



Title	ブラジキニン関連物質に関する研究
Author(s)	成瀬, 正織
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33128
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	なる 成	せ 瀬	まさ 正	お 織
学 位 の 種 類	薬	学	博	士
学 位 記 番 号	第	5	5	2 2 号
学位授与の日付	昭 和 57 年 2 月 12 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	ブラジキニン関連物質に関する研究			
論文審査委員	(主査)			
	教 授	青 沼	繁	
	(副査)			
	教 授	鎌 田	皎	教 授 近 藤 雅 臣 教 授 岩 田 平 太 郎

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

Bradykinin Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Argは血压降下剤血流調節, 平滑筋収縮等々の興味ある作用を有し,^{1~4)} それらの作用のある種の物質^{5~9)} によって阻害される一方, 逆にプラズマ由来のペプチド^{10~12)} やangiotensin converting enzyme (ACE) の阻害作用を有する蛇毒由来のペプチド^{13~15)} によって増強される。ACE阻害剤のなかには, 腎性高血圧症に有効なものがあり, 臨床評価が進むにつれて, 本態性高血圧症に対する効果も期待され, 注目を浴びている。^{16~19)}

一方bradykininは多くの研究者によって合成されているが, その活性の強さに差があることが指摘され, これは合成工程で狭雑する類縁物質がbradykininの活性に影響を及ぼす可能性を示唆している。

著者は循環器系の疾患に有用な薬物の研究開発およびbradykininの活性に影響を及ぼす因子の解明を目的として, bradykinin関連ペプチドを合成し, その生理作用を調べ, 興味ある知見を得た。合成にあたってまずbradykininはArg-を含有するので, その α -アミノ基の最適な保護基と考えられるp-methoxybenzyloxycarbonyl基 [Z(OMe)-]のアミノ酸の α -アミノ基への導入方法を検討して, Z(OMe)-amino-acidsの直接合成法を確立した。²⁰⁾ この研究については第一章で述べる。この方法を適用して, bradykinin関連ペプチドを合成し, その生理作用を調べた。この研究については第二章と第三章で述べる。さらにbradykinin類縁ペプチドの一つであるdes-Pro²-bradykinin [I] についてクロマトグラフィーにおける性質を検討した。この研究について第四章で述べる。

第一章 p-Methoxybenzyloxycarbonyl amino acids [Z(OMe)-amino acids] の合成²⁰⁾

第一節 p-Methoxybenzyloxycarbonyl hydrazide [Z(OMe)-NHNH₂] の合成²⁰⁾

Z (OMe)-基は結晶性やアミノ酸からの除去の点ですぐれた保護基で、Z (OMe)-amino acids は 2-3 の方法で合成されているが^{21,22)} 収率が低いうえ方法が繁雑などの欠点がある。そこでより簡便で実用的な合成法即ち Z (OMe)-Cl とアミノ酸から直接合成する方法を Chart 1 に示されるルートに従い検討した。Z (OMe)-Cl は anisyl alcohol と COCl₂ とから合成し、それを Z (OMe)-NHNH₂ に誘導して確認した。種々の条件での Z (OMe)-NHNH₂ の収率は Table 1 に示される。Z (OMe)-Cl の合成において、塩基触媒として、Pyridine を使用すると、生成物の分解がはげしく、Z (OMe)-NHNH₂ への誘導に際して、tri (P-methoxybenzyl) hydrazine および、その塩酸塩、1,2-di (p-methoxyphenyl) ethane などの副生物が多量に生成した。pyridine にかえて無水エーテルを溶媒兼用で用いると、好収率で Z (OMe)-NHNH₂ が得られた。

Chart 1 Direct Synthesis of Z(OMe)-Amino Acids

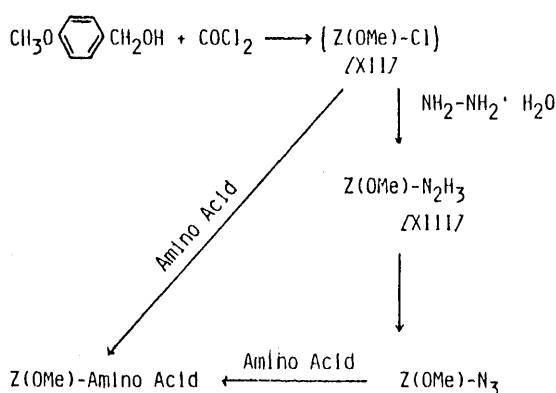


Table 1 Yield of Z(OMe)-NHNH₂ in Several Reaction Condition

Z(OMe)-Cl					Z(OMe)-NH-NH ₂			
CH ₃ O-C ₆ H ₄ -CH ₂ OH	COCl ₂	Pyridine	Temp.	Solvent	NH ₂ -NH ₂ ·H ₂ O	Temp.	Solvent	Yield
Mol	Mol	Mol	°C		Mol			%
1	1.5	1	0	Anhyd, Ether	4	R.T.	CHCl ₃	0
1	2.0	1	<-60	Anhyd, Ether	4	R.T.	CHCl ₃	44.1
1	2.0	0	-20	Anhyd, Ether	10	R.T.	CHCl ₃	84.7
1	2.0	0	0	Anhyd, Ether	10	R.T.	CHCl ₃	89.0
1	2.0	0	15-20	Anhyd, Ether	10	R.T.	CHCl ₃	85.4
1	2.0	0	15-20	THF	10	R.T.	CHCl ₃	81.3
1	2.0	0	15-20	Benzene	10	R.T.	CHCl ₃	67.8
1	2.0	0	0	Ether	10	R.T.	Ether	80.0

