



Title	蛙皮膚ペプチドBradykinyl-Gly-Lys-Phe-HisおよびXenopsinの一次構造解析とその生理作用
Author(s)	荒木, 健伍
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32436
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	荒木健伍
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 4839 号
学位授与の日付	昭和55年3月1日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	蛙皮膚ペプチド Bradykinyl-Gly-Lys-Phe-His および Xenopsin の一次構造解析とその生理作用
論文審査委員	(主査) 教授 青沼繁 (副査) 教授 上原喜八郎 教授 岩田平太郎 教授 近藤雅臣

論文内容の要旨

緒論

これまで蛙の皮膚から多くの生理活性ペプチドが単離・構造決定されているが¹⁾、そのアミノ酸配列が哺乳類の血液、脳、消化管中に見い出されたペプチドと同一もしくは類似しているものがあることから比較生化学、構造活性相関の観点から興味深い。

これまでの蛙皮膚ペプチド成分の研究の発展をふりかえると、①哺乳類ペプチドと比較して単純な構造をしていること、②含量が非常に多いこと、③蛙皮膚からの新規ペプチドの発見は哺乳類での同タイプの生理活性ペプチドの存在を示唆することなどペプチドホルモンの研究にも大きな役割を果している。

著者は活性ペプチド研究の一端として新規生理活性ペプチドの単離を試み、22種類の蛙皮膚抽出物について生物活性の検定を行なった。

その結果をもとに新規と予想される活性画分を精製し、未知の活性ペプチドの単離に成功し、その一次構造解析を行ない、その生理作用についても検討を加えた。

本論

第一章 蛙皮膚中の生理活性ペプチド成分のスクリーニングおよび新規活性成分の単離とその一次構造の決定

○ 蛙皮膚中の活性ペプチドの分画とスクリーニング

一般に消化管ホルモンを始めとする生理活性ペプチドは摘出平滑筋に対し何らかの作用を示すことが知られている。そこで蛙皮膚ペプチドのスクリーニングに際して、これまで主に用いられていた方

Table I. Biological Activities of the Eluate from an SP-Sephadex Column Chromatography of the Methanol Extract of the Skin of *Bombina orientalis*

Table II. Biological Activities of the Eluate from a SP-Sephadex Column Chromatography of the Methanol Extract of the Skin of *Xenopus laevis*

(R) : rat (G) : guinea pig +: Stimulation (Contraction , Hypertension) - : Inhibition (Relaxation , Hypotension)

法以外に、モルモット気管筋、ラット胃底筋に対する作用 (in vitro) や、ラット膵液分泌作用などの検定法を加えたものをスクリーニング系として用いた。

22種類の新鮮な蛙皮膚を用い、TCAを含むメタノールで抽出し、抽出物を部分精製するため SP-Sephadexカラムクロマトグラフィにかけ、粗分画したものについて検定し生理活性マップを作成し、新規と予想される画分の精製を行なった。

著者が精製を行なった蛙 *Bombina orientalis* (チョウセンスズカエル) と *Xenopus laevis* (アフリカツメガエル) についての検定結果を Table I, II に示した。

