

カルシトニンの培養細胞に対する作用と
構造活性相関に関する研究

平成五年度

鹿野 真弓

①

カルシトニンの培養細胞に対する作用と
構造活性相関に関する研究

平成五年度

鹿野 真弓



目次

第一章 序論	1
I-1. カルシトニン研究の歴史	2
I-2. カルシウム代謝調節系とカルシトニン	4
I-3. カルシトニンの臨床応用	10
I-4. カルシトニンの神経系に対する作用とCGRP	12
I-5. 各種動物由来カルシトニンの一次配列と活性	13
I-6. 本研究の目的	16
第二章 カルシトニンの新しい <i>in vitro</i> 活性測定法の構築	18
II-1. はじめに	19
II-2. 実験の部	21
II-3. 各種株化細胞に対するカルシトニンの作用	29
II-4. カルシトニンによるLLC-PK ₁ 細胞形態異常・増殖阻害作用	34
II-5. カルシトニンによるLLC-PK ₁ 細胞の培地酸性化	49
II-6. カルシトニン受容体と細胞内情報伝達経路に関する解析	56
II-7. カルシトニンの新しい <i>in vitro</i> 活性測定法の確立	66

第三章 カルシトニンの構造活性相関

III-1. はじめに	69
III-2. 実験の部	78
III-3. Lys18欠失誘導体とLys再挿入誘導体の <i>in vitro</i> 活性	81
III-4. 第一領域に関する解析	90
III-5. 第二領域に関する解析	96
III-6. 欠失誘導体による解析	99
III-7. eCT構造活性相関に関するまとめ	105
参考文献	107
謝辞	122

第一章

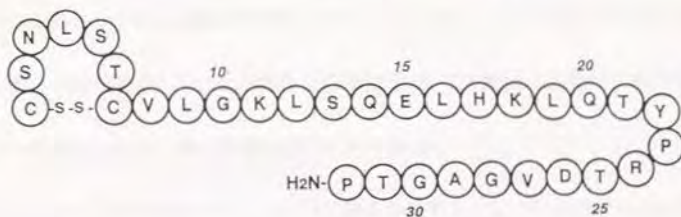
序論

I-1. カルシトニン研究の歴史

カルシトニン (calcitonin, 以下CT, 【図I-1】) は32アミノ酸より成るペプチドホルモンで、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone, 以下PTH) 活性型ビタミンD (1 α .25(OH) $_2$ D $_3$, 以下VD $_3$) とともに、哺乳動物のカルシウム代謝調節ホルモンの一つに数えられている。

1962年Coppらは、イヌとヒツジの甲状腺・副甲状腺灌流実験において、高濃度のカルシウムの灌流により、急速に血中カルシウム濃度を低下させる物質が分泌されることを見だし、この物質をカルシトニンと命名した¹⁾。彼らはCTを副甲状腺由来としていたが、翌年MunsonとHirshらが同様の作

【図I-1】 CT (ウナギ) の構造



用を持つ物質を甲状腺から抽出し、チロカルシトニン (thyrocalcitonin) と命名した²⁾。さらに1964年にはFosterらが副甲状腺と甲状腺を別々に灌流する実験を行ってCTが甲状腺由来であることを示し³⁾、CTとthyrocalcitoninとは同一物質であることも明かにされた。その後数年の間にCTの標的器官が骨^{4) 5)}、腎⁶⁾であること、甲状腺傍濾胞細胞から分泌されること⁷⁾等が示され、ウシ⁸⁾、ブタ⁹⁾、ヒツジ¹⁰⁾、ヒト¹¹⁾、ラット¹²⁾についてCTの一次構造も明かにされた。1970年代に入り、魚類CT¹³⁾が哺乳動物に対して非常に強い血中カルシウム濃度低下作用を示すことが明らかとなると、構造活性相関がさかんに研究されるようになり、また臨床応用への努力も積み重ねられていった。一方1970年代後半から、CTが中枢神経系に作用して鎮痛作用¹⁴⁾や摂食抑制作用¹⁵⁾を示す報告が多くなされ、新たな展開を見せている。1981年にCTと共通の遺伝子から異なるsplicingによって生合成されるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)¹⁶⁾が主に神経系において作用を発揮する¹⁷⁾ことが明らかとなるに至り、CT遺伝子産物の神経系における意義について、新たな関心が持たれている。