R.T.: Room Temperature

第二節 P-Methoxybenzyloxycarbonyl amino acids の合成²⁰⁾

第一節の研究で確立した最適条件で Z (OMe)-Cl を合成し、引続き種々のアミノ酸と苛性アルカリ

Table II Yield of Z(OMe)-Amino Acids

Z(OMe)-Amino Acids	Yield %
L-Phe*	85.8
Gly	84.7
L-Ala	96.3
L-Val	78.8
L-Leu*	80.0
L-Ile*	81.1
L-Thr*	57.9
L-Pro*	94.3
L-Met*	84.4
S-P-Methoxybenzyl-	
L-Cys	78.2
O-Benzyl-L-Tyr	82.9
L-Gln	70.0
L-Asn	41.3
L-Glu	84.0
ϵ -Z-L-Lys*	71.4
γ -Benzyl-L-Glu	71.4
N ⁶ -Nitro-L-Arg	69.3

* Dicyclohexylamine Salt

ペプチド結合の合成にはP-nitrophenyl, pentachlorophenyl, hydroxysuccinylなどの活性エステル法や water soluble carbodiimideを用いる縮合法によった。保護基の除去には, Pd-Cを触媒とする接触還元や無水HF-anisole法²⁵⁾を用いた。粗ペプチドは再結晶法やCM-celluloseを用いる ion-

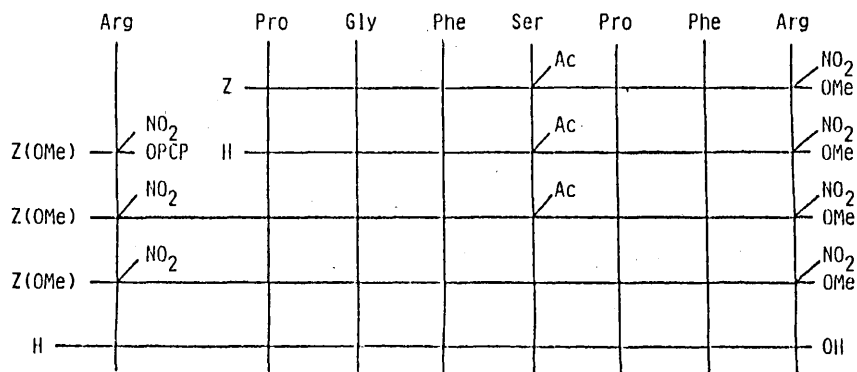
の存在下反応させて, Z(OMe)-amino acidsを合成した。その収率はTable IIに示される。この研究で確立したZ(OMe)-amino acidsの合成法は広くペプチド合成に活用されているとともに工業的にも応用可能である。

第二章 Bradykinin関連ペプチドの合成^{23, 24)}

第一章で述べた方法で合成したN^α-P-methoxybenzyloxycarbonyl-N^α-nitroarginine法を活用して10種のbradykinin関連ペプチド即ちArg-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg [I], Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg [II], Arg-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg [III], Arg-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg [IV], Phe-Ser-Pro-Phe-Arg [V], Arg-Ser-Pro-Phe-Arg [VI], Arg-Pro-Phe-Arg [VII], Pro-Phe-Arg [VIII], Arg-Pro-Arg [IX], Arg-Arg [X]を合成した。アミノ基の保護にはさきに述べたp-methoxybenzyloxycarbonyl基のほか、t-amylloxycarbonyl基, t-butyloxycarbonyl基, benzyloxycarbonyl基などを, カルボキシ基の保護には主としてbenzyl esterを用い,

Chart 2 Synthesis of Bradykinin-related Peptides

Arg-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg /I/



exchange chromatography, Sephadex LH-20を用いる column chromatographyによって精製した。各ペプチドはHPLCにて単一成分であった。合成したbradykinin関連ペプチドの物理および分析データ、Table IIIとIVに、そのうちの代表的ペプチドdes-Pro²-bradykinin [I] の合成経路をchart 2に示す。

Table III Structures and Physical and Analytical Data of Bradykinin-related Substances

Peptides	Formula (X) $\frac{25}{D}$	(c, Solvent)	Elemental Analysis				Amino Acid Analysis			
			Calcd				Calcd			
			(Found)				(Found)			
			C	H	N	Arg	Pro	Gly	Ser	Phe
I	C ₄₉ H ₈₄ N ₁₄ O ₁₉	-58.4 (0.5 1% AcOH)	50.15	7.22	16.17	2	2	1	1	2
			50.31	7.53	17.08	2.00	1.89	1.00	0.89	2.02
			52.44	7.08	14.92	1	2	1	1	1
II	C ₄₁ H ₆₆ N ₁₀ O ₁₅	-50.4 (0.4 H ₂ O)	52.36	6.53	15.16	1.01	1.82	0.92	0.74	2.00
			48.63	7.19	16.03	2	1	1	1	2
III	C ₄₆ H ₈₁ N ₁₃ O ₂₀	-50.7 (0.5 H ₂ O)	48.04	6.65	15.91	1.97	1.14	0.81	1.00	2.41
			47.81	7.45	15.93	2	1		1	2
IV	C ₄₂ H ₇₈ N ₁₂ O ₁₉	-34.6 (0.4 H ₂ O)	48.07	7.16	16.19	1.86	1.01		0.84	2.00
			54.53	7.00	14.96	1	1		1	2
V	C ₃₄ H ₅₂ N ₈ O ₁₁	-37.0 (0.5 H ₂ O)	54.51	7.07	15.15	1.02	1.05		0.89	2.00

