

## 愛情ホルモンで知られる「オキシトシン」の新規アンタゴニストを発見 ～新規の早産治療薬開発やオキシトシンの進化・構造解明に期待～

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院工学研究科の本多 裕之 教授らの研究グループは、愛情ホルモンとして知られるオキシトシン<sup>注1)</sup>のアミノ酸残基を別の天然アミノ酸に置換することで、オキシトシンの新規アンタゴニスト<sup>注2)</sup>を発見しました。

オキシトシン (CYIQNCPLG<sup>注3)</sup>) は、アミノ酸 9 個が結合し環状構造を持つペプチドホルモンで、スキンシップや授乳、他者との信頼関係が醸成される際に分泌されると言われており、愛着を深めるためだけではなく、ストレス緩和や情緒安定にも寄与すると言われてる重要なペプチドです。

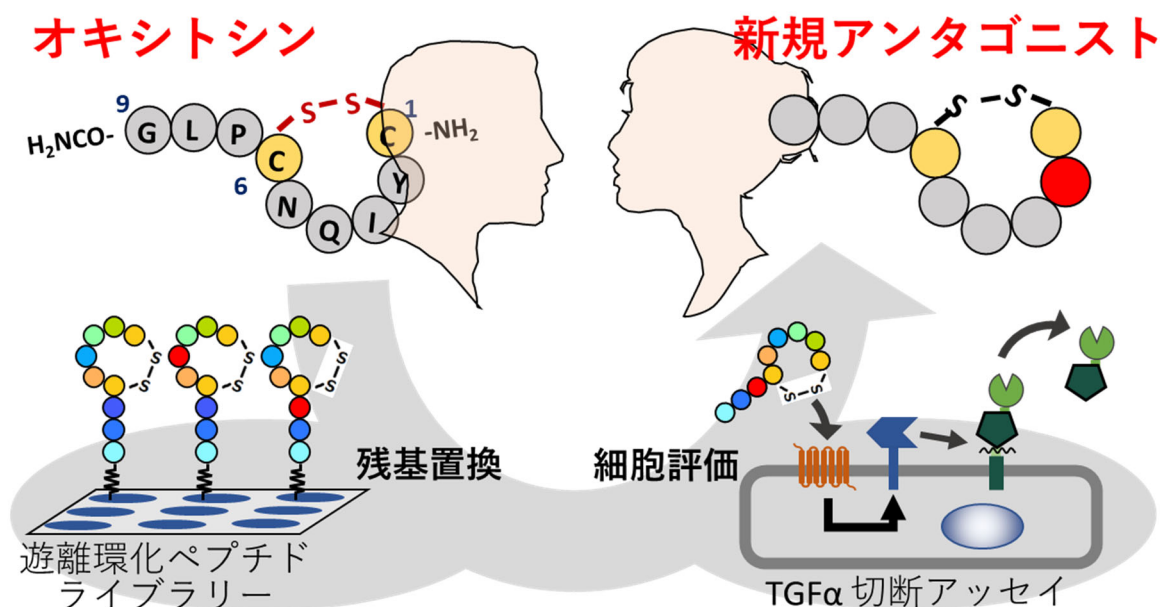
またオキシトシンは、子宮収縮作用があるため分娩誘発剤として使われますが、近年では自閉症にも効果があることが分かり、利用の拡大が進められています。一方、受容体の活性化を阻害するアンタゴニストは、切迫早産の治療薬として開発されています。

同グループは、Fmoc 固相合成法<sup>注4)</sup>で環状ペプチドを合成し、光開裂リンカー<sup>注5)</sup>で遊離させる遊離環化ペプチドライブラリーを作製する技術を開発、オキシトシンのアミノ酸残基を置換した類縁体を 80 種以上合成し、その機能を明らかにしました。その結果、2 残基目のチロシン (Y) の置換体がアンタゴニスト活性に特に重要で、ロイシン (L)、イソロイシン (I)、トリプトファン (W) 置換体で活性を示し、W 置換体で市販のアンタゴニスト、アトシバンと同程度の阻害作用を示すことが分かりました。これは新規の早産治療薬開発につながるだけでなく、オキシトシンの進化や構造に関する新しい知見として重要です。

