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

2001

関　貴弘

目次

緒言 1

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 3

実験方法 3

実験結果 7

第一節　μ／κキメラ受容体に対するDAMGOの結合特性 7

第二節　DAMGOによるμ／κ受容体間識別に関与するアミノ酸残基の同定 11

第三節　変異型受容体κ(E297K+Y313H+Y312W+S310V)に対するDAMGOのアゴニスト活性 15

第四節　変異型受容体κ(E297K+Y313H+Y312W+S310V)に対する各種オピオイドリガンドの親和性 16

考察 18

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与するアミノ酸残基 21

実験方法 23

実験結果 24

第一節　ノシセプチン受容体／κ受容体キメラ受容体に対するブレマゾシンの結合に重要な受容体領域の同定 24

第二節　ブ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の識別に重要なアミノ酸残基の同定 26

考察 30

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 33

実験方法 34

実験結果 36
第一節　CHO/NociR の樹立とノシセプチン誘導体[F/G]NC(1-13)NH_2 のアゴニストおよびアンタゴニスト活性 36
第二節　各種オピオイドリガンドの CHO/NociR に対するアゴニストおよびアンタゴニスト活性 38
第三節　各リガンドのノシセプチン受容体に対する親和性 41
考察 42

総括および結論 46

謝辞 47

発表論文目録 48

引用文献 49

緒言

オピオイド受容体はモルヒネなどの麻薬性鎮痛薬やエンケファリン、β-エンドルフィン、ダイノルフィンなどの内因性オピオイドペプチドが結合する受容体であり、薬理学的特性の違いによりμ、δおよびκの3種類のタイプに分類されている。オピオイドリガンドにはこれら全てのタイプに結合するリガンドが存在する一方で、それぞれのタイプに選択的に作用するリガンドもいくつか存在し、それらを用いて各タイプの生理的な役割の違いについての研究がなされている。しかし、そのような受容体タイプ選択的リガンドは、実際にはまだ鎮痛薬としては用いられていない。

1992年にNG108-15細胞からδオピオイド受容体がクローニングされたのを皮切りに、様々な動物種において、各タイプの受容体cDNAが単離され、タンパク質の一次構造が明らかとなった。その結果、μ、δおよびκオピオイド受容体間のアミノ酸配列は約60%と高い相同性を示すことが明らかとなった。その中でも特に、膜貫通部位（73-76%）および細胞内ループ（64-67%）では高い相同性を示すが、細胞外ループの相同性は低く(34-40%)、受容体タイプ選択的リガンドは、このような細胞外ループの違いを認識して受容体間の識別を行っている可能性が示唆されている。しかし、受容体タイプ選択的リガンドによる受容体間識別の詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。この識別メカニズムを明らかにすることは、新たな受容体タイプ選択的リガンドの創製に有用な基礎的知見となるのではないかと考えられる。そこで、著者は代表的なμオピオイド受容体選択的リガンドであるDAMGOによるμオピオイド受容体とκオピオイド受容体間の識別メカニズムについて、キメラ受容体および点変異受容体を用いた検討を行った。

一方、オピオイド受容体cDNAの単離と同時期に、オピオイド受容体と約60%と高いアミノ酸配列の相同性を示すものの、ほとんどのオピオイドリガンドと結合しないオーファン受容体のcDNAも同定された。後にこのオーファン受容体の内在性リガンドとして単離されたのが、ノシセプチン／オルファニンFQ（本論文中ではノシセプチンという名称を用いる）であり、このオーファン受容体はノシセプチン受容体と呼ばれるようになった。ノシセプチンは17アミノ酸残基からなるペプチドでありダイノルフィンAと類似した構造であるにも拘わらず、オピオイド受容体各タイプには結合性を示さず、さらに痛覚に対する効果も投与部位あるいは用量によって鎮痛作用と痛覚過敏惹起作用という相反する作用を示すことが報告されている。ノシセプチン系の生体内における役割については、受容体ノックアウトマウスなどを用いた研究が進み始めてはいるが、未だ不明な点が多く、その詳細な解明にはノシセプチン受容体に特異的に結合するアゴニストおよびアンタゴニストが必要である。そこで、著者はノシセプチン受容体特異的リガン

ド創製に有用な知見を得るため、ノシセプチン受容体とオピオイド受容体のキメラ受容体、および変異型ノシセプチン受容体を作製することにより、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アミノ酸残基の同定を試みた。また、ノシセプチン受容体を安定的に発現するCHO細胞を用いて、数種の非ペプチド性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特異的非ペプチド性リガンド創製のシード化合物となりうるリガンドの探索を行った。以下、それらの知見について3章に分け論述する。

なお、本文中あるいは表中で使用した略号またはコード番号は以下の通りである。

cAMP:	cyclic adenosine monophosphate
cDNA:	complementary DNA
CHO:	Chinese hamster ovary
COS-7:	CV-1 Origin, SV40
CTOP:	D-Pen-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH_2
DAMGO:	[D-Ala^2-*N*-MePhe^4-Gly-ol^5]enkephalin
DEAE-dextran:	diethylaminoethyl dextran
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's medium
DPDPE:	[D-Pen^2, D-Pen^5]enkephalin
HBS:	HEPES-buffered saline
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IBMX:	3-isobuthyl-1-methylxanthine
PBS:	phosphate buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
RT-PCR:	reverse transcription-polymerase chain reaction
SNC-80:	(+)-4-[(α*R*)-α-((2*S*,5*R*)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-*N*,*N*-diethylbenzamide
TAN-67:	2-metyl-4a α-(3-hydroxyphenyl)-1,2,3,4,4a,5,12,12a α-octahydro-quinolino[2,3,3-*g*]isoquinoline
TCA:	trichloroacetic acid
TRK-820:	17-cyclopropylmethyl-3,14β-dihydroxy-4,5α-epoxy-6β-[*N*-methyl-*trans*-3-(3-furyl)acrylamido]morphinan
U69,593:	(+)-(5a,7a,8b)-N-methyl-N-[7-(1-pyrrolidinyl)-1-oxaspino-(4,5)dec-8-yl]benzeneacetamide

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

1992年にマウスδオピオイド受容体のcDNAが初めてクローニングされ[1、2]、それに引き続きヒトあるいはラットなどにおいてもμ、δおよびκオピオイド受容体のcDNAが相次いでクローニングされ[3-11]、各受容体の一次構造が解明された。その結果、いずれのオピオイド受容体もGタンパク質共役型受容体に共通に見られる７回膜貫通型の構造をとっていることが明らかとなった。オピオイド受容体はその受容体タイプ間で約60%と高いアミノ酸配列の相同性を示しているが、それぞれのタイプのみに選択的に結合するリガンドがいくつか存在する。このようなタイプ選択的リガンドの受容体結合選択性と受容体構造の関係を明らかにすることは、新たなタイプ選択的リガンド創製に有用な知見を与えると考えられる。これまで当研究室が行ってきた研究により、μオピオイド受容体選択的リガンドであるDAMGOによるμ／δ受容体間識別が第２膜貫通部位と第１細胞外ループの境界領域に存在する１アミノ酸残基の違いにより行われていることが明らかになっている（図1-1 A)[12、13]。一方、μ／κ受容体間識別に関しては第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制限酵素Bgl II認識部位よりもＣ末端側の受容体領域が重要であることまでしか分かっていない（図1-1 B)[14]。本章では、さらに数種のキメラ受容体および変異型受容体を作製することによって、DAMGOによるμ／κ受容体間識別に関与するアミノ酸残基の同定を試みた。

実験方法

１．試薬

DAMGO、デルモルフィン（dermorphin）、CTOP（Peninsula Laboratories, Bermont, USA）、メチオニンエンケファリン（Met-enkephalin, ペプチド研究所、箕面）、モルヒネ（morphine, 武田薬品工業、大阪）、ナロキソン（naloxone, Sigma Chemical, St. Louis, USA）、[^{3}H]ブレマゾシン（bremazocine）、[^{3}H]DAMGO、[^{3}H]U69,593（DuPont-New England Nuclear, Wilmington, USA）を購入した。U69,593はUpjhon（Kalamazoo, USA）、フェンタニル（fentanyl）は三共（東京）から供与していただいた。

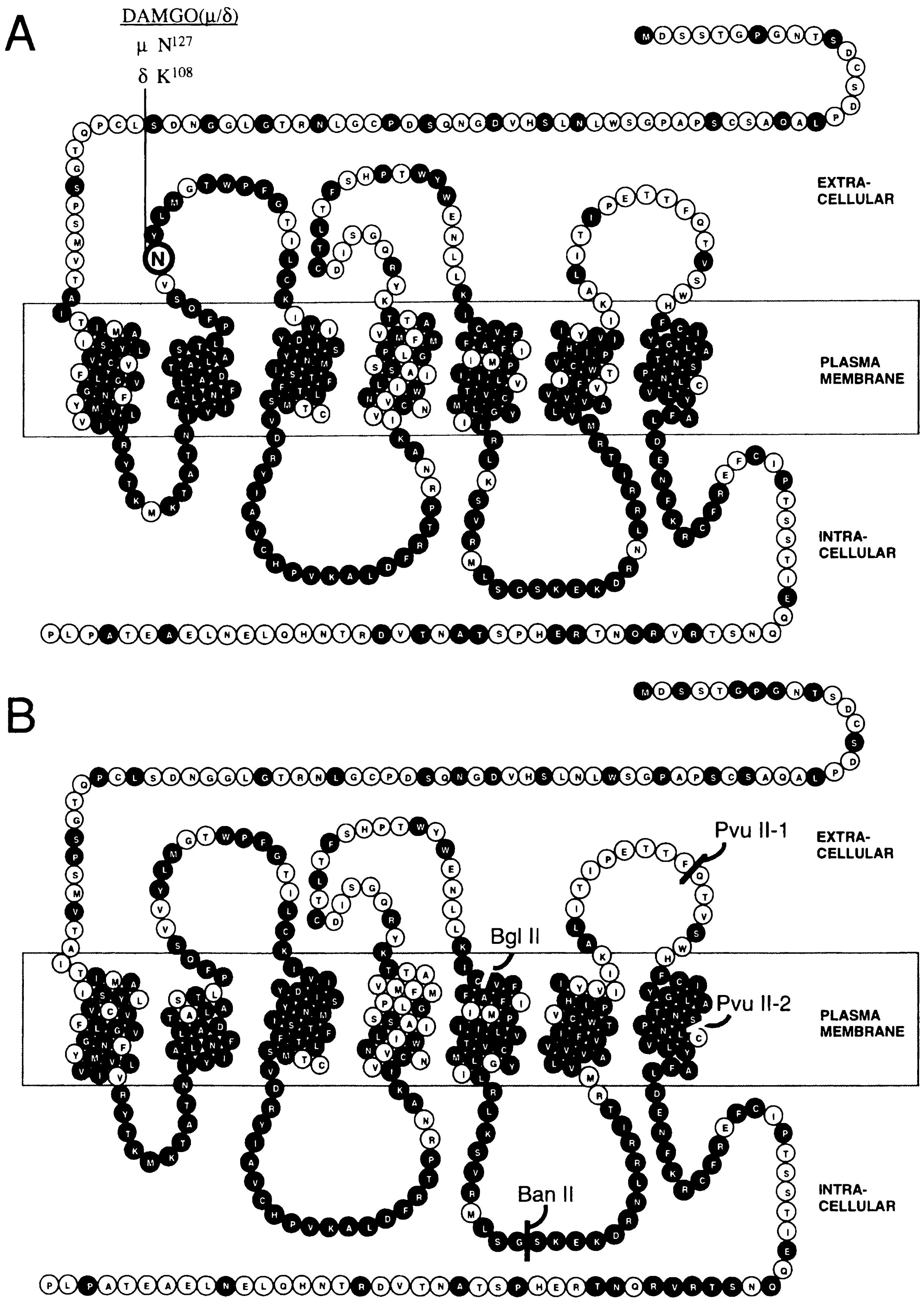


図 1-1　ラット μ オピオイド受容体の推定構造

黒丸で示したアミノ酸はラット δ 受容体（A）あるいはラット κ 受容体（B）と同一のアミノ酸残基であることを示している。A の図中には DAMGO による μ ／ δ 受容体間識別に関与するアミノ酸残基を示している。B の図中にはキメラ受容体作製に用いた制限酵素認識部位を示している

2．キメラおよび変異型受容体cDNAの作製

ラットμおよびκ受容体cDNAはMinamiらがクローニングしたものを用いた[3、4]。μ／κキメラ受容体cDNAはラットμ受容体cDNAとラットκ受容体cDNAを基にして、第3細胞内ループに存在する制限酵素Ban II認識部位（Ban II部位）と第3細胞外ループと第7膜貫通部位に存在する2カ所の制限酵素Pvu II認識部位（本論文中ではN末端側から順にそれぞれPvu II-1部位およびPvu II-2部位と呼ぶことにする）を用いて作製した(図1-1 B)。Pvu II-1部位とPvu II-2部位はそれぞれμ受容体およびκ受容体には存在していないので点変異導入によりそれぞれの対応する位置に制限酵素認識部位を導入した。この点変異導入によるアミノ酸配列の変化はキメラ受容体作成の後に再び点変異を導入することによって、元に戻した。変異型受容体cDNAの作製は目的の塩基配列を有するプライマーとTransformer Site-Directed Mutagenesis Kit (2nd version)(CLONTECH, Palo Alto, USA）を用いて行った。作製したキメラあるいは変異型受容体cDNAは適当な制限酵素で切断して発現ベクターpcDNA3（Invitrogen, Carlsbad, USA）に組み込んだ。キメラおよび変異型受容体cDNAはThermo Sequenase II Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden）を用いたシークエンシングによって確認した。

3．COS-7細胞への受容体cDNAのトランスフェクション

野生型、キメラおよび変異型受容体cDNAを含むプラスミドDNAは、DEAE-dextran法によって以下のようにトランスフェクションした。まず、COS-7細胞を150 mm dishに1×10^6 cells/dishの密度でまき、12-20時間37℃、5%炭酸ガス培養器中で培養した。培養は10%ウシ胎児血清を含むDMEM中で行った。PBSで洗浄した後、transfection solution (プラスミドDNA 40 μg、50 mM Tris (pH 7.4)、100 mMクロロキン、0.05% DEAE-dextranを含むDMEM）で37℃、4時間インキュベートした。その後、10% DMSO/PBSで37℃、2分間インキュベートし、PBSで洗浄後、65時間の培養を行った。

4．CHO細胞への受容体cDNAのトランスフェクション

CHO細胞は10%ウシ胎児血清、50 U/mlペニシリン、50 μg/ml硫酸ストレプトマイシンを含むハムF12培地で37℃、5%炭酸ガス培養器中で培養した。野生型および変異型受容体cDNAを含むプラスミドをリポフェクチン法（GibcoBRL, Gaithersburg, USA）によりCHO細胞にトランスフェクションした。500 μg/mlのG418（GibcoBRL）存在下で培養し、生存するコロニーのうち[^{3}H]ブレマゾシン(DuPont-New England Nuclear, Wilmington, USA）を用いた結合実験により各受容体を高レベルで発現しているクローン細胞を選別した。それぞれの受容体の発現はノーザンブロット法にて確認した。

5．受容体結合実験

トランスフェクション終了後のCOS-7細胞あるいはトランスフェクションした受容体を安定的に発現したCHO細胞を回収し、Tris緩衝液（50 mM Tris (pH 7.4)、10 mM $MgCl_2$、1 mM EDTA）中でホモジナイズした。30,000gで20分間遠心した後、ペレットを緩衝液に懸濁しこれを粗膜標品として結合実験に使用した。標識リガンド10 µl、非標識リガンド10 µl、粗膜標品80 µlを混合し、25℃、1時間インキュベートした後、氷冷したTris緩衝液1 mlで反応を停止した。これを0.1%ポリエチレンイミンに浸したWhatman GF/Cフィルターで濾過し、Tris緩衝液で洗浄した後、フィルターを5 mlのクリアゾルI（ナカライテスク、京都）に入れ、液体シンチレーションカウンターでその放射活性を測定した。

飽和結合実験には、種々の濃度の標識リガンドとそれぞれの非標識リガンド10 µMを用いた。競合結合実験には、一定濃度の[^{3}H]DAMGO、[^{3}H]U69,593（DuPont-New England Nuclear, Wilmington, USA）と種々の濃度の非標識リガンドを用い、非特異的結合は10 µMのDAMGOあるいはU69,593の存在下で求めた。データは3から7回の実験結果の平均値±標準誤差で表している。

6．細胞内cAMP量の定量

トランスフェクションした受容体を安定的に発現するCHO細胞を1 × 10^5 cells/wellの密度で24穴マルチウェルプレートに播種し、12-24時間培養した。1ウェル当たり0.5 mlのHBS（140 mM NaCl、4.7 mM KCl、2.2 mM $CaCl_2$、1.2 mM $MgCl_2$、1.2 mM KH_2PO_4、11 mM Glucose、15 mM HEPES、pH 7.4）で1回洗浄後、0.45 mlの1 mM IBMXを含むHBS中で37℃、10分間プレインキュベートした。反応は種々の濃度のオピオイドリガンド、100 µMフォルスコリン（forskolin, 最終濃度10 µM）、1 mM IBMXを含むHBS 50 µlを加えて開始した。37℃、10分間インキュベートした後、氷冷した0.5 mlの10% TCAを添加して反応を停止した。cAMPを抽出後、cAMP assay kit（Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden）を用い、ラジオイムノアッセイで定量した。データは3から5回の実験結果の平均値±標準誤差で表している。

6．データ解析

受容体結合実験における標識リガンドの解離定数（K_d）は、標識リガンドの飽和結合実験の結果をScatchard解析することにより算出した。各オピオイドリガンドの阻害定数（K_i）は、標識リガンドのK_d値と標識リガンドの結合を50%置換するために必要な濃度（IC_{50}）から、Cheng & Prusoffの式により計算した[15]。cAMPアッセイにおける各オピオイドリガンドのIC_{50}値はフォルスコリンにより誘発されるcAMP蓄積の最大抑制効果の50%を発現するのに必要な濃度として計算した。

実験結果

第一節　μ／κキメラ受容体に対するDAMGOの結合特性

代表的なμ受容体選択的リガンドであるDAMGOのμおよびκ受容体に対する親和性を確認するために、COS-7細胞にμおよびκ受容体をトランスフェクションし、飽和結合実験を行った（図1-2）。$[^3H]$DAMGOはμ受容体に対しては非常に高い親和性で結合したが（$K_d = 3.5 \pm 0.8$ nM）κ受容体にはほとんど結合しなかった。

