

氏名	まつもとまさる 松本大
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第684号
学位授与の日付	平成15年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	グレリンの構造機能解析および医薬品生産に関する創薬研究

論文調査委員 (主査) 教授 中川照真 教授 半田哲郎 教授 伊藤信行

### 論文内容の要旨

成長ホルモン (GH) の分泌は、成長ホルモン放出ホルモン (GHRH) および Somatostatin により制御されている。一方で、成長ホルモン分泌促進因子 (GHS) と呼ばれるペプチド性あるいは非ペプチド性の化合物に関して1980年頃から盛んに研究されてきた。GHS 化合物は GHRH と同様に下垂体からの GH 分泌を促進するが、その GH 分泌のメカニズムは GHRH とは異なることが報告されていた。その後、G タンパク共役型受容体である GHS-R が GHS の受容体としてクローニングされ、内因性リガンドの存在が強く示唆された。そして、近年、ラットの胃から GHS-R の内因性リガンドが単離精製され、「Ghrelin (グレリン)」と命名された。

Ghrelin は28残基の直鎖状ペプチドであり、3位 Ser の水酸基がオクタノイル (C8:0) 修飾されているという極めて特徴的な構造を有する。活性発現にはこの修飾が必須である。また、このような脂肪酸修飾された生理活性ペプチドホルモンは他にはまだ報告されていない。

Ghrelin の発見以降、その生理的機能について活発に研究されている。強力な GH 分泌作用を有することから、低身長児や高齢者に対して有効であることが期待されている。さらに、食欲亢進活性や循環器系機能の改善作用などが報告されている。このような研究を背景とし、Ghrelin の医薬品開発を目的として本研究を行った。

#### 第1章 Ghrelin の構造活性相関

Ghrelin は特定の Ser 水酸基が脂肪酸修飾されているという極めて特徴的な構造を有する。そこで、この修飾構造を中心に、本ペプチドの構造活性相関について詳細に解析した。部分的に構造を変えた Ghrelin 誘導体を化学合成し、その活性を評価した。

その結果、Ghrelin の脂肪酸修飾基の脂肪酸鎖長は炭素数 8~10 のとき最大の活性を示した。脂肪族疎水性基の代わりに芳香族疎水性基を導入しても高活性が保持された。また、ペプチド主鎖中の重要残基について調べたところ、N 末側から 5 残基程度の誘導体が全鎖長の Ghrelin とほぼ同等の活性を示した。そこで、更なる低分子化を試みたところ、分子量が 1/5 以下の高活性誘導体を見出すことができた。

また、Ghrelin の活性中心部位が N 末領域の 5 残基程度に集中していることから、Ghrelin と合成 GHS 化合物は構造が類似していることが考えられた。そこで、両者の類縁化合物の活性評価および分子動力学計算によって、活性発現構造について解析した。その結果、両者の共通構造が認められ、内因性 GHS である Ghrelin と既存の合成 GHS の間には構造上の類似性があると推測された。

これらの結果は、内因性リガンドのもつ構造情報の豊富さを再認識させると共に、新規 GHS 化合物の合成展開において有用な情報となる。

#### 第2章 Ghrelin の大量生産

種々のペプチド製剤が医薬品として現在使用されているが、その製造方法としては化学合成法あるいは遺伝子組換えによる製造が一般的である。しかし、化学合成法による20残基以上のペプチドの工業生産は、溶解度、工程数、経済性などの点

で問題がある。一方、Ghrelinのような修飾ペプチドの遺伝子組換え法による工業生産は、現時点では不可能である。

そこで著者は、化学合成法と遺伝子組換え法とを組み合わせた半合成法によるGhrelin生産法を開発した。すなわち、オクタノイル修飾基を含むN末側フラグメントを化学合成法により製造し、通常の直鎖状配列をもつC末側フラグメントを遺伝子組換え法により製造し、両者を縮合するという方法である。

N末側フラグメントとして、弱酸性離脱樹脂を用いたFmoc固相合成法により $[N^{\alpha}\text{-Boc, Ser}^{2,6}(\text{tBu})]\text{hGhrelin}(1-7)$ を製造した。水酸基の選択的脱保護方法として、 $t$ -ブチルジメチルシリル基をテトラブチルアンモニウムフルオリドによって脱保護する反応が適用できることを見出した。また、C末側フラグメントは、大腸菌を用いた遺伝子組換え法によりN末部にリンカー配列を付与した形でhGhrelin(8-28)を含むフラグメントペプチドを得た。その後、Lysアミノ基をBoc基で保護した後、エンドペプチダーゼKex2でリンカー配列を切断し、保護C末側フラグメント $[\text{Lys}^{16,19,20,24}(\text{Boc})]\text{hGhrelin}(8-28)$ を得た。適切に保護された両フラグメントが得られたため、HBTU等の縮合剤を用いて両者を縮合し、高収率かつ高純度でGhrelinを製造することができた。

本Ghrelin生産法は選択的脂肪酸修飾という課題を克服したのみならず、リン酸化や糖化など他の翻訳後修飾を受けたペプチドの製造にも適用できると考えられ、修飾ペプチドの製造方法として有用である。

### 第3章 Ghrelinの安定性および分解機構

一般的に、生理活性ペプチドは消化管内のプロテアーゼにより不活性化されるため、その多くは注射剤としての製剤形態で臨床的に供されている。従って、その製剤化に際しては水溶液中での安定性が重要な要素となる。そこで、製剤設計等のための基礎情報としてGhrelinの安定性や分解機構について解析した。

