

(論文内容の要旨)

G タンパク共役型受容体 GPR54 は、癌転移の抑制や性ホルモン放出の制御に関与していることから、抗癌剤やホルモン分泌調節剤の魅力的な創薬標的として注目を集めている。2001 年、GPR54 の内因性リガンドとして 54 残基からなるペプチド kisspeptin が同定された (Figure 1)。しかしながら、kisspeptin のようなペプチド化合物の医薬品としての使用を想定した場合、酵素分解等による速やかな失活が懸念される。そこで、著者は有用な人工 GPR54 アゴニストの創製を目的として、強力な GPR54 アゴニスト活性を示す kisspeptin の C 末端デカペプチド kisspeptin-10 をリード化合物とする構造活性相関研究に着手した。

1. ペンタペプチド GPR54 アゴニストの創製

まず、GPR54 アゴニスト活性に必要なペプチドの最小構造の同定と分子サイズの低減を行った。その第一段階として、kisspeptin-10 のアラニンスキャンを行ったところ、C 末端側 5 残基の側鎖官能基がアゴニスト活性に重要であることが示唆された。この結果より、kisspeptin-10 の N 末端側 5 残基は別の構造で代替可能であると推測し、C 末端側の 5 残基を保存して N 末端に種々の修飾を施した短鎖ペプチドを設計、合成した。その結果、kisspeptin と同等のアゴニスト活性を有しながら大幅に低分子化されたペンタペプチド誘導体 **1** および **2** を見出した。次に、各アミノ酸残基の側鎖官能基の最適化、および C 末端アミド基の構造活性相関研究を行った結果、ペプチド鎖の C 末端領域は非常に厳密な制約がある一方で、N 末端側の構造的な要求は比較的柔軟であることが示唆された。そこで、N 末端領域の修飾による活性の向上を期待し、様々な N 末端アシル化ペンタペプチドを合成、活性評価したところ、N 末端アシル基の芳香環が活性に重要であることが示唆された。また、N 末端ベンゾイル基上に存在する置換基の違いによって活性の差異が認められたことから、置換ベンゾイル基について定量的構造活性相関研究を行った。その結果、誘起的電子求引性が高く立体的に小さいベンゾイル環上 4 位置換基が、アゴニスト活性に有利である傾向が示唆され、強力な新規 GPR54 アゴニストとして 4-フルオロベンゾイル誘導体 **3** を見出した。さらに、各種フッ素置換ベンゾイル誘導体の検討を行ったが、4 位以外のフッ素置換は生物活性に不利に働くことを明らかにした。

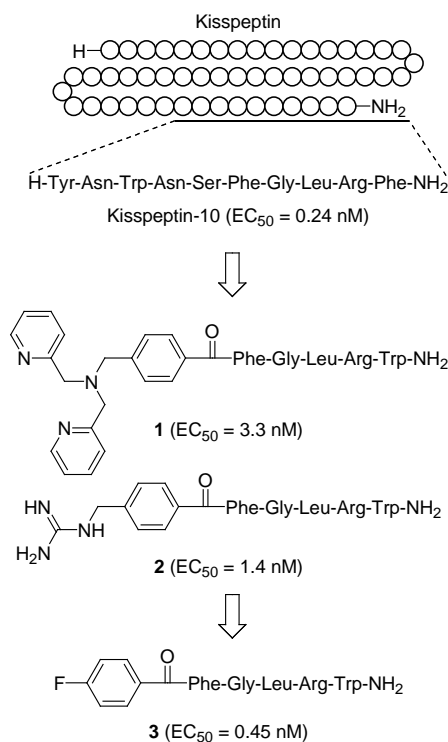


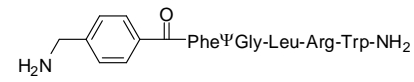
Figure 1.

