

ドラッグライクテンプレートの開発研究

-新規ニューロキニン-3 受容体選択的アゴニストの開発を目的とした

タキキニン類ペプチドの構造活性相関研究-

Development of Drug-Like-Templates

-Structure-activity Relationship Study of Tachykinin Peptides

for Development of Novel Neurokinin-3 Receptor Selective Agonists-

京都大学薬学研究科 薬品有機製造学分野 大野 浩章

背景と目的

ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) は、視床下部-下垂体-性腺系において、黄体形成ホルモンや卵胞刺激ホルモンの分泌に重要な役割を担う性ホルモンである。GnRH 分泌には、卵胞発育を促進するパルス状の分泌 (GnRH パルス) と排卵を誘起する一過性のサージ状の分泌 (GnRH サージ) の 2 種類が知られている¹。当研究室では、これまでに GnRH サージを誘起するキスペプチン類の構造活性相関研究を展開し、GPR54 (キスペプチン受容体) 選択的アゴニストの創製に成功している²⁻⁴。一方、GnRH パルスは、近年、タキキニン受容体の 1 つとして知られる NK3 受容体の刺激により調節を受けることが報告された⁵。一部の不妊症患者において、NK3 受容体の変異による GnRH パルスの異常が認められるとの報告から、NK3 受容体は卵胞発育不全が関与する不妊症の治療薬の新たな標的となることが期待されている⁶。

ヒトの内因性タキキニン類としてサブスタンス P (SP)、ニューロキニン A (NKA) 及びニューロキニン B (NKB) が知られている。また、タキキニン受容体は、NK1 受容体、NK2 受容体及び NK3 受容体の 3 種類が同定されており、C 末端にコンセンサス配列 (-Phe-Xaa-Gly-Leu-Met-NH₂) を有するペプチド (タキキニン類) を認識する。SP、NKA 及び NKB は、それぞれ NK1、NK2 及び NK3 受容体に対する指向性を示すものの、その選択性は低い (Figure 1)。このため、タキキニン受容体を標的とする医薬品や研究ツールの開発を目的として、各受容体に対する選択的リガンドの開発がこれまでに試みられ、NK3 受容体選択的アゴニストとして[MePhe⁷]-NKB や senktide が見出されている^{7,8}。こうした背景のもと、著者は、さらなる高活性 NK3 受容体選択的アゴニストの開発、及び構造的な要求の解明を目的として NK3 受容体アゴニストの構造活性相関研究に着手した。

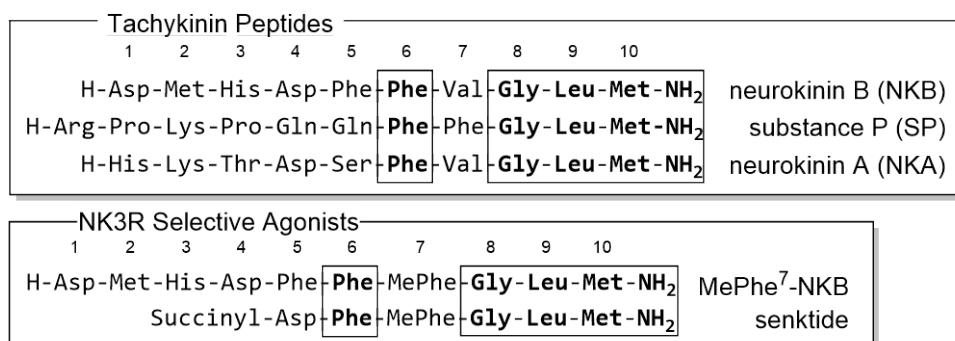


Figure 1. The sequences of human tachykinin peptides and NK3R-selective agonists.

