

μ -オピオイド受容体アゴニストとORL-1受容体アンタゴニストから成る キメラペプチドの受容体親和性と鎮痛活性

河野 奨, 伊藤 里沙, 西山 美春, 久保 麻衣, 松島 知子, 安保 明博, 佐々木有亮

Receptor binding properties and antinociceptive effects of chimeric peptides consisting of a μ -opioid receptor agonist and an ORL-1 receptor antagonist

Susumu KAWANO, Risa ITO, Miharu NISHIYAMA, Mai KUBO, Tomoko MATSUSHIMA,
Akihiro AMBO, and Yusuke SASAKI*

(Received November 21, 2006)

Receptor binding properties and antinociceptive activities of chimeric peptides linked by spacers were investigated. The peptides consisted of the μ -opioid receptor ligand dermorphin (Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH₂) or its analog YRFB (Tyr-D-Arg-Phe- β Ala-NH₂) linked to the ORL-1 receptor ligand Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Ile-Lys-NH₂ (Ac-RYYRIK-NH₂). All chimeric peptides were found to possess high receptor binding affinities for both μ -opioid and ORL-1 receptors in mouse brain membranes. In particular, chimeric peptide **2**, which consists of dermorphin and Ac-RYYRIK-NH₂ connected by a long spacer, had high binding affinities toward both receptors. In the tail-flick test following intracerebroventricular (i.c.v.) administration of chimeric peptides containing the YRFB sequence (**3** and **4**) unexpectedly showed much less potent antinociceptive activity (ED₅₀ >100 pmole/mouse). These results suggest the involvement of nociceptin-like effects of the Ac-RYYRIK pharmacophore in the peptides, and the regulation of μ -opioid receptor-mediated antinociception in brain. The present chimeric peptides (**2**, **3** and **4**) may be useful as pharmacological tools for studies on μ -opioid receptor/ORL-1 receptor heterodimers.

Key words — chimeric peptide; μ -opioid receptor ; ORL1 receptor ; receptor binding property; tail-flick test

Nociceptin/orphanin FQ (Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln, NOC) は opioid receptor-like 1 (ORL-1) 受容体の内因性リガンドである^{1,2)}. NOCによるORL-1受容体の活性化は, 脊髄において高用量で鎮痛効果を示し, 低用量では痛覚過敏や抗opioid鎮痛効果を示し, 自発行動量の低下, 記憶学習, 不安など多彩な生理活性を引き起こす³⁻¹²⁾.

最近NOCと同程度のORL-1受容体親和性をもつ acetyl-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Ile-Lys-NH₂ (Ac-RYYRIK-NH₂)

を含む数種のヘキサペプチドがペプチドライブラリー技術によって見出されている¹³⁾. これらヘキサペプチドは, [³⁵S]GTP γ S結合やforskolinによる細胞内c-AMP増加作用に対して, それぞれpartial agonistあるいはantagonistとして機能することが報告されている^{14,15)}. またマウスの輸精管を用いたin vitro 生物活性試験ではantagonistとして作用することが報告されている¹⁶⁾. 従ってこれらのペプチドはmorphineに代表されるopioidとは異なる作用機序をもつ新規鎮痛薬のリード化合物になる

可能性を有している。

一方, G-タンパク質共役型受容体はホモあるいはヘテロ二量体を形成することが報告されている¹⁷⁾. opioid受容体においてもそのホモまたはヘテロ二量体の存在が示唆されており, 生体内においてそれらがopioid agonistの持つ生理活性の一部を担っていることが推測される¹⁸⁾. Panらは μ -opioid受容体とORL-1受容体が物理的に会合していることを発見し, この複合体の受容体親和性がそれぞれの受容体単独での受容体親和性と異なることを明らかにした¹⁹⁾.

これらのことから, 著者らは μ -opioid受容体とORL-1受容体の両方を認識する二価性の化合物は, 親和性の増加, 生物活性の上昇を引き起こす可能性があると考え, 前報で μ -opioid受容体リガンドのdermorphin (Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH₂)²⁰⁾ または, YRFB (Tyr-D-Arg-Phe- β -Ala-NH₂)²¹⁾ とORL-1受容体リガンドAc-RYYRIK-NH₂を連結した4種類のキメラペプチド (Fig. 1) を合成した²²⁾. これらキメラペプチドは, ラット脳の μ -opioid受容体とHEK-293細胞に発現させたORL-1受容体に対して高い親和性を持つことを明らかにした²²⁾.