○ *Bombina orientalis* の皮膚から新規 bradykinin 関連ペプチドの単離と一次構造の決定

Table I の結果から、No.45付近にモルモット気管筋を弛緩させる成分の存在が示唆されたことから

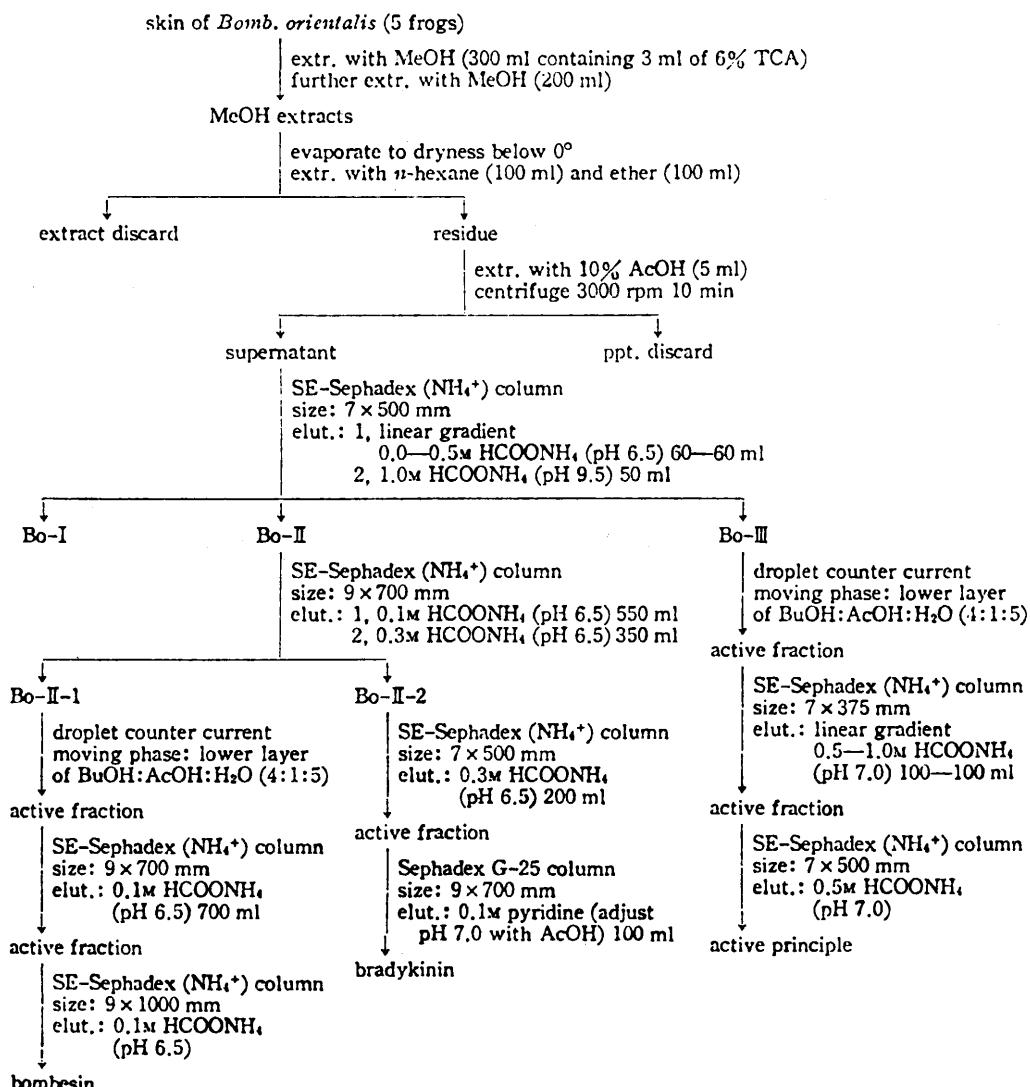
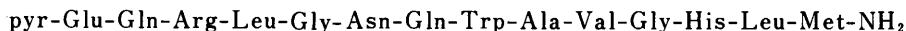


Chart 1 Separation and Purification of Active Peptides

新規ペプチドの存在を予想し、この蛙の抽出物の精製を行なった。精製法の概要は Chart 1 に示した。最初のSE-Sephadex カラムクロマトグラフィによって子宮筋収縮活性画分は三ヶ所に認められ (Bo- I, - II, - III), この内Bo- II, - IIIについてさらに精製を行ないBo- II はさらに二つに活性が分かれ (Bo- II-1, - 2) それぞれの一次構造解析を行なった。