これまでに明らかにされているCTに関する知見を、以下に簡単にまとめた。

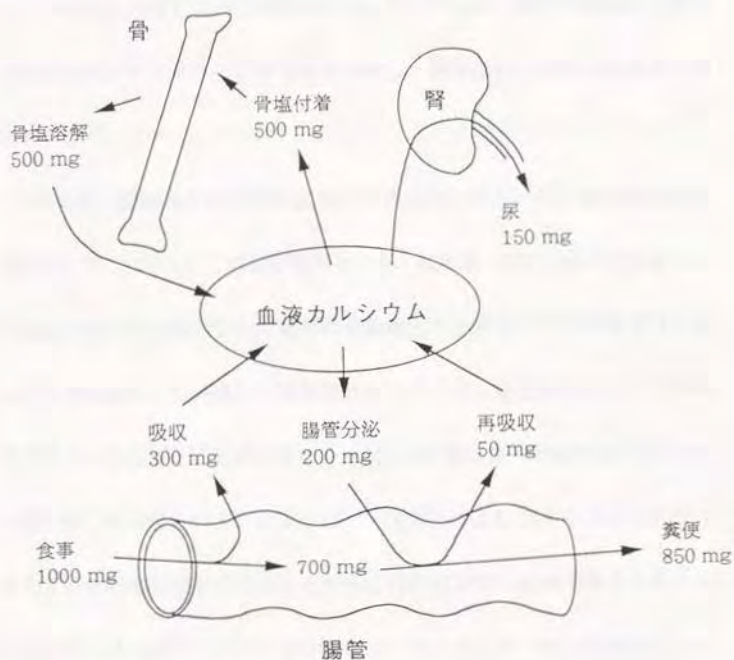
I-2. カルシウム代謝調節系とカルシトニン

カルシウムが各種の細胞の機能維持等において重要な働きをしていることは良く知られている。そのカルシウムは血流を介して供給されるため、血中カルシウム濃度が各細胞機能に大きく関わることになる。従って生体内のカルシウム代謝は非常に精巧に調節されており、その血中濃度はヒトの場合で85~100 $\mu\text{g/ml}$ (2.1~2.5mM) という比較的狭い範囲内に維持されている。成人体内には約1 kgのカルシウムが存在しているが、このうち99%がhydroxyapatiteのリン酸カルシウムとして骨に局在している。すなわち骨は、体の構造を維持する支持体としての役割の他に、カルシウム、リンの貯蔵部位としての重要な働きを担っている。骨においては骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収（骨の溶解）との反応が常に起こっており、そのバランスにより骨量が維持されている。

この骨からの出入りの他、血中カルシウム濃度の調節は、腸管粘膜を介する食物に由来するカルシウムの吸収、腎糸球体で濾過された後の尿細管からのカルシウムとリン酸の再吸収という、大きく3つの窓口を介して維持されている（【図I-2】）。これらの窓口での出入りを主に調節しているのが VD_3 、PTH、そしてCTの3つのホルモンである。各ホルモンの作用は互いに複雑

に影響し合うため、未だ明確にされていない部分も多いが、現在までに得られている知見を以下にまとめた。

【図1-2】成人男子における一日のカルシウム移動



1) ビタミンD₃

体外から摂取された、あるいは紫外線存在下皮膚で合成されたコレカルシフェロールは、肝臓において25位が、腎臓で1位が水酸化を受け、活性型の1 α ,25(OH)₂D₃となる。特に腎での水酸化がこのホルモン生合成の律速段階となっており、この過程はPTHやCT、低Pi血症により促進され、1 α ,25(OH)₂D₃自身によって抑制される^{1,8)}。VD₃は、腸管や腎臓など標的細胞内に存在する受容体と複合体を形成し、標的遺伝子の転写調節作用を発揮する^{1,9)}。

VD₃の最も重要な作用は腸管粘膜からのカルシウム、リン酸の吸収促進である。そしてVD₃はこの腸管吸収を司る、ほぼ唯一のホルモンでもある。空腸、回腸でのカルシウムの吸収は受動輸送であるが、十二指腸ではカルシウムを粘膜側から漿膜側へ移動させるカルシウム結合蛋白を介する能動輸送によっており、VD₃はこのカルシウム結合蛋白質の合成を促進する。

