

氏名	せき 関 たか 貴 ひろ 弘
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第464号
学位授与の日付	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	オピオイド受容体ファミリーとそのリガンドの相互作用に関する分子薬理学的研究
論文調査委員	(主査) 教授 佐藤 公道 教授 川 寄 敏 祐 教授 赤 池 昭 紀

論 文 内 容 の 要 旨

オピオイド受容体は μ 、 δ および κ の3タイプに大きく分類されており、いずれも7回膜貫通型のGタンパク共役型受容体ファミリーの一員であることが知られている。オピオイド受容体は各タイプ間で約60%と高いアミノ酸配列の相同性を示すが、いくつかのオピオイドリガンドはタイプ間で親和性の異なる結合を示す。また、ノシセプチン受容体はオピオイド受容体と約60%と高い相同性を示すにも拘わらずほとんどのオピオイドリガンドとは結合せず、またその内在性ペプチドリガンドであるノシセプチンはオピオイド受容体に結合性を示さない。著者はリガンドによるオピオイド受容体タイプ間およびオピオイド受容体/ノシセプチン受容体間の識別機構を解明することにより、オピオイド受容体およびノシセプチン受容体に対する新たなリガンド創製に有用な基礎的知見が得られるのではないかと考え、キメラ受容体および変異型受容体を発現させたCOS-7細胞を用いてリガンド結合実験を行い、以下の新知見を得た。また、幾つかのオピオイドリガンドについてノシセプチン受容体に対するアゴニストおよびアンタゴニスト活性を検討し、ノシセプチン受容体に対するリガンド創製のリード化合物となりうるオピオイドリガンドを見出した。

第一章 μ オピオイド受容体選択的リガンドDAMGOによる μ/κ オピオイド受容体間識別に関するアミノ酸残基

代表的な μ オピオイド受容体選択的リガンドであるDAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol⁵] enkephalin) による μ/κ 受容体間の識別機構を明らかにするために種々の μ/κ キメラ受容体および部位特異的点変異を導入した変異型受容体を用いた検討を行い、 μ/κ 受容体間識別に関するアミノ酸残基の同定を試みた。その結果、DAMGOによる μ/κ 受容体間識別は μ/δ 受容体間識別の時とは異なり、 κ 受容体の第6膜貫通部位と第3細胞外ループとの境界領域に存在する297番目のグルタミン酸残基と、第3細胞外ループと第7膜貫通部位との間に存在する310番目のセリン残基、312番目のチロシン残基、313番目のチロシン残基、および μ 受容体の対応する位置に存在するリジン残基、バリン残基、トリプトファン残基とヒスチジン残基の4アミノ酸残基の違いが重要であることを明らかにした。

第二章 非選択的オピオイドリガンド、ブレマゾシンによるオピオイド受容体/ノシセプチン受容体間識別に関するアミノ酸残基

ブレマゾシンは各タイプのオピオイド受容体に対して高親和性に結合するが、ノシセプチン受容体に対しては結合しない。このように各種オピオイドリガンドがノシセプチン受容体に結合しない原因となっている受容体構造の相違を明らかにするため、ノシセプチン受容体と最も相同性の高いオピオイド受容体である κ 受容体との間での種々のキメラ受容体および変異型受容体を作成し、ブレマゾシンによるオピオイド受容体/ノシセプチン受容体間識別に関するアミノ酸残基の同定を試みた。その結果、第2細胞外ループと第5膜貫通部位の境界領域に存在するノシセプチン受容体の216番目のアミノ酸残基であるアラニン残基と、第6膜貫通部位に存在するノシセプチン受容体の279-281番目のアミノ酸残基あるバリン残基、グルタミン残基、バリン残基という4アミノ酸残基をオピオイド受容体のそれぞれ対応する位置に存在するリジン残基、イソロイシン残基、ヒスチジン残基、イソロイシン残基に置換した変異型受容体に対してブレマゾシンの高親和性の結合が見ら