本研究成果は、2021 年 11 月 9 日付オープンアクセスジャーナル「ACS Omega, 6 (2021)」に掲載されました。

## 【ポイント】

- ・遊離環化ペプチドライブラリーの作製に成功した。
- ・80種以上の1残基置換体を評価した結果、アンタゴニスト活性を示す置換体が得られた。
- ・分子構造上、同一面に存在する2~5残基目の疎水度がアンタゴニスト活性に重要。
- ・2残基目のW置換体で市販のアンタゴニスト、アトシバンと同程度の阻害作用を示した。



## 【研究背景と内容】

### ペプチドホルモン

生体内で作られるペプチド類のことであり、多くは血液を通して体内を循環し、標的細胞の表面で固有の受容体と相互作用し、生理活性を示します。インスリン、グルカゴンなどの膵臓ホルモン、ガストリン、コレシストキニンなどの消化器系ホルモン、バソプレッシン、オキシトシン、成長ホルモンなどの視床下部・脳下垂体ホルモンなどがあります。多くは分子内もしくはサブユニット間で共有結合を形成し、堅牢な分子構造をもち、受容体と高い親和性を示します。

### オキシトシン (OXT)

オキシトシン (OXT) は CYIQNCPLG (2つのCの間はジスルフィド結合) の9残基からなる環化ペプチドで、脳下垂体から分泌され、OXT受容体と結合して様々な生理機能を発揮します。愛情ホルモンとも呼ばれ、出産時に子宮収縮作用を促すだけでなく、授乳時に乳汁分泌も促します。触覚との関連性が示されており、スキンシップにより両方で分泌されることが知られています。OXT投与で他者への信頼が増加すると言われており、愛・信頼・認識に基づいて行われる、社会全体の活動や人の行動の基盤に深く関与すると考えられています。脳科学的、精神科学的アプローチも行われており、自閉症に対してOXT投与が効果的で、愛着を深めるためだけでなく、ストレス緩和

や情緒安定にも寄与すると言われていています。OXT は細胞表面にある受容体と結合して作用しますが、受容体の活性化を阻害するアンタゴニストは、切迫早産の治療薬として開発されています。OXT は、抗利尿ホルモンとして知られているバソプレッシンと 2 つのアミノ酸残基が異なります。また進化的には、霊長類と偶蹄類、げっ歯類では完全に保存され、有袋類、鳥類、両生類では 7 残基目のみ異なり、魚類でも 4 および 7 残基の 2 か所の違いであり、動物界でその配列は高く保存されています。

### 遊離環化ペプチドライブラリー

ペプチドは Fmoc 固相合成法により、活性化セルロース膜上に化学的にスポット合成することで作製できます。N 末端を Fmoc 基で保護した  $\alpha$  アミノ酸を使用するため、ペプチドの C 末端が下方（膜側）、N 末端が上方（溶液側）を向いて合成されます。このとき、最下部に紫外線照射で開裂する光開裂リンカーを挟みこみ、さらに合成した配列中のシステイン（C）残基間にジスルフィド結合を形成することで、環化したペプチドを遊離型で合成できます。ジスルフィド結合は、20%DMSO<sup>注6)</sup> 中で 24 時間静置することで効率よく形成できます。これを遊離環化ペプチドライブラリーと呼んでいます。

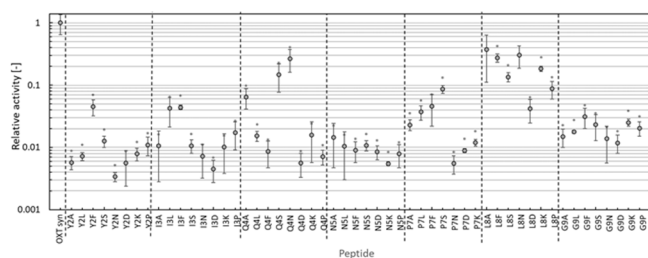
### 1 残基置換体

ペプチド配列の 1 か所のアミノ酸残基を、別の 19 種類のアミノ酸残基に交換した置換体のことです。たった 1 か所のアミノ酸残基を置換するだけでも、生理活性が大きく変わるものがあります。評価する OXT は、システイン残基以外に 7 つのアミノ酸残基があります。これら 7 つのアミノ酸残基を他のアミノ酸残基すべてに置換するのは評価置換体数が多くなるので大変です。このため、この研究では 20 種類の天然アミノ酸を次の 8 グループに分類しました。①疎水性小側鎖アミノ酸：G,A、②疎水性大側鎖アミノ酸：V,L,I,M、③芳香族アミノ酸：F,W,Y、④水酸基アミノ酸：T,S、⑤アミド基アミノ酸：Q,N、⑥負電荷アミノ酸：D,E、⑦正電荷アミノ酸：H,K,R、⑧プロリン：P。