また古くから知られているように、VD₃欠乏により小児ではくる病が、成人では骨軟化症が見られることから、骨の石灰化に必須であると考えられている。さらにオステオカルシン、オステオポエチン等の骨基質タンパクの合成促進作用^{2,0)}も報告されている。骨芽細胞にはVD₃受容体の存在が報告されている^{2,1)}が、骨形成におけるVD₃の作用については未だ明確

な知見は得られていない。腎での作用としては、遠位尿細管でのカルシウム再吸収促進作用が報告されている^{2.2)}。

2) 副甲状腺ホルモン (PTH)

PTHは血中カルシウム濃度の低下に伴って副甲状腺から分泌される^{2.3)}。骨におけるPTHの作用は骨吸収の促進^{2.4)}であるが、PTH受容体は破骨細胞には存在せず、骨芽細胞に存在する^{2.5)}。従ってPTHは、骨芽細胞に作用し、液性因子あるいは細胞間の接触を介して破骨細胞を活性化したり^{2.6)}、破骨細胞前駆細胞からの破骨細胞への分化を誘導すると考えられている^{2.7)}。腎においてはPTHは近位尿細管のリン酸最吸収を抑制してリンを積極的に排出す^{2.8)}。他、VD₃の活性化酵素である1 α 水酸化酵素を活性化することでVD₃産生を高め^{2.9)}結果として腸管からのカルシウム、リン酸の吸収を促進する。一方遠位尿細管においてはVD₃の存在下にカルシウム再吸収を促進する^{3.0)}。すなわちPTHの作用を全体的にとらえると、骨吸収、腸管吸収により動員されたカルシウムとリン酸のうち、カルシウム血中濃度のみを効率良く上昇させるのである。

3) カルシトニン (CT)

さてCTは、PTHとは逆に血中カルシウム濃度低下作用を有し、血中カルシウム濃度の上昇により分泌が促進される^{1) 3.1)}。また、ガストリンなど消化管ホルモンによっても分泌が促進される^{3.2)}ことから、食事後に腸管から吸収されたカルシウムが血中カルシウム濃度の上昇を引き起こすのを防ぐと考えられている。

骨においてCTは、破骨細胞に作用してその活性を強く抑制し、骨吸収を抑える^{3.3)}。腎での作用については動物種や部位によりかなり異なり明確な知見は得られていないが、一応リン酸再吸収を抑制するとされている。カルシウム再吸収については、ラットなどにおいては近位尿細管でのカルシウム、リン酸の再吸収を促進するが、ヒトでは逆に尿中へのカルシウム排泄は増加する。また、PTHの場合とは異なる部位の近位直尿細管において 1α 水酸化酵素を活性化し、 VD_3 生合成を促進する^{3.4)}。すなわちCTは、カルシウムを積極的に体外から取り込むと共に、取り込まれたカルシウムの骨からの溶出を抑制するため、結果的に血中カルシウム濃度は低く保たれる。

4) その他の因子

以上のホルモンの他に、最近各種のサイトカインや細胞増殖因子等が骨代謝に関与することを示す報告が相次いでいる。骨芽細胞が間葉系幹細胞から分化すること、破骨細胞が血液幹細胞、特に単球・マクロファージ系の前駆細胞から分化することを考えると考えればあながち不思議なことではない。骨芽細胞はinsulin-like growth factorにより前駆細胞から分化することが知られている³⁶⁾。一方破骨細胞は、骨芽細胞に由来すると考えられるM-CSFとVD3との作用によりマクロファージ系前駆細胞が分化・融合することで形成される巨大多核細胞である^{36) 37)}。いずれにしてもこれらの物質のカルシウム代謝に及ぼす作用は細胞の分化を介するため長期的なものである。比較的短期の間にカルシウム代謝系そのものを直接調節しているのは前述の3つのホルモンと考えてよいであろう。