I Arg-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg 2AcOH 5H₂O ; II Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg AcOH 4H₂O ;
 III Arg-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg 3AcOH 5H₂O ; IV Arg-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg 2AcOH 7H₂O ;
 V Phe-Ser-Pro-Phe-Arg 0.5AcOH 3H₂O

Table IV Structures and Physical and Analytical Data of Bradykinin-related Substances

Peptides	Formula (X) $\frac{25}{D}$	(c, Solvent)	Elemental Analysis				Amino Acid Analysis			
			Calcd				Calcd			
			(Found)				(Found)			
			C	H	N	Arg	Pro	Gly	Ser	Phe
VI	C ₃₃ H ₅₉ N ₁₁ O ₁₃	-40.4 (0.6 H ₂ O)	48.46	7.27	18.84	2	1		1	1
			48.26	7.61	18.40	2.00	1.02		0.80	1.00
			47.80	7.74	17.94	2	1			1
VII	C ₃₁ H ₅₈ N ₁₀ O ₁₃	-33.0 (0.7 H ₂ O)	47.28	7.60	18.21	2.03	1.06			1.00
			54.32	7.14	16.53	1	1			1
VIII	C ₂₃ H ₃₆ N ₆ O ₇	-21.6 (0.5 H ₂ O)	54.35	7.51	16.52	1.00	0.97			1.04
			48.64	7.26	18.91	2	1			
IX	C ₂₇ H ₄₈ N ₉ O _{10.5}	+7.7 (0.6 DMF)	49.00	7.46	18.83	2.00	0.97			
			41.02	7.75	23.92					
X	C ₁₆ H ₃₆ N ₈ O ₈	-15.1 (0.7 H ₂ O)	40.87	8.01	24.13					

VI Arg-Ser-Pro-Phe-Arg 2AcOH 2H₂O ; VII Arg-Pro-Phe-Arg 2.5AcOH 3H₂O ; VIII Pro-Phe-Arg 1.5AcOH ;
 IX Arg-Phe-Arg 3AcOH 0.5H₂O ; X Arg-Arg 2AcOH H₂O

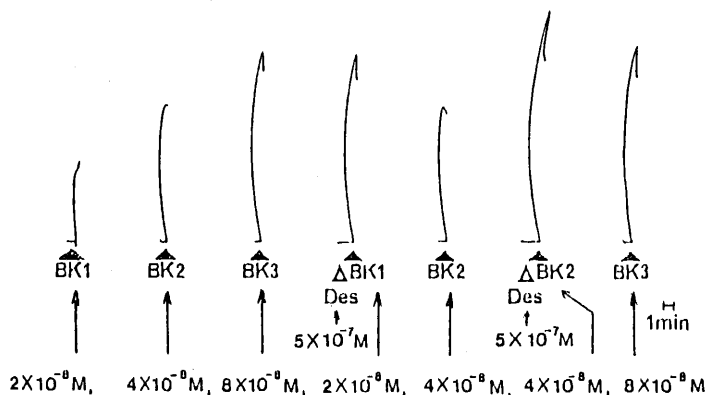
第三章 Bradykinin関連ペプチドの生理作用²⁴⁾

合成した bradykinin 関連ペプチドの生理作用について、まず摘出したモルモットの回腸を用いて bradykinin 様の平滑筋収縮作用および bradykinin による平滑筋収縮に対する影響を調べ、日本産マムシ *Agkistrodon halys blomhoffii* から得られる bradykinin potentiator B (Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro) の²⁶⁾ 活性と比較した。最も活性の強かったペプチド des-Pro²-bradykinin [I] についてラットの血圧に対する作用および bradykinin による血圧下降に対する影響を調べ、SQ14225の活性と比較検討した。さらに作用機序の解明の目的から、angiotensin converting enzyme 阻害作用を調べた。

第一節 Bradykinin によるモルモット摘出回腸の収縮に対する増強作用²⁴⁾

モルモット摘出回腸を Tyrode 溶液中に懸垂し、Magnus 法にて被験物質の活性を測定した。合成した bradykinin 関連ペプチドには bradykinin 様作用は認められなかった。次に bradykinin 増強作用を検討した。被験ペプチドを反応槽に添加し、1 分間回腸を処理したのち、bradykinin を添加した。Fig. 1 には Des-Pro²-bradykinin [I] による増強効果が示されている。即ち BK₁, BK₂, BK₃ は反

Fig. 1 Effect of Des-Pro²-Bradykinin on Contracile Responses of Isolated Guinea Pig Ileum to Bradykinin



応槽内の bradykinin 濃度が 2×10^{-8} , 4×10^{-8} , 8×10^{-8} M における回腸の収縮を示し、収縮は用量依存的に強くなった。