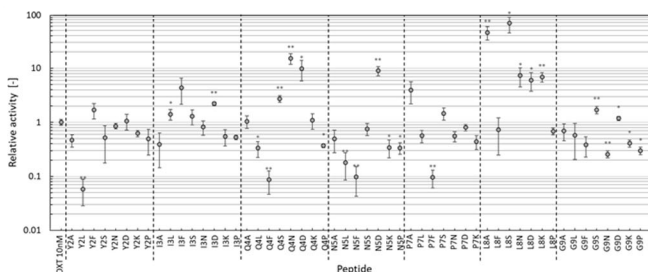
この研究では、各グループの代表アミノ酸 8 種（A,L,F,S,N,D,K,P）に置換した 53 種類を合成して評価しています。

### 活性測定

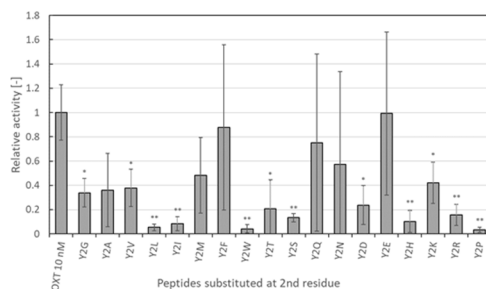
OXT、OXT 類縁体などの化合物と OXT 受容体との結合の検出のため、まずヒト胎児腎細胞である HEK293 細胞に、OXT 受容体遺伝子と AP-TGF $\alpha$  遺伝子（AP はアルカリフォスファターゼ）を導入しました。この遺伝子導入細胞に化合物を作用させ、化合物が受容体に結合し、細胞内にシグナル伝達が生じると AP-TGF $\alpha$  のエクストドメインが切断され、膜結合型 AP-TGF $\alpha$  が培地中に遊離します。遊離した AP-TGF $\alpha$  の活性を AP の基質で分析することで、化合物と受容体との結合を定量評価することができます。これは東北大学の井上飛鳥博士の開発した方法であり、TGF $\alpha$  切断アッセイ<sup>注7)</sup> と呼ばれます。



A) 残基置換体のアゴニスト活性



B) 残基置換体のアンタゴニスト活性



C) P2置換体のアンタゴニスト活性

D) アンタゴニストの解離定数

Peptide	Dissociation constant ( $K_d$ ) [nM]
Y2L	424
Y2I	101
Y2W	44
Atosiban	21

## 図 研究成果の概要

- A: 各位置のアミノ酸残基を他のグループのアミノ酸に置換した置換体でアゴニスト活性を測定。しかし OXT 以上の活性を示すものはない。P4、P8 位の置換体は比較的高い活性を維持していた。
- B: A と同じ置換体ペプチドのアンタゴニスト活性を測定（置換体を作用させた後に OXT を添加。アンタゴニスト活性があれば活性は低下する）。アゴニスト活性のあるペプチドは OXT と相加的に高活性を示したが、Y2L、Q4F、N5F<sup>注8)</sup> および P7F の 5 置換体は高いアンタゴニスト活性を示した。
- C: P2 位<sup>注9)</sup> のチロシン残基をすべての天然アミノ酸置換体を合成してアンタゴニスト活性評価。Y2L、Y2I、Y2W で高いアンタゴニスト活性を検出。
- D: 3 種の置換体を外注合成しアンタゴニスト活性の濃度依存性を評価。解離定数を算出した。Y2W は市販アンタゴニストであるアトシバンと同等の活性を示した。

## 得られた成果

システイン残基以外の 7 か所のアミノ酸残基を、8 グループの代表アミノ酸 8 種に置換した置換体 53 種類を、遊離環化ペプチドライブラリー合成法で合成しました。OXT 受容体は G タンパク質共役型受容体 (GPCR)<sup>注10)</sup> なので、HEK293 細胞に受容体遺伝子を導入し、その結合が評価できる TGF $\alpha$  切断アッセイでその活性を評価しました。