れること、すなわち、プレマゾシンによるオピオイド受容体/ノシセプチン受容体間識別にはこれら4アミノ酸残基の違いが重要であることを明らかにした。

第三章 ノシセプチン受容体に対するオピオイドリガンドのアゴニストおよびアンタゴニスト活性

ノシセプチン受容体に選択的な非ペプチド性アゴニストあるいはアンタゴニストを創製する際のリード化合物となりうるリガンドを探索するために、クローン化ヒトノシセプチン受容体を安定的に発現したCHO細胞(CHO/NociR)を用いて、いくつかのオピオイドリガンドのノシセプチン受容体に対するアゴニストおよびアンタゴニスト活性を検討した。CHO/NociRにおいて、今回用いたオピオイドリガンドであるモルヒネ、ナロキソン、ノルビナルトルフィミン、TAN-67の(+)体と(-)体、TRK-820およびナロキソンベンゾイルヒドラゾン単独ではフォルスコリン誘発cAMP蓄積にほとんど影響を与えず、アゴニスト活性は見られなかった。一方、10nMノシセプチンによるcAMP蓄積抑制効果は、TRK-820では 10^{-5} M以上、ナロキソンベンゾイルヒドラゾンでは 10^{-4} Mの同時処置により有意に拮抗され、これらはノシセプチン受容体に対してアンタゴニスト活性を示すことを明らかにした。

以上、著者はオピオイドリガンドによるオピオイド受容体タイプ間識別やオピオイド受容体/ノシセプチン受容体間識別が数個のアミノ酸残基の違いの認識によって行われていることを明らかにした。このことは、リガンドのわずかな構造変化によって別の受容体に結合する化合物を合成できる可能性を示唆するものである。さらに、ノシセプチン受容体に対してTRK-820やナロキソンベンゾイルヒドラゾンがアンタゴニスト活性を示すことを明らかにし、ノシセプチン受容体に特異的に結合する非ペプチド性アゴニストあるいはアンタゴニストの創製の基礎的知見を与えた。

論文審査の結果の要旨

μ 、 δ および κ タイプに分類されているオピオイド受容体遺伝子がクローニングされ、各タイプ間で約60%の高いアミノ酸配列の相同性があることが判明したが、各タイプ受容体に選択的なリガンドが存在する。また、オピオイド受容体と約60%の相同性を示すが、ほとんどのオピオイドリガンドが高親和性には結合しないノシセプチン受容体も明らかにされ、その内因性リガンドであるノシセプチンもオピオイド受容体とは高親和性には結合しないことが示された。因みに、これらの受容体は全て7回膜貫通型Gタンパク共役型である。著者は、オピオイド受容体各タイプおよびノシセプチン受容体に対する選択的で有用なリガンド創製のための基礎的知見を得る目的で、諸種のキメラ受容体および部位特異的変異を導入した変異型受容体を作製し、リガンドのオピオイド受容体タイプ間およびオピオイド受容体/ノシセプチン受容体間の選択性発現の分子機構等に関する研究を行い、以下のような新知見を得た。

第一章 μ オピオイド受容体選択的リガンドDAMGOによる μ/κ オピオイド受容体間識別に関与するアミノ酸残基

代表的 μ オピオイド受容体選択的リガンドDAMGO([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol⁵] enkephalin)による μ/κ 受容体間識別機構を検討した結果、 κ 受容体の第6膜貫通部位と第3細胞外ループの境界領域にあるGlu²⁹⁷、および、第3細胞外ループと第7膜貫通部位の間にあるSer³¹⁰, Tyr³¹², Tyr³¹³の計4つのアミノ酸残基と、 μ 受容体においてこれらに対応する位置にあるLys³⁰³, Val³¹⁶, Trp³¹⁸, His³¹⁹の違いが重要であることを見いだした。

第二章 非選択的オピオイドリガンド、プレマゾシンによるオピオイド受容体/ノシセプチン受容体間識別に関与するアミノ酸残基

プレマゾシンによるオピオイド受容体とノシセプチン受容体間の識別には、ノシセプチン受容体の第2細胞外ループと第5膜貫通部位との境界領域にあるAla²¹⁶および第6膜貫通部位にあるVal²⁷⁹, Gln²⁸⁰, Val²⁸¹とオピオイド受容体においてそれぞれ対応する位置にあるLys, Ile, His, Ileの4アミノ酸残基の違いが重要であることを明らかにした。

第三章 ノシセプチン受容体に対するオピオイドリガンドのアゴニストおよびアンタゴニスト活性

クローン化ヒトノシセプチン受容体を安定的に発現するCHO細胞を樹立し、ノシセプチン受容体に対するリガンドのアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性を評価できる実験系を確立した。それを用いて、TRK-820およびナロキソンベンゾイルヒドラゾンが高濃度ではあるがアンタゴニスト活性を示すことを明らかにした。

以上のように、著者はオピオイドリガンドによるオピオイド受容体タイプ間の識別は、細胞外ループと膜貫通部位の境界領域に存在する数個のアミノ酸残基の違いを認識することによって行われていることを明らかにした。さらにノシセプチン

受容体に特異的に結合する非ペプチド性アゴニストあるいはアンタゴニスト創製の基礎的知見を与えた。

よって、本論文を博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成13年2月26日に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。