本研究では, これらのキメラペプチドの鎮痛作用をマウス tail flick法を用いて検討し, マウス脳シナプトソーム画分において μ -opioid受容体およびORL-1受容体に対する親和性との比較を行った。

実験材料および方法

1. ペプチド

すべてのキメラペプチドは一般的なFmoc固相合成法によって合成した²²⁾. すなわちFmoc-Lys(Alloc)-NH SAL樹脂より合成を開始し, LysのN α 位側にORL-1受容体に対するファーマコフォア (Ac-RYYRIK-部) を構築し, tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0) により脱Alloc化後, N α 位側に μ -opioid受容体に対するファーマコフォア (dermorphin あるいはYRFB部) を構築した。

2. 使用動物

25–30gのddY系雄性マウス (1群8匹) 用いた。マウスは明暗12時間サイクル, 室温22 \pm 0.5 $^{\circ}$ Cの一定環境下, 固形飼料, 水道水を自由摂取させた。なお, 実験動物の取り扱いには東北薬科大学動物実験指針に基づき実施した。

3. 受容体結合試験

マウス前脳を10倍容量の氷冷0.25 Mショ糖/10 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4) 中でホモジネートし, 4 $^{\circ}$ C, 1,000xg, 10分間遠心分離した。得られた上清をさらに4 $^{\circ}$ C, 10,000xg, 15分間遠心分離し, ペレットに5倍容量の50 mM Tris-HCl緩衝液を加えて懸濁した。溶液を15分間室温でインキュベーションの後, 4 $^{\circ}$ C, 10,000xg, 15分間遠心分離を行いシナプトソーム画分とした。Bradford法²³⁾によりタンパク質量を求め, 2 mg/mLの濃度に調整した。

マウス脳シナプトソーム画分 (600 μ g protein), 合成ペプチド (50 μ L), プロテアーゼインヒビター (50 μ g bacitracin, 5 μ g bestatin, 20 μ g soybean trypsin inhibitor) を含む5%BSA/ Tris-HCl 緩衝液, 50 μ L, 2 nM [³H] DAMGO ([³H] [D-Ala², MePhe⁴, Gly-ol⁵] enkephalin, 59.0 Ci/mmol, Amersham) または1 nM [³H] NOC (23 Ci/mmol, Amersham) を含む全量500 μ LのTris-HCl緩衝液 (pH 7.4) を25 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベーションした。非特異的結合は1 μ MのDAMGO またはNOC存在下で測定した。インキュベーション終了後, その反応混

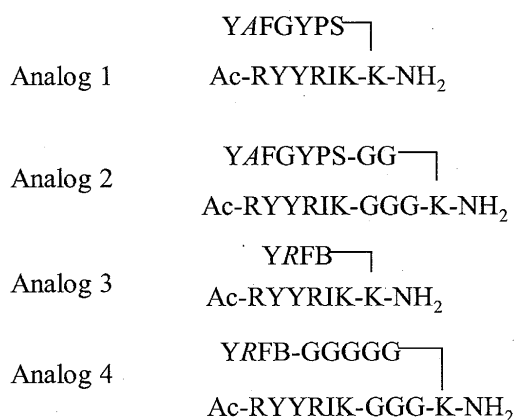


Fig. 1. Synthetic chimeric peptides. Italic letters (A, R) represent the D-isof orm.

液 450 μ L をあらかじめ 0.1 % polyethyleneimine に浸しておいた Whatman GF/B ガラスフィルターで吸引ろ過した。その後ガラスフィルターを氷冷した 4 mL の 50 mM Tris-HCl 緩衝液で 2 回洗浄し B/F 分離した後、バイアル瓶に移し 3 mL のクリアゾル I を加え、十分に攪拌し、一晩放置後、液体シンチレーションカウンター (Beckman 6500LS) で放射活性を測定した。それぞれの合成ペプチドの受容体への結合能は [3 H] 標識リガンドの結合を 50 % 阻害する濃度 (IC_{50}) で示した。