合成置換体を評価した結果、OXT 以上の活性を示すものはありませんでした。しかし P4、P8 位の置換体は比較的高い活性を維持していました。また、すべてのアミノ酸残基を D 体置換した 1 残基 D 体置換体、および任意の 2 残基を D 体に置換した 2 残基 D 体置換体も合成しましたがいずれも活性を失っていました。これらの結果を踏まえて、次に 53 種の置換体のアンタゴニスト活性を評価しました。上述の遺伝子導入 HEK293 細胞に置換体をまず作用させ、続けて OXT を作用させ、活性が阻害されるものを調べました。その結果、アゴニスト活性のあるペプチドは、予想通り OXT と相加的に高い活性を示しました。一方、Y2L、Q4F、N5F および P7F の 4 つの置換体は活性を強く阻害しました。すなわち高いアンタゴニスト活性を示すことを発見しました。分

子構造上、P2、P4、P5 位のアミノ酸残基側鎖は同一平面に存在します。これらのアミノ酸残基の疎水度がアンタゴニスト活性に重要なのであろうと考察できました。Y2L がもっとも高いアンタゴニスト活性を示しましたので、P2 位のチロシン残基をすべての天然アミノ酸置換体を合成してアンタゴニスト活性を評価しました。Y2L、Y2I、Y2W で高いアンタゴニスト活性があることを発見しました。3 種の置換体を外注合成し、アンタゴニスト活性の濃度依存性を評価しました。解離定数を算出したところ、Y2W は市販アンタゴニストであるアトシバンと同等の活性を示しました。天然アミノ酸の置換体で OXT 活性を阻害できるアンタゴニストが発見できたことは初めての知見であり、今後の創薬研究につながる成果です。また多くの置換体の活性データを示したことは、今後のオキシトシンの構造学的考察を進めるうえでも重要な発見になります。

### 【成果の意義】

オキシトシンは内在性ペプチドホルモンとして注目されており、その機能解明や類似機能および阻害作用を示す化合物は重要や創薬ターゲットです。今回、天然アミノ酸残基へ改変した置換体を評価することでアンタゴニスト活性を示す置換体が発見しました。天然アミノ酸への置換体はアゴニスト活性が高くなることはありませんでした。しかし、活性を失うだけではなく、逆にアンタゴニスト活性を示すものがありました。これは、OXT-OXT 受容体の相互作用を喪失させる（アンタゴニスト活性を示す変異化合物に代わる）遺伝子改変（進化）の可能性を残しているとも考えられます。OXT は集団としての社会活動に重要なホルモンです。OXT 受容体に結合するが、シグナル伝達しないアンタゴニスト化合物に変容するという発見は、進化工学的に興味深いです。何世代か後の人類は、集団行動を喪失した進化を遂げるのかもしれませんが。

今回得られた結果は L 体置換体 53 化合物の結果であり、この結果は分子構造学的にも大変興味深いです。また、高いアンタゴニスト活性を持つ置換体 Y2W は、新規の早産治療薬としての可能性があります。

### 【用語説明】

注 1) オキシトシン：

略記 OXT。1952 年に分子構造が決定された。OXT は上記の通り CYIQNCPLG (2 つの C の間はジスルフィド結合) の 9 残基からなる環化ペプチドで、脳下垂体から分泌され、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である OXT 受容体と結合して様々な生理機能を発揮するため、現在も大きな注目を浴びている。

注 2) アンタゴニスト：

本来のリガンド（結合して作用する因子）と同様に、生体内の受容体分子に働いて作用する化合物をアゴニストと呼ぶが、受容体分子に働いて本来のリガンドである神経伝達物質や、ホルモンなどの働きを阻害する化合物をアンタゴニストと呼ぶ。作用自体はないが受容体に可逆的に結合する。このため、本来のリガンド分子と結合する受容体

部位を奪い合うことによって阻害する競合的拮抗薬と、受容体の結合定数に影響をおよぼしたり、受容体と不可逆的に結合したりするなどして阻害する非競合的拮抗薬がある。

注 3) CYIQNCPLG :

