎖状にしても活性は保持されていたが、直鎖状ペプチドは蛋白分解酵素の一つズブチリシンによって、環状構造を持つペプチドに比べ非常に早く分解されることが分かった。ET-1 の(12-21)部分はターン構造を有しており、この構造が受容体結合に重要であると考えられている。RES-701-1/ET-1 ハイブリッドペプチドでは、C 末側の構造が RES-701-1 環状部分ペプチドによって安定化され、活性向上に加えてプロテアーゼに対する安定性も向上させたと推測できる。そこで柴田健志は、RES-701-1 環状部分ペプチドが、その C 末側に結合した様々なペプチドの溶液中での立体構造、とりわけターン構造を安定化し、その結果として活性や酵素分解に対する安定性の向上を達成できるのではないかと予測した。まず RES-701-1 環状部分ペプチドに、ターン構造を有する次の 2 種のペプチドを結合し、それらの生理活性とプロテアーゼに対する安定性を調べた。一つは、細胞と細胞外マトリックスとの接着を阻害することが知られている RGD 配列を有するペプチド (RGD ペプチド)、もう一つは、細胞増殖シグナル伝達に重要なフ

アルネシルトランスフェラーゼ (FTase) 阻害ペプチドである (Fig. 3)。

2種類の典型的な RGD ペプチド (48a, 49a) を、RES-701-1 環状部分ペプチドに結合したもの (48b, 49b) は、癌細胞のフィブロネクチンに対する接着阻害活性が最高で約 4 倍に向上し、トリプシンなどのプロテアーゼに対する安定性も大幅に向上した。

2種の FTase 阻害ペプチド (50a, 51a) についても環状ペプチドと結合することで、FTase 阻害活性が最高で 3 倍に向上し、プロリルエンドペプチダーゼに対する安定性も大幅に向上した。

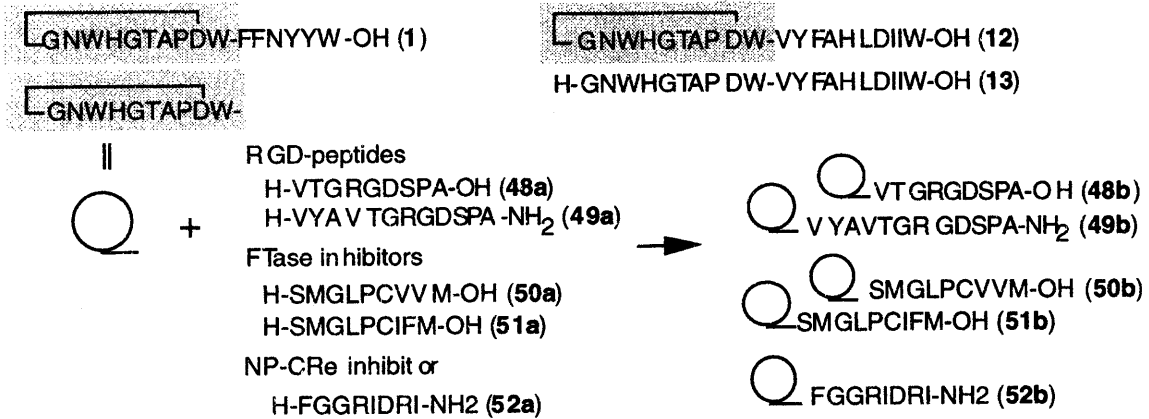


Fig. 3. Structures of RES-701-1 (1) and biologically active peptides coupled with the cyclic moiety of 1.

さらに、ナトリウム利尿ペプチド (NP) のクリアランス受容体 (NP-CRe) 結合阻害ペプチドとして知られている ANP の部分ペプチド 52a に RES-701-1 の環状ペプチドを結合させたところ、NP-CRe 結合活性が約 10 倍にも向上した。このペプチドに関して NMR による立体構造解析を行ったところ、環状ペプチド部分の Trp3、Ala7、Pro8 と、C 端側 ANP 部分ペプチド配列中の Phe11、Ile15 との間に NOE が観測され、環状部分が C 端側ペプチド鎖と相互作用し、C 端側ペプチド鎖の立体構造の安定化に寄与していることが直接示された。

この事実から、上記 ET-1 部分ペプチド、RGD ペプチドおよび FTase 阻害ペプチドに関しても、RES-701-1 環状部分ペプチドが C 端側のそれぞれのペプチド鎖と相互作用し、その立体構造を安定化することが、生理活性および/またはプロテアーゼに対する安定性の向上につながったものと考えられる。

以上、柴田健志の研究業績は、今後の医薬開発に重要な貢献をすると期待され、博士 (薬学) に値すると判断した。