

Title	Development of Neuropeptide Receptor Ligands for the Control of Reproductive Systems( Abstract_要旨 )
Author(s)	Misu, Ryosuke
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2015-03-23
URL	<a href="http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k18929">http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k18929</a>
Right	許諾条件により本文は2016/03/22に公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

( 続紙 1 )

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	三須 良介
論文題目	Development of Neuropeptide Receptor Ligands for the Control of Reproductive Systems (生殖内分泌系を制御する神経ペプチド受容体リガンドの創製研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) は、視床下部-下垂体-性腺軸において、黄体形成ホルモンや卵胞刺激ホルモンの分泌を調節する神経ペプチドである。GnRH分泌には、間欠的な濃度上昇を一定間隔で繰り返すパルス状分泌と一過性に著しく濃度が上昇するサージ状分泌の2種類が知られているが、それらの詳細な調節機構は明らかでない。近年、GnRH分泌の鍵分子としてキスペプチンが報告され、より最近になってキスペプチン神経細胞にニューロキニンB (NKB) 及びダイノルフィンA (DynA) が共局在することが報告された。これらのことは、キスペプチン、NKB及びDynAの3つの神経ペプチドが協働してGnRH分泌を調節することを示唆しており、それぞれの受容体であるGPR54、NK3受容体、及び<math>\kappa</math>オピオイド受容体は生殖内分泌系を調節する医薬品の新たな標的として期待されている。</p> <p>こうした背景のもと、著者は、キスペプチンの更なる生理機能の解明に向けて、キスペプチン類の受容体選択性の評価及びプローブ分子の開発研究を行った。また、卵胞発育不全による不妊症の治療や畜産動物の繁殖効率改善に適用可能なNK3受容体を標的とするゴナドトロピン分泌調節薬の創製研究を行った。</p>			
<b>第1章第1節：GPR54リガンドによるニューロペプチドFF受容体の活性化</b>			
<p>キスペプチン類は、多くの神経ペプチドに共通のRFアミド構造を有する。著者は、所属研究室で開発されたペプチドミメティクス (FTM080及びFTM145) を含むいくつかのGPR54アゴニストの他の神経ペプチド受容体に対する受容体選択性を評価した。キスペプチンのC末端部分10残基ペプチドである Kp-10は、FTM080やFTM145と比べて、2つのNPFF受容体 (NPFFR1及びNPFFR2) に対して高い結合活性及びアゴニスト活性を示した。正中隆起組織からのGnRH分泌促進はKp-10添加時にのみ認められたことから、Kp-10による正中隆起からのGnRH分泌にはNPFF受容体を含むGPR54以外の受容体による制御を受ける可能性が示唆された。</p>			
<b>第1章第2節：キスペプチン受容体プローブの創製</b>			
<p>GPR54のタンパク質レベルでの発現解析は、有効な抗GPR54抗体が存在しないことから困難を極めている。この問題を解決するため、キスペプチン類を基にした蛍光プローブ及び光アフィニティープローブを設計・合成した。得られた蛍光プローブは、非標識のキスペプチンと同等の強力な生物活性を示した。フローサイトメトリ解析及び共焦点顕微鏡を用いた画像解析により、本プローブはGPR54の発現を直接的に検出できることを明らかにした。また、光アフィニティープローブを用いた光ラベル化実験の結果から、キスペプチン類のGPR54との結合には、C末端側10</p>			

残基だけでなく、N末端領域の特定のアミノ酸配列が副次的に関与していることが示唆された。

### 第2章第1節：NK3受容体アゴニストの構造活性相関研究

NKBを含むタキキニン類ペプチドは、3つのタキキニン受容体（NK1受容体、NK2受容体、NK3受容体）に対する選択性が低い。著者はまず、タキキニン類ペプチド及び[MePhe<sup>7</sup>]-NKBの構造活性相関研究を行い、NK3受容体に対する生物活性及び受容体選択性の発現に必要な部分構造を明らかにした。次に、新規高活性NK3受容体選択的アゴニストの開発を目的としてsenktideの構造最適化研究を行った。N末端領域の最適化によりNK3受容体に対する生物活性が向上し、senktideよりも高い生物活性を有する誘導体を見出した。

### 第2章第2節：ペプチダーゼ耐性を有するNK3受容体アゴニストの創製研究

高い生体安定性を有する新規NK3受容体アゴニストの開発を目指して、NK3受容体選択的アゴニストの生体内安定性を評価した。Senktideは動物血清中及び視床下部抽出液中で安定であるのに対し、NKB分解酵素として知られているネプリライシン（NEP）処理によりGly-Leu間でのエンド型加水分解が認められた。分解産物はNK3受容体に対してアゴニスト活性を示さなかったことから、senktideは生体内でNEPにより不活性化されることが示唆された。

次に、分解部位であるGly-Leu間のペプチド結合を様々なジペプチド等価体で置換したsenktide誘導体を設計し合成した。このうち、(E)-アルケン型ジペプチド等価体で置換した誘導体がsenktideと同等の生物活性を維持することを見出した。本誘導体は高い生体内安定性を示すとともに、senktideと比較してより持続的に作用した。

( 論文審査の結果の要旨 )

本博士論文は、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) の分泌を調節するペプチド性リガンドの創製について述べている。申請者は、GnRH 分泌の鍵分子として知られているキスペプチンとニューロキニン B (NKB) に着目した。最初に、キスペプチンの C 末端部分 10 残基に相当する Kp-10 の神経ペプチド受容体に対する作用を精査し、Kp-10 がニューロペプチド FF 受容体 1 および 2 に対して高い結合活性とアゴニスト活性を示すことを見出した。さらに、GPR54 の発現を直接的に検出できるキスペプチン誘導体蛍光プローブの開発にはじめて成功し、キスペプチン類と GPR54 との結合には C 末端 10 残基部分に加えて N 末端領域の特定のアミノ酸配列が重要であることを示した。申請者は引き続き、天然に存在するタキキニン類ペプチドの構造活性相関研究を実施し、活性発現に必要な構造的な要求を明らかにした。既知の NK3 受容体アゴニストを用いた構造活性相関研究においては、NK3 受容体選択的な高活性アゴニストを見出し、生体内安定性の向上が期待されるネプリライシン耐性アナログの開発にも成功している。開発したペプチドリガンドを用いて、ヤギ、ラットの生体に対する活性を直接的に評価している点は、本研究が単なる基礎研究に留まらず、実際の繁殖制御を目指していることを示している。

これらの研究成果は、生殖内分泌系を制御する神経ペプチド受容体の機能解明と、高活性ペプチド性リガンドの創製において重要な知見を提供するものである。よって、本論文は博士 (薬科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 27 年 2 月 23 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日以降