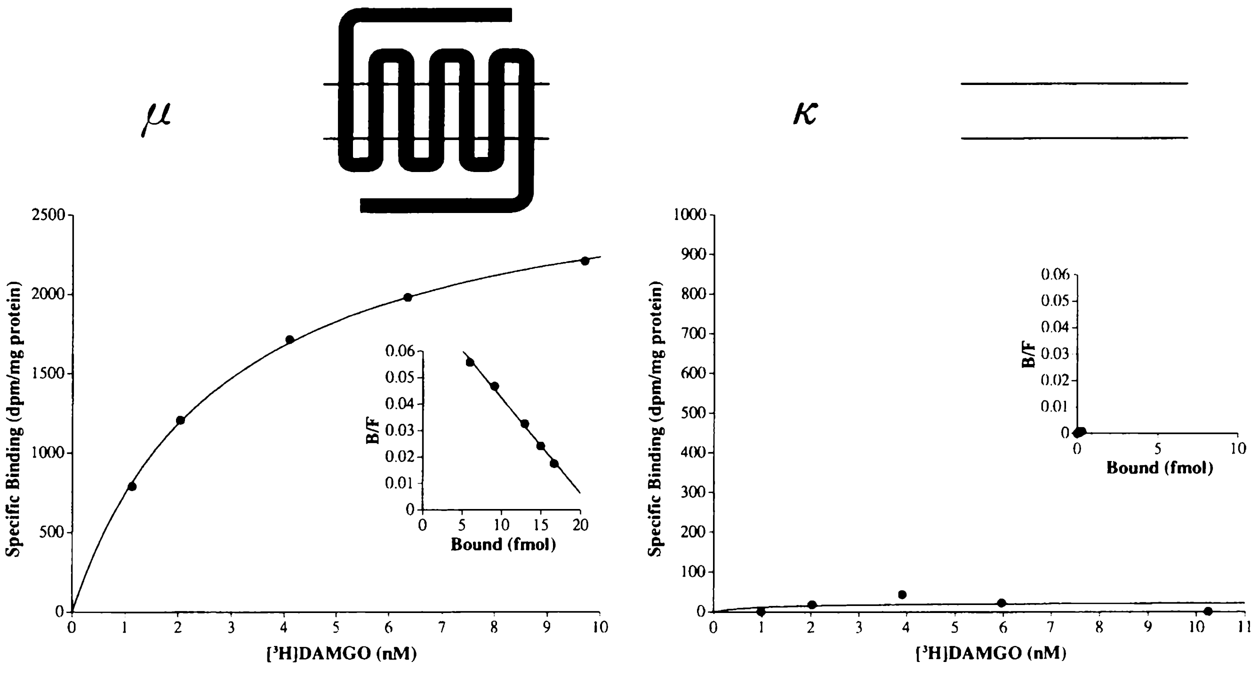


図1-2　野生型μおよびκ受容体を発現するCOS-7細胞の膜画分に対する$[^3H]$DAMGOの飽和結合実験とScatchardプロット

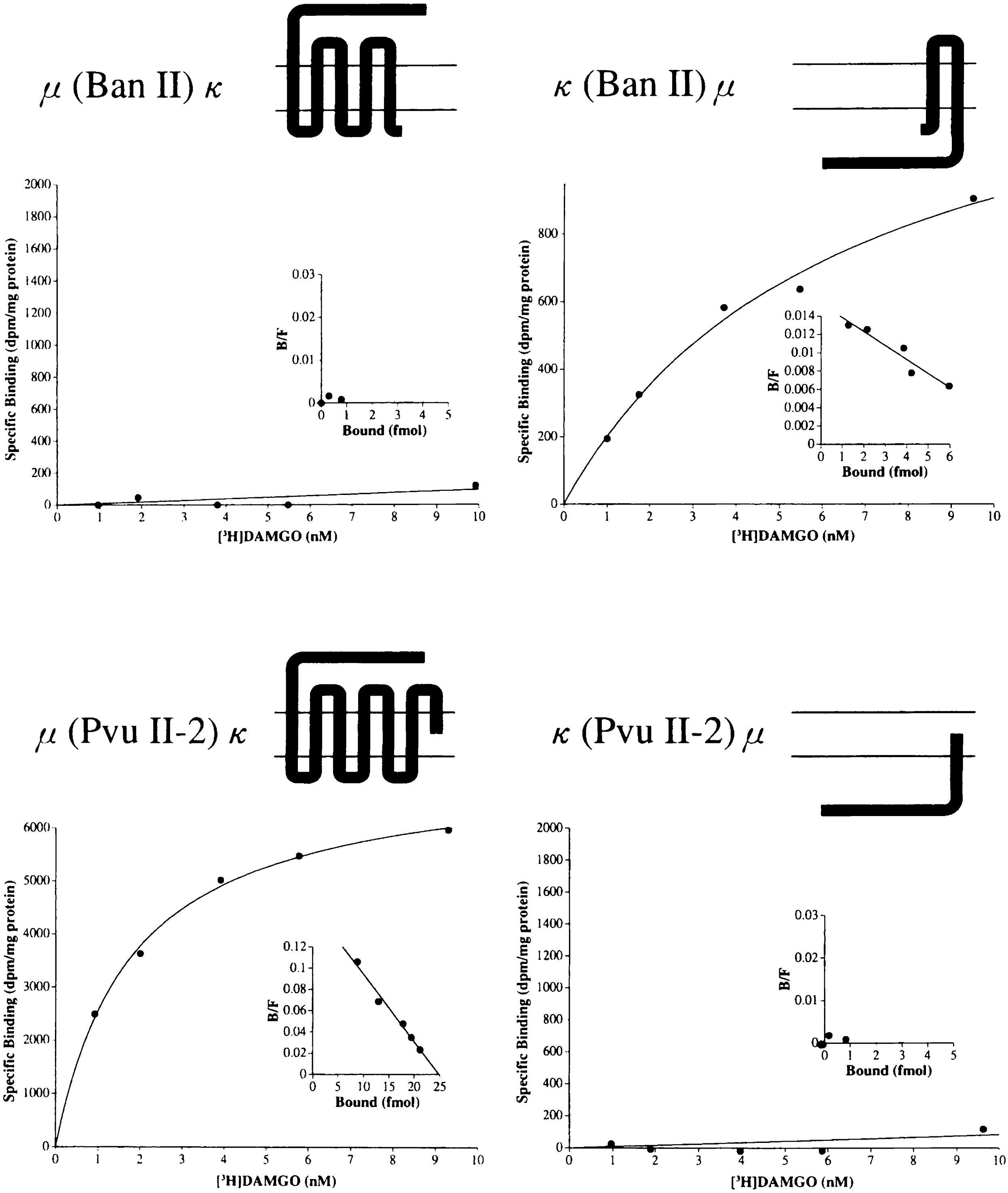


図1-3　Ban II部位およびPvu II-2部位を用いて作製したキメラ受容体を発現するCOS-7細胞の膜画分に対する[^{3}H]DAMGOの飽和結合実験とScatchardプロット

キメラ受容体モデルでは、μ受容体に由来する部分を黒、κ受容体に由来する部分を灰色で示している。

続いて、Bgl II部位よりC末端側に存在する制限酵素認識部位のうち、まず、第3細胞内ループに存在するBan II部位を用いて、μ受容体のBan II部位よりもC末端側をκ受容体に置換したキメラ受容体μ(Ban II)κとそのミラーイメージであるκ(Ban II)μを作製して、[^{3}H]DAMGOの飽和結合実験を行った。図1-3上段にその結果を示す。[^{3}H]DAMGOはμ(Ban II)κにはほとんど結合しなかったが、κ(Ban II)μにはμ受容体と同程度の高親和性の結合を示した（K_d = 4.4 ± 1.2 nM）。さらに、第7膜貫通部位に存在するPvu II-2部位を用いて作製した2種のキメラ受容体μ(Pvu II-2)κおよびκ(Pvu II-2)μについて[^{3}H]DAMGOの結合実験を行ったところ（図1-3下段）、μ受容体のPvu II-2部位からC末端側をκ受容体に置換したキメラ受容体μ(Pvu II-2)κへの親和性は高かったものの（K_d = 1.1 ± 0.2 nM）、κ(Pvu II-2)μへはほとんど結合しなかった。以上の結果より、DAMGOによるμ／κ受容体間識別には、第3細胞内ループのBan II部位と第7膜貫通部位のPvu II-2部位の間の受容体領域が重要であることが示唆される。

さらに、第3細胞外ループの中程に存在するPvu II-1部位を用いて2種のキメラ受容体μ(Pvu II-1)κおよびκ(Pvu II-1)μを作製し、[^{3}H]DAMGOの飽和結合実験を行った。この結果を図1-4に示す。しかしながら、[^{3}H]DAMGOはこの両受容体に対して高親和性の結合

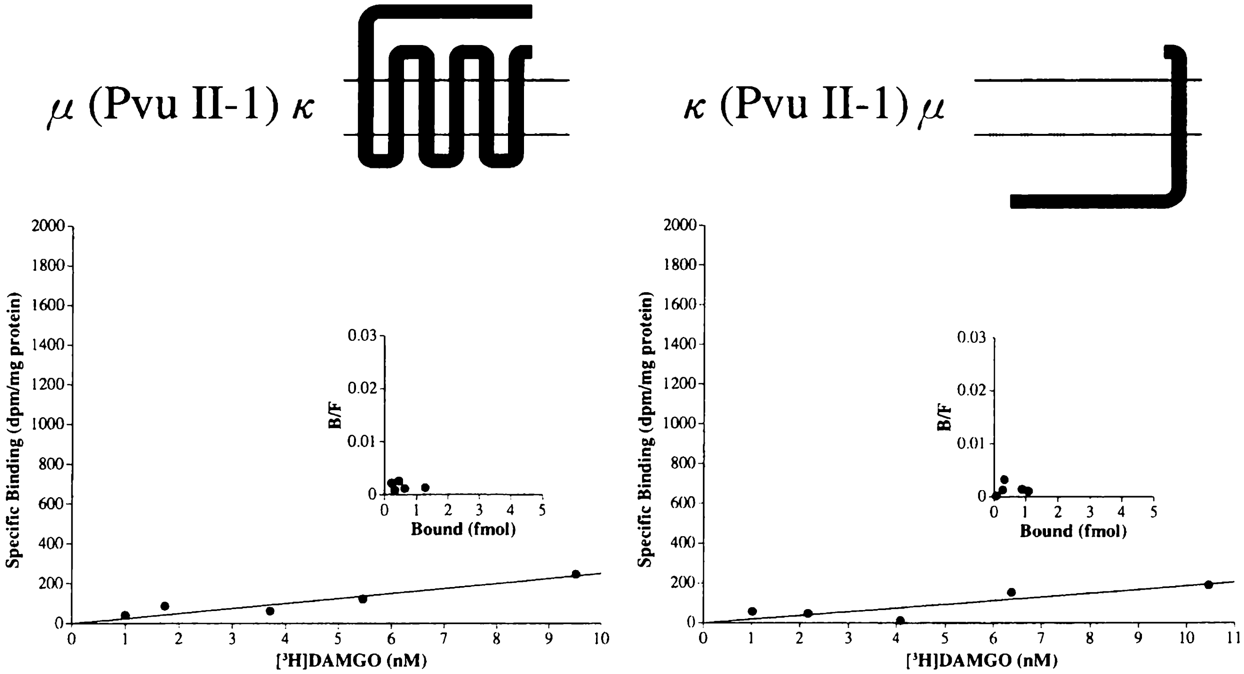
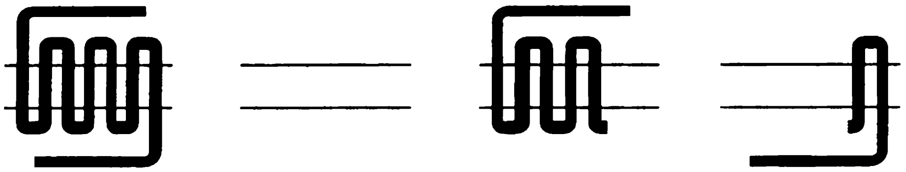


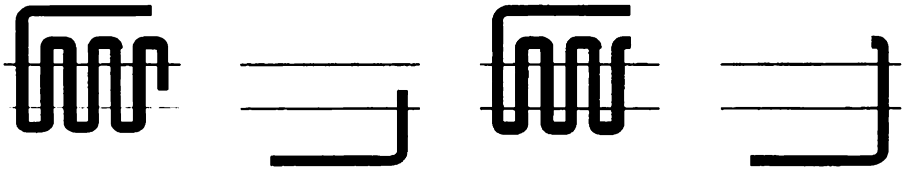
図1-4　Pvu II-1部位を用いて作製したキメラ受容体を発現するCOS-7細胞の膜画分に対する[^{3}H]DAMGOの飽和結合実験とScatchardプロット
キメラ受容体モデルでは、μ受容体に由来する部分を黒、κ受容体に由来する部分を灰色で示している。

は示さなかった。なお、表1-1に示すように、この両キメラ受容体に対し、非選択的オピオイドリガンドである$[^{3}H]$ブレマゾシンは高親和性の結合を示したことにより、受容体の発現および高次構造形成には問題がないと考えられる。この結果は、DAMGOによるμ／κ受容体間識別に重要な領域が第3細胞内ループのBan II部位と第3細胞外ループのPvu II-1部位との間の領域と、第3細胞外ループのPvu II-1部位と第7膜貫通部位のPvu II-2部位との間の領域に少なくとも1カ所ずつ存在することを示すものである。

表1-1　野生型μ、κ受容体およびμ／κキメラ受容体を発現するCOS-7細胞の膜画分に対する$[^{3}H]$DAMGOと$[^{3}H]$ブレマゾシンのK_d値（nM）
N.D.：低親和性のため、K_d値を求められなかったことを示す。



	μ	κ	μ(Ban II)κ	κ(Ban II)μ
$[^{3}H]$DAMGO	**3.5 ± 0.8**	**N.D.**	**N.D.**	**4.7 ± 1.2**
$[^{3}H]$Bremazocine	**2.7 ± 0.2**	**3.1 ± 0.4**	**3.9 ± 0.5**	**7.6 ± 0.4**



	μ(Pvu II-2)κ	κ(Pvu II-2)μ	μ(Pvu II-1)κ	κ(Pvu II-1)μ
$[^{3}H]$DAMGO	**1.1 ± 0.1**	**N.D.**	**N.D.**	**N.D.**
$[^{3}H]$Bremazocine	**7.9 ± 0.6**	**6.9 ± 0.9**	**3.4 ± 0.5**	**9.9 ± 1.1**

第二節　DAMGOによるμ／κ受容体間識別に関与するアミノ酸残基の同定

第一節の結果からDAMGOによるμ／κ受容体間識別は2カ所以上の受容体領域が関与していることが明らかとなった。そこで、まずBan II部位からPvu II-1部位の間の領域において重要なアミノ酸残基の同定を行うために、点変異導入法によりアミノ酸残基を置換した変異型受容体を用いて結合実験を行った。図1-5に示すように、Ban II部位からPvu II-1部位の間の領域でμ／κ受容体間で異なるアミノ酸残基は16残基存在するが、このうち、第6膜貫通部位と第3細胞外ループの境界領域に存在するκ受容体の297番目のグルタミン酸残基は、κ受容体選択的アンタゴニストであるノルビナルトルフィミン(norbinaltorphimine)やκ受容体選択的アゴニストであるTRK-820の選択的結合に重要であることが報告されているため[16-18]、この残基に注目し、キメラ受容体κ(Pvu II-1)μにおいて、このグルタミン酸残基をμ受容体の対応する位置に存在するリジン残基に置換した変異型受容体κ(Pvu II-1)μ(E297K)を作製し、[^{3}H]DAMGOの結合実験を行った(図1-6)。その結果、κ(Pvu II-1)μとは異なり、[^{3}H]DAMGOはκ(Pvu II-1)μ(E297K)に対して高親和性の結合を示し、そのK_d値は11 ± 2.7 nMであった。このことから、Ban II部位からPvu II-1部位の間の領域ではκ受容体の297番目のグルタミン酸残基とμ受容体の対

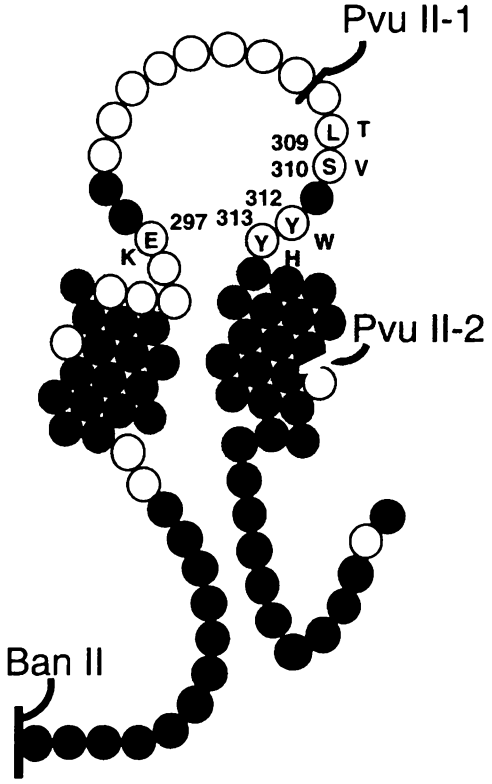


図1-5　ラットκオピオイド受容体の第3細胞外ループ周辺のアミノ酸残基
黒丸はラットμ受容体と保存されているアミノ酸残基を示している。アルファベットの書かれた白丸は本研究中で変異を行ったアミノ酸残基である。ループの内側にそのアミノ酸残基の番号を、外側にμ受容体の対応する位置に存在するアミノ酸残基を示している。

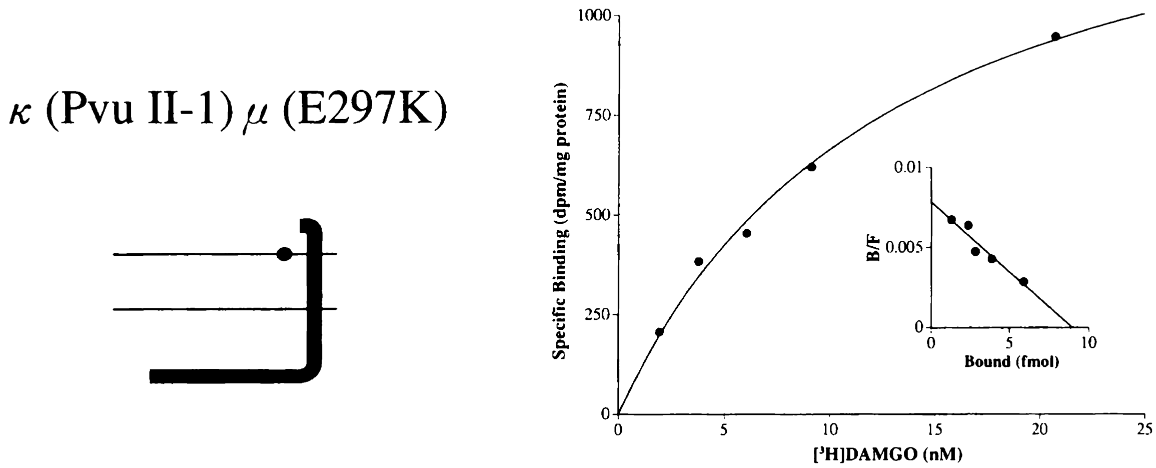


図 1-6　変異型受容体 κ (Pvu II-1) μ (E297K) を発現する COS-7 細胞の膜画分に対する [^{3}H]DAMGO の飽和結合実験と Scatchard プロット

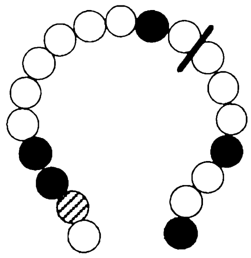
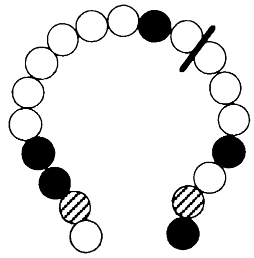
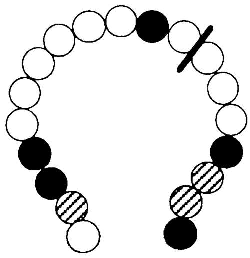
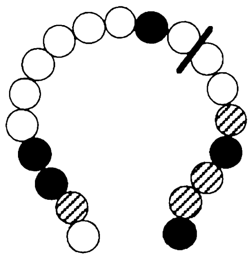
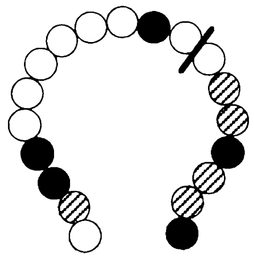
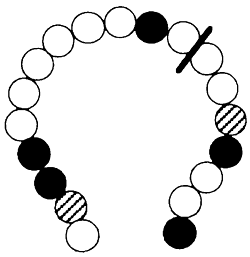
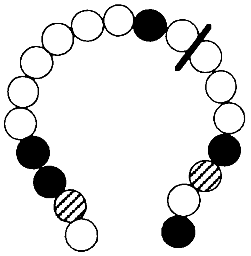
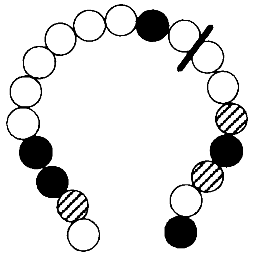
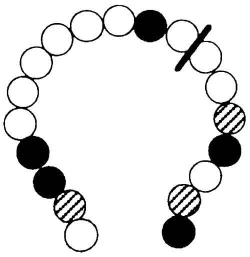
キメラ受容体モデルでは、μ 受容体に由来する部分を黒、κ 受容体に由来する部分を灰色で示している。

応する位置に存在する 303 番目のリジン残基の違いが DAMGO による μ ／ κ 受容体間識別に関与することが示唆される。なお、κ 受容体において297番目のグルタミン酸残基のリジン残基への置換のみを行った変異型受容体 κ (E297K)に対しては、[^{3}H]DAMGOはほとんど結合しなかった（表 1-2)。