Ghrelinのオクタノイル修飾構造のpH安定性について把握するため、pH-分解速度定数プロファイルを算出した。その結果、オクタノイル修飾構造はpH全般にわたって不安定であるが、弱酸性においては比較的安定であることが分かった。また、Ghrelinの経時的な分解物生成パターンを解析したところ、主要な分解物は、オクタノイル修飾基が加水分解されたデスアシル体、およびオクタノイル修飾基が $\beta$ 脱離したデヒドロアラニン体であることが判明した。また、これらの分解物からさらに2次分解物が生成し、2位と3位の間が分解し易いことを見出した。すなわち、Ghrelinの3位オクタノイルSerは不安定であり、さらにこの残基の分解がGhrelinのペプチド主鎖の分解にも大きく寄与していることが示された。

これらの解析結果は、Ghrelinを医薬品として開発する過程、特に製剤開発や品質確保において必須となる情報である。

以上の成果は、Ghrelinの医薬品開発過程、すなわち、開発化合物の選定、原薬の生産、製剤開発、品質管理など幅広いステージで、重要な基礎情報となる。Ghrelinは医薬品として実用化される最初のGHS化合物として期待されるが、その開発展開において本研究の貢献は極めて大きいと言える。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、内因性成長ホルモン分泌促進因子「Ghrelin (グレリン)」を医薬品として開発することを目的として、その構造活性相関の解析、原薬の大量生産法の開発、製剤設計や品質管理等に必要な安定性に関する物性情報の解析を行ったものである。

成長ホルモン(GH)の分泌は、成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)およびSomatostatinにより制御されている。その一方で、成長ホルモン分泌促進因子(GHS)と呼ばれるペプチド性あるいは非ペプチド性の合成化合物に関して1980年頃から盛んに研究されてきた。このGHS化合物はGHRHと同様に下垂体からのGH分泌を促進するが、そのGH分泌のメカニズムはGHRHとは異なることが知られていた。その後、1996年のGHS受容体の発見に続き、1999年にはその内因性リガンドとしてGhrelinが発見された。Ghrelinが医薬品として開発されれば、その強力なGH分泌作用は低身長児や高齢者に対して有効であることが期待されている。さらに、食欲亢進活性や循環器系機能の改善作用などが報告されている。

Ghrelinは28残基の直鎖状ペプチドであり、3位Serの水酸基がオクタノイル(C8:0)修飾されているという極めて特徴的な構造を有する。活性発現にはこの修飾が必須である。また、このような脂肪酸修飾された生理活性ペプチドホルモンは他にはまだ報告されていない。

そこで、この修飾構造を中心に、Ghrelinの構造活性相関について詳細に解析した。部分的に構造を変えた誘導体を化学

合成し、その活性を評価した。その結果、活性発現に重要な構造は脂肪酸修飾部位の付近に集中しており、また、この修飾基は他の嵩高い疎水性基に置換可能であることが判明した。さらに、分子動力学計算の結果、内因性 GHS である Ghrelin と既存のペプチド性 GHS 化合物との間で構造上の類似性が認められた。これらの結果は、内因性リガンドのもつ構造情報の豊富さを再認識させると共に、新規 GHS 化合物の合成展開において有用な情報となる。

次に、この特殊な構造を有する Ghrelin を医薬品として使用するための大量生産法について検討した。ここでは、修飾構造を有する N 末側の配列を化学合成法、有さない C 末側の配列を遺伝子組換え法によりそれぞれ製造し、両者を縮合する半合成法を開発した。N 末側フラグメントとしては、弱酸性離脱樹脂を用いた Fmoc 固相合成法により [N<sup>α</sup>-Boc, Ser<sup>2,6</sup>(tBu)]hGhrelin(1-7) を製造した。また、C 末側フラグメントは、大腸菌を用いた遺伝子組換え法により N 末部にリンカー配列を付与した形で hGhrelin(8-28) を含むフラグメントペプチドを調製した後、Lys アミノ基を Boc 基で保護し、エンドペプチダーゼ Kex2 でリンカー配列を切断して [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]hGhrelin(8-28) を得た。この両者を縮合することにより、高収率かつ高純度で Ghrelin を製造することができた。

また、製剤処方設計等の基礎情報として、Ghrelin の安定性および分解機構について解析した。Ghrelin のオクタノイル修飾構造の pH 安定性について調べたところ、この修飾構造は pH 全般にわたって不安定であるが、弱酸性においては比較的安定であることが示された。また、Ghrelin の経時的な分解物生成パターンを解析したところ、主要な分解物はオクタノイル修飾基が加水分解されたデスアシル体、およびオクタノイル修飾基が β 脱離したデヒドロアラニン体であることが判明した。また、2 次分解についても解析し、オクタノイル Ser 残基の分解が Ghrelin のペプチド主鎖の分解にも大きく寄与していることが示された。すなわち、この残基の安定化が Ghrelin 分子の安定化に必須であることが判明した。

以上、本研究は Ghrelin の医薬品開発過程、すなわち、開発化合物の選定、原薬の生産、製剤開発、品質管理など幅広いステージで、重要な基礎情報となる。Ghrelin は医薬品として実用化される最初の GHS 化合物として期待されるが、その開発展開において本研究の貢献は極めて大きいと言える。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに平成15年1月24日論文内容とそれに関連した事項につき諮問を行った結果優秀と認定した。