2. ジペプチドイソスターの合成と GPR54 アゴニストへの応用

2-1. アルケン型ジペプチドイソスターによる活性コンフォメーション解析

新規リガンドを設計する際、リガンドの活性コンフォメーション情報は非常に有用であり、その多くは X 線結晶構造解析より提供されているものの、現状において膜タンパク-リガンド複合体の X 線結晶構造解析は容易ではない。一方、非水解性アミド等価体として知られるアルケン型ジペプチドイソスター (ADI) は、アミド結合に潜在するシス-トランス異性化を起こさないため、ペプチド結合のコンフォメーション解析に応用可能である (Figure 2)。著者は ADI を用いて GPR54 アゴニストの活性コンフォメーション解析を行った。所属研究室で開発された手法に従い、Phe-Gly 型のアルケン型ジペプチドイソスターを合成し、GPR54 アゴニスト **4** に導

入した。その結果、シスアミド等価体含有ペプチド **6** において有意な生物活性が示されなかったのに対して、トランスアミド等価体含有ペプチド **5** ではペプチド **4** と同等の生物活性が認められた (Table 1)。この結果、Phe-Gly ペプチド結合がトランス型である時、アゴニスト活性を示すことが明らかとなった。



	Ψ	EC ₅₀ (nM)
4	CONH	2.9
5	(E)-CH=CH	7.8
6	(Z)-CH=CH	> 100

Table 1.

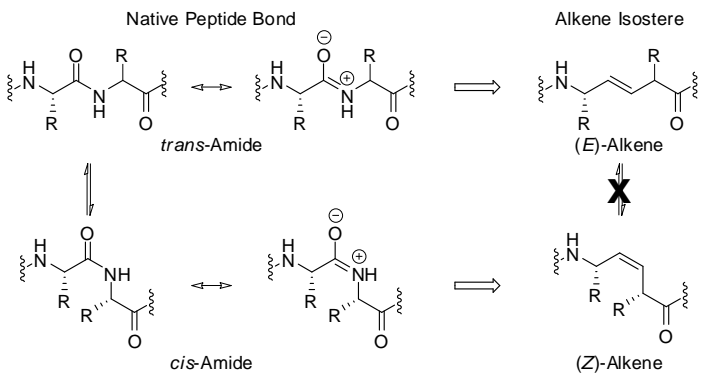


Figure 2.

2-2. ジペプチドイソスターの分岐的合成と生体内安定性の向上への応用

GPR54 アゴニスト **3** は kisspeptin-10 と類似のペプチド配列を有し、その Gly-Leu ペプチド結合は癌組織で顕著な発現が認められるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) によって加水分解されることが報告されている。著者は、このペプチド結合を非水解性のアミド等価体と置換することで、生体内安定性に優れた GPR54 アゴニストの創出が可能であると考えた。しかしながら、アミド等価体の導入により、GPR54 アゴニスト活性の低下を誘導する可能性がある。そこで、活性を維持したまま生体内安定性を向上させるアミド等価体を効率的に見出すため、アルケン型ジペプチドイソスターを共通の合成中間体とし、分岐的に誘導可能な 7 種類のイソスターを応用した (Figure 3)。

合成した種々のイソスター含有ペプチドのうち、アルケン型イソスター含有体 **7** と (2R,4S)-ヒドロキシエチレン型イソスター含有体 **8** にリードペプチド **3** と同等の GPR54 アゴニスト活性が認められた (Table 2)。これらのペプチドは MMP に分解されず、マウス血清中での半減期が大幅に延長されたことから、kisspeptin-10 および **3** に比べて生体内安定性に優れた新規 GPR54 アゴニストであると考えられる。

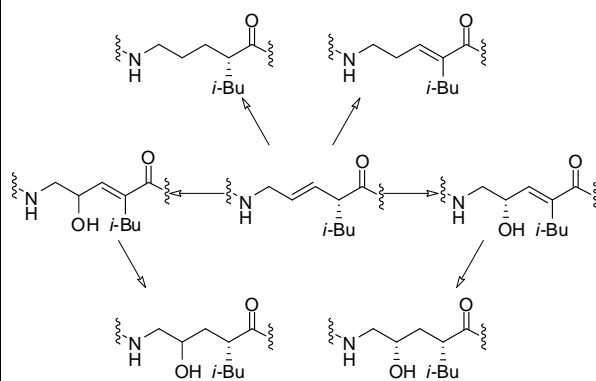
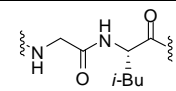
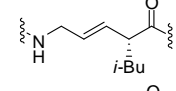
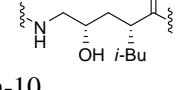


Figure 3.

Table 2.