続いて、Pvu II-1 部位から Pvu II-2 部位の間の領域で重要なアミノ酸残基の検討を行った。この結果は表1-2にまとめて示す。この第 3 細胞外ループと第 7 膜貫通部位にかけての領域において、μ ／ κ 受容体間では 5 つのアミノ酸残基の相違が見られる (図1-5)。そこで、このうち最もＣ末端側に存在するアミノ酸残基である κ 受容体の313番目のチロシン残基からＮ末端方向に順に μ 受容体の対応する位置に存在するアミノ酸残基への変異を κ 受容体の297番目のグルタミン酸残基からリジン残基への置換と組み合わせた変異型受容体を作製し、[^{3}H]DAMGO の結合実験を行った。κ 受容体の 297 番目のグルタミン酸残基からリジン残基への置換に加えて、313番目のチロシン残基を μ 受容体の対応する位置に存在するヒスチジン残基に置換した変異型受容体 κ (E297K+Y313H)、およびさらに312番目のチロシン残基も μ 受容体の対応する位置に存在するトリプトファン残基に置換した変異型受容体 κ (E297K+Y313H+Y312W)に対しては[^{3}H]DAMGOの親和性は低く、K_d 値は求められなかった。それに対し、さらに310番目のセリン残基も μ 受容体の対応する位置に存在するバリン残基に置換した変異型受容体 κ (E297K+Y313H+Y312W+S310V)に対しては、[^{3}H]DAMGO は高親和性の結合を示した（K_d = 8.7 ± 1.2 nM)。さらに 309 番目のロイシン残基も μ 受容体の対応する位置に存在するトレオニン残基に置換した変異型受容体 κ (E297K+Y313H+Y312W+S310V+L309T)に対しても [^{3}H]DAMGO は高親和性の結合を示した（K_d = 17 ± 1.7 nM）が、κ (E297K+Y313H+Y312W+S310V)と比べて、さら

表1-2 変異型κ受容体を発現するCOS-7細胞の膜画分に対する[³HDAMGOと[³H]ブレマゾシンのK_d値（nM）

図中の斜線の丸は対応するμ受容体のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸残基を、斜線はPvu II-1部位を示している。N.D.：低親和性のため、K_d値を求められなかったことを示す。

			
	κ(E297K)	κ(E297K+Y313H)	κ(E297K+Y313H +Y312W)
[³H]DAMGO	N.D.	N.D.	N.D.
[³H]bremazocine	3.9 ± 0.3	8.9 ± 1.5	2.1 ± 0.9
			
	κ(E297K+Y313H +Y312W+S310V)	κ(E297K+Y313H +Y312W+S310V+L309T)	κ(E297K+S310V)
[³H]DAMGO	8.7 ± 1.2	17 ± 1.7	N.D.
[³H]bremazocine	6.3 ± 0.5	5.0 ± 1.7	5.0 ± 0.8
			
	κ(E297K+Y312W)	κ(E297K+Y312W +S310V)	κ(E297K+Y313H +S310V)
[³H]DAMGO	N.D.	N.D.	45 ± 9.5
[³H]bremazocine	2.6 ± 0.4	5.6 ± 0.4	12 ± 0.8

なる親和性の上昇は見られなかった。次に、Pvu II-1部位からPvu II-2部位の間の領域でこれら3アミノ酸残基のすべての置換が$[^3H]$DAMGOは高親和性の結合に必要であるかを検討するために、3つのうち1つあるいは2つのアミノ酸残基を置換した変異型受容体をさらに4つ作製したところ（表1-2）、κ(E297K+S310V)、κ(E297K+Y312W)およびκ(E297K+Y312W+S310V)では$[^3H]$DAMGOの高親和性の結合は見られなかったが、κ(E297K+Y313H+S310V)に対しては、$[^3H]$DAMGOは比較的高親和性の結合を示した（K_d = 45 ± 9.5 nM）。しかしながら、この親和性は変異型受容体κ(E297K+Y313H+Y312W+S310V)に対する親和性に比べると約5.2倍低いものであった。この結果は、κ受容体の297番目のグルタミン酸残基、310番目のセリン残基および313番目のチロシン残基の置換によりDAMGOは一応結合できるが、その親和性は低く、DAMGOの高親和性の結合にはさらに312番目のチロシン残基の変異も必要であることを示すものである。以上の結果より、Pvu II-1部位からPvu II-2部位の間の領域ではκ受容体の297番目のグルタミン酸残基、310番目のセリン残基、312番目のチロシン残基および313番目のチロシン残基と、μ受容体のそれぞれ対応する位置に存在する303番目のリジン残基、316番目のバリン残基、318番目のトリプトファン残基および319番目のヒスチジン残基の違いがDAMGOによるμ／κ受容体間識別に重要であることが示唆される。（図1-7）。

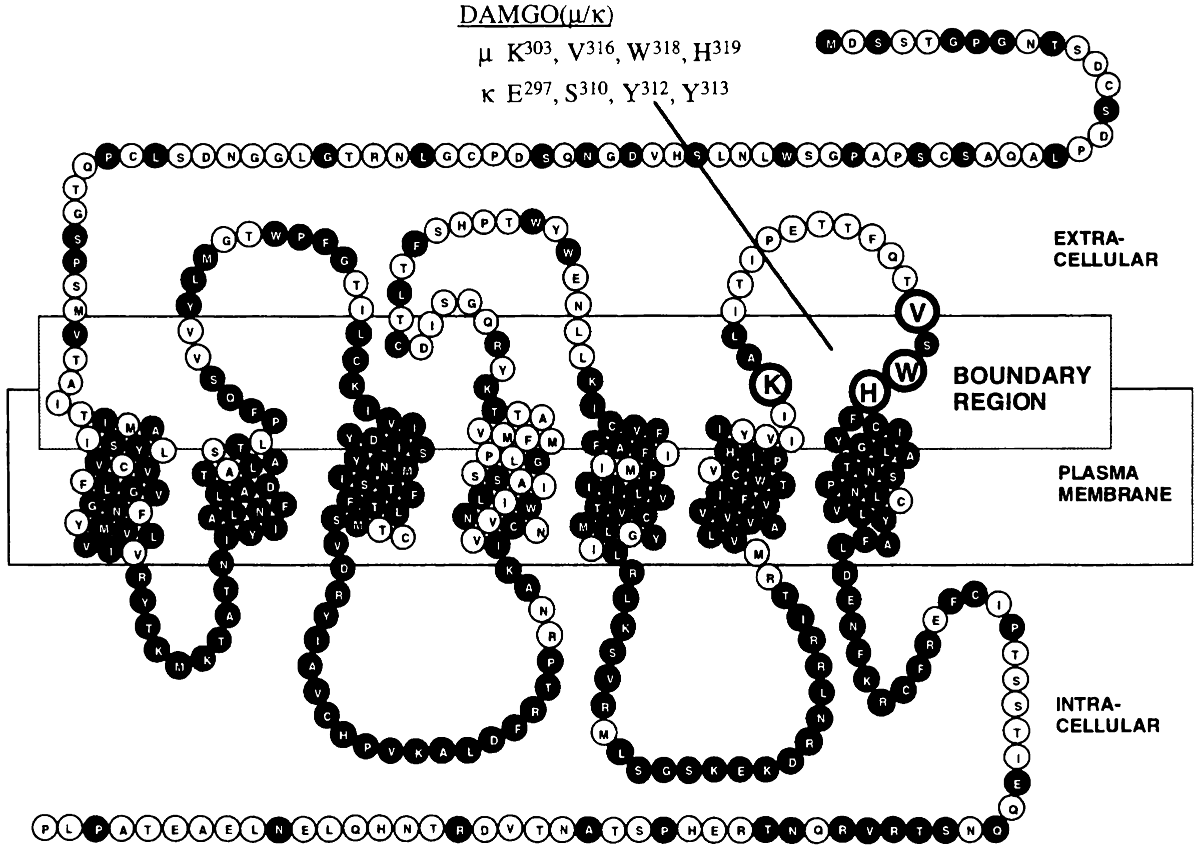


図1-7　μ受容体におけるDAMGOによるμ／κ受容体間識別に関与するアミノ酸残基
黒丸で示したアミノ酸はκ受容体と同一のアミノ酸残基であることを示している。

第三節　変異型受容体κ(E297K+Y313H+Y312W+S310V)に対するDAMGOのアゴニスト活性

野生型のμ受容体、κ受容体および変異型受容体κ(E297K+Y313H+Y312W+S310V)を安定的に発現するCHO細胞を樹立し、これらの細胞に対するDAMGOのアゴニスト活性をフォルスコリン誘発細胞内cAMP蓄積に対する抑制作用を指標に検討した。野生型μ受容体を発現するCHO細胞ではDAMGOはフォルスコリン誘発細胞内cAMP蓄積を用量依存的に抑制した（IC_{50} = 3.0 ± 0.6 nM）が、野生型κ受容体発現するCHO細胞ではDAMGOはフォルスコリン誘発細胞内cAMP蓄積の抑制作用は弱いものであった（IC_{50} > 3000 nM）。それに対して、変異型受容体κ(E297K+Y313H+Y312W+S310V)発現するCHO細胞では、野生型μ受容体の時と同様にDAMGOはフォルスコリン誘発細胞内cAMP蓄積を濃度依存的に抑制し、そのIC_{50}値は36 ± 11 nMであった（図1-8 A）。また、この変異型受容体を発現するCHO細胞においてはκ受容体受容体選択的アゴニストであるU69,593によってもフォルスコリン誘発細胞内cAMP蓄積が濃度依存的に抑制され、そのIC_{50}値は41 ± 10 nMであった（図1-8 B）。

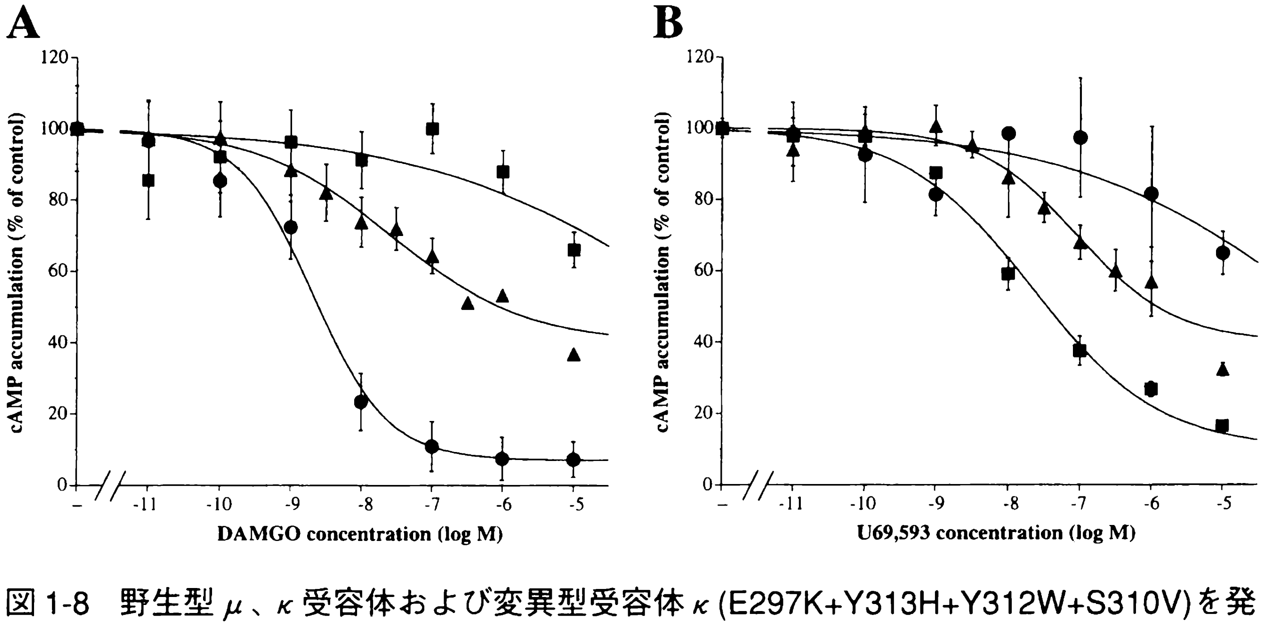


図1-8　野生型μ、κ受容体および変異型受容体κ(E297K+Y313H+Y312W+S310V)を発現するCHO細胞におけるフォルスコリン誘発細胞内cAMP蓄積のDAMGO（A）およびU69,593（B）による抑制

●：μ　■：κ　▲：κ(E297K+Y313H+Y312W+S310V)

第四節　変異型受容体κ(E297K+Y313H+Y312W+S310V)に対する各種オピオイドリガンドの親和性

この変異型受容体に対して、κ受容体よりもμ受容体に高親和性で結合する他のリガンドの親和性もDAMGOと同様に上昇するかどうかを、前節と同じCHO細胞を用いて検討した。その結果を表1-3にまとめて示す。COS-7細胞に発現させた場合と同様に、κ(E297K+Y313H+Y312W+S310V)を安定的に発現するCHO細胞に対して[^{3}H]DAMGOは高親和性の結合を示した（K_d = 8.9 ± 1.5 nM)。また、κ受容体選択的リガンドである[^{3}H]U69,593も同様にこの変異型受容体に対し高親和性の結合を示した（K_d = 7.5 ± 0.7 nM)。Hjorthらの報告に見られるように、異なる2種の標識リガンドを用いて変異型κ受容体に対する競合結合実験を行うと、同じリガンドに対するK_i値が異なって算出される場合がある。そのため、κ(E297K+Y313H+Y312W+S310V)に対するDAMGOの競合結合実験を[^{3}H]DAMGOと[^{3}H]U69,593の両方を用いて行ったが、算出されたK_i値は同程度であった(K_i値はそれぞれ8.1 ± 2.6および16 ± 7 nM)。これは今回用いた全てのリガンドにお

表1-3　野生型μ、κ受容体および変異型κ受容体を発現するCHO細胞の膜画分に対する各種オピオイドリガンドのK_i値（nM)

	μ	κ (E297K+Y313H +Y312W+S310V)		κ
	[^{3}HDAMGO	[^{3}H]DAMGO	[^{3}H]U69,593	[^{3}H]U69,593
	K_d = 1.1 ± 0.2	K_d = 8.9 ± 1.5	K_d = 7.5 ± 0.7	K_d = 1.9 ± 0.1
Peptidic ligands				
DAMGO	0.87 ± 0.01	8.1 ± 2.6	16 ± 7	460 ± 100
Dermorphin	1.5 ± 0.3	>3000	>3000	>3000
CTOP	40 ± 8	>3000	>3000	>3000
Met-enkephalin	3.0 ± 0.3	340 ± 70	490 ± 120	750 ± 220
Nonpeptidic ligands				
Morphine	1.9 ± 0.5	190 ± 40	150 ± 30	130 ± 10
dl-Methadone	13 ± 1	1300 ± 300	>3000	>3000
Fentanyl	1.9 ± 0.6	330 ± 120	350 ± 110	270 ± 50
Naloxone	4.1 ± 0.3	31 ± 8	41 ± 15	19 ± 3

いて共通であったので、以下本文中では、κ(E297K+Y313H+Y312W+S310V)に対する各リガンドの親和性は[^{3}H]DAMGOを用いて算出されたものを示す。

ペプチド性μ受容体選択的アゴニストであるデルモルフィン、ペプチド性μ受容体選択的アンタゴニストであるCTOPおよび内在性オピオイドペプチドであるメチオニンエンケファリンはμ受容体には高親和性の結合を示した（K_i値はそれぞれ1.5 ± 0.3、40 ± 0.3および3.0 ± 0.3 nM）がκ受容体に対する親和性は低かった（K_i値はそれぞれ>3000、>3000および750 ± 220 nM）。κ(E297K+Y313H+Y312W+S310V)に対するこれらのリガンドの親和性は、野生型κ受容体の親和性と同程度であり（K_i値はそれぞれ>3000、>3000および340 ± 70 nM）、DAMGOの場合とは異なり、ほとんど上昇しなかった。モルヒネ、メサドン（methadone）およびフェンタニルなどの麻薬性鎮痛薬や代表的なオピオイドアンタゴニストであるナロキソンはκ受容体（K_iはそれぞれ130 ± 10、>3000、270 ± 50および19 ± 3 nM）よりμ受容体に高親和性に結合した（K_i値はそれぞれ1.9 ± 0.5、13 ± 1、1.9 ± 0.6および4.1 ± 0.3 nM）。これらの非ペプチド性リガンドのκ(E297K+Y313H+Y312W+S310V)に対する親和性も、ペプチド性リガンドの場合と同様に、野生型κ受容体と比較して親和性の上昇は見られなかった（K_i値はそれぞれ190 ± 40、1300 ± 300、330 ± 120および31 ± 8 nM）。

考察

以前の当研究室で行われた研究により、DAMGOによるμ／κ受容体間識別には第3細胞外ループ付近の受容体領域が重要であることが報告されている[14]。本研究では、さらに詳細に、μ／κキメラ受容体を用いた結合実験を行い、DAMGOによるμ／κ受容体間識別に重要な受容体領域は第3細胞内ループのBan II部位と第3細胞外ループのPvu II-1部位の間の領域とPvu II-1部位と第7膜貫通部位のPvu II-2部位の間の領域の両方にそれぞれ別々に存在することを示した。

続いて、Ban II部位とPvu II-1部位の間の領域で重要なアミノ酸残基の同定を行ったところ、第6膜貫通部位と第3細胞外ループの境界領域に存在するκ受容体の297番目のグルタミン酸残基とμ受容体の対応する位置に存在する303番目のリジン残基の違いが重要であることが明らかとなった。このκ受容体の297番目のグルタミン酸残基はκ受容体選択的アンタゴニストであるノルビナルトルフィミンやκ受容体選択的アゴニストであるTRK-820の選択的結合に重要であることが報告されており[16-18]、また、δ受容体の対応する位置に存在する284番目のトリプトファン残基はδ受容体選択的アゴニストであるDPDPEやSNC-80の結合に重要であることも報告されている[19]。グルタミン酸は酸性アミノ酸、リジンは塩基性アミノ酸、トリプトファンは大きな側鎖を持つアミノ酸であるので、この位置に存在するアミノ酸残基の性質の違いがこのような受容体タイプ選択的リガンドの結合性に影響を与えているのかもしれない。この領域の中で、それ以外のアミノ酸残基の違いがDAMGOによる識別に関与している可能性も否定できないが、[^{3}H]DAMGOのκ(Pvu II-1)μ(E297K)への親和性がκ(Ban II)μの親和性と同程度であったことより、その関与はあっても小さいものであろうと考えられる。

次に、Pvu II-1部位とPvu II-2部位の間の領域で重要なアミノ酸残基を検討し、κ受容体の310番目のセリン残基、312番目のチロシン残基および313番目のチロシン残基と、μ受容体の316番目のバリン残基、318番目のトリプトファン残基および319番目のヒスチジン残基の違いが重要であることを見出した。これらのアミノ酸残基のうち、ヒトμ受容体において、300番目のトリプトファン残基（ラットμ受容体の318番目のトリプトファン残基に対応する）がμ受容体へのδ受容体選択的アゴニストであるDPDPEやSNC-80の結合を阻害しているという報告もあり[20]、この位置に存在するアミノ酸残基はDAMGO以外のタイプ選択的オピオイドリガンドの結合選択性にも関与しているものと考えられる。

本研究により、DAMGOによるμ／κ受容体間識別にはκ受容体の297番目のグルタミン酸残基、310番目のセリン残基、312番目のチロシン残基および313番目のチロシン残

基と μ 受容体の303番目のリジン残基、316番目のバリン残基、318番目のトリプトファン残基および319番目のヒスチジン残基4アミノ酸残基の違いが重要であることが示された。この4アミノ酸残基の置換を行った変異型 κ 受容体をCHO細胞に安定的発現させて検討したところ、これらの変異により、DAMGOの親和性が上昇したばかりでなく、DAMGOのアゴニスト活性の効力も野生型 κ 受容体と比較して上昇が見られた。これはこの変異型受容体の機能が保たれているということを示唆するものである。このDAMGOによるcAMP蓄積抑制作用の最大抑制率は約60%とDAMGOの μ 受容体に対する作用よりも小さいものであったが、これは同じ変異型受容体を発現するCHO細胞で κ 受容体選択的アゴニストであるU69,593でも同程度の最大抑制効果しか得られなかったため、変異型受容体を発現するCHO細胞と μ 受容体を発現するCHO細胞の性質の違いのためではないかと考えられる。

一方、本変異型受容体に対するDAMGO以外の μ 受容体に選択的に結合するリガンドの親和性は、野生型 κ 受容体に対する親和性と同程度であり、この4アミノ酸残基の変異による親和性の上昇は見られなかった。これは、Minamiらの報告したDAMGOによる μ ／ δ 受容体間識別の時とは異なっていた[13]。DAMGOによる μ ／ δ 受容体間識別には第2膜貫通部位と第1細胞外ループの境界領域に存在する μ 受容体の127番目のアスパラギン残基と δ 受容体の108番目に存在するリジン残基の違いが重要であり、δ 受容体の108番目に存在するリジン残基をアスパラギン酸に置換した変異型受容体に対して、DAMGOだけでなく、デルモルフィン、CTOP、モルヒネ、メサドンおよびナロキソンの親和性が野生型 δ 受容体への親和性よりも上昇していた。この知見は、DAMGOによる μ ／ κ 受容体間識別と μ ／ δ 受容体間識別は異なる機序で行われており、μ ／ δ 受容体間識別はいくつかの μ 受容体選択的リガンドと同様の機序であるのとは対照的に、μ ／ κ 受容体間識別はDAMGOに特有の機序で行われていることを示唆するものである。