1-3. CTの臨床応用

カルシトニンは、その生理的意義や作用機作等についての基礎研究よりむしろ臨床応用が先行したホルモンである。当初は甲状腺機能亢進症や悪性腫瘍等の患者に見られる高カルシウム血症の治療薬として、1970年代後半から用いられ始めたようである。作用が一過性で2週間程で作用が消失する^{3,8)}という、いわゆるescape現象の問題はあるが、速効性で副作用が少なく^{3,9)}、ステロイド等、他の薬物との併用が効果的^{4,0)}であるため、現在でも広く利用されている。しかし骨Paget病や骨粗鬆症等における、カルシトニンの骨代謝改善効果については疑問視されている。カルシトニンは骨吸収を抑制するので、長期連用すると一時的に骨量は増加するが、骨形成は促進されない^{4,1)}ので結果的にはあまり効果が無い^{4,1)}。むしろこれらの疾病や骨転移をともなう進行癌での骨痛改善に効果が認められており^{4,2)}、日本では疼痛に対する治療薬として認可されている。その鎮痛効果発現の機序としては、血中カルシウム濃度の低下、プロスタグランジン等の疼痛惹起物質の産生抑制、 β -エンドルフィンやACTH分泌促進、中枢性に疼痛域値を上昇させる等の説が挙げられている^{4,3)}。実際にカルシトニンを治療に用いている臨床医の話聞く機会があったが、骨代謝の改善が見られなくても鎮痛効果が得られる

こと、静注直後に鎮痛効果が見られる場合もあるとのことであった。これは、カルシトニンの鎮痛作用は骨の状態が改善されることに由来するのではなく、以下に述べるように中枢神経系に作用している可能性を示唆しているとの印象を受けた。

I-4. CTの神経系での作用とCGRP

1980年代に入って、胃酸分泌抑制などCTの消化管に対する作用^{4.4) 4.5)}が中枢神経系を介する^{4.6)}こと、鎮痛作用^{4.7)}、摂食抑制作用^{4.8)}や、中枢におけるCT受容体の存在が報告されるにつれ^{4.9)}、中枢神経系におけるCTの意義が注目されるようになった。1982年に、CTと共通の遺伝子から異なるsplicingによって、37個のアミノ酸より成る calcitonin gene-related peptide (CGRP) が発現する^{1.6)}ことが示され、翌年には甲状腺ではCTが、中枢・末梢の神経においてはCGRPが組織特異的なsplicingによって主に発現している^{1.7)}ことが明かにされた。しかし中枢神経系にはCT受容体が存在しており、これに作用するべきCTが血液-脳関門を通過して到達するとは考えにくいこと、甲状腺でCTを産生するC細胞は神経冠由来である^{5.0)}こと等からCTが中枢において発現している可能性は否定できない。またCGRPはCTと同様に鎮痛作用、胃酸分泌抑制作用を有する^{5.1)}が血管拡張作用が非常に強力^{5.2)}であり、中枢がCGRPの主たる作用部位であるとは考えにくい。CT遺伝子産物の神経系での意義については今後の研究の展開が期待される。

1-5. 各種動物由来CTの一次配列と活性

【図1-3】に、これまでに明らかにされた12種のCT^{81) - 13) - 53) 54) 55)}について、その一次配列およびラット血中カルシウム濃度低下作用の強さをまとめた。すべてのCTは32アミノ酸残基より成り、1-7位のdisulfid結合およびC末端のPro-NH₂を有しているが、一次配列の相同性からヒト型、ブタ型、魚類・鳥類型の3種に分類することができる。興味深いことに哺乳動物であるラットやヒトに対する活性は、ヒト型、ブタ型等の哺乳類CTより魚類・鳥類型CTの方がはるかに強い。CTの臨床応用が進んだこともあり、構造活性相関が盛んに調べられ（詳細は第三章の序を参照）、より高比活性あるいは持続性のCT製剤開発が行われてきたが、未だ限られた知見しか得られていない。

一方、CTの種差は比較発生学的、比較内分泌学的観点からも興味深い研究課題となっている。哺乳動物でCTを分泌している甲状腺C細胞（傍ろ胞細胞）は、先にも述べたとおり神経冠に由来している⁵⁰⁾。この細胞は、発生の過程で一旦エラの後ろの鰓後腺と呼ばれる器官に取り込まれ、後にこれが甲状腺と融合する。魚類・鳥類においては鰓後腺は終生独立して存在し、カルシトニンはここから分泌される。魚類・鳥類での骨代謝・カルシウム代謝