● Bo- II-1

アミノ酸分析の結果 (Glu₃, Arg₁, Leu₂, Gly₂, Asp₁, Ala₁, Val₁, His₁, Met₁) の組成値が計算された。各種酵素に対する作用態度と DNS 法などの結果から Erspamer らがすでに単離した bom-besin²⁾ と同一物質であることが判明した。構造は下記の通りである。



● Bo- II-2

アミノ酸分析の結果 (Arg₂, Pro₃, Gly₁, Phe₂, Ser₁) が確認され、この組成から bradykinin が予想された。DNS 体の TLC による Rf 値が標品 bradykinin と一致し、また chymotrypsin で失活するが trypsin では失活しないことから bradykinin (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) と同定した。

● Bo- III

アミノ酸分析の結果 (Lys₁, His₁, Arg₂, Ser₁, Pro₃, Gly₂, Phe₃) が確認された。trypsin 分解により bradykinin が生成することが確認され、他方の fragment は Edman dansyl 法, carboxypeptidase A 処理、DNS 法による N 末端アミノ酸分析などの結果、構造を下記の如く推定し、合成により間違いないことが確認された。³⁾



これまで多くの bradykinin 関連ペプチドが単離されているが、これは全く新規な関連ペプチドである。

○ *Xenopus laevis* (アフリカツメガエル) 皮膚より新規ペプチドの単離と一次構造の決定

Table II の結果より No.20 付近の活性画分がアミン系、キニン系と異なることから新規ペプチドと予想し精製を行なった。

30 匹分の新鮮皮膚を原料として用い、ラット胃底筋収縮活性を指標にして精製を行なった。最初の SP-Sephadex カラムクロマトグラフィによって活性は三ヶ所に認められ (XE- I, - II, - III), まず、pronase により失活した XE- I の精製を行なった。精製の概要は Chart 2 に示す如く、最終的に 0.8 mg 単離した。

● 一次構造解析

XE-1 はアミノ酸分析の結果 (Lys₁, Arg₁, Glu₁, Pro₁, Gly₁, Ile₁, Leu₁, Trp₁) の組成が確認された。trypsin, chymotrypsin などによる酵素分解、DNS 法、Birch 還元などによって Fig. 1 の構造を推定し、合成⁴⁾によって間違いないことが確認された。