本研究で明らかにされたDAMGOによる μ ／ κ 受容体間識別に関与する4アミノ酸残基はいずれも細胞外ループと膜貫通部位の境界領域に存在するものであった。Minamiらの報告したDAMGOによる μ ／ δ 受容体間識別に関与するアミノ酸残基も第2膜貫通部位と第1細胞外ループとの境界領域に存在するものであった[13]。また、κ 受容体選択的アゴニストであるTRK-820およびアンタゴニストであるノルビナルトルフィミンによる κ ／ μ 受容体間識別は第5膜貫通部位と第3細胞外ループの境界領域に存在する κ 受容体の293番目のグルタミン酸残基と μ 受容体の303番目のリジン残基の違いによって行われていることが報告されている[16-18]。δ 受容体選択的アゴニストであるDPDPEおよびSNC-80の結合には δ 受容体の第3細胞外ループと第6および第7膜貫通部位の境界領域に存在する284番目のトリプトファン残基、296番目のバリン残基、297番目のバリン残

基および300番目のロイシン残基が必要であることが示されている[19、20]。また、オピオイド以外のGタンパク質共役型受容体であるニューロキニン受容体[21]、ソマトスタチン受容体[22]、αアドレナリン受容体[23]およびエンドセリン受容体[24]においても同様に受容体選択リガンドの結合に細胞外ループと膜貫通部位の境界領域にあるアミノ酸残基が重要であることが報告されている。これらの知見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によりGタンパク質共役受容体ファミリーに属する多くの受容体のサブタイプ選択的リガンドの認識が行われるということを示唆するものである（図1-9）。この概念はGタンパク質共役型受容体の新しいサブタイプ選択的リガンドの創製に役立つものであると考えられる。

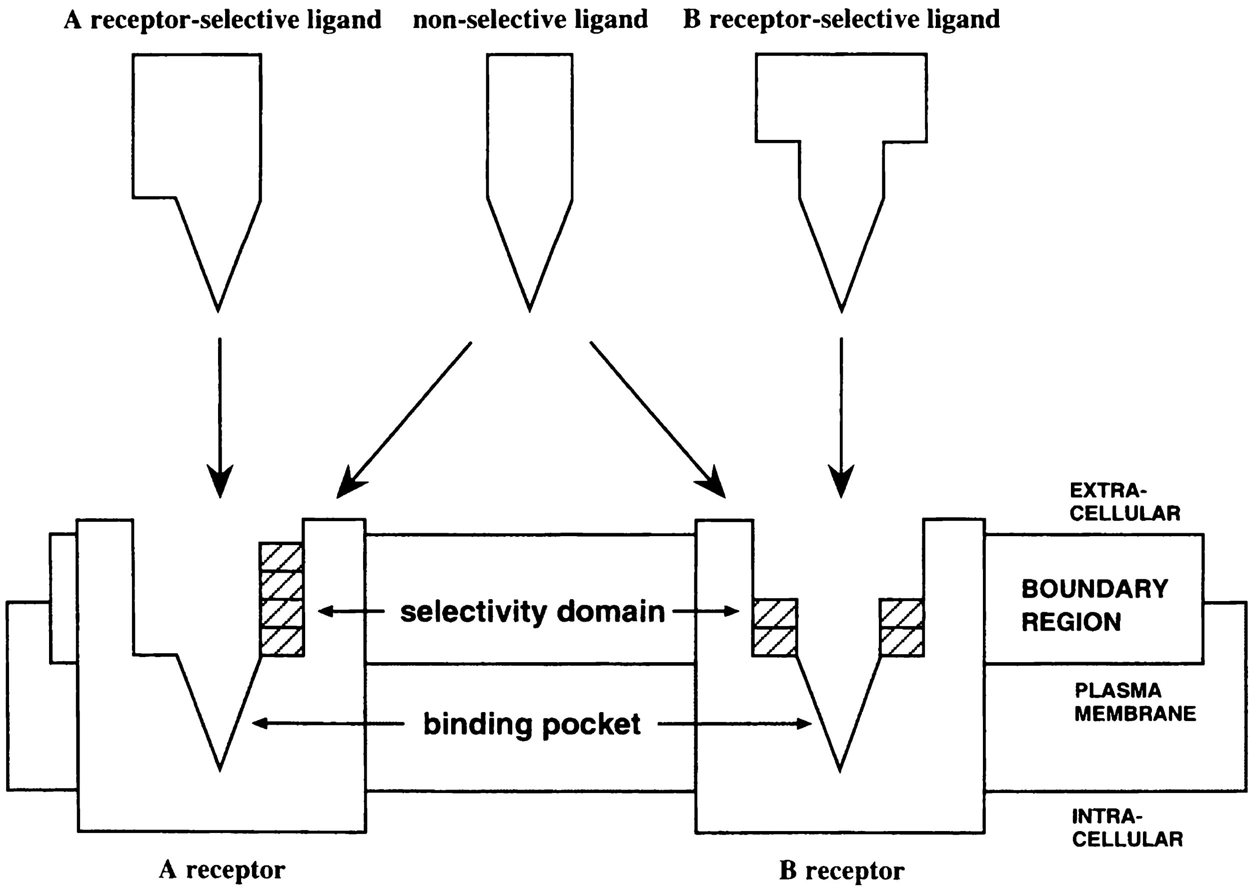


図1-9　Gタンパク質共役型受容体のリガンド識別機構の概念図
斜線の四角はリガンド識別に関与するアミノ酸残基を示しており、これらが細胞外ループと膜貫通部位の境界領域に存在していることを表している。

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与するアミノ酸残基

ノシセプチン受容体は1994年にオピオイド受容体と高い相同性を有しているにも拘わらず（図2-1)、ほとんどのオピオイドリガンドと結合しないオーファン受容体としてクローニングされた[25-28]。その後、1995年にその内在性リガンドとして17アミノ酸残基からなるペプチドが単離され、ノシセプチン（あるいはオルファニンFQ）と名付けられた[29、30]。ノシセプチンはκ受容体に高い親和性を有する内在性オピオイドリガンドであるダイノルフィンA（1-17）と似た構造を持つにも拘わらず（図2-2)、μ、δ、κいずれのオピオイド受容体に対しても高親和性に結合しない。また、in vivoの実験において、ノシセプチンを側脳室内投与することにより、オピオイドアゴニストとは逆に、痛覚過敏が惹起され、さらにオピオイドによる抗侵害受容作用に対して拮抗作用を示すなどの報告がなされている[29-32]。また、ノシセプチンの脊髄くも膜下腔内投与により、高用量では抗侵害受容作用を示し[33]、一方、極めて低用量では痛覚過敏[34、35]あるいは痛覚様行動[36]が惹起されることが報告されている。このように、ノシセプチンの痛覚情報伝達系に対する作用は複雑であり、未だ、一定の見解は得られていない。また、近年作製されたノシセプチン受容体ノックアウトマウスを用いた研究により、ノシセプチン系は痛覚情報伝達以外にも聴覚[37]、学習・記憶[38-40]、モルヒネによる耐性の形成[41]などに関与することが明らかにされている。しかし、ノックアウトマウスを用いた研究では、成長過程においてノシセプチン系の機能が他の系によって代償されている可能性も否定できない。ノシセプチン系が関与する生体機能調節機構を解明するためにはノシセプチン受容体に特異的なアゴニストあるいはアンタゴニストの創製が不可欠であり、その系をターゲットとした新規医薬品の開発につながることも期待できる。

本章ではオピオイド受容体と類似したアミノ酸配列を有するにも拘わらず、ノシセプチン受容体にはほとんどのオピオイド受容体リガンドが高親和性には結合しない原因となっている両受容体の構造上の相違点を分子レベルで明らかにすることにより、ノシセプチン受容体のリガンド設計に有用な知見が得られると考え、オピオイド受容体の中でノシセプチン受容体と最も相同性の高いκ受容体との間のキメラ受容体および変異型ノシセプチン受容体を作製し、それらに対して、非ペプチド性で非選択的なオピオイド受容体リガンドの１つであるブレマゾシンの結合実験を行うことにより、ノシセプチン受

容体に対して、オピオイド受容体リガンドが結合できない原因となっているアミノ酸残基の同定を試みた。

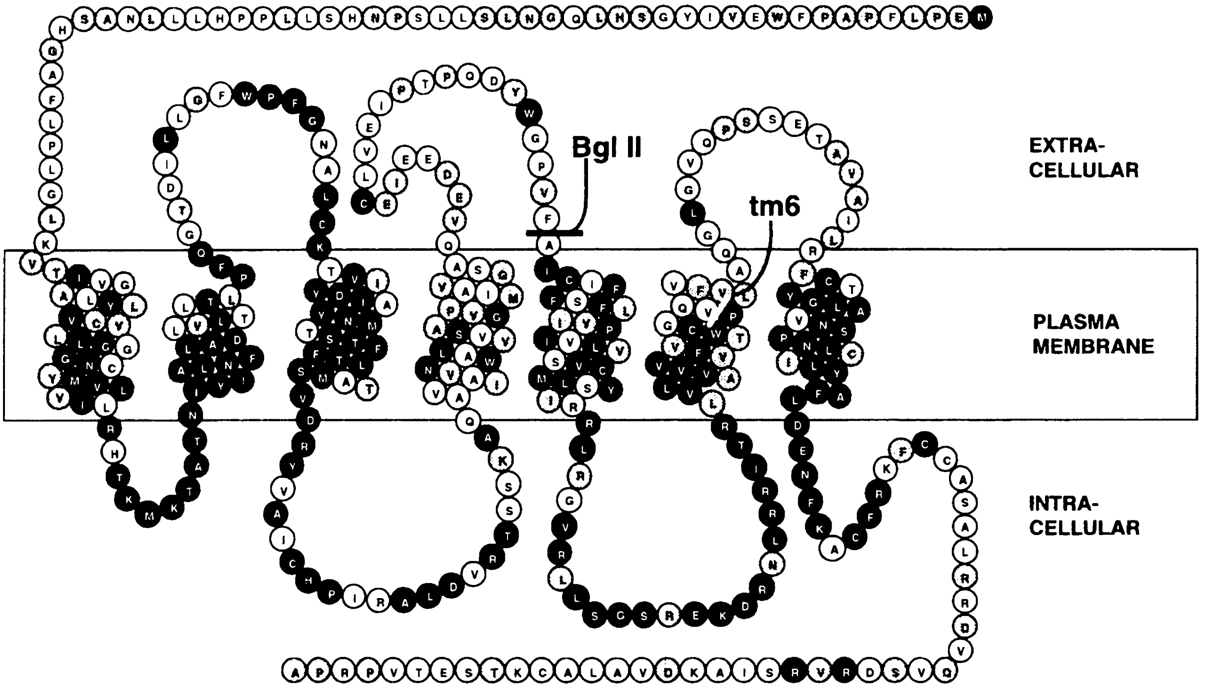


図2-1　ヒトノシセプチン受容体の推定構造

黒で示したアミノ酸はヒトノシセプチン受容体とラット μ、δ、κ オピオイド受容体全てで保存されているアミノ酸残基であることを示している。灰色で示したアミノ酸はノシセプチン受容体と3種のオピオイド受容体のうちの1種あるいは2種のタイプ間で保存されているアミノ酸残基であることを示している。キメラ受容体作製の際のつなぎ目となったBgl II部位とtm6部位を図中に示す。

Nociceptin	**Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln**
Dynorphin A(1-17)	**Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln**

図2-2　ノシセプチンおよびダイノルフィンA（1-17）のアミノ酸配列

両ペプチドで保存されたアミノ酸を下線で示す。

実験方法

1．試薬

[^{3}H]ブレマゾシンは第一章と同じものを用いた。

2．ヒトノシセプチン受容体cDNAのクローニング

ヒトノシセプチン受容体cDNAは、ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60より抽出したtotal RNAを鋳型として、RT-PCR法によりクローニングした。培養細胞に発現させるために、クローニングしたcDNAを発現ベクターpcDNA3にサブクローニングした。

3．キメラおよび変異型受容体cDNAの作製

ノシセプチン受容体／κ受容体キメラ受容体の作製は制限酵素Bgl IIおよびPCR法を用いて行った。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制限酵素Bgl II認識部位（Bgl II部位）および第6膜貫通部位に存在するPCR法によるキメラ受容体のつなぎ目（tm6部位）を図2-1に示す。ノシセプチン受容体にはBgl II部位が存在しないため、点変異導入によりノシセプチン受容体の対応する位置に導入した。点変異導入および作製したcDNAのサブクローニングは第一章と同様の方法で行った。

4．COS-7細胞への受容体cDNAのトランスフェクション

第一章と同様の方法で行った。

5．受容体結合実験

標識リガンドとして、[^{3}H]ブレマゾシンを用いて飽和結合実験を行った。結合実験は第一章と同様の方法で行った。

実験結果

第一節　ノシセプチン受容体／κ受容体キメラ受容体に対するブレマゾシンの結合に重要な受容体領域の同定

ブレマゾシンの野生型κ受容体およびノシセプチン受容体（NociR）に対する親和性を確認するためにCOS-7細胞にκ受容体およびノシセプチン受容体をトランスフェクションし、[^{3}H]ブレマゾシンの結合実験を行った。[^{3}H]ブレマゾシンはκ受容体に対しては高い親和性で結合したが（$K_d = 3.1 \pm 0.4$ nM）、ノシセプチン受容体にはほとんど結合しなかった（図2-3）。このことより、ブレマゾシンがκ受容体には結合するがノシセプチン受容体には高親和性に結合しないことが確認された。

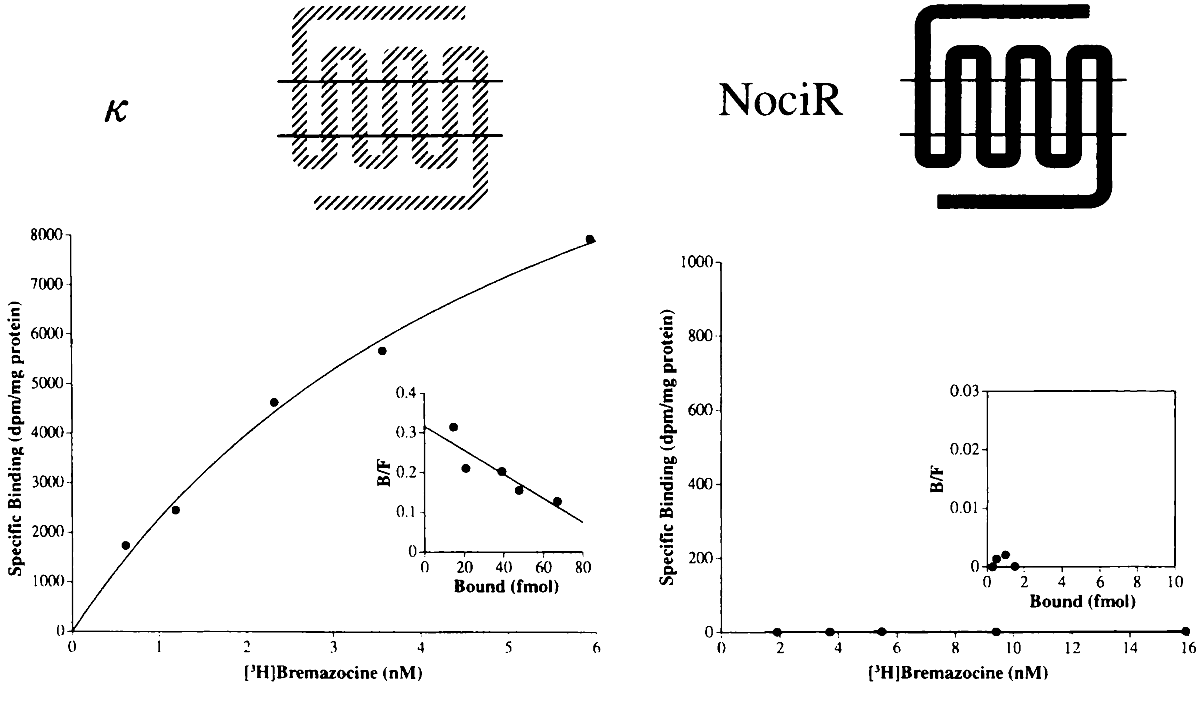


図2-3　野生型κ受容体およびノシセプチン受容体（NociR）を発現するCOS-7細胞の膜画分に対する[^{3}H]ブレマゾシンの飽和結合実験とScatchardプロット

続いて、オピオイド受容体とノシセプチン受容体間の識別に関与する受容体の領域を同定するため、κ受容体とノシセプチン受容体間で種々のキメラ受容体を作製し、ブレマゾシンの親和性を検討した（図2-4）。ノシセプチン受容体の第2細胞外ループと第5膜貫通部位の境界領域に存在するBgl II部位からC末端側をκ受容体の対応する受容体領域に置換したキメラ受容体NKbglを作製したところ、[^{3}H]ブレマゾシンはノシセプチン受容体の場合とは異なり、NKbglに対し高親和性の結合を示した（$K_d = 11 \pm 3$ nM）。さらに、キメラ受容体NKbglの第6膜貫通部位に存在するtm6部位からC末端側をノシセプチン受容体の対応する位置に存在する受容体領域に置換したキメラ受容体NKbglNtm6を作製したところ、特異的結合はみられたものの、このキメラ受容体に対する[^{3}H]ブレマゾシンの親和性は低く、K_d値を求めることはできなかった。以上の結果より、ブレマゾシンの結合に重要な受容体領域がκ受容体のtm6部位よりC末端側に少なくとも1カ所存在することが示唆される。

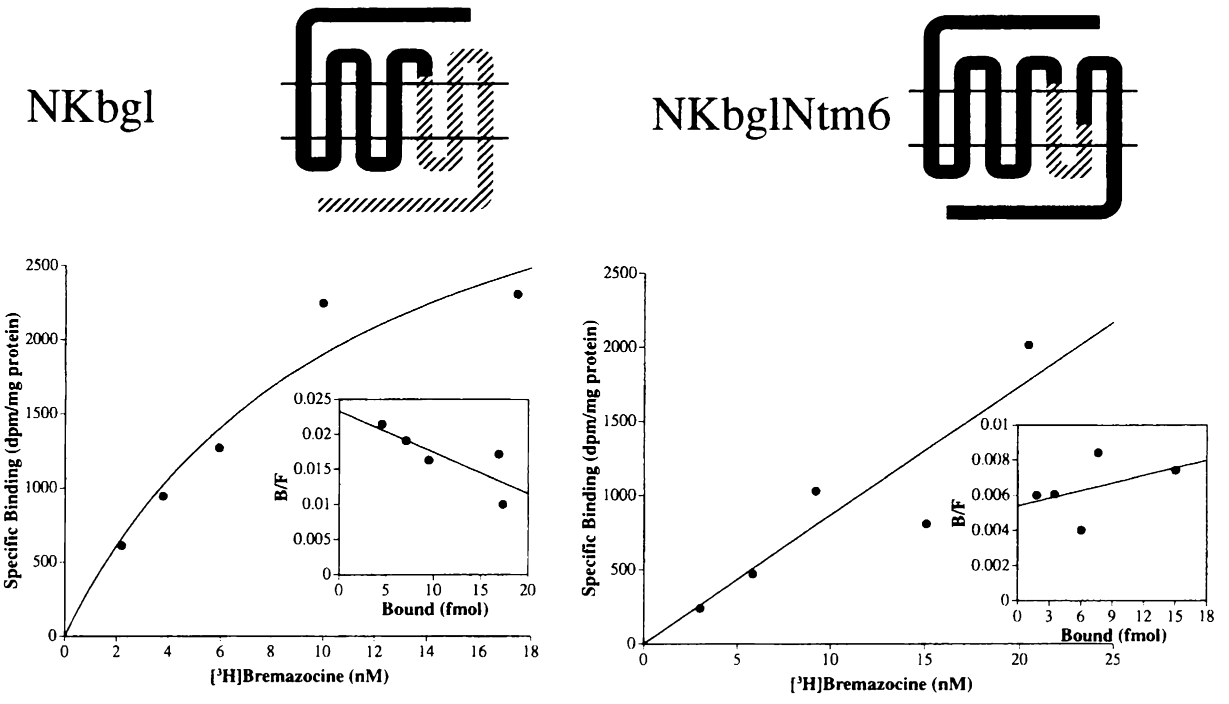


図2-4　キメラ受容体NKbglおよびNKbglNtm6を発現するCOS-7細胞の膜画分に対する[^{3}H]ブレマゾシンの飽和結合実験とScatchardプロット
キメラ受容体モデルでは、κ受容体に由来する部分を斜線、ノシセプチン受容体に由来する部分を黒で示している。