次に des-Pro²-bradykinin [I] を反応槽に添加し、(反応槽内濃度は 5×10^{-7} M)、回腸の収縮がおこらないことを確認したのち、引続き 2×10^{-8} M の bradykinin で処理すると、回腸の収縮は増強され、収縮の強さは 8×10^{-8} M の bradykinin によるそれと同程度であった。同様に 5×10^{-7} M の des-Pro²-bradykinin [I] と 4×10^{-8} M の bradykinin とで処理すると、収縮は 8×10^{-8} M の bradykinin で処理した場合のそれよりも強かった。Arg-Arg [X] 以外のペプチドは 2×10^{-7} から 3.4×10^{-4} M までの濃度範囲で、bradykinin の活性を増強させた。活性の強さを比較するために、bradykinin の活性を 2 倍に増強させるのに必要な各ペプチドの濃度を求めた。Table V のその結果が示されている。最も活性の強かったペプチドは des-Pro²-bradykinin [I] で、 0.2×10^{-6} M の濃度で bradykinin の活性を 2 倍に増強させ、その強さは日本産マムシ *Agkistrodon halys blomhoffii* の毒成分の一つで

Table V Potentiation of Bradykinin-Induced
Contraction of Guinea Pig Ileum by
Bradykinin Related Substances

Peptides	Concentration* x 10 ⁻⁶ M
I	0.20 ± 0.09
II	5.5 ± 0.11
III	0.82 ± 0.01
IV	2.7 ± 0.16
V	59.0 ± 1.35
VI	6.0 ± 0.09
VII	6.7 ± 0.14
VIII	123.0 ± 0.77
IX	42.0 ± 0.35
X	> 500.0
Arg	340.0 ± 9.35
XI	0.38 ± 0.11

Concentration of Peptides in Tyrode Solution Required to
Double the Bradykinin Activity. XI: Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-
Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro (Potentiator B).

ある bradykinin potentiator B (IX: Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro) のそれ (0.38×10^{-6} M にて活性を 2 倍に増強) の約 2 倍であった。Arg は弱いながらも増強活性を有するが, Arg-Arg [X] は 500×10^{-6} M の濃度においても増強活性がなかった。構造と活性との相関について考察すると, 次の 2 点が示唆される。即ち

① ペプチドの構造が bradykinin に近くなる程増強活性は強くなる。

② N 末への Arg の導入は増強活性を強める。

① から bradykinin 関連ペプチドの増強活性の機序として kininase による bradykinin の分解の拮抗的な抑制が推定される。一方 N 末への Arg の導入により活性は 18.4—27.5 倍強くなり, 例えば Pro-Phe-Arg [VIII] は 123.0×10^{-6} M の濃度で bradykinin の活性を 2 倍に増強させるのに対し, Pro-Phe-Arg [VIII] に Arg を導入した Arg-Pro-Phe-Arg [VII] のそれは 6.7×10^{-6} M であり, Phe-Ser-Pro-Phe-Arg [V] では 59.0×10^{-6} M であるのに対し, Arg-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg [IV] では 2.7×10^{-6} M, Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg [II] では 5.5×10^{-6} M に対し, Arg-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg (des-Pro²-bradykinin) [I] では 0.20×10^{-6} M であった。

Bradykinin potentiator として知られている物質には, 2,3-dimercaptopropanol や thioglycolic acid などの SH 化合物²⁷⁻²⁹⁾ glutation,³⁰⁾ ε-aminocaproic acid,³¹⁾ tetraethylammonium 化合物,³²⁾ guanetidine, dibenzamine, Phenoxybenzamine,³³⁾ ある種の血漿成分^{11,34-38)} 蛇毒成分^{13,39-41)} な

どがあるが、それらの構造には共通性がないうえ、bradykininの構造との類似性もなく、bradykinin関連ペプチドにその増強活性が見出されていたのは今回がはじめてである。bradykinin以外の平滑筋を収縮させる物質例えばacetylcholineによって誘発される回腸の収縮に対しては、des-Pro-bradykinin〔I〕は影響を及ぼさなかった。

第二節 Bradykininによるラットの血圧下降に対する増強作用²⁴⁾

ウレタン麻酔したウイスター系ラットに0.1, 1, 3, 10 $\mu\text{g/kg}$ のbradykininを静注すると、血圧は用量依存的に下降し、30秒後にはそれぞれ最低値 4.9 ± 0.7 , 8.3 ± 1.2 , 15.8 ± 1.2 , $26.3 \pm 1.8 \text{ mmHg}$ となり、2分後にはほぼ投与前のレベルまで回復した。その結果はFig. 3に示されている。Bradykinin関連ペプチドについては、それらのうちのモルモット回腸に対するbradykinin増強活性が最も強かったdes-Pro²-bradykinin〔I〕を選んで検討し、SQ14225と比較した。

Fig. 2 Effect of Bradykinin on Carotid Arterial Blood Pressure of Anesthetized Rats