検討内容

NK3 受容体選択的アゴニストの構造的な要求を明らかにするため、まず、天然タキキニン類の NK3 受容体に対する結合活性及びアゴニスト活性を、($[^{125}\text{I}]\text{His}^3$, MePhe^7)-NKB を用いた競合阻害実験及び受容体刺激時における細胞内 Ca^{2+} 濃度の定量実験により評価した。また、NK1 受容体及び NK2 受容体に対する受容体選択性を比較する目的で、 $[^{125}\text{I}]\text{-BH-SP}$ (NK1 受容体) または $[^{125}\text{I}]\text{-NKA}$ (NK2 受容体) を用いた競合阻害実験を行った。次に、天然タキキニン類の 5 位及び 7 位を Asp 及び MePhe に置換したペプチドを合成し、これら 2 つのアミノ酸の生物活性及び受容体選択性に対する影響を検討した。さらに eledoisin 及び kassinin について、Asp 及び MePhe のうち、一方のアミノ酸のみを導入した誘導体を合成し、各アミノ酸の寄与を精査した。これらの検討により得られた知見に基づき、既知 NK3 受容体選択的アゴニストである $[\text{MePhe}^7]\text{-NKB}$ の Phe^5 を様々なアミノ酸に置換することで、構造最適化を行った。

結果・考察

《天然タキキニン類及びその誘導体の構造活性相関》

まず、天然タキキニン類 **2a-9a** の NK3 受容体結合活性及びアゴニスト活性を評価した。その結果、いずれも中程度から高い生物活性を示した (Table 1)。一方、これらのペプチドの受容体選択性を評価したところ、いずれも 10 μM において NK1 受容体及び NK2 受容体に対する結合活性を示した。これまでの Severini らの研究により 5 位及び 7 位のアミノ酸の NK3 受容体に対する生物活性及び受容体選択性への寄与が示唆されていること⁹、さらに既知 NK3 受容体選択的アゴニストとこれら天然タキキニン類の構造が類似していることに着目し、次に 5 位及び 7 位を Asp 及び MePhe で置換した誘導体 **3b-9b** を合成してそれらの活性を評価した。その結果、いずれの誘導体も親ペプチドと比べて高い生物活性及び受容体選択性を示した。この結果は、5 位及び 7 位のアミノ酸の修飾が NK3 受容体に対する結合活性及び受容体選択性の発現に大きく寄与することを支持している。

Table 1. Structure-activity relationships of tachykinins and their analogs.

Peptide	Sequence	IC ₅₀ ^a (nM)	EC ₅₀ ^b (nM)	Binding inhibition ^c (%)	
				NK1R	NK2R
$[\text{MePhe}^7]\text{-NKB}$ (1a)	H-Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.0038	0.11	< 10	59
PG-KII (2a)	pGlu-Pro-Asn-Pro-Asp-Glu-Phe -Val- Gly-Leu-Met-NH ₂	0.053	0.079	94	92
PG-SP1 (3a)	pGlu-Pro-Asn-Pro-Asp-Glu-Phe -Tyr- Gly-Leu-Met-NH ₂	0.71	1.38	98	< 10
3b	pGlu-Pro-Asn-Pro-Asp-Asp-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.019	0.083	< 10	< 10
uperolein (4a)	pGlu-Pro-Asp-Pro-Asn-Ala-Phe -Tyr- Gly-Leu-Met-NH ₂	0.082	0.12	100	60
4b	pGlu-Pro-Asp-Pro-Asn-Asp-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.017	0.13	< 10	< 10
eledoisin (5a)	pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe -Ile- Gly-Leu-Met-NH ₂	0.18	0.22	100	95
5b	pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Asp-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.015	0.090	< 10	< 10
kassinin (6a)	H-Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Gln-Phe -Val- Gly-Leu-Met-NH ₂	0.35	0.21	101	96
6b	H-Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Asp-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.11	0.085	< 10	< 10
sialokinin II (7a)	H-Asp-Thr-Gly-Asp-Lys-Phe -Tyr- Gly-Leu-Met-NH ₂	1.93	10.88	99	98
7b	H-Asp-Thr-Gly-Asp-Asp-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.081	0.11	< 10	< 10
physalaemin (8a)	pGlu-Ala-Asp-Pro-Asn-Lys-Phe -Tyr- Gly-Leu-Met-NH ₂	1.55	3.36	101	68
8b	pGlu-Ala-Asp-Pro-Asn-Asp-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.054	1.48	87	< 10
bufokinin (9a)	H-Lys-Pro-Arg-Pro-Asp-Gln-Phe -Tyr- Gly-Leu-Met-NH ₂	2.98	10.73	101	95
9b	H-Lys-Pro-Arg-Pro-Asp-Asp-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.031	5.04	26	< 10