第二節　ブ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の識別に重要なアミノ酸残基の同定

作製した変異型受容体に対する[^{3}H]ブレマゾシンのK_d値を表2-1にまとめて示した。ブレマゾシンは非選択的オピオイドリガンドであるので、ブレマゾシンによるκ受容体とノシセプチン受容体間の認識は、μ、δ、κ、3種類のオピオイド受容体タイプ間で共通して存在し、かつノシセプチン受容体では異なっているようなアミノ酸残基が重要ではないかと考えた。tm6部位よりC末端側の受容体領域に存在するアミノ酸残基のうち、このような条件を満たすアミノ酸残基は7つしかなく、しかも、そのうち3つはリガンド結合には直接関与しないと考えられるC末端細胞内領域に存在する（図2-5）。そこで残りの4つのうち、第6膜貫通部位に存在するノシセプチン受容体の279番目のバリン残基、280番目のグルタミン残基、281番目のバリン残基のリガンド認識における役割を検討する目的で、キメラ受容体NKbglNtm6において、この3残基をオピオイド受容体の対応する位置に存在するアミノ酸残基であるイソロイシン残基、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NKbglNtm6+VQV(279-281)IHIを作製した。その結果、この変異型受容体に対し、[^{3}H]ブレマゾシンはキメラ受容体NKbglと同程度の高親和性で結合した（$K_d = 29 \pm 3$ nM）。この結果は、tm6部位からC末端側の受容体領域では、ブ

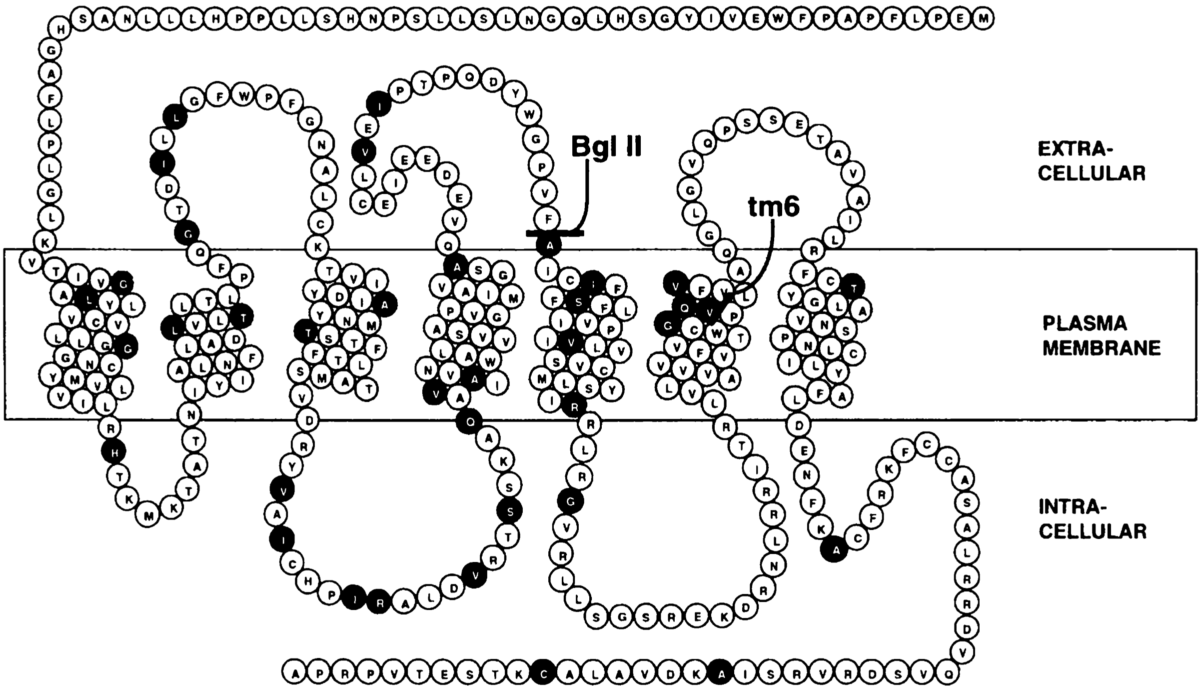
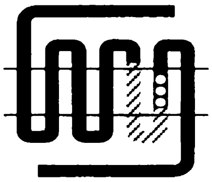
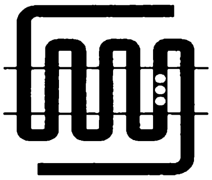
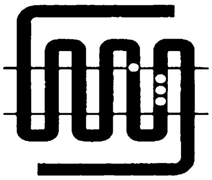
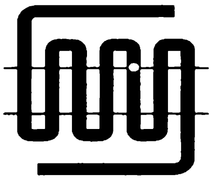
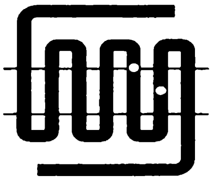
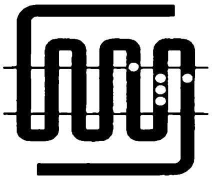


図2-5　ヒトノシセプチン受容体の推定構造
黒で示したアミノ酸はμ、δ、κ受容体全てで保存されているが、ノシセプチン受容体では異なっているアミノ酸残基であることを示している。キメラ受容体作製の際のつなぎ目となったBgl II部位とtm6部位を図中に示す。

表2-1　変異型ノシセプチン受容体を発現するCOS-7細胞の膜画分に対する$[^{3}H]$ブレマゾシンのK_d値（nM）

図中の斜線部分はκ受容体に由来する受容体領域を示す。白丸は対応するκ受容体アミノ酸残基に置換されたアミノ酸残基を示している。

N.D.：低親和性のため、K_d値を求められなかったことを示す。

		K_d (nM)
		$[^{3}H]$Bremazocine
NKbglNtm6 +VQV(279-281)IHI		**29 ± 3**
NVQV(279-281)IHI		**N.D.**
NA216K +VQV(279-281)IHI		**31 ± 14**
NA216K		**N.D.**
NA216K +Q280H		**N.D.**
NA216K +VQV(279-281)IHI +T305I		**23 ± 5**

レマゾシンによる受容体識別にこの３残基の違いが関与することを示すものである。しかしながら、野生型ノシセプチン受容体において、この３残基のみをオピオイド受容体型アミノ酸残基に置換した変異型受容体NVQV(279-281)IHIに対しては、[^{3}H]ブレマゾシンの親和性は低く、K_d 値を求めることはできなかった。この結果より、ブレマゾシンの高親和性の結合に重要なアミノ酸残基は、第６膜貫通部位に存在する３残基だけではなく、Bgl II 部位と tm6 部位の間の領域にも存在することが明らかとなった。

Bgl II部位とtm6部位の間の領域にはオピオイド受容体タイプ間で保存されており、なおかつノシセプチン受容体では異なっているアミノ酸残基は７残基存在するが（図2-5）、そのうち最も細胞膜外表面近くに存在する、第２細胞外ループと第５膜貫通部位との境界領域のノシセプチン受容体の216番目のアラニン残基にまず注目し、279-281番目のバリン残基、グルタミン残基、バリン残基のイソロイシン残基、ヒスチジン残基、イソロイシン残基への置換に加えて、この216番目のアラニン残基もオピオイド受容体の対応する位置に存在するリジン残基に置換した変異型受容体NA216K+VQV(279-281)IHIを作製した。この変異型受容体に対し、[^{3}H]ブレマゾシンは変異型受容体NKbglNtm6+VQV(279-281)IHI とほぼ同程度の高親和性で結合を示した（$K_d = 31 \pm 14$ nM）。また、ノシセプチン受容体の216番目のアラニン残基のみをリジン残基に置換した変異型受容体NA216Kに対しては、[^{3}H]ブレマゾシンの親和性は低いものであった。従って、ブレマゾシンの結合にはこれら２カ所に同時に変異を導入する必要があると考えられる。

オピオイド受容体の第６膜貫通部位のヒスチジン残基は幾つかのオピオイドリガンドの結合に重要であることが報告されており[42、43]、ブレマゾシンの結合も、tm6 部位からＣ末端側の領域ではグルタミン残基のヒスチジン残基への置換で十分であるかもしれない。そこで、ノシセプチン受容体の 216 番目のアラニン残基と 280 番目のグルタミン残基をそれぞれリジン残基、ヒスチジン残基に置換した変異型受容体NA216K+Q280Hを作製した。この変異型受容体に対して、ブレマゾシンの結合は検出できず、tm6 サイトよりＣ末端側の受容体領域では、ノシセプチン受容体の 280 番目のグルタミン残基のヒスチジン残基への置換では不十分であり、279-281 番目のバリン残基、グルタミン残基、バリン残基 のイソロイシン残基、ヒスチジン残基、イソロイシン残基 への置換がブレマゾシンの結合には重要であることが確認された。また、4 アミノ酸残基の変異に加えて、ノシセプチン受容体の第７膜貫通部位に存在する 305 番目のアミノ酸残基トレオニン残基をオピオイド受容体の全てのタイプで保存されているアミノ酸残基であるイソロイシン残基に置換した変異型受容体 NA216K+VQV(279-281)IHI+T305I を作製したところ、ブレマゾシンはこの変異型受容体 に対して高親和性の結合を示した（$K_d = 23 \pm 5$ nM）が、その親和性は NA216K+VQV(279-281)IHI と同程度であった。このことより、ブレマゾシ

ンの結合におけるノシセプチン受容体の305番目のトレオニン残基とオピオイド受容体の対応する位置に存在するイソロイシン残基の相違は寄与が小さいことが確認された。

以上の結果より、ブ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存在する216番目のアラニン残基、第6膜貫通部位に存在する279-281番目のバリン残基、グルタミン残基、バリン残基と、オピオイド受容体のそれぞれの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、イソロイシン残基の違いが関与しているということが示唆される（図2-6）。

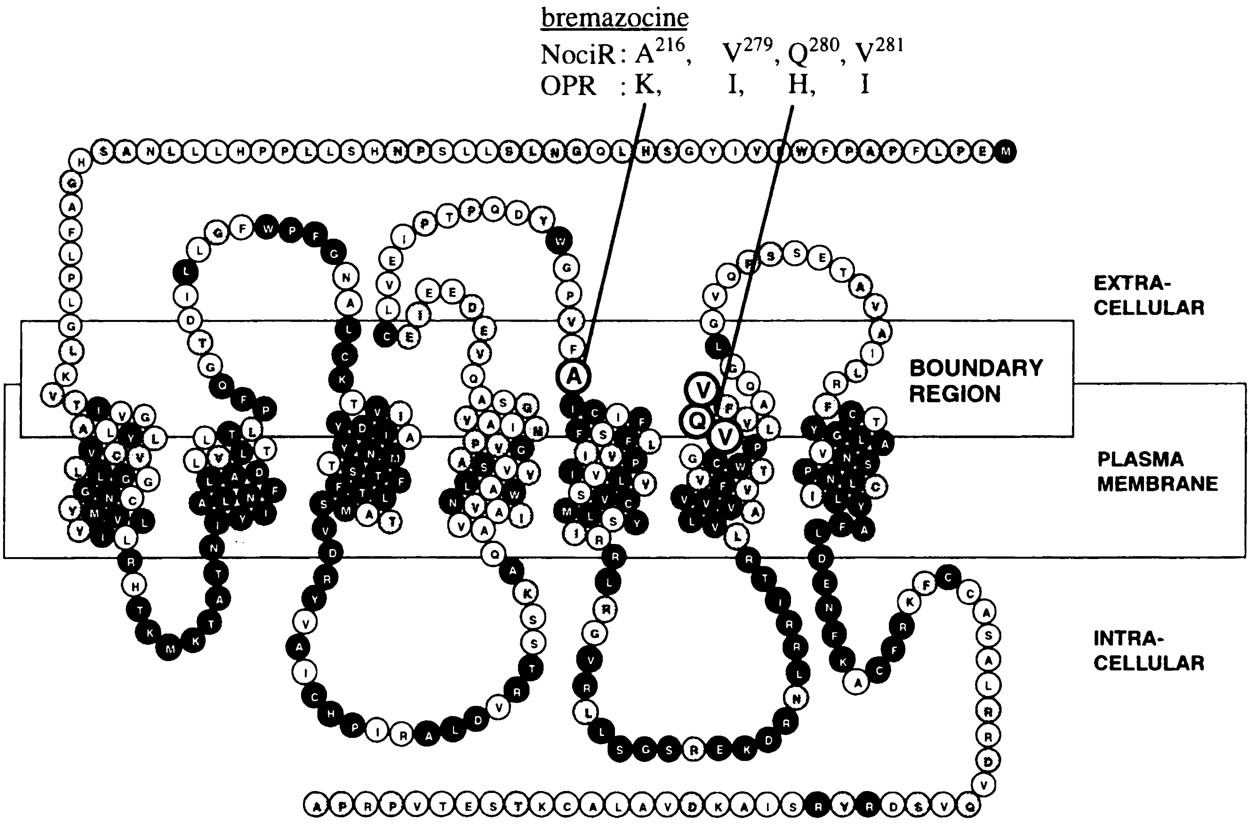


図2-6　ブレマゾシンによるオピオイド受容体／ノシセプチン受容体間識別に関与するアミノ酸残基

黒で示したアミノ酸はノシセプチン受容体とラットμ、δ、κオピオイド受容体全てで保存されているアミノ酸残基であることを示している。灰色で示したアミノ酸はノシセプチン受容体と3種のオピオイド受容体のうちの1種あるいは2種のタイプ間で保存されているアミノ酸残基であることを示している。

考察

まず、ノシセプチン受容体とκ受容体間でキメラ受容体を作製し、ブレマゾシンの結合実験を行った結果、第6膜貫通部位中程に存在するtm6部位よりC末端側の受容体領域にブ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重要な部位が少なくとも1カ所存在することを示した。このtm6部位よりC末端側において重要な役割を果たすアミノ酸残基を同定するため、キメラ受容体に変異を導入した受容体を用い、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であるバリン残基、グルタミン残基、バリン残基とオピオイド受容体の対応する位置に存在するイソロイシン残基、ヒスチジン残基、イソロイシン残基の3残基の違いが重要な役割を果たすことを見出した。また、変異型受容体NKbglNtm6+VQV(279-281)IHIにブレマゾシンが高親和性の結合を示す（$K_d = 29 \pm 3$ nM）のに対し、変異型受容体NVQV(279-281)IHIには結合を示さなかったことより、Bgl II部位とtm6の間にもブレマゾシンによる識別に重要な受容体領域が存在し、第一章と同様にリガンド識別に異なる2カ所の受容体領域にまたがって重要なアミノ酸残基が存在することが示唆された。そこで、さらなる変異型受容体を用いた検討を行い、Bgl II部位とtm6の間の受容体領域では第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オピオイド受容体の対応する位置に存在するリジン残基の違いが、重要であることを示し、第6膜貫通部位に存在する3残基と合わせて僅か4残基という数少ないアミノ酸残基の違いによりブ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がなされているということを見出した。ノシセプチン受容体において、この4残基をオピオイド受容体型のアミノ酸残基に置換した変異型受容体NA216K+VQV(279-281)IHIに対するブレマゾシンの親和性（$K_d = 31 \pm 14$ nM）はブレマゾシンのκ受容体に対する親和性（$K_d = 3.1 \pm 0.4$ nM）より10倍程度低いものであるため、これ以外のアミノ酸残基もブレマゾシンの高親和性の結合に関与しているかもしれないが、その寄与はこの4アミノ酸残基と比べると小さいのではないかと考えられる。

本研究結果はMengらの報告[44]と一部共通する結果となっている。Mengらはラットノシセプチン受容体において、ヒトノシセプチン受容体を用いた本研究結果の4アミノ酸残基と対応する位置に存在する、213番目のアラニン残基あるいは276-278番目のバリン残基、グルタミン残基、バリン残基をそれぞれリジン残基あるいはイソロイシン残基、ヒスチジン残基、イソロイシン残基に置換することにより、ダイノルフィンAの親和性が増大すると報告している。さらに、Mengらは第7膜貫通部位に存在する302番目のトレオニン残基のイソロイシン残基への置換により、ダイノルフィンAの親和性のさらなる

上昇が見られるとしている。しかし、本研究において4アミノ酸残基の変異に加えて、ヒトノシセプチン受容体の対応する残基である305番目のトレオニン残基のイソロイシン残基への置換を行ったが、ブレマゾシンの親和性の著明な上昇は見られず、ブレマゾシンの結合にはこのアミノ酸残基の違いは重要ではないことが示唆される。Mengらはその後の報告[45]で、ラットノシセプチン受容体の213番目のアラニン残基のリジン残基への置換のみでブレマゾシンの親和性が著しく上昇すると報告している。ところが、本研究結果ではNA216Kに対してブレマゾシンは高親和性の結合を示さなかった。この相違の明確な理由は不明であるが、ヒトとラットという用いたノシセプチン受容体の種間差によるものかもしれない。Mengらはさらに、δオピオイド受容体において、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214番目のリジン残基をアラニン残基に、第6膜貫通部位に存在する277-279番目のイソロイシン残基、ヒスチジン残基、イソロイシン残基をバリン残基、グルタミン残基、バリン残基に変異させることにより、リガンドの親和性は変化させないが、ブレマゾシンを含めた各リガンドのアゴニストおよびアンタゴニスト活性を増強あるいは減弱させることを報告している[46]。この知見はこれらのアミノ酸残基が、オピオイド受容体においてリガンドによる受容体の活性化プロセスに重要な働きをしていることを示唆するものである。

また、変異型ノシセプチン受容体の報告はMollereauらのグループからも出されている[47]。Mollereauらはヒトノシセプチン受容体の280番目のグルタミン残基のみをヒスチジン残基に置換することによって、ロフェンタニル、フェンタニル、ノルビナルトルフィミンといった非ペプチド性オピオイドリガンドの親和性が上昇すると報告している。しかし、本研究ではtm6部位からC末端側の領域において同様に280番目のグルタミン残基のみをヒスチジン残基に置換した変異型受容体NA216K+Q280Hに対してブレマゾシンは高親和性の結合を示さなかった。よって、ブレマゾシンの結合には、tm6部位からC末端側の領域においては280番目のグルタミン残基のみのヒスチジン残基への置換では不十分であり、その両側もイソロイシン残基に置換することが必要であることが示唆される。

本研究で明らかとなったブ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重要な4つのアミノ酸残基は、第一章でのDAMGOによるμ／κ受容体間識別に関与するアミノ酸残基と同様にいずれも細胞外ループと膜貫通部位の境界領域に存在していた(図2-6)。最近、コンピューターによるノシセプチンとノシセプチン受容体の結合の分子モデリングが行われた[48]。その結果、ノシセプチンのN末端の4アミノ酸残基は、オピオイド受容体へのペプチドリガンドの結合と同様に、ノシセプチン受容体の膜貫通部位で形成される疎水性のbinding pocketと結合しており、さらに、ノシセプチンの8から13番目までの塩基性アミノ酸を多く含む部分は、酸性アミノ酸残基が数多く存

在するノシセプチン受容体の第2細胞外ループと結合しているというモデルが得られた。このモデリングにより、ノシセプチン受容体でもオピオイド受容体と同様な疎水性のbinding pocketが存在していることが示唆された。本研究結果と併せて考えると、受容体間識別に関与している細胞外ループと膜貫通部位の境界領域のアミノ酸残基の変異を行ったことにより、ブレマゾシンがオピオイド受容体と類似したノシセプチン受容体のbinding pocketに結合可能になったのではないかと考えられる。これは、多くのGタンパク質共役受容体ファミリーに属する受容体のサブタイプ選択的リガンドの認識が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により行われているという第一章で述べた概念（図1-9）と一致するものである。本研究結果のようなオピオイド受容体とノシセプチン受容体間のリガンド識別機構に関する分子レベルでの研究成果はノシセプチン受容体に対する非ペプチド性リガンド創製に有用な知見となりうると考えられ、これを基に創製されたリガンドによりノシセプチン系の生体内における機能が詳細に解明されることが期待される。