ペプチドはアミノ酸配列の違いで機能が発現したり消失したり、別の機能が発現されたりするため、配列情報が重要である。これは OXT の配列情報。20 種類あるアミノ酸を 1 文字表記した。C : システイン、Y : チロシン、I : イソロイシン、Q : グルタミン、N : アスパラギン、P : プロリン、G : グリシン。他に、A : アラニン、D : アスパラギン酸、E : グルタミン酸、F : フェニルアラニン、H : ヒスチジン、K : リジン、L : ロイシン、M : メチオニン、R : アルギニン、S : セリン、T : スレオニン、V : バリン、W : トリプトファン。

注 4) Fmoc 固相合成法 :

高収率で  $\alpha$  アミノ酸をペプチド結合で連結させるための化学合成方法。反応後の目的分子以外の不要物や残存試薬の除去が簡便である。N 末端のアミノ基を塩基で除去できる Fmoc 基で保護する方法。 $\alpha$  アミノ酸の側鎖は別の保護基で保護する。

注 5) 光開裂リンカー :

紫外線照射で共有結合が開裂する化合物。この研究では 4-{4-[1-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)ethyl]-2-methoxy-5-nitrophenoxy}butanoic acid を使用しており、ペプチド合成の際、根元にリンカーとして挿入して合成した。またトランスイルミネーターを用いて 365 nm の UV を 3 h 照射することで、開裂させた。

注 6) DMSO :

Dimethyl sulfoxide。有機化合物で種々の有機化合物や無機塩も溶解できる優れた非プロトン性極性溶媒。疎水度の高いペプチドを溶解するために使われる。

注 7) TGF $\alpha$  切断アッセイ :

東北大学の井上飛鳥先生により提案された GPCR シグナル検出方法。OXT 受容体のような GPCR にアゴニスト活性のあるリガンドが結合すると、細胞内にシグナル伝達が始まる。GPCR シグナルの下流で膜型プロテアーゼ TACE (TGF $\alpha$  converting enzyme) が活性化され、膜貫通前駆体 AP-TGF $\alpha$  (AP はアルカリフォスファターゼ) のエクストドメイン切断を引き起こす。遊離した AP-TGF $\alpha$  を AP の基質で分析する。

注 8) Y2L、Q4F、N5F :

残基置換体の表記方法。最初のアルファベットは、本来のペプチドの置換位置のアミノ酸残基、2 番目の数字は置換位置、3 番目のアルファベットは置換体でのアミノ酸残基。すなわち、Y2L は 2 残基目の Y を L に置換、Q4F は 4 残基目の Q を F に置換、

N5F は 5 残基目の N を F に置換した置換体であることを示す。

注 9) P2 位 :

N 末端 (タンパク質やペプチドはアミノ酸のポリマーであり、アミノ基とカルボキシ基がアミド結合して直鎖状に並ぶ。このため、末端はアミノ基またはカルボキシ基になる。アミノ基を N 末端と呼ぶ) からのアミノ酸残基の位置、P2 は 2 残基目を示す。

注 10) G タンパク質共役型受容体 (GPCR : G protein-coupled receptor) :

生体に存在する受容体の形式の 1 つ。別名として G タンパク質結合受容体、あるいは細胞膜を 7 回貫通する特徴的な構造から 7 回膜貫通型受容体と呼ばれることもある。G タンパク質は、グアニンヌクレオチド結合タンパク質の略称であり、GTP または GDP を結合して活性の ON/OFF を行うことにより、細胞内情報伝達に参与する。

### 【論文情報】

掲載紙 : ACS Omega, 6, (2021)

論文タイトル : Agonist/antagonist activity of oxytocin variants obtained from free cyclic peptide libraries generated via amino acid substitution

著者 : Remi Kinoshita<sup>a</sup>, Ikko Kozaki<sup>a</sup>, Kazunori Shimizu<sup>a</sup>, Takahiro Shibata<sup>b</sup>, Akihito Ochiai<sup>c</sup> and Hiroyuki Honda<sup>a</sup>

a: 名古屋大学大学院工学研究科生命分子工学専攻

b: 名古屋大学大学院生命農学研究科応用生命科学専攻

c: 新潟大学工学部

DOI : 10. 1021/acsomega. 1c04982

URL : <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.1c04982>