

審査の結果の要旨

氏名 上代 才

生体内における様々な生理活性ペプチドの生体調節機構を解明することは、それらが関与する系における疾病の本質を理解し治療薬を開発する上で必要不可欠である。生体試料中のペプチドは、その感度の高さから ELISA, RIA 等の免疫学的手法で定量される場合が多いが、タンパク質とは異なり特異性の高い抗体を得ることが困難である低分子量のペプチドにおいては、HPLC-蛍光検出法は有用な手段のひとつである。しかしながら、夾雑ピークと目的物の分離が不十分であることや、疎水性の高い蛍光試薬が結合することによりペプチドの吸着性が増し回収率が下がる等の問題点があり、HPLC-蛍光検出法により生体試料中のペプチド定量に成功している例は数少ない。申請者はこれらの欠点を改良すべく、水溶性発蛍光誘導体化試薬を開発して誘導体化における回収率を向上し、さらに分離にカラムスイッチングシステムを導入することにより特異性を改善し、HPLC-蛍光検出法による精度及び真度の高いペプチド定量法を開発することを目的として研究を行った。

1. まず、DBD-F の 4 位の側鎖にスルホン酸基を導入することにより水溶性ベンゾフラザン発蛍光誘導体化試薬 2-(7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamido)ethanesulfonic acid (ES-ABD-F), 4-(7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamido)benzenesulfonic acid (*p*-BS-ABD-F) 及び 3-(7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamido)benzenesulfonic acid (*m*-BS-ABD-F) を合成し、それらのペプチド誘導体化試薬としての有用性を評価した。

次に、感度について検証したところ、ES-ABD-F 及び *m*-BS-ABD-F のアミノ化合物誘導体は DBD-F と同等の感度を示すのに対して *p*-BS-ABD-F は約 1/3 の蛍光強度しか示さなかった。そこで、ES-ABD-F 及び *m*-BS-ABD-F を選択し、ペプチド誘導体化試薬としての可能性についてさらに検討した。その結果、ES-ABD-F は pH>8.5 で安定して高い反応性を示し、ペプチドの多成分同時分析に適していることが判明した。本試薬は N 末端アミノ基のみならず、リジンの側鎖のアミノ基とも良好な反応性を示し、リジンを持つペプチドに対しても単一の誘導体を得た。また、アンジオテンシン I (Ang I), Ang II, Ang III, ブラジキニン及びサブスタンス P の誘導体は ODS カラムにより良好に分離された。一方、*m*-BS-ABD-F は塩基性条件下では反応性が低いが、中性条件下におけるペプチドとの反応性は ES-ABD-F に匹敵し、一般的な低分子アミノ化合物のアミノ基より pKa 値が低いペプチド N 末端アミノ基を比較的特異的に誘導体化できることが期待できた。中性条件下での反応は、ペプチドの分解やラセミ化を軽減できる点からも望ましく、また、*m*-BS-ABD-F は合成において収率がよいことも利点である。

2. 1 で開発した誘導体化試薬 *m*-BS-ABD-F を用いて、ラット尿中ブラジキニン(BK) 定量法の開発を試みた。BK はキニン-カリクレイン系 (KKS) で生成される生理活性ペプチドであり、ナトリウム排泄増大及び利尿作用を介して降圧作用を示す。*m*-BS-ABD-F と BK の誘導体化反応は pH7.0/70°C/100 min で完了した。ラット尿管より採取した尿を固相抽出による前処理後、誘導