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特異的に結合するアゴニストあるいはアンタゴニストを創製するには、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評価する実験系が必要である。そこで、本章では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細胞株を樹立し、アデニル酸シクラーゼ活性化薬であるフォルスコリンの刺激による細胞内cAMP蓄積に対する抑制効果を指標として、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評価することができる実験系を確立した。まず、モルモット回腸やマウス輸精管などの末梢組織においてノシセプチン受容体に対する選択的アンタゴニストであると報告されたノシセプチン誘導体、$[Phe^{1}\psi(CH_2\text{-}NH)Gly^{2}]$ノシセプチン(1-13)$NH_2$（$[F/G]NC(1\text{-}13)NH_2$）[49、50]のアゴニストおよびアンタゴニスト活性を検討した。さらに、非ペプチド性オピオイドリガンドの中にもノシセプチン受容体に対しアゴニストあるいはアンタゴニスト活性を示すものがあるのではないかと考え、ノシセプチン受容体に特異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シード化合物となりうるリガンドを探索する目的で、本実験系

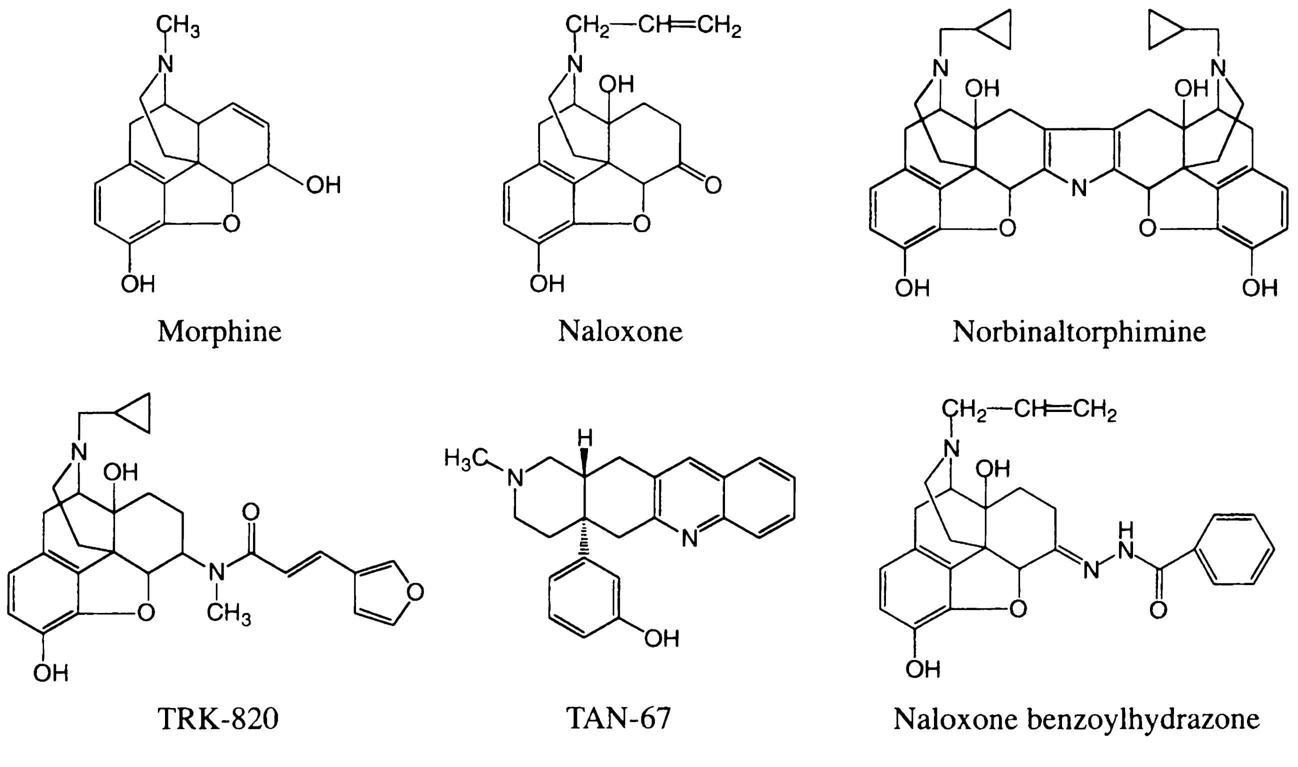


図3-1　各種非ペプチド性オピオイドリガンドの構造

を用いて、従来から用いられている代表的なオピオイドアゴニストであるモルヒネおよびアンタゴニストであるナロキソンに加え、代表的な非ペプチド性κオピオイド受容体選択的アンタゴニストであるノルビナルトルフィミン[51]、ノルビナルトルフィミンから最近合成された非ペプチド性κオピオイド受容体選択的アゴニストであるTRK-820[52]、非ペプチド性δオピオイド受容体選択的アゴニストであるTAN-67[53]の（+）体および（−）体およびκ_3受容体アゴニストと考えられているナロキソンベンゾイルヒドラゾン(naloxone benzoylhydrazone)[54]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（図3-1)。

実験方法

1．試薬

モルヒネ、ナロキソンは第一章と同じものを用いた。ノシセプチン（Peninsula Laboratories, Bermont, USA)、[^{3}H]ノシセプチン（Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)を購入した。ノルビナルトルフィミン、TAN-67の（+）体および（−）体、TRK-820、ナロキソンベンゾイルヒドラゾンは 長瀬　博 博士（東レ、鎌倉）から供与していただいた。

2．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細胞の樹立

第二章で得たヒトノシセプチン受容体cDNAの断片を発現ベクターpcDNA3にサブクローニングし、第一章と同様の方法でCHO細胞にトランスフェクションした。フォルスコリンにより誘発される細胞内cAMP蓄積に対するノシセプチンの抑制効果を指標としてスクリーニングを行い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（CHO/NociR）を樹立した。

3．アゴニストおよびアンタゴニスト活性の検討

アゴニストおよびアンタゴニスト活性はCHO/NociRにおける10 μMフォルスコリンにより誘発される細胞内cAMP蓄積に対する効果を指標として検討し、cAMPの定量は第一章と同様の方法で行った。アゴニスト活性の検討は、種々の濃度のリガンドを単独で加えた時の細胞内cAMP蓄積に対する抑制効果を指標として検討した。アンタゴニスト活性の検討は種々の濃度のリガンドを最大抑制に近い作用を示す10 nMノシセプチンと同時処置し、ノシセプチンによる細胞内cAMP蓄積抑制効果に対する拮抗作用を指標として検討した。ナロキソンベンゾイルヒドラゾンは水に対する溶解性が低いため、0.05 N酢

酸と20%DMSOを含む溶液に溶解させ各濃度に段階希釈した後に、HBSと混合した。最終的に0.0025 N酢酸と1%DMSOが含まれたHBSをvehicleとした。

4．受容体結合実験

第一章と同様の方法で0.5 nM[^{3}H]ノシセプチンを標識リガンドとして用いて行ったが、[^{3}H]ノシセプチンの吸着を防ぐためにTris緩衝液に0.1%のウシ血清アルブミンを加えた。また、濾過に用いたWhatmam GF/Cフィルターは0.3%ポリエチレンイミンに浸したものを用いた。ナロキソンベンゾイルヒドラゾンは0.05 N酢酸と20%DMSOを含む溶液に溶解させ、各濃度に段階希釈した後に、Tris緩衝液と混合した。最終的に0.005 N酢酸、2%DMSOおよび0.1%ウシ血清アルブミンが含まれたTris緩衝液をvehicleとした。

実験結果

第一節　CHO/NociRの樹立とノシセプチン誘導体[F/G]NC(1-13)NH_2のアゴニストおよびアンタゴニスト活性

ヒトノシセプチン受容体cDNAを発現ベクターpcDNA3にサブクローニングしたプラスミドをリポフェクトアミン法によりCHO細胞にトランスフェクションすることにより、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細胞株であるCHO/NociRを樹立した。このCHO/NociRに対して、10 μMフォルスコリンにより誘発される細胞内cAMP蓄積はノシセプチンにより濃度依存的に抑制され、そのIC_{50}値は0.18 ± 0.04 nM、最大抑制率は77 ± 3%であった（図3-2A）。

次に、CHO/NociRにおいて、ノシセプチン誘導体である[F/G]NC(1-13)NH_2のアゴニスト活性を検討した。[F/G]NC(1-13)NH_2はフォルスコリン誘発細胞内cAMP蓄積を濃度依存的に抑制した（IC_{50} = 15 ± 5 nM）が、その最大抑制率は43 ± 2%とノシセプチンの最大抑制率と比較して有意に小さいものであった（図3-2A）。続いて、[F/G]NC(1-13)NH_2のノシセプチン受容体に対するアンタゴニスト活性を検討した。その結果、10 nMノシセプチンによるフォルスコリン誘発細胞内cAMP蓄積の抑制作用は1 μM [F/G]NC(1-13)NH_2の同時処置により有意に拮抗されたが、さらに高濃度である10 μMの同時処置では有意な拮抗作用は見られなかった（図3-2B）。

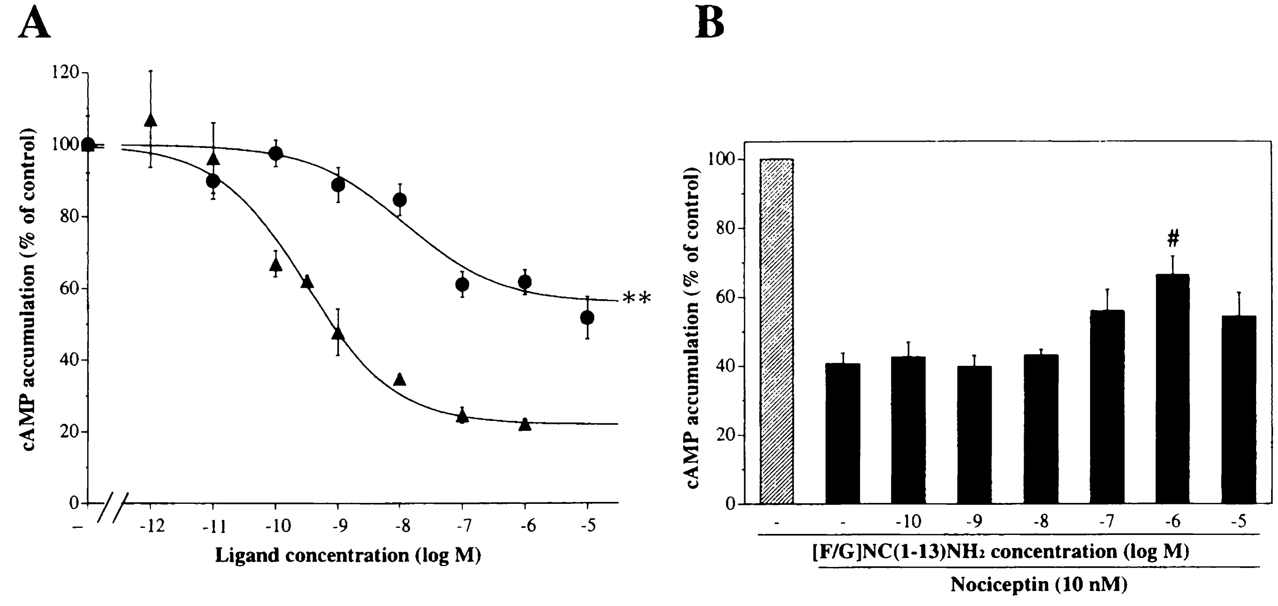


図3-2　CHO/NociRにおけるフォルスコリン誘発細胞内cAMP蓄積に対するノシセプチンおよび[F/G]NC(1-13)NH_2の効果（A）および10 nMノシセプチンによる細胞内cAMP蓄積抑制効果に対する[F/G]NC(1-13)NH_3の拮抗作用（B）

▲：ノシセプチン　●：[F/G]NC(1-13)NH_2

** $P < 0.01$ vs nociceptin (Unpaired student's-t test)

# $P < 0.05$ vs forskolin + nociceptin 10 nM (Dunett multiple comparison test)

第二節　各種オピオイドリガンドのCHO/NociRに対するアゴニストおよびアンタゴニスト活性

CHO/NociRにおいて、モルヒネ、ナロキソン、ノルビナルトルフィミン、TRK-820、TAN-67の（＋）体および（－）体およびナロキソンベンゾイルヒドラゾンのアゴニスト活性を検討したところ、いずれのリガンドもフォルスコリン誘発細胞内cAMP蓄積に有意な影響を与えず、その抑制率は100 μMという非常に高いリガンド濃度を用いてもモルヒネ、ノルビナルトルフィミン、TRK-820、（－）TAN-67では30%未満、ナロキソンでは20%未満、（＋）TAN-67およびナロキソンベンゾイルヒドラゾンでは10%未満であり、フォ

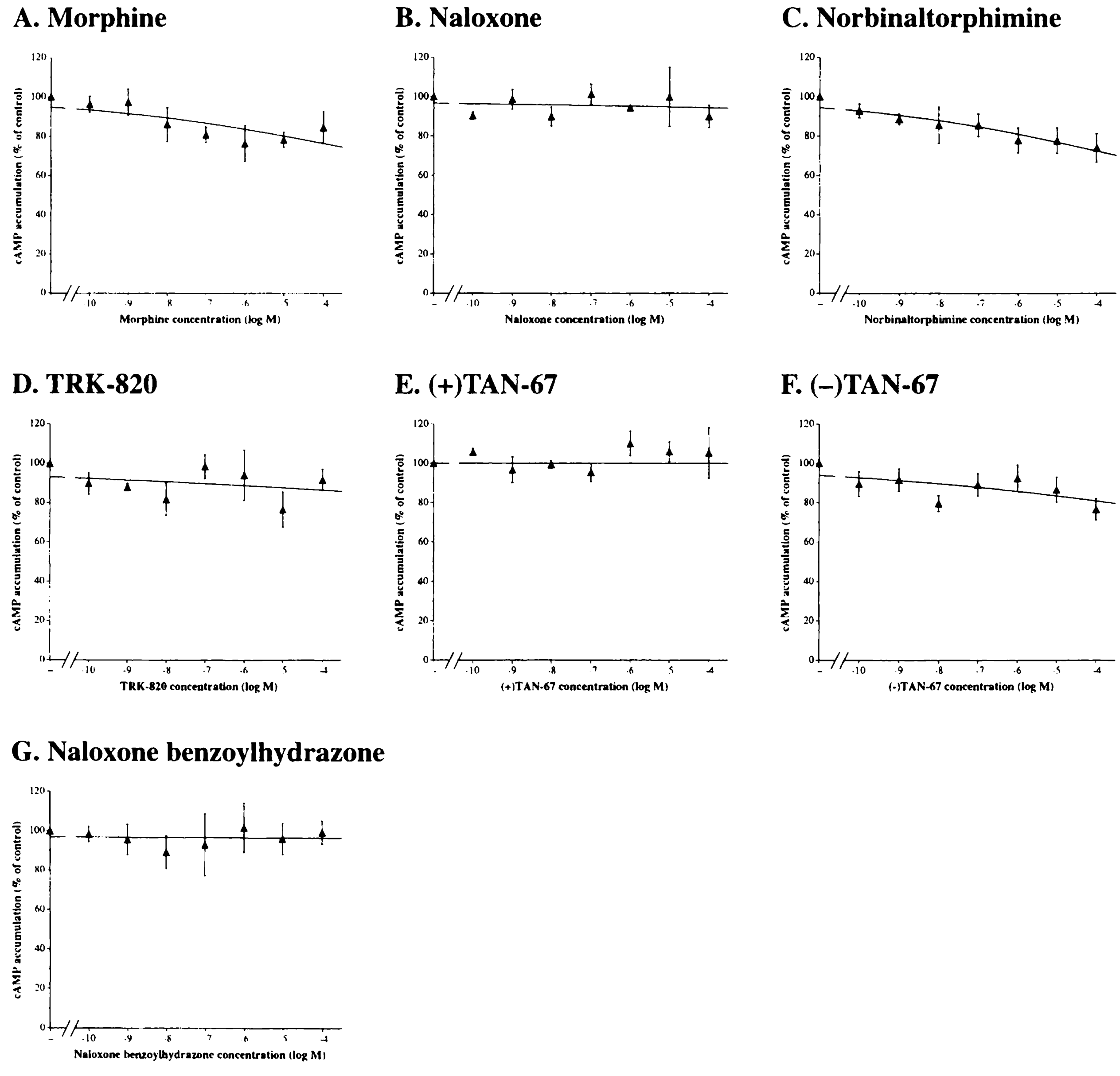


図3-3　CHO/NociRにおけるフォルスコリン誘発細胞内cAMP蓄積に対する各種非ペプチド性オピオイドリガンドの効果

ルスコリン誘発細胞内cAMP蓄積に対する抑制効果を指標としたアゴニスト活性の本評価系において、ほとんどアゴニスト活性を示さなかった。

10 nM ノシセプチンと各オピオイドリガンドの同時処置により、ノシセプチンによるフォルスコリン誘発細胞内cAMP蓄積抑制効果に対する拮抗作用を指標として、各リガンドのアンタゴニスト活性を検討した。モルヒネ、ナロキソン、ノルビナルトルフィミン、(+) TAN-67および (−) TAN-67は今回検討したいずれの濃度 (1 nMから100 μM) においても10 nM ノシセプチンの細胞内cAMP蓄積抑制効果に対して有意な拮抗作用は示さなかった。それに対して、TRK-820は10 μM以上、ナロキソンベンゾイルヒドラゾ

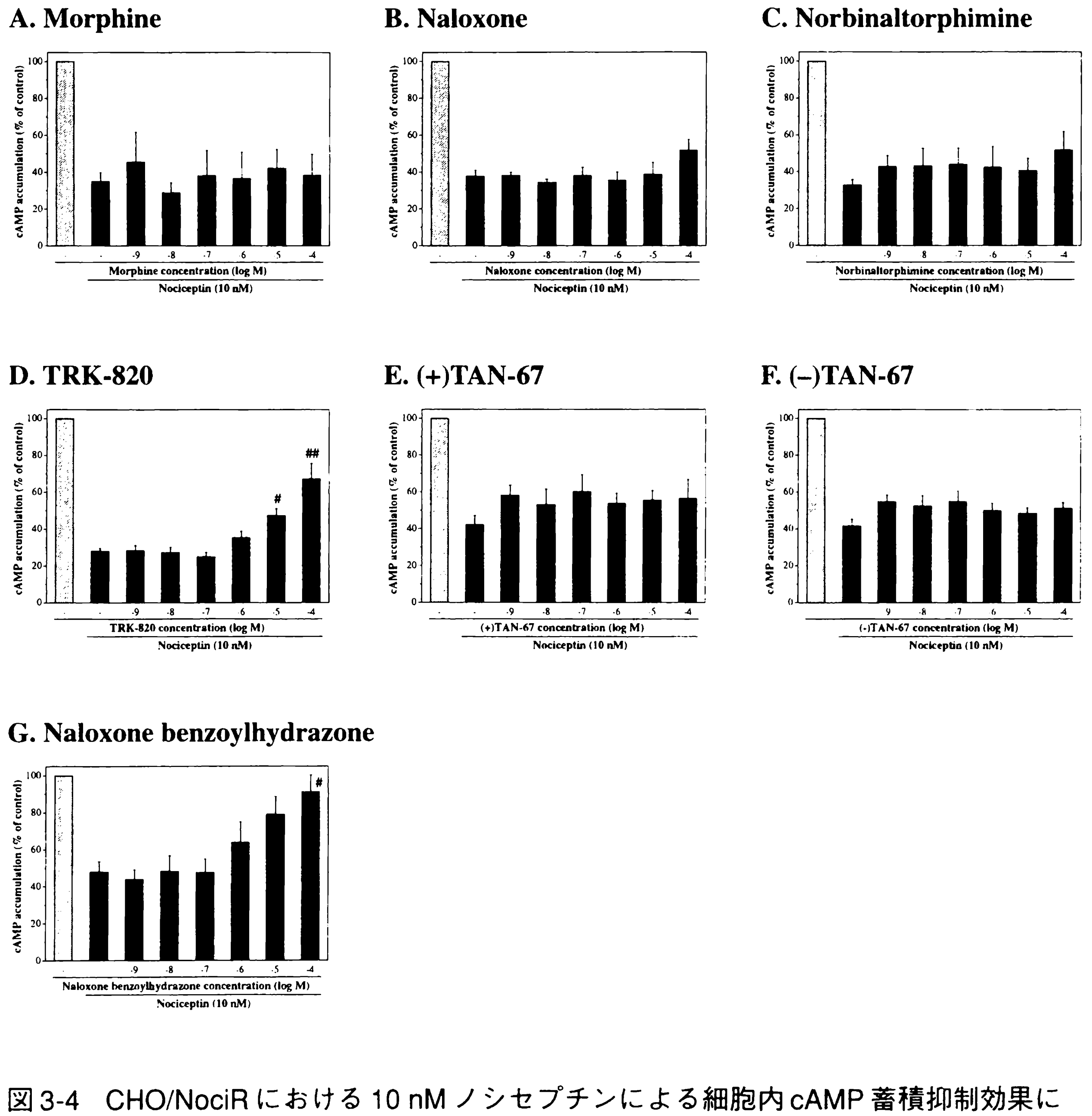


図3-4 CHO/NociRにおける10 nM ノシセプチンによる細胞内cAMP蓄積抑制効果に対する各種非ペプチド性オピオイドリガンドの拮抗作用

# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs forskolin + nociceptin 10 nM (Dunett multiple comparison test)