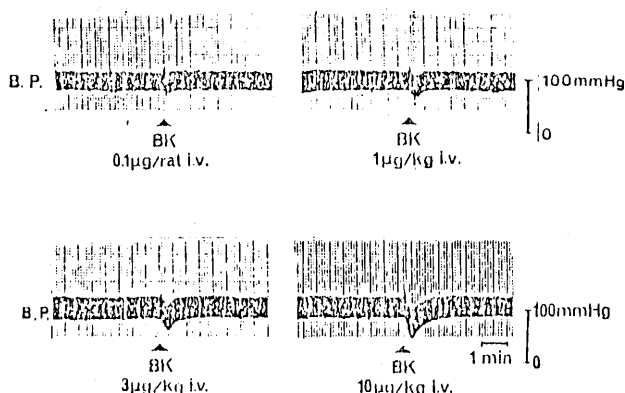
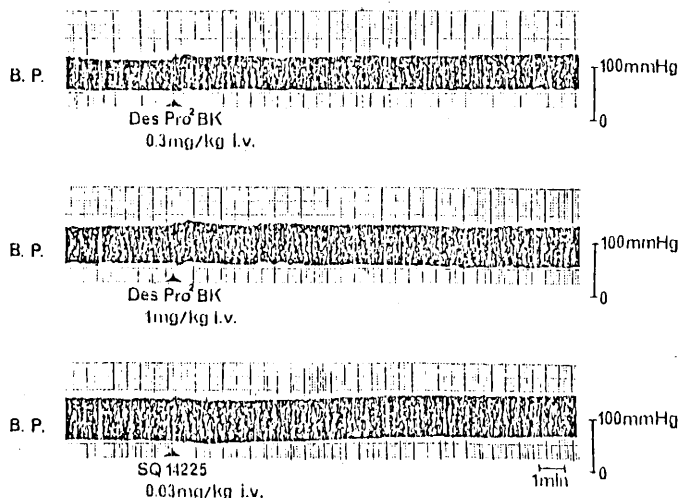


Fig. 3 Effect of Des-Pro²-Bradykinin and SQ 14225 on Carotid Arterial Blood Pressure of Anesthetized Rats

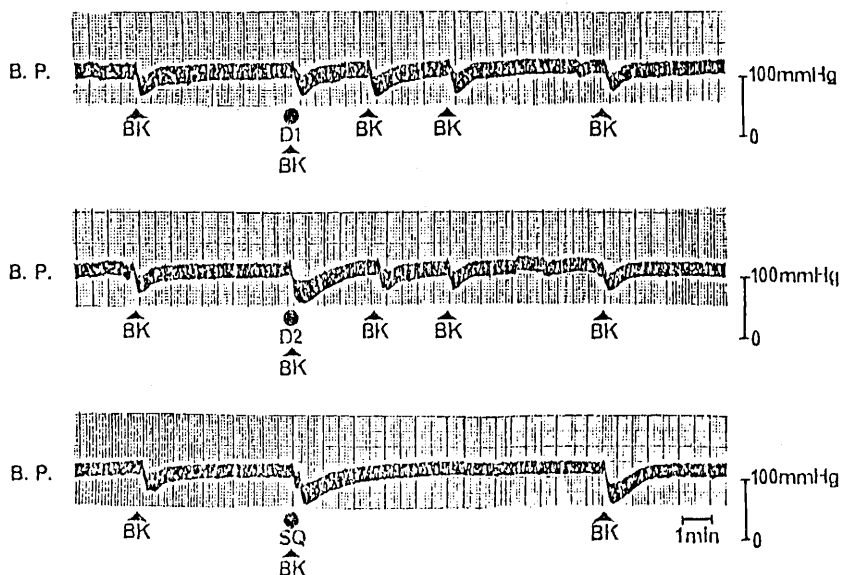


両者それぞれ単独で静注した場合の血圧の変化はFig. 3に示され、des:Pro²-bradykinin〔I〕を0.1—1 mg/kg、静注しても血圧下降は認められず、逆にわずかな上昇傾向（2—15 mmHg）があり、5分

後には投与前のレベルに回復した。血圧上昇は有意ではなく、全体として血圧に対する影響はないと考えられる。一方SQ14225を0.03mg/kg静注すると、1—2分後に血圧はやや下降し（5—15mmHg）、5分後にはもとのレベルに戻ったが、その後やや上昇傾向が続いた。

併用効果についてはFig. 4に示されている。まず3 μ g/kgのbradykininを静注して、血圧の下降を確認し、もとのレベルに戻った後、D₁、D₂ではdes-Pro²-bradykinin〔I〕を0.1、0.3mg/kg、SQではSQ14225を0.03mg/kgそれぞれ静注し、次いで3 μ g/kgのbradykininをdes-Pro²-bradykinin〔I〕の投与と同時に、2.5、5、10、20分後に、およびSQ14225の投与と同時に、10、20分後にそれぞれ投与した。

Fig. 4 Effect of Des-Pro²-Bradykinin and SQ 14225 on Bradykinin Vasodepressive Responses of Anesthetized Rats



増強活性はbradykininを単独投与した場合の血圧下降が、併用投与によってどれだけ増強されたかを%として表示した。その結果はFig. 4とTable VIに示されている。des-Pro²-bradykinin〔I〕を0.1または0.3mg/kgとbradykinin 3 μ g/kgとを同時に静注すると、bradykininによる血圧下降は有意に増強され、増強率はそれぞれ39.8 $\pm$ 15.5、90.6 $\pm$ 19.5%であった。bradykininの投与2.5分後には血圧はもとのレベルまで回復するので、des-Pro²-bradykinin〔I〕の投与（各実験において1回だけ投与）2.5、5、10、20分後にbradykininを再投与しても増強効果は認められなかった。

一方SQ14225を0.03mg/kg静注し、さらにbradykininを同時、10、20分後にそれぞれ静注すると、血圧下降は有意に増強され、増強率は127.1 $\pm$ 24.0、153.6 $\pm$ 20.4、159.5 $\pm$ 29.7%であった。des-Pro²-bradykinin〔I〕による増強効果は一過性であるのに対し、SQ14225のそれは持続性であった。