4. 鎮痛活性試験

鎮痛活性はマウス側脳室内にペプチドを投与し tail flick 法を用い測定した。側脳室内投与 (i.c.v.) は Haley と McCormick らの方法²⁴⁾ に準じ、50 μ L ハミルトンマイクロシリンジを用い、すべての薬液を 5 μ L 投与した。なお μ -opioid リガンドと ORL-1 リガンドの同時投与は、同用量のリガンド混液を用いた。熱刺激をマウス尾部に照射し、その刺激からの回避潜時を測定した。刺激強度は未処理のマウスの回避潜時が 2 ~ 3 秒になるように設定した。組織損傷を最小限にするため最大照射時間は 8 秒にした。鎮痛活性は、MPE% (percentage of maximum possible effect) で示す。MPE% は以下の式によって求めた。MPE% = $\{(\text{test latency}) - (\text{base-line latency})\} / \{(\text{cut-off time}) - (\text{base-line latency})\} \times 100$ 。

5. 統計処理

鎮痛活性は 1 群 8 匹とし、受容体結合試験は 3 回行い、平均 \pm 標準誤差で示した。受容体結合試験の有意差は一元配置分散分析 (ANOVA) の後 Tukey-Kramer test 用いた。ED₅₀ と 95% 信頼区間は Graph Pad Prism (Graph Pad Software, var.4) の非線形解析を用いて求めた。

結 果

1. 受容体親和性

4 種のキメラペプチドの μ -opioid 受容体および ORL-1 受容体親和性を参照ペプチドと共に Table 1 に示す。 μ -opioid リガンドである dermorphin と YRFB の IC_{50} 値は、それぞれ 0.29 と 0.67 nM を示し、高い μ -受容体親和性を有した。これら μ -opioid リガンドの ORL-1 受容体親和性は極めて低かった。一方 ORL-1 リガンドの Ac-RYYRIK-NH₂ は IC_{50} 値で 0.64 nM と高い ORL-1 受容体親和性を有し、 μ -opioid 親和性は極めて低かった。Dermorphin と Ac-RYYRIK-NH₂ を Lys 残基で結合した **1** や長いスパーサーの **2** は、dermorphin に匹敵する μ -opioid 親和性を有していた (1: 0.49 nM, 2: 0.16 nM)。対照的に、YRFB を含む **3** と **4** は μ -受容体親和性が有意に低下した。これら 4 種のキメラペプチドは Ac-RYYRIK-NH₂ に匹敵する ORL-1 受容体親和性を有していた (IC_{50} : 0.48 – 2.12 nM)。

Table 1. μ -Opioid and ORL1 receptor binding affinities in mouse brain membranes

Peptide	IC_{50} (nM)	
	[3 H] DAMGO (μ)	[3 H] NOC (ORL1)
dermorphin	0.29 \pm 0.04	10000<
YRFB	0.67 \pm 0.20	10000<
Ac-RYYRIK-NH ₂	10000<	0.64 \pm 0.25
1	0.49 \pm 0.24	2.12 \pm 0.30
2	0.16 \pm 0.07	0.48 \pm 0.21
3	4.57 \pm 0.69*	0.67 \pm 0.48
4	3.14 \pm 0.16*	0.59 \pm 0.28

Each value represents the mean \pm S.E.M of at least three separate experiments. The statistical significance of differences between groups was determined by Tukey-Kramer test. * $p < 0.05$ vs. YRFB

2. 鎮痛活性

キメラペプチドの鎮痛活性をマウス tail flick 法により検討した。ED₅₀ 値を Table 2 に、用量反応曲線を Fig. 2 に示した。本条件下では ORL-1 リガンドである Ac-RYYRIK-NH₂ の単独投与 100 pmol/mouse 以下では鎮痛活性は微弱であった。一方 μ -opioid リガンドである dermorphin および YRFB はそれぞれ ED₅₀ 値として 6.54, 2.24 pmol/mouse を示し、強力な鎮痛活性を有していた、これは Sakurada

らの報告^{25,26)} とほぼ同様な結果である。さらに dermorphin および YRFB と Ac-RYYRIK-NH₂ の同用量同時投与では、dermorphin および YRFB を単独投与した場合と比べ、鎮痛効果はそれぞれ約 70 % と約 50 % に減弱した。ペプチド 1 と 2 はそれぞれ 5.55, 14.23 pmol/mouse の ED₅₀ 値を示し、比較的強い鎮痛活性を有していた。またその効果は用量依存的だった。しかし、 μ -opioid 親和性の低い 1 は 2 に比べ強い鎮痛活性を有していた。すなわち