この構造はこれまで蛙の皮膚を始め、哺乳類などから発見された活性ペプチドに見られない新しい

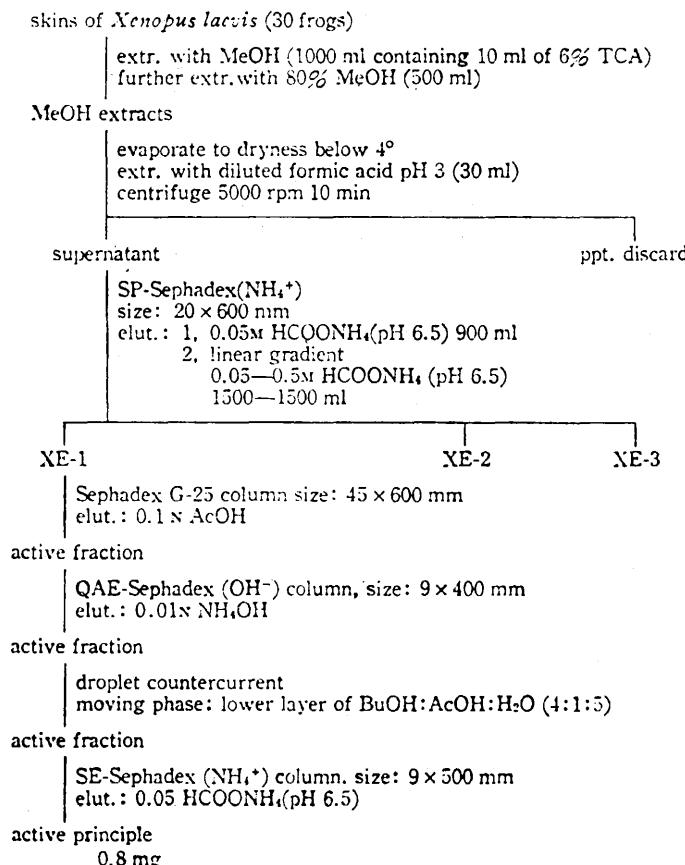


Chart 2 Separation and Purification of Xenopsin

タイプのペプチドでありXenopsinと命名した。

● インドール化合物の同定

アフリカツメガエル抽出物中にラット胃底筋収縮活性はXE-IのXenopsinの他にXE-II, -IIIの二ヶ所に認められた。それぞれアルミナカラムクロマトグラフィによって精製を行ない、XE-IIIはさらに活性が二つに分かれ、どの活性画分も紫外外部吸収波形やエーリッヒ試薬などの発色試薬であったことからインドール系化合物と予想され、ペーパークロマトグラフィにより、それぞれN-methyl-serotonin, buftotenidine, serotoninであることを同定した。

第二章 Bradykinin-Gly-Lys-Phe-His の生理作用

bradykinyl-Gly-Lys-Phe-Hisの作用をラット子宮筋収縮作用, モルモット回腸収縮作用, ラット十二指腸弛緩作用, ラット血圧降下作用について bradykinin と比較した。さらに C末端部 tetrapeptide Gly-Lys-Phe-His についても作用の有無を調べた。

その結果、この関連ペプチドはbradykininと同じ生理作用を示したが、効力はすべて bradykinin より弱く、モル比で子宮収縮活性は $\frac{1}{20}$ 、回腸収縮活性は $\frac{1}{10}$ 、十二指腸弛緩活性は $\frac{1}{8}$ 、降圧作用は $\frac{1}{5}$ であった。また tetrapeptide Gly-Lys-Phe-His は何ら活性を示さなかった。

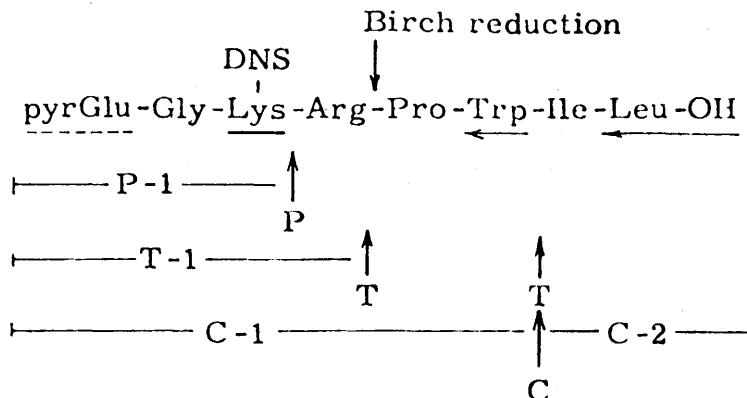


Fig. 1 Summary of Approaches used in Establishing the Amino Acid Sequence of Xenopsin

P: papain, T: trypsin, --- : carboxypeptidase A, $\cdots\cdots\cdots$: alkali-treatment, — : tritium labeling reaction,
C: chymotrypsin

第三章 Xenopsinの生理作用

○ 構造と活性相関

合成された種々のフラグメントのラット胃底筋収縮活性を測定した結果を Table III に示した。

Table III Contractile Activities of Xenopsin Analogs on Rat Stomach Strip

Compounds	Activity
Xenopsin: pyrGlu-Gly-Lys-Arg-Pro-Trp-Ile-Leu-OH	100
H-Pro-Trp-Ile-Leu-OH	0
H-Arg-Pro-Trp-Ile-Leu-OH	0.5
pyrGlu-Gly-Lys-Arg-Pro-Trp-Ile-OH	0.002
pyrGlu-Lys-Gly-Arg-Pro-Trp-Ile-Leu-OH	70
pyrGlu-Lys-Pro-Arg-Gly-Trp-Ile-Leu-OH	0.02
pyrGlu-Gly-Lys-Arg-Pro-Trp-Ile-Leu-NH ₂	20
pyrGlu-Gly-Lys-Arg-Pro-Trp-Ile-NH ₂	0