以上の結果を図で表示したのがFig. 5である。

Bradykinin以外の血圧下降性物質、例えばacetylcholineの静注によるラットの血圧下降に対しては、des-Pro²-bradykinin〔I〕は殆んど影響を及ぼさなかった。

Table VI Potentiating Effects of Des-Pro²-Bradykinin and SQ 14225 on Bradykinin-Induced Vasodepression

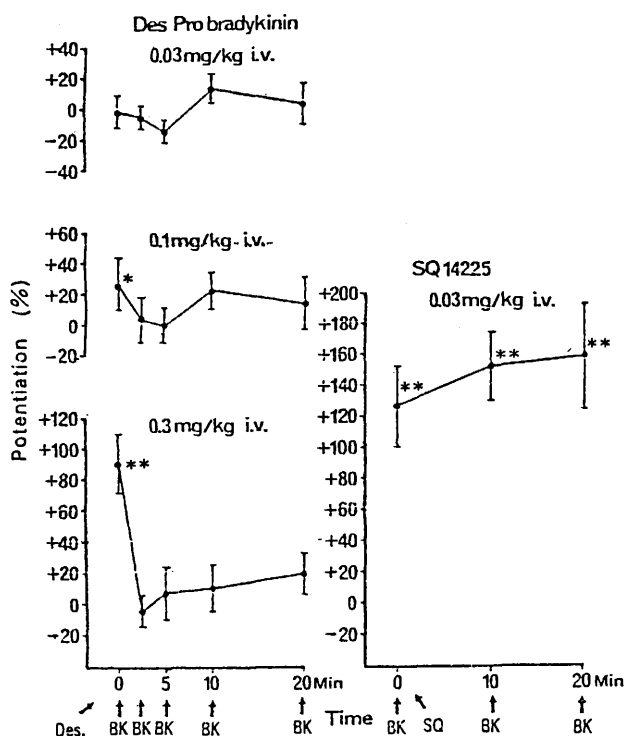
Time (min)		0	2.5	5	10	20
Time (min)	Bradykinin	3	3	3	3	3 µg/kg
	Potentiator					
0	Des-Pro ² -Bradykinin					
	30 µg/kg	-1.8±10.6	-5.5±8.0	-13.5±10.7	13.4±10.2	3.1±15.3
	100	39.8±15.5*	3.1±15.5	-0.8±12.1	22.9±13.3	13.8±17.6
	300	90.6±19.5**	-5.3±11.3	7.7±18.6	10.1±11.6	19.6±13.4
	SQ 14225					
	30 µg/kg	127.1±24.0**			153.6±20.4**	159.5±29.7**

*: P < 0.05 as compared with bradykinin alone

**: P < 0.01 as compared with bradykinin alone

The paired t-test was performed.

Fig. 5 Change in i.v. Bradykinin induced Vasodepression by Des-Pro²-Bradykinin and SQ 14225

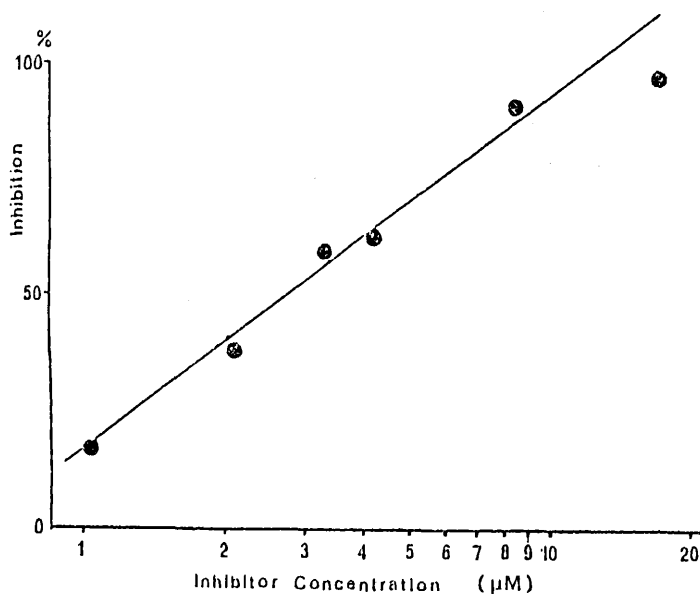


最近荒川⁴²⁾らはヒトの血漿蛋白をtrypsin処理して得られる降圧性ペプチドの一つはdes-Pro-bradykininであることをアミノ酸分析値やTLCのデータをもとにして報告している。著者の合成したdes-Pro²-bradykinin〔I〕は単独では降圧作用を示さなかった。荒川らの単離したペプチド成分には類縁の降圧ペプチド例えばbradykininが狭雑しているか、あるいはそれはアミノ酸配列を異にするdes-Pro-bradykininと予想される。この成分の精製がさらに進められ、そこからdes-Pro-bradykinin〔I〕が単離同定されるようなことになれば、生体内に強力な降圧性ペプチドとそれを微調整する類縁の成分とが存在し、後者はその使命からして短時分にて分解し失活するという生体にとって極めて合理的な、学問的にも興味ある機構を想定することが可能となる。