ンは100 μMで、10 nMノシセプチンによる細胞内cAMP蓄積抑制効果に対して有意な拮抗作用を示し、これらのリガンドは比較的高濃度でノシセプチン受容体に対してアンタゴニスト活性を示した。

第三節　各リガンドのノシセプチン受容体に対する親和性

ノシセプチン、$[F/G]NC(1\text{-}13)NH_2$および検討したオピオイドリガンドのうち、ノシセプチン受容体にアンタゴニスト活性を示したTRK-820およびナロキソンベンゾイルヒドラゾンのノシセプチン受容体に対する親和性をCHO/NociRから調製した膜画分を用いた$[^3H]$ノシセプチンに対する競合結合実験により検討した。まず、CHO/NociRの膜画分に対して$[^3H]$ノシセプチンの飽和結合実験を行ったところ、$[^3H]$ノシセプチンは高親和性の結合を示し、そのK_d値は0.19 ± 0.04 nM、全受容体量（B_{max}）は61 ± 8 fmol/mg proteinであった。競合結合実験において、$[F/G]NC(1\text{-}13)NH_2$およびナロキソンベンゾイルヒドラゾンのK_i値はそれぞれ5.9 ± 1.4および4.2 ± 1.0 nMであり、ノシセプチン（K_i = 0.35 ± 0.09 nM）と比較して約10倍程度低い親和性であった。また、TRK-820（K_i = 380 ± 50 nM）はノシセプチンよりも約1000倍低い親和性でノシセプチン受容体に結合した。

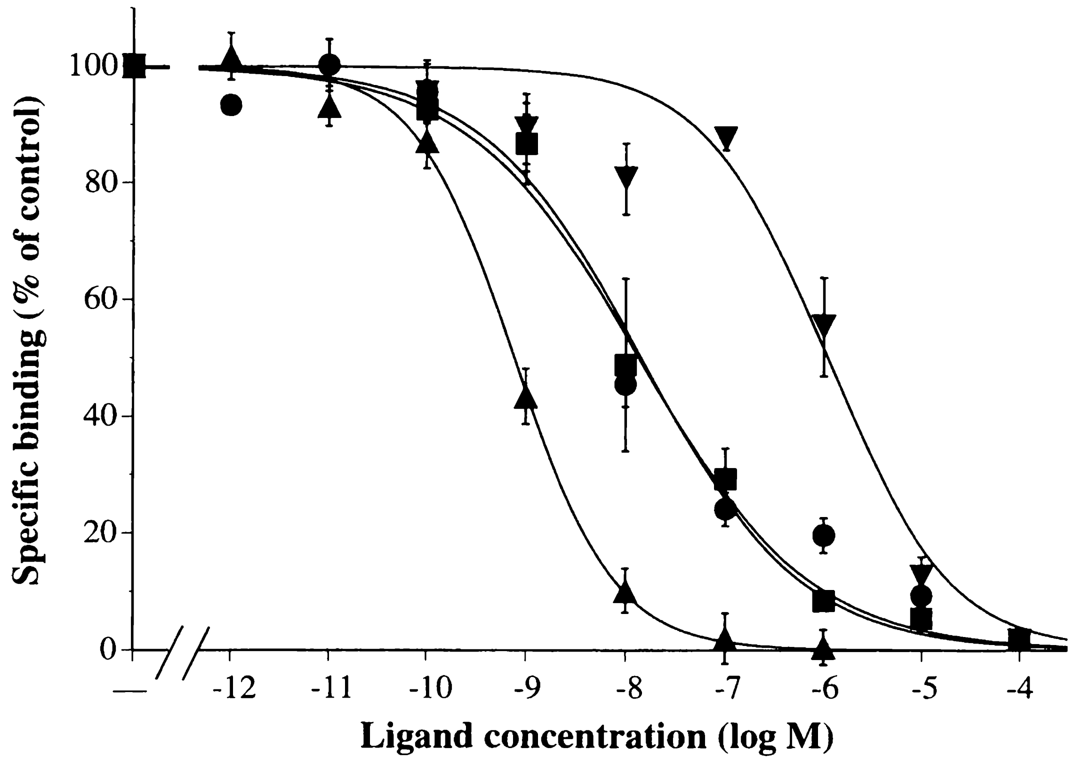


図3-5　CHO/NociRの膜標品に対する0.5 nM$[^3H]$ノシセプチン結合に対する各種リガンドによる阻害

▲：ノシセプチン　●：$[F/G]NC(1\text{-}13)NH_2$　▼：TRK-820

■：ナロキソンベンゾイルヒドラゾン

考察

著者は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細胞株を樹立し、この細胞株において、ノシセプチンは濃度依存的にフォルスコリンによる細胞内cAMP蓄積を抑制した。また、ノシセプチン誘導体[F/G]NC(1-13)NH_2は10 nMノシセプチンによる細胞内cAMP蓄積抑制作用に対して、部分的にではあるが拮抗した。このことから、今回樹立した細胞株CHO/NociRは、ノシセプチン受容体に対する各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することができる実験系として利用可能であることを示した。

[F/G]NC(1-13)NH_2はノシセプチンと同程度に強いアゴニスト活性を示すことが知られているノシセプチン(1-13)NH_2[55]において、ノシセプチンがアミノペプチダーゼによって代謝される主なペプチド結合である1位のフェニルアラニン残基と2位のグリシン残基の結合[56]を保護する目的で合成されたペプチドであるが、モルモット回腸およびマウス輸精管においてノシセプチンの作用に拮抗することが報告され[49、50]、ノシセプチン受容体に対する初めてのアンタゴニストではないかと考えられた。ところが、その後に行われたin vivoおよびin vitroの実験系において、[F/G]NC(1-13)NH_2がノシセプチンと同様の作用を有し、ノシセプチン受容体のアゴニストとして作用するのではないかという報告が相次いで出された[57-60]。本研究で、CHO/NociRにおいて、[F/G]NC(1-13)NH_2はフォルスコリン誘発細胞内cAMP蓄積を濃度依存的に抑制したが、その最大抑制効果はノシセプチンと比較して有意に小さいものであった。これは[F/G]NC(1-13)NH_2がノシセプチン受容体に対して部分アゴニストとして作用していることを示すものである。また、アンタゴニスト活性を検討した実験では、[F/G]NC(1-13)NH_2は1 μMではノシセプチンによる細胞内cAMP蓄積抑制効果に有意に拮抗し、アンタゴニスト活性も有していることを示した。しかしながら、濃度を上げた10 μMではその拮抗作用が消失した。これは[F/G]NC(1-13)NH_2自身のアゴニスト活性によりアンタゴニスト活性がマスクされてしまったからではないかと考えられ、この結果からも、[F/G]NC(1-13)NH_2は本実験系のノシセプチン受容体に対しては部分アゴニストとして作用しているものと考えられる。本研究結果と同様に、[F/G]NC(1-13)NH_2がノシセプチン受容体に対して部分アゴニストとして作用することは青斑核および中脳水道周囲灰白質における電気生理学的研究[61、62]やマウスN1E-115神経芽細胞を用いた研究[63]でも報告されている。

ノシセプチンとアミノ酸配列の相同性の高い内在性ペプチドであるダイノルフィンAは、低い親和性であるものの、ノシセプチン受容体に結合しアゴニスト結合を示すことが報告されている[64]。また、非ペプチド性オピオイドリガンドの中でもロフェンタニル

(lofentanil) がダイノルフィンAと同程度で他のリガンドよりも高い親和性でノシセプチン受容体に結合し、アゴニスト活性を示すという報告もなされている[65]。そこで、他の非ペプチド性オピオイドリガンドの中にもノシセプチン受容体にある程度の親和性で結合し、アゴニストあるいはアンタゴニスト活性を示すものが存在するのではないかと考え、まず代表的な非ペプチド性オピオイドリガンドであるモルヒネおよびナロキソンについて検討を行ったが、これらはCHO/NociRにおいて有意なアゴニストおよびアンタゴニスト活性は示さなかった。

ノシセプチンとダイノルフィンAが構造的に類似していること、ダイノルフィンAがノシセプチン受容体に弱いながらも結合してアゴニスト活性を示すことから、κオピオイド受容体に結合するリガンドがノシセプチン受容体にも結合する可能性が高いのではないかと考え、代表的な非ペプチド性κオピオイド受容体選択的アンタゴニストであるノルビナルトルフィミン[51]とノルビナルトルフィミンから最近合成された非ペプチド性κオピオイド受容体選択的アゴニストであるTRK-820[52]についてノシセプチン受容体におけるアゴニストおよびアンタゴニスト活性を検討した。ノルビナルトルフィミンはアゴニスト活性、アンタゴニスト活性いずれも示さなかったが、TRK-820は10 μM以上という高濃度ながらノシセプチン受容体に対してアンタゴニスト活性を示した。TRK-820はin vivoにおいてκオピオイド受容体アンタゴニストにより選択的に抑制される強い抗侵害受容作用を示すことが報告されており[66]、in vitroの研究でもκオピオイド受容体に高親和性に結合し、強いアゴニスト活性を示すことも明らかとなっている[18]。しかし、TRK-820のin vivoの作用には、嫌悪反応を引き起こさない、モルヒネの耐性形成に影響を与えない、アジュバント関節炎ラットにおいて正常のラットと同程度の効力で抗侵害受容作用を引き起こすなど、従来より知られているκ_1受容体アゴニストであるU50,488HやICI-199441の作用と異なるものが多い[67-69]。このようなin vivoの作用の違いはTRK-820がκ_1受容体だけに作用するのではなく、ノシセプチン受容体にもアンタゴニストとして作用することに由来しているのかもしれない。

TAN-67は非ペプチド性δオピオイド受容体選択的アゴニストとして合成された[53]。最初は（+）体と（−）体のラセミ混合物として用いられ、in vitroの研究ではペプチド性δオピオイド受容体選択的アゴニストであるDPDPEと同様のδオピオイド受容体選択的な強いアゴニスト活性を示す[70]。In vivoの研究では、モルヒネの抗侵害受容作用に対してδオピオイド受容体選択的な増強作用を示すものの、DPDPEとは異なりTAN-67単独での抗侵害受容作用は非常に弱いことが報告されている[71、72]。最近になって、（+）体と（−）体に分離され、（−）TAN-67はδ_1受容体選択的な抗侵害受容作用を示したが、（+）TAN-67は脊髄クモ膜下腔内投与によって逆に痛覚過敏様の作用を引き起こすこと

が報告された[73]。TAN-67のラセミ混合物のin vivoの作用はこれらの作用が打ち消しあったためではないかと考えられる。この（＋）TAN-67による痛覚過敏惹起がノシセプチン受容体を介して起こっている可能性も考えられるため、（＋）TAN-67および（－）TAN-67についても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の検討を行ったが、両者ともノシセプチン受容体に対してアゴニスト活性もアンタゴニスト活性も示さなかった。この結果から、（＋）TAN-67の誘発の痛覚過敏惹起はノシセプチン受容体を介するものではないことが考えられる。（＋）TAN-67の脊髄クモ膜下腔内投与による痛覚過敏惹起はタキキニンNK_1受容体のアンタゴニストによって拮抗されることより、この作用はサブスタンスPの遊離を介して引き起こされるということが報告された[74]が、どのような機序でその遊離が起こっているかは未だ明らかではない。

ナロキソンベンゾイルヒドラゾンはオピオイド受容体アンタゴニストであるナロキソンの誘導体であり、in vivoおいて、それ単独の投与により抗侵害受容作用を示すが、オピオイドアゴニストによる抗侵害受容作用に対しては拮抗作用を示すという性質を持つ[54、75]。ナロキソンベンゾイルヒドラゾン単独による抗侵害受容作用はμ、δあるいはκ_1受容体のアンタゴニストにより阻害されないため、これはκ_3受容体と薬理学的に分類される受容体に作用しているのではないかと考えられてきた[54]。最近、このκ_3受容体とノシセプチン受容体が同一のものではないかという考えもなされてきており[76]、ナロキソンベンゾイルヒドラゾンがノシセプチン受容体に作用して抗侵害受容作用を示している可能性も考えられるため、本研究で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の検討を行った。その結果、ナロキソンベンゾイルヒドラゾンは100 µMという高濃度においてではあるがノシセプチン受容体にアンタゴニスト活性を示した。本研究結果と同様に、in vivoやin vitroにおいて、ナロキソンベンゾイルヒドラゾンがノシセプチンの作用に拮抗するという報告もなされており[40、77、78]、さらに、ノシセプチン受容体ノックアウトマウスにおいてナロキソンベンゾイルヒドラゾンの抗侵害受容作用が消失するという報告[78]もなされている。本研究結果と併せて考えると、ナロキソンベンゾイルヒドラゾンはノシセプチン受容体にアンタゴニストとして作用することによって鎮痛作用を示すという可能性が推察される。ところが、ナロキソンベンゾイルヒドラゾンによる鎮痛作用は慢性投与によって耐性を形成すること[75]や、ヒト神経芽細胞SH-SY5Yにおいてモルヒネと同様に細胞内cAMP蓄積を濃度依存的に抑制するという知見も報告されている[79]。薬物による耐性は、一般的には、アゴニスト投与によって形成されることから、ナロキソンベンゾイルヒドラゾンはノシセプチン受容体とは異なるκ_3受容体にアゴニストとして作用して鎮痛効果を示すのではないかとも考えられる。また、ナロキソンベンゾイルヒドラゾンによる鎮痛作用がノシセプチン受容体ノックア

ウトマウスで消失することより、κ_3受容体はノシセプチン受容体のスプライシングバリアント[80、81]である可能性も考えられる。

本研究結果より、TRK-820とナロキソンベンゾイルヒドラゾンがノシセプチン受容体においてアンタゴニスト活性を示すことが示された。さらに最近になって、麻薬拮抗性鎮痛薬の１つであるブプレノルフィン(buprenorphine)がノシセプチン受容体にノシセプチンより約10倍程度低い親和性で結合し、ノシセプチン受容体の完全アゴニストとして作用することが報告された[82]。ロフェンタニルを含めて、これらのノシセプチン受容体にアゴニストあるいはアンタゴニスト活性を示すことが明らかとなった非ペプチド性リガンドは、ノシセプチン受容体よりも高い親和性でオピオイド受容体に作用することが知られているため、これらのリガンドそのものをノシセプチン受容体のアゴニストあるいはアンタゴニストとして用いることは不適当であると考えられる。しかしながら、本研究結果はこれら化合物がノシセプチン受容体の非ペプチド性リガンド創製のためのリード化合物となる可能性を示すものである。

総括および結論

著者は、本研究においてラットμ、κオピオイド受容体およびヒトノシセプチン受容体cDNAを用いてキメラ受容体および変異型受容体を作製し、これらを用いた研究により以下の新知見を得た。

1．　μオピオイド受容体選択的リガンドであるDAMGOによるμ／κ受容体間識別には、κ受容体第6膜貫通部位と第3細胞外ループの境界領域に存在するの297番目のグルタミン酸残基と第3細胞外ループと第7膜貫通部位の境界領域に存在する310番目のセリン残基、312番目のチロシン残基および313番目のチロシン残基とμ受容体の対応する位置に存在する303番目のリジン残基、316番目のバリン残基、318番目のトリプトファン残基および319番目のヒスチジン残基の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。

2．　非選択的オピオイドリガンドであるブ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存在する216番目のアラニン残基および第6膜貫通部位に存在するバリン残基、グルタミン残基、バリン残基とオピオイド受容体のそれぞれの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、イソロイシン残基の4アミノ酸残基の違いが重要であるということを明らかにした。

3．　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。本実験系を用いて、いくつかの非ペプチド性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活性およびアンタゴニスト活性を検討し、TRK-820およびナロキソンベンゾイルヒドラゾンが高濃度において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、オピオイドリガンドによるオピオイド受容体ファミリーの受容体間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することが可能であることを示唆するものである。さらに、いくつかの非ペプチド性オピオイドリガンドが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、ノシセプチン受容体に特異的に結合する非ペプチド性のアゴニストあるいはアンタゴニスト創製のための基礎的知見を与えた。

謝辞

本研究に際しまして終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科教授 佐藤公道 先生に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益な御助言を頂いた京都大学大学院薬学研究科助教授 南　雅文 先生に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科教授 赤池昭紀 先生、助教授 金子周司 先生、助教授 香月博志 先生、助手 中川貴之 先生、並びに助手 久米利明 先生に深く感謝いたします。さらに、TAN-67、TRK-820 およびナロキソンベンゾイルヒドラゾンを御供与していただいた東レ基礎研究所創薬研究室室長 長瀬博 博士に深く感謝いたします。

さらに、共同研究者として本研究にご協力いただきました 木村千晶 修士ならびに 井手聡一郎 学士に深く感謝いたします。

発表論文目録

本研究の内容の大部分は以下の論文に公表した。

1) Seki, T., Minami, M., Nakagawa, T., Ienaga, Y., Morisada, A. and Satoh, M.
DAMGO recognizes four residues in the third extracellular loop to discriminate between μ- and κ-opioid receptors.
Eur. J. Pharmacol., **350,** 301-310 (1998)

2) Seki, T., Minami, M., Kimura, C., Uehara, T., Nakagawa, T. and Satoh, M.
Bremazocine recognizes the difference in four amino acid residues to discriminate between a nociceptin/orphanin FQ receptor and opioid receptors.
Jpn. J. Pharmacol., **77,** 301-306 (1998)

3) Seki, T., Awamura, S., Kimura, C., Ide, S., Sakano, K., Minami, M., Nagase, H. and Satoh, M.
Pharmacological properties of TRK-820 on cloned μ-, δ- and κ-opioid receptors and nociceptin receptor.
Eur. J. Pharmacol., **376,** 159-167 (1999)

引用文献

1) Evans, C. J., Keith Jr., D. E., Morrison, H., Magendzo, K. and Edwards, R. H.: Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science,* **258,** 1952-1955 (1992)

2) Kieffer, B. L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C. and Hirth, C. G.: The δ-opioid receptor: Isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 12048-12052 (1992)

3) Minami, M., Toya, T., Katao, Y., Maekawa, K., Nakamura, S., Onogi, T., Kaneko, S. and Satoh, M.: Cloning and expression of a cDNA for the rat κ-opioid receptor. *FEBS Lett.,* **329,** 291-295 (1993)

4) Minami, M., Onogi, T., Toya, T., Katao, Y., Hosoi, Y., Maekawa, K., Katsumata, S., Yabuuchi, K. and Satoh, M.: Molecular cloning and in situ hybridization histochemistry for rat μ-opioid receptor. *Neurosci. Res.,* **18,** 315-322 (1994)

5) Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J. A. and Yu, L.: Molecular cloning and functional expression of a μ-opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.,* **44,** 8-12 (1993)

6) Fukuda, K., Kato, S., Mori, K., Nishi, M. and Takeshima, H.: Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor δ- and μ-subtypes. *FEBS Lett.*, **327,** 311-314 (1993)

7) Min, B. H., Augustin, L. B., Felsheim, R. F., Fuchs, J. A. and Loh, H. H.: Genomic structure and analysis of promoter sequence of a mouse μ opioid receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9081-9085 (1994)

8) Yasuda, K., Raynor, K., Kong, H., Breder, C. D., Takeda, J., Reisine, T. and Bell, G. I.: Cloning and functional comparison of κ and δ opioid receptors from mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 6736-6740 (1993)

9) Mestek, A., Hurley, J. H., Bye, L. S., Campbell, A. D., Chen, Y., Tian, M., Liu, J., Schulman, H. and Yu, L.: The human μ opioid receptor: Modulation of functional desensitization by calcium/calmodulin-dependent protein kinase and protein kinase C. *J. Neurosci.,* **15,** 2396-2406 (1995)

10) Knapp, R. J., Malatynska, E., Fang, L., Li, X., Babin, E., Nguyen, M., Santoro, G., Varga, E. V., Hruby, V. J., Roeske, W. R. and Yamamura, H. I.: Identification of a human delta opioid receptor: Cloning and expression. *Life Sci.*, **54,** PL463-PL469 (1994)

11) Mansson, E., Bare, L. and Yang, D.: Isolation of a human κ opioid receptor cDNA from placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **202,** 1431-1437 (1994)