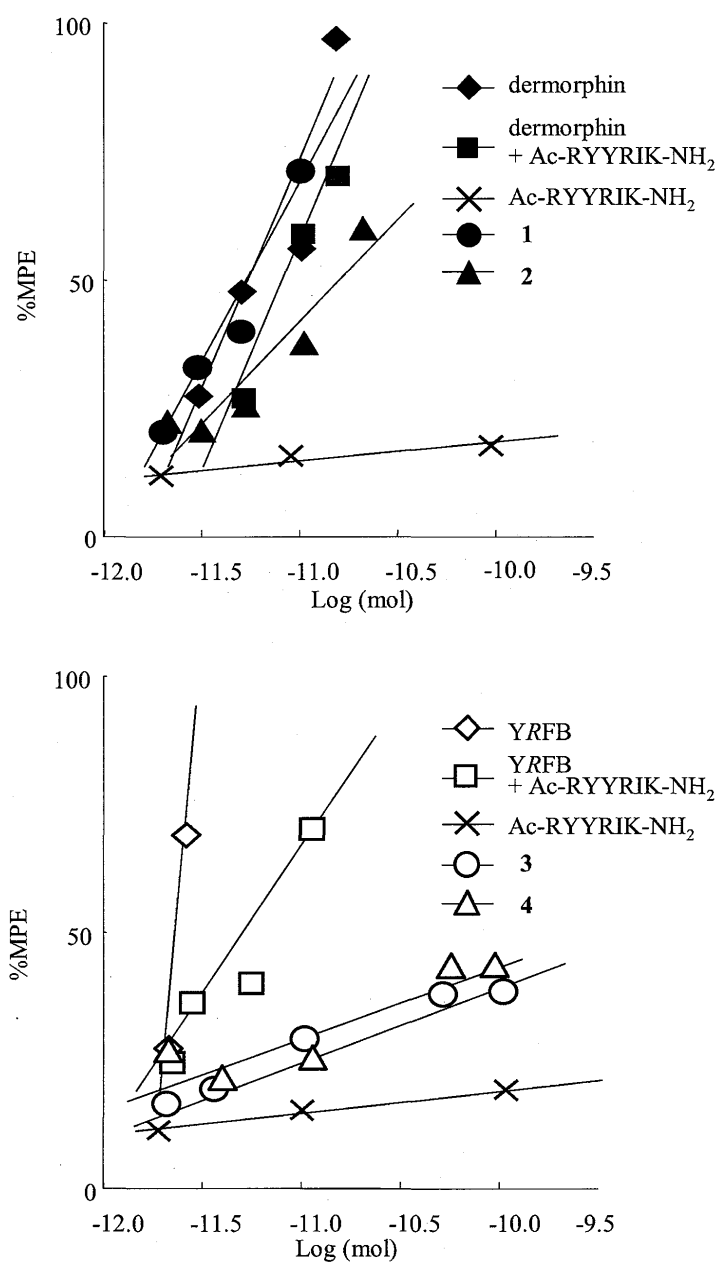


Fig. 2. Dose response curves of chimeric peptides after i.c.v. administration in the tail-flick test. Each point represents the mean determined with eight mice.

Table 2. Antinociceptive activities of chimeric peptides in the tail-flick test after i.c.v. administration in mice^{a)}

Peptide	ED ₅₀ (pmole)
dermorphin	6.54 (5.23 - 8.42)
dermorphin + Ac-RYYRIK-NH ₂ ^{b)}	8.34 (6.44 - 10.79)
YRFB	2.24 (2.12 - 2.38)
YRFB + Ac-RYYRIK-NH ₂ ^{b)}	4.59 (3.29 - 6.40)
Ac-RYYRIK-NH ₂	100<
1	5.55 (4.27 - 7.23)
2	14.23 (9.65 - 20.97)
3	100<
4	100<

a) Each value represent the mean (95% confidence limits) of 8 mice/group.

b) The same amount of both peptides was simultaneously injected.

μ -opioid 親和性の低い **1** は dermorphin 単独投与と同程度の鎮痛効果を示し, **2** は dermorphin 単独投与時の約 50 %, Ac-RYYRIK-NH₂ 同時投与の約 70 % に低下した. これに対し, **3** と **4** の鎮痛効果は弱く, Fig. 2 に示すように, 低用量側では用量依存性であるが高用量側では明瞭な用量依存性がみられず, 100 pmol/mouse 投与で約 45 %MPE にとどまった. すなわち **3** と **4** は, それぞれの μ -リガンド単独投与時の 1/50 以下, Ac-RYYRIK-NH₂ の同時投与時の 1/20 以下に減弱した.