【図1-3】各種動物由来CT一次配列

ヒト型	10	20	30	ラット血中Ca ²⁺ human CTに 濃度低下作用 対するhomology	
				(MRC units/mg)	(%)
human	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP-NH ₂			70	100
rat	CGNLSTCMLGTYTQDFLKFHTFPQTAIGVGAP-NH ₂			250	97
ブタ型					
porcine	CSNLSTCVLSAYWRNLNNFHRFSGMGFGPETP-NH ₂			120	44
bovine	CSNLSTCVLSAYWKDLNNTHRFSGMGFGPETP-NH ₂			60	44
ovine	CSNLSTCVLSAYWRNLNNFHRYSGMGFGPETP-NH ₂			70	41
魚類、鳥類型					
salmon I	CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTNTGSGTP-NH ₂			2,700	50
salmon II	CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTFPRTNTGAGVP-NH ₂			2,400	53
salmon III	CSNLSTCMLGKLSQELHKLQTFPRTNTGAGVP-NH ₂			600	56
goldfish	CSSLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTNVGAGTP-NH ₂				44
eel	CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGAGTP-NH ₂			4,400	50
chicken	CASLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGAGTP-NH ₂			4,500	47
ray	CTSLSTCVVGKLSQQLHKLQDIQRTDVGGAATP-NH ₂			1,500-3,800	34

図中省略したが、すべてのCTは、Cys1とCys7の間にdisulfide結合を形成している。

は哺乳動物のそれとは大きく異なっており、CTの生理的意義も当然異なると予想される。魚類・鳥類においても、CTの投与により血中カルシウム濃度がどのように変化するかを調べた例は多いが、カルシウム濃度が上がるという報告、あるいは変化しないという報告等、まちまちで、魚類・鳥類でのCTの生理的意義については、現在までのところ明確な説明はなされていない。

1-6. 本研究の目的

先にも述べたとおりCTは臨床応用が先行したホルモンで、基礎研究は後を追う形になっている。中枢神経系での作用の解明や比較内分泌学的研究、構造活性相関の解明のためには、細胞レベルでの作用や受容体、細胞内情報伝達経路に関する情報の蓄積が必須である。CT特異性を有する膜受容体とCT感受性を持つadenylate cyclaseの存在がラット腎皮質から分離された細胞膜において証明され^{5,6)}て以来、cAMPがCTの主な細胞内second messengerであると考えられてきた。それ以来長い間、CTの細胞レベルでの作用としてはもっぱらこの反応のみが指標とされ^{5,7)}、それ以上の研究はほとんどなされていなかったといえる。遺伝子操作技術や細胞内情報伝達経路に関する研究が飛躍的進展をとげ、ようやくここ数年CTの基礎的研究が本格的に始まったと言っても過言ではない。ごく最近、CT受容体の遺伝子がcloningされ^{5,8)}、その構造は従来知られているGsタンパク質にlinkした受容体に共通な、細胞膜を7回貫通する構造であった。Gsタンパク質はadenylate cyclaseの活性化に関与することが知られており^{5,9)}、cAMPがCT作用の細胞内second messengerであるという説を裏付ける結果となった。しかしその一次配列は既知のどの受容体familyにも属さず、唯一同時にcloningされたPTH受容体^{5,10)}とのみ高いhomologyを示していた。すなわち

CT受容体とPTH受容体は新しい受容体familyを形作るものと考えられ、新たな興味の対象となっている。また一方では、腎尿管由来培養細胞におけるCT刺激によるinositol phosphates生成^{6,1)}やprotein kinase Cの活性化^{6,2)}、calmodulinの関与する反応^{6,1)}も報告され、細胞レベルでのCTの作用を解明することがこれからのCT研究においては必須と考えられる。

本研究においてはCT製剤開発を念頭において、ウナギCT (eCT) の各種誘導体の活性を比較することで構造活性相関を知ることを企図した。誘導体の活性の指標としては、*in vivo*活性を反映した簡便な*in vitro*活性測定系を用いる必要があるが、従来在用いられてきた手法は適当ではないと考えられた。そこでまず、II章においてはcAMP産生量を指標として種々の株化培養細胞の中からCTに対する反応性の高い細胞株を選択し、その結果選択された細胞についてCTの作用を調べ、新たに見いだされた反応を指標とした簡便な*in vitro*活性測定系を構築した。さらにIII章において、eCT誘導体の活性測定を行ない、eCTの構造活性相関を明らかにすることを試みた。