C末端 leucine のない desleucyl-xenopsin は極端な活性の低下がみられ、C末端—COOHをアミドにすることによっても活性の低下が認められた。N端部の lysine と glycine の交換では活性の低下はあまりみられなかった。C末端部 tetrapeptide Pro-Trp-Ile-Leu では活性は認められず、pentapeptide Arg-Pro-Trp-Ile-Leu で始めて活性が認められたことから、活性発現の最小単位は Arg-Pro-Trp-Ile-Leu であると考えられる。

また菊川の方法⁵⁾に従い pyridine borane によって tryptophan のインドール核を特異的に還元すると活性が極端に低下 (1/200) したことから tryptophan のインドール核も活性発現に重要な役割を果すものと推定された。

○ Xenopsinの生理作用

Xenopsinの胃底筋収縮作用はFig. 2に示す如く, serotonin, acetylcholineより低用量で収縮させたが, 最大収縮高さはacetylcholineの約1/2であった。

Xenopsinの発見後 Carrawayら⁶⁾によりウシ視床下部より単離されたneurotensin (pyrGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu) の構造が発表された。xenopsin と比較するとC末端部アミノ酸配列が類似しており, その作用も類似していることから両者の生理作用の比較をかね諸生理作用について実験した。

各生理作用について xenopsin と neurotensin の効力比は Table IV に示すごとく, 両者とも全く同じ作用を示し, 相反する作用はなく, neurotensin の方が一般に強かった。

Xenopsinのラット胃底筋収縮作用は atropine, diphenhydramine, dibenzyline で影響を受けず, モルモット心耳収縮作用も α -blocker, β -blocker, diphenhydramine の影響を受けなかったことから筋肉に直接作用するものと予想される。

Xenopsinのラット血圧降下作用は非常に強いタキフィラキシィが認められこのタキフィラキシィについては neurotensin についても同じ結果が報告⁷⁾ されている。これらのことから両ペプチドは同じ作用形態を示すことが推察され, 蛙皮膚ペプチドと哺乳類ペプチドに新しい関係を加えたものである。