第三節 Bradykinin増強作用の作用機序⁴⁴⁾

次にbradykinin関連ペプチドのbradykinin増強作用の作用機序について検討した。増強作用はその構造がbradykininに近くなればなるほど強くなり、かつ作用時間が短いことや蛇毒由来の増強ペプチドはangiotensin converting enzymeを阻害すること⁴⁰⁾などから、bradykinin関連ペプチドの作用機序として、この酵素の阻害が予想される。そこで増強活性の最も強かったdes-Pro²-bradykinin〔I〕を選んで、阻害活性を測定した。阻害活性はcushmanらの方法⁴³⁾に準じ、家兔の肺臓から抽出したangiotensin converting enzymeを使用し、Hip-His-Leuからhippuric acidの生成を比色定量することにより求めた。Fig. 6にその結果が示されている。des-Pro²-bradykinin〔I〕は濃度依存的にangiotensin converting enzymeを阻害し、そのIC₅₀は2.7 μ Mであった。bradykininにも弱いながら、この酵素を阻害するので、⁴⁴⁾ des-Pro²-bradykinin〔I〕にも、angiotensin converting

Fig. 6 Relationship of Des-Pro²-Bradykinin Concentration to Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme

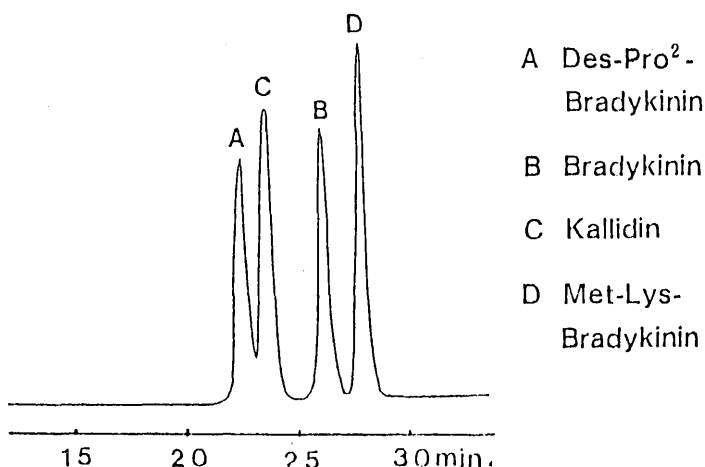


enzyme阻害作用が認められるのはよく理解出来る。以上の実験から合成したbradykinin関連ペプチドの作用機序はangiotensin converting enzyme阻害であると結論される。さきにも述べたように、des-Pro²-bradykinin [I]の増強活性は比較的短かったが、それはこのペプチドはangiotensin converting enzymeを阻害する一方で、この酵素により分解されることによるのであろう。

第四章 Des-Pro²-bradykinin [I]のchromatographyにおける性質²³⁾

Des-Pro²-bradykinin [I]はin vitroおよびin vivoにおいて、bradykininの作用を増強することから、bradykininの活性を正確に測定するには類縁物質とりわけ生理活性物質を完全に分離しておく必要がある。そこでそれらの分離をchromatographyにて検討した。まずcellulose platesを使用するTLCでは、des-Pro²-bradykinin [I]とbradykininのRf値は一致し、通常のTLC system例えばBuOH:AcOH:H₂O (4:1:5 v/v upper phase)やBuOH:AcOH:Pyridine:H₂O (15:3:10:12 v/v)などの系では、分離不可能なうえ、PHが2, 4.5, 6.5における濾紙電気泳動においても両者を分離出来なかった。そこでHPLCによってそれらの分離を試みた。

Fig. 7 Separation of Bradykinin Derivatives on HPLC



Des-Pro²-bradykinin [I], bradykinin, Kallidin, Met-Lys-bradykininを各 2.2μg/2ulになるように混合して被分離原液とし、eluantには、10mMのH₃PO₄-K₂HPO₄ buffer (PH 2.4)を用い、flow rate 1ml/minとした。Fig.7にHPLCによる流出チャートが示されている。この条件におけるHPLCによって、des-Pro²-bradykinin [I]はbradykininの100分の1の少量であっても、bradykinin, Kallidin, Met-Lys-bradykininの1:1:1の混合物から分離出来た。この方法は天然のbradykinin混合成分のみならず、合成bradykininからのdes-Pro²-bradykinin [I]の検出、分離や分取に有用である。以上の研究から従来から指摘されている合成bradykininの活性力価に差がある原因の一つは合成工程で夾雑するbradykinin関連ペプチド類の検出と分離が不完全であったため、bradykinin標品の力価が影響をうけたことによると考えられる。

まとめ

1. 循環器疾患に有用な薬物の研究開発, およびbradykininの活性に影響を及ぼす因子の解明を目的

- として, bradykinin関連ペプチドを合成し, その生理作用と chromatographyでの性質を調べた。
2. 合成にあたって, Argの最適な保護基と考えられる p-metkoxybenzyloxycarbonyl基 [Z (OMe)-] のアミノ酸の α -アミノ基への直接導入法を検討し, Z (OMe)-amino acidsの一般的合成法を開発した。この方法はペプチド化学の研究面で広く活用され, 工業的にも応用可能である。
 3. 2の方法を活用して合成したbradykinin関連ペプチドには, bradykinin様のモルモット回腸の収縮作用は認められなかったが, bradykinin様作用を増強し, 最も活性の強かつdes-Pro²-bradykinin [I] は 0.2×10^{-6} Mの濃度で, bradykininの活性を2倍に増強し, 蛇毒由来のpotentiator Bの約2倍の強さであった。この増強活性において, N末のArgは重要な因子である。
 4. Des-Pro²-bradykinin [I] は単独ではラットの血圧に影響を及ぼさなかったが, bradykininと同時に静注すると, bradykininによる血圧降下を有意に増強し, 0.3mg/kgの静注における増強率は90.6%であった。
 5. Des-Pro²-bradykinin [I] は家兎の肺臓由来のangiotensin converting enzymeを阻害し, そのIC₅₀は 2.7μ Mであった。このことからbradykinin増強作用の機序はangiotensin converting enzymeの阻害によるbradykininの分解失活の抑制と考えられる。
 6. Bradykinin関連ペプチドにbradykinin増強活性が認められるので, bradykinin標品の活性力価に差があるのは, これらの生理活性な類縁ペプチドの夾雑によるとみられる。従って天然由来, 合成品を問わずbradykininの力価測定にはこれらの類縁物質を完全に分離する必要がある。
 7. それは通常のTLC systemや濾紙電気泳動では不可能で, HPLCによって達成される。