体化し ODS カラムで直接分析した場合には、夾雑ピークのために BK 誘導体のピークが観察できなかったが、陽イオン交換カラムと ODS カラムを組み合わせたカラムスイッチング HPLC システムで分析することにより、試料中の妨害ピークを効果的に除くことができた。さらに、限外ろ過膜による前処理を誘導体化後に行うことにより BK の回収率が改善され、水溶性試薬による誘導体化で吸着が軽減されることが判明した。本分析方法について得られたバリデーションデータは直線性 ($R>0.999$), 真度(回収率 $>95\%$), 精度 ($c.v.<5.5\%$) の全てについて良好であり、検出限界($S/N=3$)は 35 fmol と高感度であった。SD ラット(9-11 週齢, 雄)の尿中 BK 排泄量は 56.0 ± 22.1 pg/min/kg であり, ELISA 法による報告値とよく一致した。以上のように, *m*-BS-ABD-F を蛍光誘導体化試薬として用い, HPLC-蛍光検出カラムスイッチングシステムにより分析することで精度及び真度の高いラット尿中 BK の定量法が確立できた。

3. 申請者はさらに、腎におけるもうひとつの体液調節生理活性ペプチド生成系である尿細管中レニン-アンジオテンシン系 (RAS) の評価方法の確立を試みた。尿細管管腔内では異なる生理活性を持つ複数のアンジオテンシン類が管腔内で速やかに代謝を受けながら作用を示すため、目的部位におけるペプチド量が正確に求められるサンプリング方法を選択する必要があるため、マイクロダイアリシス(MD)法によるサンプリングを採用した。この際、親水性透析膜(AN69, Hospal) が市販のポリアクリロニトリル製プローブと比較して、アンジオテンシン類に対して高い回収率を示すことを見出し、この膜により作成した MD プローブを近位尿細管の存在部位であるラット腎皮質に装着して MD を行い、その灌流液を分析することにより腎尿細管 RAS を評価することを試みた。MD により得られた試料は *m*-BS-ABD-F による誘導体化(70°C/pH7.0/2h) 後、サイズ排除カラム/ODS カラムスイッチングシステムを導入することにより低分子の定量妨害成分を効果的に除去でき、用手法による前処理を必要とせず、4 種のアンジオテンシン類の同時定量が可能であった。生理的レベルのアンジオテンシン類は検出できなかったが、基質である Ang I 溶液を灌流すると、Ang (1-7)及び Ang II が灌流液に回収されることが判明した。これは、プローブ膜から組織に拡散した Ang I が組織中の酵素で代謝され、生成した Ang (1-7)及び Ang II が再度膜の内側に拡散して回収されたものと考えられた。主要な生成ペプチドは Ang (1-7)であり、灌流する Ang I 濃度と回収された Ang (1-7)及び Ang II の濃度は良好な直線性を示した。また、Ang I から直接 Ang(1-7)を生成する酵素である Neprilysin(NEP)の阻害剤を Ang I と同時に灌流すると、Ang (1-7)の生成は大きく抑えられた。Ang(1-7)は NEP により AngI から直接生成されることは良く知られており、さらに近年、腎尿細管管腔内液中には Ang II より高濃度の Ang (1-7)が存在することが報告されている。本実験において得た結果はこれらの報告とよく一致するものであり、本法により腎尿細管 RAS の活性が評価できることが示唆された。

以上本研究において、申請者の開発した水溶性ベンゾフラザン発蛍光誘導体化試薬は、ペプチドの吸着を軽減し HPLC 分析において分離や回収率を向上させることが判明し、ペプチド誘導体化試薬としての有用性が認められた。*m*-BS-ABD-F を誘導体化試薬とし、分離分析系にカラムスイッチング HPLC-蛍光検出法を用いることにより、ラット尿中 BK 定量法及びラット腎皮質 MD 灌流液中のアンジオテンシン類の同時定量法を確立することができ、腎尿細

管において体液調節を司る KKS 及び RAS を評価する手法が確立できた。

本研究は、免疫学的手法で十分な特異性を示す抗体を得ることが困難な低分子量ペプチドの定量において、水溶性誘導体化試薬を用いた HPLC-蛍光検出法は一つの有用な手法であることを示し、さらに、MD 実験においては親水性透析膜 AN69 をプローブに使用することによりペプチドの回収率を向上させることに成功するなど、薬学分野の分析化学に寄与するところ大であり、博士（薬学）に相応しい研究と認めた。