考 察

先に著者らは μ -opioid 受容体リガンドの dermorphin あるいは YRFB と ORL-1 受容体リガンド Ac-RYYRIK-NH₂ から成るキメラペプチド **1** - **4** がラット脳シナプトソーム画分 (μ -opioid 受容体) とヒト ORL-1 受容体発現細胞膜標本に対して, 高い親和性を示すことを報告している²²⁾. 本研究でのマウス脳シナプトソーム画分においても, μ -opioid と ORL-1 両受容体に対して高い親和性を有していた. キメラペプチドの中でも, dermorphin と Ac-RYYRIK-NH₂ の配列を Lys とオリゴ Gly 残基で架橋した長鎖スパーサーを持つ **2** は, 両受容体に強い親和性を持つことから μ -opioid と ORL-1 受容体両方に結合できるユニバーサルリガンドであることが示唆された.

これらペプチドの i.c.v. 投与後の鎮痛効果は μ -opioid 受容体親和性とは必ずしも一致しなかった. 近年, 脳において NOC は μ -opioid 受容体を介して起きる鎮痛作用を阻害することが数多く報告されていることから^{8-10,27-31)}, キメラペプチドの Ac-RYYRIK-ファーマコフォアは antagonist としてよりも agonist としての効果が現れたと考えられる. 脳では, ORL-1 と μ -opioid 受容体と同じ領域に分布していることが報告³²⁾ されており, 今回合成したキメラペプチドは, 脳において μ -opioid 受容体を介して起きる鎮痛作用を減弱させることから, これらの受容体に 2 つのファーマコフォアを介して同時に結合している可能性も考えられる. dermorphin を μ -opioid リガンドファーマコフォアとしてもつキメラペプチドは, 2 つのファーマコフォア間に **2** のような長鎖スパーサーを挿入することにより鎮痛効果の減弱が引き起こされる, **2** はその高い受容体親和性を考え合わせると, in vivo でも μ -opioid および ORL-1 受容体両方に結合できるユニバーサルリガンドである可能性が考えられる.

一方, YRFB を μ -opioid ファーマコフォアとしてもつキメラペプチド **3**, **4** にはスパーサーによる明瞭な差は見られなかった. しかし, 高用量側での鎮痛活性は用量依存性がみられず, μ -opioid 受容体に対する partial agonist として作用することが示唆された. これらの効果は dermorphin をファーマコフォアとして持つ **1** および **2** の結果と異なり, 興

味深い知見である。

最後に, μ -opioid 受容体と ORL-1 受容体は脳で共発現している。また機能的に相互作用し, 特殊な情報伝達が起こることが指摘されている³⁰⁻³⁴⁾。本研究でのキメラペプチドのうち, 特に **2** は in vitro でも in vivo でも μ -opioid 受容体と ORL-1 受容体両方に結合できるキメラペプチドであることが示唆された。本研究では一つの分子が μ -opioid および ORL-1 受容体に同時に結合している可能性と, 2つの受容体にそれぞれ片方のファーマコフォアが結合している可能性もあり, 現在のところ詳細な受容体への結合様式については明らかでない。しかし新規な作用をもつこれらのキメラペプチドは, in vivo での μ -opioid 受容体, ORL-1 受容体の薬理学的, 生理学的な相互作用の解明に有用と考えられる。