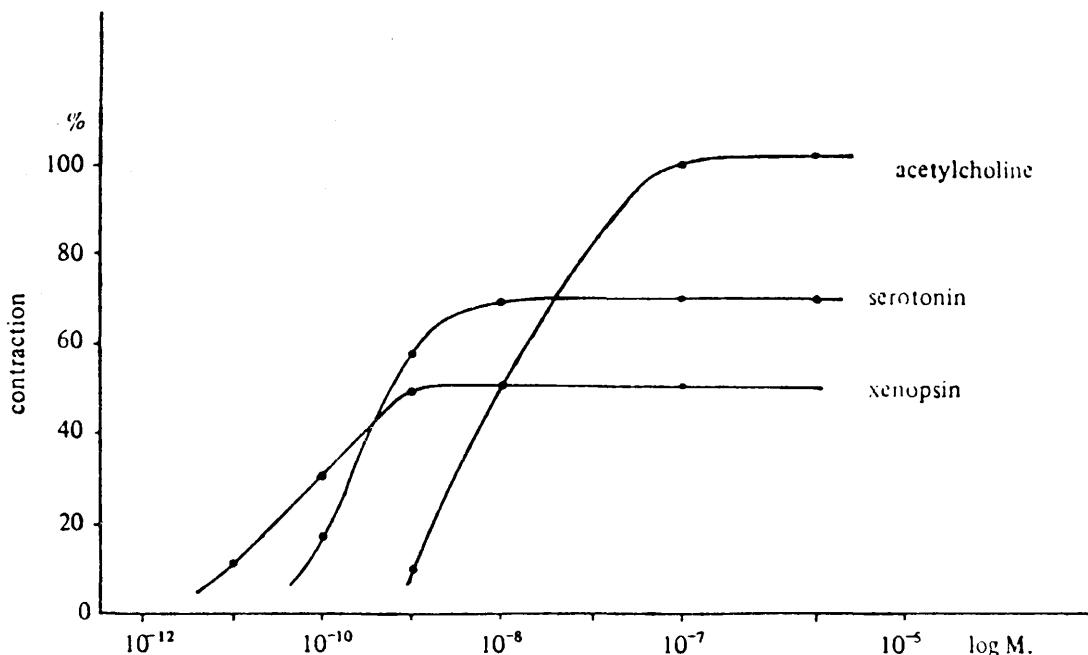


Fig. 2 Dose Response Curves of Xenopsin, Serotonin and Acetylcholine on Rat Stomach Strip
Each point represents the average of three estimates.

Table IV Relative Potency of Xenopsin and Neurotensin

	Xenopsin	neurotensin
rat stomach strip (contraction)	1	2
guinea pig ileum (contraction)	1	2
rat duodenum (relaxation)	1	1
guinea pig atrium (contraction)	1	6
hyperglycemic activity (rat)	1	5
rat vascular permeability (stimulation)	1	0.5

結論

- *Bombina orientalis* から新しいbradykinin関連ペプチドbradykinyl-Gly-Lys-Phe-Hisを単離・一次構造解析した。その生理作用はbradykininと同じであったが効力はbradykininより弱かった。またC末端部tetrapeptide Gly-Lys-Phe-Hisには作用は認められなかった。
- *Xenopus laevis* からは新しいタイプのペプチドを単離・一次構造解析し, *xenopsin*と命名した。その他にインドール化合物としてserotonin, buffotenidine, N-methyl-serotoninを同定した。
- *Xenopsin*の活性中心はC末端部pentapeptide Arg-Pro-Trp-Ile-Leuであり, 活性発現にC末端leucine, tryptophanのインドール核が重要な役割を果すことを確認した。
- *Xenopsin*の生理作用はラット胃底筋, モルモット回腸・心耳に対し収縮作用, ラット十二指腸に対し弛緩作用, ラット血糖上昇作用, タキフィラキシイを伴うラット血圧降下作用, ラット毛細血管透過性亢進作用を有する。*Xenopsin*と構造の類似する視床下部ペプチド*neurotensin*も同じ作用を有していた。

文献

- 1) G. Bertaccini, *Pharmacol. Rev.*, **28**, 127 (1976)
- 2) V. Erspamer, G. F. Erspamer, M. Inselvini, *J. Pharm. Pharmacol.*, **22**, 876 (1970)
- 3) T. Yasuhara, M. Hira, T. Nakajima, K. Araki, S. Tachibana, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 1388 (1973)
- 4) K. Araki, S. Tachibana, M. Uchiyama, T. Nakajima, T. Yasuhara, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 2801 (1973)
- 5) Y. Kikugawa, *J. Chem. Res. (S)*, 184 (1978)
- 6) R. Carraway, S. E. Leeman, *J. Biol. Chem.*, **250**, 1907 (1975)
- 7) R. Carraway, S. E. Leeman, *J. Biol. Chem.*, **248**, 6854 (1973)

論文の審査結果の要旨

Bombina orientalis の皮膚から新しい bradykinin 関連ペプチドを単離、一次構造を決定しその生理作用を bradykinin と種々比較考察した。また *Xenopus laevis* の皮膚から新物質を単離し Xenopsin と命名しその構造を決定し、その生理作用としてラット胃底筋、モルモット回腸収縮作用、ラット血糖上昇作用、毛細血管透過性亢進作用などを有することを認めた。よって薬学博士に値する論文であることを認めた。