12) Onogi, T., Minami, M., Katao, Y., Nakagawa, T., Aoki, Y., Toya, T., Katsumata, S. and Satoh, M.: DAMGO, a μ-opioid receptor selective agonist, distinguishes between μ- and δ-opioid receptors around their first extracellular loops. *FEBS Lett.*, **357,** 93-97 (1995)

13) Minami, M., Nakagawa, T., Seki, T., Onogi, T., Aoki, Y., Katao, Y., Katsumata, S. and Satoh, M.: A single residue, Lys108, of the δ-opioid receptor prevents the μ-opioid selective ligand [D-Ala^2, *N*-MePhe^4, Gly-ol^5]enkephalin from binding to the δ-opioid receptor. *Mol. Pharmacol.*, **50,** 1413-1422 (1996)

14) Minami, M., Onogi, T., Nakagawa, T., Katao, Y., Aoki, Y., Katsumata, S. and Satoh, M.: DAMGO, a μ-opioid receptor selective ligand, distinguishes between μ- and κ-opioid receptors at a different region from that for the distinction between μ- and δ-opioid receptors. *FEBS Lett.*, **364,** 23-27 (1995)

15) Cheng, Y.-C. and Prusoff, W. H.: Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.*, **22,** 3099-3108 (1973)

16) Hjorth, S.A., Thirstrup, K., Grandy, D. K. and Schwartz, T. W.: Analysis of selective binding epitopes for the κ-opioid receptor antagonist nor-binaltorphimine. *Mol. Pharmacol.*, **47,** 1089-1094 (1995)

17) Jones, R. M., Hjorth, S. A., Schwartz, T. W. and Portoghese, P. S.: Mutational evidence for a common κ antagonist binding pocket in the wild-type κ and mutant μ[K303E] opioid receptors. *J. Med. Chem.*, **41,** 4911-4914 (1998)

18) Seki, T., Awamura, S., Kimura, C., Ide, S., Sakano, K., Minami, M., Nagase, H. and Satoh, M.: Pharmacological properties of TRK-820 on cloned μ-, δ- and κ-opioid receptors and nociceptin receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **376,** 159-167 (1999)

19) Valiquette, M., Vu, H. K., Yue, S. Y., Wahlestedt, C. and Walker, P.: Involvement of Trp-284, Val-296, and Val-297 of the human δ-opioid receptor in binding of δ-selective ligands. *J. Biol. Chem.*, **271,** 18789-18796 (1996)

20) Pepin, M.-C., Yue, S. Y., Roberts, E., Wahlestedt, C. and Walker, P.: Novel "restoration of function" mutagenesis strategy to identify amino acids of the δ-opioid receptor involved in ligand binding. *J. Biol. Chem.*, **272,** 9260-9267 (1997)

21) Gether, U., Nilsson, L., Lowe III, J. A. and Schwartz, T. W.: 2Specific residues at the top of transmembrane segment V and VI of the neurokinin-1 receptor involved in binding of the nonpeptide antagonist CP96,345. *J. Biol. Chem.*, **269,** 23959-23964 (1994)

22) Kaupmann, K., Bruns, C., Raulf, F., Weber, H. P., Mattes, H. and Lübbert, H.: Two amino acids, located in transmembrane domains VI and VII, determine the selectivity of the peptide agonist SMS 201-995 for the SSTR2 somatostatin receptor. *EMBO J.*, **14,** 727-735 (1995)

23) Zhao, M. M., Hwa, J. and Perez, D. M.: Identification of critical extracellular loop residues involved in α_1-adrenergic receptor subtype-selective antagonist binding. *Mol. Pharmacol.*, **50,** 1118-1126 (1996)

24) Krystek Jr., S. R., Patel, P. S., Rose, P. M., Fisher, S. M., Kienzle, B. K., Lach, D. A., Liu, E. C. K., Lynch, J. S., Novotny, J. and Webb, M. L.: Mutation of peptide binding site in transmembrane region of a G protein-coupled receptor accounts for endothelin receptor subtype selectivity. *J. Biol. Chem.*, **269,** 12383-12386 (1994)

25) Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J. L., Moisand, C., Chalon, P., Caput, D., Vassart, G. and Meunier, J. C.: ORL1, a novel member of the opioid receptor family. *FEBS lett.*, **341,** 33-38 (1994)

26) Fukuda, K., Kato, S., Mori, K., Nishi, M., Takeshima, H., Iwabe, N., Miyata, T., Houtani, T. and Sugimoto, T.: cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS lett.*, **343,** 42-46 (1994)

27) Chen, Y., Fan, Y., Liu, J., Mestek, A., Tian, M., Kozak, C. A. and Yu, L.: Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *FEBS lett.*, **347,** 279-283 (1994)

28) Bunzow, J. R., Saez, C., Mortrud, M., Bouvier, C., Williams, J. T., Low, M. and Grandy D. K.: Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a μ, δ or κ opioid receptor type. *FEBS lett.*, **347,** 284-288 (1994)

29) Meunier, J. C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P,, Butour, J. L., Guillemot, J. C., Ferrara, P., Monsarrat, B., Mazarguil, H., Vassart, G., Parmentier, M. and Costentin, J.: Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL_1 receptor. *Nature*, **377,** 532-535 (1995)

30) Reinscheid, R. K., Nothacker, H. P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R. A., Bunzow, J. R., Grandy, D. K., Langen, H., Monsma, Jr. F. J. and Civelli, O.: Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science,* **270,** 792-794 (1995)

31) Mogil, J. S., Grisel, J. E., Reinscheid, R. K., Civelli, O., Belknap, J. K. and Grandy, D. K.: Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. *Neuroscience,* **75,** 333-337 (1996)

32) Mogil, J. S., Grisel, J. E., Zhangs, G., Belknap, J. K. and Grandy, D. K.: Functional antagonism of μ-, δ- and κ-opioid antinociception by orphanin FQ. *Neurosci. Lett.,* **214,** 131-134 (1996)

33) Xu, X. J., Hao, J. X. and Wiesenfeld-Hallin, Z.: Nociceptin or antinociceptin: potent spinal antinociceptive effect of orphanin FQ/nociceptin in the rat. *NeuroReport,* **7,** 2092-2094 (1996)

34) Okuda-Ashitaka, E., Tachibana, S., Houtani, T., Minami, T., Masu, Y., Nishi, M., Takeshima, H., Sugimoto, T. and Ito, S.: Identification and characterization of an endogenous ligand for opioid receptor homologue ROR-C: its involvement in allodynic response to innocuous stimulus. *Mol. Brain Res.,* **43,** 96-104 (1996)

35) Hara, N., Minami, T., Okuda-Ashitaka, E., Sugimoto, T., Sakai, M., Onaka, M., Mori, H., Imanishi, T., Shingu, K. and Ito, S.: Characterization of nociceptin hyperalgesia and allodynia in concious mice. *Br. J. Pharmacol.,* **121,** 401-408 (1997)

36) Sakurada, T., Katsuyama, S., Sakurada, S., Inoue, M., Tan-No, K., Kisara, K., Sakurada, C, Ueda, H. and Sasaki, J.: Nociceptin-induced scratching, biting and licking in mice: involvement of spinal NK_1 receptors. *Br. J. Pharmacol.,* **127,** 1712-1718 (1999)

37) Nishi, M., Houtani, T., Noda, Y., Mamiya, T., Sato, K., Doi, T., Kuno, J., Takeshima, H., Nukada, T., Nabeshima, T., Yamashita, T., Noda, T. and Sugimoto, T.: Unrestrained nociceptive response and disregulation of hearing ability in mice lacking the nociceptin/orphanin FQ receptor. *EMBO J.,* **16,** 1858-1864 (1997)

38) Ueda, H., Yamaguchi, T., Tokuyama, S., Inoue, M., Nishi, M. and Takeshima, H.: Partial loss of tolerance liability to morphine analgesia in mice lacking the nociceptin receptor gene. *Neurosci. Lett.,* **237,** 136-138 (1997)

39) Manabe, T., Noda, Y., Mamiya, T., Katagiri, H., Houtani, T., Nishi, M., Noda, T., Takahashi, T., Sugimoto, T., Nabeshima, T. and Takeshima, H.: Facilitation of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors. *Nature,* **394,** 577-581 (1998)

40) Mamiya, T., Noda, Y., Nishi, M., Takeshima, H. and Nabeshima, T.: Nociceptin system plays a role in the memory retention: involvement of naloxone benzoylhydrazone binding sites. *NeuroReport,* **10,** 1171-1175 (1999)

41) Mamiya, T., Noda, Y., Nishi, M., Takeshima, H. and Nabeshima, T.: Enhancement of spatial attention in nociceptin/orphanin FQ receptor-knockout mice. *Brain Res.,* **783,** 236-240 (1998)

42) Bot, G., Blake, A. D., Li, S. and Reisine, T.: Mutagenesis of a single amino acid in the rat μ-opioid receptor discriminates ligand binding. *J. Neurochem.,* **70,** 358-365 (1998)

43) Mansour, A., Taylor, L. P., Fine, J. L., Thompson, R. C., Hoversten, M. T., Mosberg, H. I., Watson, S. J. and Akil, H.: Key residues defining the μ-opioid receptor binding pocket: a site-directed mutagenesis study. *J. Neurochem.,* **68,** 344-353 (1997)

44) Meng, F., Taylor, L. P., Hoversten, M. T., Ueda, Y,, Ardati, A., Reinscheid, R. K., Monsma, F. J., Watson, S. J., Civelli, O. and Akil, H.: Moving from the orphanin FQ receptor to an opioid receptor using four point mutations. *J. Biol. Chem.,* **271,** 32016-32020 (1996)

45) Meng, F., Ueda, Y., Hoversten, M. T., Taylor, L. P., Reinscheid, R. K., Monsma, F. J., Watson, S. J., Civelli, O. and Akil, H.: Creating a functional opioid alkaloid binding site in the orphanin FQ receptor through site-directed mutagenesis. *Mol. Pharmacol.,* **53,** 772-777 (1998)

46) Meng, F., Wei, Q., Hoversten, M. T., Taylor, L. P. and Akil, H.: Switching agonist/antagonist properties of opiate alkaloids at the δ opioid receptor using mutations based on the structure of the orphanin FQ receptor. *J. Biol. Chem.,* **275,** 21939-21945 (2000)

47) Mollereau, C., Moisand, C., Butour, J. L., Parmentier, M. and Meunier, J. C.: Replacement of Gln^{280} by His in TM6 of the human ORL1 receptor increases affinity but reduces intrinsic activity of opioids. *FEBS lett.,* **395,** 17-21 (1996)

48) Topham, C. M., Mouledous, L., Pada, G., Maigret, B. and Meunier, J. C.: Molecular modelling of the ORL1 receptor and its complex with nociceptin. *Protein Eng.,* **11,** 1163-1179 (1998)

49) Guerrini, R., Calo, G., Rizzi, A., Bigoni, R., Bianchi, C., Salvadori, S. and Regoli, D.: A new selective antagonist of the nociceptin receptor. *Br. J. Pharmacol.,* **123,** 163-165 (1998)

50) Calo, G., Guerrini, R., Bigoni, R., Rizzi, A., Bianchi, C., Regoli, D. and Salvadori, S.: Structure-activity study of the nociceptin(1-13)-NH_2 N-terminal tetrapeptide and discovery of a nociceptin receptor antagonist. *J. Med. Chem.,* **41,** 3360-3366 (1998)

51) Portoghese, P. S., Lipkowski, A. W. and Takemori, A. E.: Bimorphinans as highly selective, potent κ opioid receptor antagonists. *J. Med. Chem.*, **30,** 238-239 (1987)

52) Nagase, H., Hayakawa, J., Kawamura, K., Kawai, K., Takezawa, Y., Matsuura, H., Tajima, C. and Endo, T.: Discovery of a structurally novel opioid κ-agonist derived from 4,5-epoxymorphinan. *Chem. Pharm. Bull.,* **46,** 366-369 (1998)

53) Nagase, H., Wakita, H., Kawai, K., Endoh, T., Matsuura, H., Tanaka, C. and Takezawa, Y.: Syntheses of non-peptidic *delta* opioid agonists and their structure activity relationships. *Jpn. J. Pharamacol.,* **64,** suppl. 1, 35 (1994)

54) Paul, D., Levison, J. A., Howard, D. H., Pick, C. G., Hahn, E. F. and Pasternak, G. W.: Naloxone benzoylhydrazone (NalBzoH) analgesia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **255,** 769-774 (1990)

55) Dooley, C. T. and Houghten, R. A.: Orphanin FQ: receptor binding and analog structure activity relationships in rat brain. *Life Sci.* **59,** PL23-PL29 (1996)

56) Montiel, J. L., Cornille, F., Roques, B. P. and Noble, F.: Nociceptin/orphanin FQ metabolism: role of aminopeptidase and endopeptidase 24.15. *J. Neurochem.,* **68,** 354-361 (1997)

57) Grisel, J. E., Farrier, D. E., Wilson, S. G. and Mogil, J. S.: [$Phe^1\psi(CH_2$-NH)Gly^2]nociceptin-(1-13)-NH_2 acts as an agonist of the orphanin FQ/nociceptin receptor in vivo. *Eur. J. Pharmacol.,* **357,** R1-R3 (1998)

58) Carpenter, K. J. and Dickenson, A. H.: Evidence that [$Phe^1\psi(CH_2$-NH)Gly^2]nociceptin-(1-13)-NH_2, a peripheral ORL-1 receptor antagonist, acts as an agonist in the spinal cord. *Br. J. Pharmacol.,* **125**, 949-951 (1998)

59) Wang, Y. Q., Zhu, C. B., Cao, X. D. and Wu, G. C.: Supraspinal hyperalgesia and spinal analgesia by [$Phe^1\psi(CH_2$-NH)Gly^2]nociceptin-(1-13)-NH_2 in rat. *Eur. J. Pharmacol.,* **376,** R1-R3 (1999)

60) Okawa, H., Nicol, B., Bigoni, R., Hirst, R. A., Calo, G., Guerrini, R., Rowbotham, D. J., Smart, D., McKnight, A. T. and Lambert, D. G.: Comparison of the effects of [$Phe^1\psi(CH_2$-NH)Gly^2]nociceptin(1-13)NH_2 in rat brain, rat vas deferens and CHO cells expressing recombinant human nociceptin receptors. *Br. J. Pharmacol.,* **127,** 123-130 (1999)

61) Chiou, L. C.: [Phe$^1\psi$(CH_2-NH)Gly^2]nociceptin-(1-13)-NH_2 activation of an inward rectifier as a partial agonist of ORL1 receptors in rat periaqueductal gray. *Br. J. Pharmacol.,* **128,** 103-107 (1999)

62) Connor, M., Vaughan, C. W., Jennings, E. A., Allen, R. G. and Christie, M. J.: Nociceptin, Phe$^1\psi$-nociceptin$_{1-13}$, nocistatin and prepronociceptin$_{154-181}$ effects on calcium channel currents and a potassium current in rat locus coeruleus *in vitro. Br. J. Pharmacol.,* **128,** 1779-1787 (1999)

63) Olianas, M. C., Maullu, C., Ingianni, A. and Onali, P.: [Phe$^1\psi$(CH_2-NH)Gly^2]nociceptin-(1-13)-NH_2 acts as a partial agonist at ORL1 receptor endogenously expressed in mouse N1E-115 neuroblastoma cells. *NeuroReport,* **10,** 1127-1131 (1999)

64) Zhang, S. and Yu, L.: Identification of dynorphins as endogenous ligands for an opioid receptor-like orphan receptor. *J. Biol. Chem.,* **270,** 22772-22776 (1995)

65) Butour, J. L., Moisand, C., Mazarguil, H., Mollereau, C. and Meunier, J. C.: Recognition and activation of the opioid receptor-like ORL1 receptor by nociceptin, nociceptin analogs and opioids. *Eur. J. Pharmacol.,* **321,** 97-103 (1997)

66) Endoh, T., Matsuura, H., Tajima, A., Izumimoto, N., Tajima, C., Suzuki, T., Saitoh, A., Suzuki, T., Narita, M., Tseng, L. and Nagase, H.: Potent antinociceptive effects of TRK-820, a novel κ-opioid receptor agonist. *Life Sci.,* **65,** 1685-1694 (1999)

67) 遠藤　孝、松浦博敏、田嶋知子、田嶋　敦、泉本直樹、早川　潤、河合孝治、川村邦明、長瀬　博　新規 κ 作動薬、TRK-820の薬理作用　第18回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム要旨集 80-84 (1997)

68) Endoh, T., Tajima, A., Suzuki, T., Kamei, J., Suzuki, T., Narita, M., Tseng, L. and Nagase, H.: Characterization of the antinociceptive effects of TRK-820 in the rat. *Eur. J. Pharmacol.,* **387,** 133-140 (2000)

69) Tsuji, M., Yamazaki, M., Takeda, H., Matsumiya, T., Nagase, H., Tseng, L. F., Narita, M. and Suzuki, T.: The novel κ-opioid receptor agonist TRK-820 has no affect on the development of antinociceptive tolerance to morphine in mice. *Eur. J. Pharmacol.,* **394,** 91-95 (2000)

70) Knapp, R. J., Landsman, R., Waite, S., Malatynska, E., Varga, E., Haq, W., Hruby, V. J., Roeske, W. R., Nagase, H. and Yamamura, H. I.: Properties of TAN-67, a nonpeptidic δ-opioid receptor agonist, at cloned human δ- and μ-opioid receptors. *Eur. J. Pharmacol.,* **291,** 129-134 (1995)

71) Kamei, J., Saitoh, A., Ohsawa, M., Suzuki, T., Misawa, M., Nagase, H. and Kasuya, Y.: Antinociceptive effects of the selective non-peptidic δ-opioid receptor agonist TAN-67 in diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.,* **276,** 131-135 (1995)

72) Suzuki, T., Tsuji, M., Mori, T., Misawa, M., Endoh, T. and Nagase, H.: Effects of a highly selective nonpeptide δ opioid receptor agonist, TAN-67, on morphine-induced antinociception in mice. *Life Sci.,* **57,** 155-168 (1995)

73) Tseng, L. F., Narita, M., Mizoguchi, H., Kawai, K., Mizusuna, A., Kamei, J., Suzuki, T. and Nagase, H.: *Delta*-1 opioid receptor-mediated antinociceptive properties of a nonpeptidic *dalta* opioid receptor agonist, (-)TAN-67, in the mouse spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **280,** 600-605 (1997)

74) Kamei, J., Ohsawa, M., Suzuki, T., Saitoh, A., Endoh, T., Narita, M., Tseng, L. F. and Nagase, H.: The modulatory effect of (+)-TAN-67 on the antinociceptive effects of the nociceptin/orphanin FQ in mice. *Eur. J. Pharmacol.,* **383,** 241-247 (1999)

75) Gisterk, M. A., Paul, D., Hahn, E. F. and Pasternak, G. W.: Pharmacological actions of a novel mixed opiate agonist/antagonist: Naroxone benzoylhydrazone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **251,** 469-476 (1989)

76) Wollemann, M.: Orphan receptor or κ_3-opioid receptor? *Trends Pharmacol. Sci.,* **17,** 217 (1996)

77) Nicholson, J. R., Peterson, S. J., Menzies, J. R. W., Corbett, A. D. and McKnight, A. T.: Pharmacological studies on the "orphan" opioid receptor in central and peripheral sites. *Can. J. Physiol. Pharmacol.,* **76,** 304-313 (1998)

78) Noda, Y., Mamiya, T., Nabeshima, T., Nishi, M., Higashioka, M. and Takeshima, H.: Loss of antinociception induced by naloxone benzoylhydrazone in nociceptin receptor-knockout mice. *J. Biol. Chem.,* **273,** 18047-18051 (1998)

79) Kelly, J. C., Standifer, M., Tublin, P. R., Su, W. and Pasternak, G. W.: Demonstration of κ_3-opioid receptors in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J. Neurochem.,* **65,** 170-175 (1995)

80) Wang, J. B., Johnson, P. S., Imai, Y., Persico, A. M., Ozenberger, B. A., Eppler, C. M. and Uhl, G. R.: cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS Lett.,* **348,** 75-79 (1994)

81) Pan, Y. X., Xu, J., Wan, B. L., Zuckermen, A. and Pasternak, G. W.: Identification and differential regional expression of KOR-3/ORL-1 gene splice variant in mouse brain. *FEBS Lett.,* **435,** 65-68 (1998)

82) Wnendt, S., Krüger, T., Janocha, E., Hildebrandt, D. and Englberger, W.: Agonistic effect of buprenorphine in a nociceptin/OFQ receptor-triggered reporter gene assay. *Mol. Pharmacol.*, **56,** 334-338 (1999)