^a IC₅₀ values are the concentrations for 50% inhibition of 0.1 nM of ($[^{125}\text{I}]\text{His}^3$, MePhe^7)-NKB binding to NK3R ($n = 3$). ^b EC₅₀ values are the concentrations for 50% induction of Ca^{2+} influx in NK3R expressing CHO cells ($n = 3$). ^c Binding inhibition (%) was calculated by the binding inhibition assay using a radioactive ligand (0.1 nM) and each peptide (10 μM).

次に、各アミノ酸の寄与を示すため、eledoisin 及び kassinin の 5 位または 7 位を置換した誘導体を設計・合成し、それらの生物活性及び受容体選択性を評価した (Table 2)。その結果、Asp に比べて MePhe の寄与が大きいことが示唆されたものの、どちらか一方のみの置換では十分な受容体選択性が得られないことが明らかとなった。このことから、NK3 受容体選択的アゴニストには Asp⁵ 及び MePhe⁷ の両者が重要であることがわかった。

Table 2. Structure-activity relationships of eledoisin, kassinin and their analogs.

Peptide	Sequence	IC ₅₀ ^a (μM)	EC ₅₀ ^b (nM)	Binding inhibition ^c (%)	
				NK1R	NK2R
[MePhe ⁷]-NKB (1a)	H-Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.0034	0.013	< 10	57
eledoisin (5a)	pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.096	0.241	100	99
5b	pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Asp-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.0055	0.078	< 10	< 10
5c	pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Asp-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.035	0.0054	91	56
5d	pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.0079	0.071	48	26
kassinin (6a)	H-Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Gln-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.10	0.25	99	99
6b	H-Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Asp-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.027	0.15	< 10	< 10
6c	H-Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Asp-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.089	0.47	53	74
6d	H-Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Gln-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.013	0.038	46	11

^a IC₅₀ values are the concentrations for 50% inhibition of 0.1 nM of ([¹²⁵I]His³, MePhe⁷)-NKB binding to NK3R (*n* = 3). ^b EC₅₀ values are the concentrations for 50% induction of Ca²⁺ influx in NK3R expressing CHO cells (*n* = 3). ^c Binding inhibition (%) was calculated by the binding inhibition assay using a radioactive ligand (0.1 nM) and each peptide (10 μM).

《[MePhe⁷]-NKB の 5 位の構造最適化》

これまでの検討により、NK3 受容体選択的アゴニストにおける Asp⁵ 及び MePhe⁷ の重要性が示されたことから、著者は既知 NK3 受容体選択的アゴニストである [MePhe⁷]-NKB の 5 位の最適化を行った (Table 3)。その結果、合成したいずれの誘導体においても顕著な生物活性の変化は認められなかった。続いて各誘導体の受容体選択性を評価したところ、Asp 及び Glu を導入した誘導体 1b 及び 1c は、NK3 受容体に対する高い選択性を示した。一方、Arg、Lys 及び Gln に置換した誘導体 1d、1e 及び 1n では NK1 受容体に対する結合活性が認められた。このことから 5 位のアミノ酸残基が受容体選択性に寄与し、酸性アミノ酸の存在が NK3 受容体に対する選択性の発現に重要であることが示された。

Table 4. Structure-activity relationships of Phe⁵-substituted [MePhe⁷]-NKB analogs