4-fluorobenzoyl-Phe-Gly Ψ Leu-Arg-Trp-NH ₂			
Peptide	Gly Ψ Leu	EC ₅₀ (nM)	t _{1/2} (h) ^a
3		0.45	6.6
7		0.30	38
8		0.36	35
Kisspeptin-10		0.24	< 1

^aHalf-life in murine serum.

以上のように、著者は、GPR54 の内因性ペプチド断片をリードとする構造活性相関研究を行った結果、生物活性を維持しつつ分子サイズを低減し生体内安定性を向上した新規 GPR54 アゴニストを見出した。本研究は、GPR54 アゴニストのみならず生理活性ペプチドをリード化合物とする創薬研究に対して有用な基礎的知見を提供すると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

近年、ヒトゲノム解析が終了し、新規創薬標的として期待される数多くのオーファン GPCR が同定された。GPR54 もそのひとつであり、2001 年に内因性リガンドとして kisspeptin-54 と呼ばれるペプチド化合物が同定された。GPR54/kisspeptin 系の活性化は悪性腫瘍の遠隔転移能を抑制する他、性成長の進行に不可欠と考えられているゴナドトロピン放出の促進に寄与することが知られているため、GPR54 アゴニストは癌転移抑制剤および性機能調節剤として期待されている。しかしながら、人工 GPR54 リガンドの開発はほとんど報告されておらず、既知リガンドの生物活性は kisspeptin に比べて著しく低いのが現状である。著者は、kisspeptin-54 の C 末端断片ペプチド kisspeptin-10 をリード化合物とする構造活性相関研究を通して新規 GPR54 アゴニストの創製に取り組んだ。さらに、その活性コンフォメーション解析や生物学的安定性の向上を指向したジペプチド等価体の応用を検討した。

最初に、著者は kisspeptin-10 の低分子化研究に着手した。GPR54 活性化におけるファーマコフォアを同定するために、kisspeptin-10 のアラニンスキャンを行った結果、C 末端側の 5 残基が生物活性に重要であることを明らかにした。そこで、C 末端ペントペプチドに基づく構造活性相関研究を行ったところ、C 末端ペントペプチドの N 末端アミノ基をベンゾイル構造で修飾することにより、強力な GPR54 アゴニスト活性が維持されることを見出した。次に、生物活性の向上を目的として、各官能基の最適化を検討した。まず、各アミノ酸残基の最適化を行ったところ、C 末端フェニルアラニンをトリプトファンに、N 末端フェニルアラニンをナフチルアラニンで変換した時、それぞれ活性が向上することを明らかにした。また、N 末端ベンゾイル基上の置換基における構造活性相関および定量的構造活性相関研究を行った結果、4 位置換基として誘起的電子求引性でかつ立体的に小さな構造が強力なアゴニスト活性に有利であることを示し、kisspeptin-10 と同等の生物活性を有する 4-フルオロベンゾイル誘導体を見出した。さらに、多置換フルオロベンゾイル誘導体を検討したが、過剰なフッ素置換は生物活性に不利であることを明らかにした。

GPCR をはじめとする膜タンパクの X 線結晶構造を得ることは通常困難であり、そのリガンドの活性コンフォメーションを明らかにする別の手法が求められている。著者は、ペプチド結合に潜在するシス-トランス異性化を起こさないアルケン型ジペプチド等価体を GPR54 アゴニストに導入することによって、その Phe-Gly ペプチド結合がトランスアミドコンフォメーションで存在する時に生物活性を示すことを明らかにした。

ペプチドリード創薬において、ペプチド結合の酵素加水分解による不活性化は重大な問題である。GPR54 アゴニストは、マトリックスメタロプロテアーゼに起因する

Gly-Leu ペプチド結合の加水分解により失活してしまう。著者は Gly-Leu ジペプチドを分岐的に合成した種々の非水解性ジペプチド等価体で置換することにより、強力な GPR54 アゴニスト活性を維持したまま、生物学的安定性が改善された新規 GPR54 アゴニストを見出した。

以上、著者は内因性 GPR54 ペプチドリガンドの部分構造をリードとする構造活性相関研究を行った結果、大幅に低分子化され、かつ生物学的安定性にすぐれた新規 GPR54 アゴニストを見出した。

本論文に記載された内容は、GPR54 を標的とする医薬品化学のみならず、生理活性ペプチドをリード化合物とする創薬研究において有用な基礎的知見を提供すると判断される。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成21年2月25日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。