REFERENCES

- 1) Meunier J. C., Mollereau C., Toll L., Suaudeau C., Moisand C., Alvinerie P., Butour J. L., Guillemot J. C., Ferrarau P., Monsarrat B., Masarguil H., Vassart G., Parmentier M., Costentin J., *Nature*, **377**, 532-535 (1995)
- 2) Reimsheid R. K., Nothacker H. P., Bourson A., Ardati A., Hennigsen R. A., Bunzow JR., Grandy D. K., Langen H., Monsma F. J., Jr., Civelli O., *Science*, **270**, 792-798 (1995)
- 3) Meunier J. C., *Eur. J. Pharmacol.*, **340**, 1-15 (1997)
- 4) Calo G., Guerrini R., Rizzi A., Salvadori S., Regoli D., *Br. J. Pharmacol.*, **229**, 1261-1283 (2000)
- 5) Mogil J. S., Pasternak G. W., *Pharmacol. Rev.*, **53**, 381-415 (2001)
- 6) Henderson G., Macknight A. T., *Trends. Pharmacol. Sci.*, **18**, 293-300 (1997)
- 7) Rossi G., Leventhal L., Bolan E. A., Pasternak G. W., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 858-865 (1997)
- 8) Tian J. H., Xu W., Fang Y., Mogil J. S., Grisel J. E., Grandy D. K., Sheng J. H., *Br. J. Pharmacol.*, **120**, 676-680 (1997)
- 9) King M., Chang A., Pasternak G. W., *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 1537-1540 (1998)
- 10) Kolesnikov Y. A., Pasternak G. W., *Life Sci.*, **64**, 2021-2028 (1999)
- 11) Calo G., Rizzi A., Marzola G., Guerrini R., Salvadori S., Beani L., Regoli D., Bianchi C., *Br. J. Pharmacol.*, **125**, 373-378 (1998)
- 12) Inoue M., Shimohira I., Yoshida A., Takeshima H., Sakurada T., Ueda H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **291**, 308-313 (1999)
- 13) Dooley C. T., Spaeth C. G., Berzetei-Gurske I. P., Craymer K., Adapa I. D., Brandt S. R., Houghten R. A., Toll L., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 735-741 (1997)
- 14) Berger H., Albrecht E., Wallukat G., Bienert M., *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 555-558 (1999)
- 15) Berger H., Bigoni R., Albrecht E., Richter R. M., Krause E., Bienert M., Calo G., *Peptides*, **21**, 1131-1139 (2000)
- 16) Calo G., Bigoni R., Rizzi A., Guerrini R., Salvadori S., Regoli D., *Peptides*, **21**, 935-947. (2000)
- 17) Rios C. D., Jordan B. A., Gomes I., Devi L. A., *Pharmacol. Ther.*, **92**, 71-87 (2001)
- 18) Jordan B. A., Cvejic S., Devi L. A., *Neuropharmacology*, **23**, S5-S18 (2000)
- 19) Pan Y. X., Bolan E., Pasternak G. W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **297**, 659-663 (2002)
- 20) Broccardo M., Erspamer V., Erspamer G. F., Improta G., Linari G., Melchiorri P., Motencucchi P. C., *Br. J. Pharmacol.*, **73**, 625-631 (1981)
- 21) Sasaki Y., Ambo A., Suzuki K., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2316-2318 (1991)
- 22) Kawano S., Ambo A., Sasaki Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 4839-4841 (2006)
- 23) Bradford M. M., *Anal. Biochem.*, **248**, 54 (1976)
- 24) Haley T. J., McComick W. G., *Br. J. Pharmacol.*, **12**, 12-15 (1957)
- 25) Sakurada S., Takeda S., Sato T., Hayashi T., Yuki M., Kutsuwa M., Tan-No K., Sakurada C., Kisara K., Sakurada T., *Eur. J. Pharmacol.*, **395**, 107-112 (2000)
- 26) Sakurada S., Watanabe H., Sakurada T., Kisara K., Sasaki Y., Suzuki K., *Eur. J. Pharmacol.*, **211**, 75-80 (1992)

- 27) Wang Y. Q., Zhu C. B., Wu G. C., Cao X. D., Wang Y., Cui D. F., *Brain. Res.*, **835**, 241-246 (1999)
- 28) Mogil J. E., Grisel J. E., Zhangs G., Belknap J. K., Grandy D. K., *Neurosci. Lett.*, **214**, 131-134 (1996)
- 29) Mandyam C. D., Thakker D. R., Christensen J. L., Standifer K. M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **302**, 502-509 (2002)
- 30) Wang H. L., Hsu C. Y., Huang P. C., Kuo Y. L., Li A. H., Yeh T. H., Tso A. S., Chen Y. L., *J. Neurochem.*, **92**, 1285-1294 (2005)
- 31) King M., Chang A., Pasternak G.W., *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 1537-1540 (1998)
- 32) Monteillet-Agius G., Fein J., Anton B., Evans C. J., *J. Comp. Neurol.*, **399**, 373-383 (1998)
- 33) Yamamoto T., Shono K., Tanabe S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **318**, 206-213 (2006)
- 34) Grisel J. E., Mogil J. S., Belknap J. K., Grandy D. K., *Neuroreport.*, **7**, 2125-2129 (1996)