H-Asp-Met-His-Asp-Xaa-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH ₂					
Peptide	Xaa	IC ₅₀ ^a (μM)	EC ₅₀ ^b (nM)	Binding Inhibition (%)	
				NK1R	NK2Rb
[MePhe ⁷]-NKB (1a)	Phe	0.0038	0.070	< 10	57
1b	Asp	0.038	0.040	< 10	< 10
1c	Glu	0.0075	0.024	< 10	< 10
1d	Arg	0.0025	0.080	60	62
1e	Lys	0.011	0.026	40	35
1f	His	0.0059	0.017	< 10	47
1g	Tyr	0.0015	0.072	< 10	51
1h	Trp	0.0018	0.28	< 10	79
1i	Val	0.0015	0.065	< 10	29
1j	Leu	0.0069	0.051	< 10	29
1k	Ile	0.0040	0.060	< 10	35
1l	Ala	0.0044	0.012	< 10	33
1m	Asn	0.018	0.036	< 10	10
1n	Gln	0.0046	0.043	24	21
1o	Ser	0.0036	0.040	< 10	31
1p	Thr	0.0043	0.046	< 10	19
1q	Met	0.0017	0.032	< 10	41
1r	Pro	0.045	0.041	< 10	38
1s	Gly	0.013	0.036	< 10	22

^a IC₅₀ values are the concentrations for 50% inhibition of 0.1 nM of ([¹²⁵I]His³, MePhe⁷)-NKB binding to NK3R (*n* = 3). ^b EC₅₀ values are the concentrations for 50% induction of Ca²⁺ influx in NK3R expressing CHO cells (*n* = 3). ^c Binding inhibition (%) was calculated by the binding inhibition assay using a radioactive ligand (0.1 nM) and each peptide (10 μM).

参考論文

- 1) Maeda, K; Tsukamura, H; Ohkura, S.; Kawakami, S.; Nagabukuro, H.; Yokoyama, A. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1995**, *19*, 427-437.
- 2) Tomita, K.; Oishi, S.; Cluzeau, J.; Ohno, H.; Navenot, J.; Wang, Z.; Peiper, S. C.; Akamatsu, M.; Fujii, N. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3222-3228.
- 3) Tomita, K.; Oishi, S.; Ohno, H.; Peiper S. C.; Fujii, N. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7645-7649.
- 4) Oishi, S.; Misu, R.; Tomita, K.; Setsuda, S.; Masuda, R.; Ohno, H.; Naniwa, Y.; Ieda, N.; Inoue, N.; Ohkura, S.; Uenoyama, Y.; Tsukamura, H.; Maeda, K.; Hirasawa, A.; Tsujimoto, G.; Fujii, N. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 53-57.
- 5) Kinsey-Jones, J. S.; Grachev, P.; Li, X. F.; Lin, Y. S.; Milligan, S. R.; Lightman, S. L.; O'Byrne K. T. *Endocrinology* **2012**, *153*, 307-315.
- 6) Topaloglu, A. K.; Reimann, F.; Guclu, M.; Yalin, A. S.; Kotan, L. D.; Porter, K. M.; Serin, A.; Mungan, N. O.; Cook, J. R. Ozbek, M. N.; Imamoglu, S.; Akalin, N. S.; Yuksel, B.; O'Rahilly, S.; Semple, R. K. *Nat. Genetics* **2009**, *3*, 354-358.
- 7) Drapeau, G.; D'Orleans-Juste, P.; Dion, S. *Neuropeptides* **1987**, *10*, 43-54.
- 8) Wormser, U.; Laufer, R.; Hart, Y.; Chorev, M.; Gilon, C.; Selinger, Z. *EMBO J.* **1986**, *5*, 2805-2808.
- 9) Severini, C.; Improta, G.; Falconieri-Erspamer, G.; Salvadori, S.; Erspamer, V. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 285-322.