References

- 1) M. E. Webster, "Report of the committee on nomenclature for hypotensive peptides", p. 648, 1966
- 2) E. G. Erdos, "Hypotensive peptides: bradykinin, Kallidin and eledoisin in advance in pharmacology" p. 1, 1966
- 3) G. P. Lesis, Physiol. Rev., **10**, 647 (1960)
- 4) M. Schachter, Ann. Rev. Pharmacol. **4**, 281 (1964)
- 5) E. D. Nicolaides, J. Med. Chem., **6**, 524 (1963)
- 6) K. Suzuki, Chem. Pharm. Bull., **14**, 1017 (1966)
- 7) K. Suzuki, Chem. Pharm. Bull., **15**, 536 (1967)
- 8) K. Suzuki, Chem. Pharm. Bull., **15**, 1212 (1967)
- 9) K. Suzuki, Chem. Pharm. Bull., **15**, 1508 (1967)
- 10) A. J. Osbahr, Biochem. Biophys. Acta, **86**, 535 (1964)
- 11) K. Buluk, Brit. J. Pharmacol., **35**, 79 (1969)
- 12) U. Hamberg, Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl., **24**, 21 (1969)
- 13) S. H. Ferreira, Brit. J. Pharmacol., **24**, 163 (1965)
- 14) H. Kato, Proc. Jap. Acad., **46**, 176 (1970)

- 15) J. L. Green, *Pharm. Res. Comm.*, **1**, 159 (1969)
- 16) 熊原雄一, *臨床科学*, **15**, 281 (1979)
- 17) B. Rubin, "Pharmacol. Antihypertensive Drugs," p. 21, 1980
- 18) K. Yamamoto, "Prophyl. Appr. Hypertensive Disease," p. 353, 1980
- 19) C. S. Sweet, *Nature*, **288**, 280 (1980)
- 20) S. Sakakibara and M. Naruse, *Experientia*, **25**, 576 (1969)
- 21) F. Weygand and K. Hunger, *Chem. Ber.*, **95**, 1 (1962)
- 22) J. H. Jones and G. T. Young, *Chem. & Ind.*, 1722, (1966)
- 23) M. Naruse, *Chem. Pharm. Bull.*, "In Press"
- 24) M. Naruse, *Chem. Pharm. Bull.*, "In Press"
- 25) S. Sakakibara, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **40**, 2164 (1967)
- 26) T. Suzuki, *Experientia*, **25**, 694 (1969)
- 27) S. H. Ferreira, *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 1123 (1962)
- 28) W. Auerswald, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **168**, 188 (1967)
- 29) M. Cirstea, *Brit. J. Pharmacol.*, **25**, 405 (1965)
- 30) H. Edery, *Brit. J. Pharmacol.*, **35**, 51 (1969)
- 31) W. Doleschol. *Experientia*, **22**, 540 (1966)
- 32) P. A. Khairalah, *Am. J. Physiol.*, **200**, 51 (1961)
- 33) R. Capek, *Arch. Exptl. Pat. Pharmacol.*, **236**, 101 (1959)
- 34) J. A. Gladner, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **104**, 47 (1963)
- 35) B. Blombäck, *Acta Chem. Scand.*, **17**, 1819 (1963)
- 36) K. Laki, *Physiol. Rev.*, **44**, 127 (1964)
- 37) P. N. Arsen, *Brit. J. Pharmacol. Chemother.*, **32**, 453 (1968)
- 38) U. Hamberg, *Advan. Exptl. Med. Biol.*, **2**, 626 (1968)
- 39) S. H. Ferreira, *Biochemistry*, **9**, 2583 (1970)
- 40) H. Kato, *Biochemistry*, **10**, 972 (1971)
- 41) H. Kato, *Experientia*, **26**, 1205 (1970)
- 42) K. Arakawa, *Koketsuatsu*, **3**, 1 (1980)
- 43) D. W. Cushman, *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637 (1971)
- 44) G. E. Sander, *Biochem. Biophys. Acta*, **242**, 662 (1971)

論文の審査結果の要旨

循環器疾患に有用な薬物の研究開発, および bradykinin の活性に影響を及ぼす因子の解明を目的と

して, bradykinin関連ペプチドを合成し, その生理作用と Chromatographyでの性質を調べた。

合成にあたって簡便な直接合成法を確立し, 得られた関連ペプチドを摘出モルモット回腸収縮試験
ラット血圧下降試験などを用い検定し, ブラジキニンの2倍又は3倍の活性を有する物のあることを
認めた。さらにそれぞれの新しい作用機序の研究を進め新知見を得た。

よって薬学博士として価値ある論文と認める。