第二章

カルシトニンの新しい *in vitro*活性測定法の構築

II-1. はじめに

本章においては、株化細胞を用いて細胞レベルでのCT作用を検討し、*in vivo*でのCT作用をより反映した新たな*in vitro*活性測定法の確立を目的とした。序論において述べたようにCTは臨床応用が先行したホルモンで、細胞レベルでの作用について長い間ほとんど解析が進んでいなかった。CT構造活性相関に関する研究も、主にラット血中カルシウム濃度を指標とした*in vivo*作用を比較することで行われてきた。しかし*in vivo*作用は、生体内でのCT分子の安定性や他のホルモン等のfeed back的な作用の影響が大きい。したがってCT分子の構造活性相関を知るためには、CTそのものの活性を反映した反応、すなわちCTの細胞膜上受容体への結合と、それに引き続いて起こる細胞の反応を*in vitro*で検討することが望ましい。*in vitro*活性測定法としては、腎尿管^{5,6)}でのCTによるcAMP増加がかなり早くから知られていたため、従来ラット腎臓粗膜画分^{5,7)}や培養細胞を用いたcAMP産生反応と受容体結合反応が用いられていた。これまでにCT刺激によりcAMP量の増大が報告されている細胞株としては、ブタ尿管上皮由来のLLC-PK₁^{6,3)}とPK(15)^{6,4)}、ウシ腎繊維芽細胞由来のMDBK^{6,5)}、ヒト乳ガン由来T47D^{6,6)}及びMCF7^{6,7)}、ヒト肺ガン由来BEN^{6,8)}等がある。またこの他、CTの細胞

レベルの作用としては、腎及びLLC-PK₁でのurokinase type tissue plasminogen activator産生がCTにより引き起こされる^{6,9)}こと、またこの反応がcAMPを介する^{7,10)}ことが知られている。ところが本研究を開始した頃、LLC-PK₁細胞でのCT刺激によるリン酸取り込み反応がprotein kinase Cの活性化や、calmodulinを介する^{6,2)}こと、またこの細胞でCT刺激によりinositol phosphatesが生成すること^{9,1)}が報告され、またCTが破骨細胞に作用すると、cAMP産生^{7,1)}のみでなく細胞内カルシウム濃度の上昇も観察される^{7,2)}という報告もなされた。すなわち以上の情報は、cAMP産生反応のみをCT作用の*in vitro*活性指標とすることは十分ではないことを示すものである。

そこで本章においてはCT構造活性相関の解析に先立ち、CTの*in vitro*活性指標とするべき、cAMP産生反応以外の新たな活性測定法の確立を目的とした。その手順としては、まず各種株化培養細胞を用いてCTの短期作用としてcAMP産生能を、長期作用として細胞形態変化を指標に用い、CTに対して高い反応性を有する細胞株を選択した。細胞株としては、腎由来細胞株及び破骨細胞と同じく血液幹細胞に由来する細胞株を中心に用いることにした。次いで得られた細胞に対するCTの作用を詳細に検討し、新たな*in vitro*活性の指標となる反応を見いだすこととした。

II-2. 実験の部

1) 試薬

ウナギ、サケ、ブタ、ヒトの各CT (以下FeCT, sCT, pCT, hCT) は、Novabiochem AG (Laufelfingen, Switzerland) より購入した。cAMP測定キットはヤマサ醤油 (銚子、千葉) より、[methyl-³H]-thymidine (3.07 TBq/mmol) はAmersham Japan (東京) より、ウシ血清アルブミン (BSA) およびHyMedium606は光仁 (東京) より購入した。インターロイキン 2 (IL-2) はGenzyme社 (Boston, MA) より、1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride (H-7)、N-(2-guanidinoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide hydrochloride (HA1004) は生化学工業 (東京) より購入した。ウシインシュリン、3-isobutyl-1-methylxanthine, forskolin, phorbol-12-myristate-13-acetateはSigma社 (St. Louis, MO, USA) より購入した。グルコース定量には和光純薬 (東京) のグルコースCIIテストワコーを用いた。

2) 細胞及びその培養

腎由来の8細胞株すなわちサルJTC-12.p3(F)^{7,3)}、ブタLLC-PK₁^{7,4)}、

ブタPK(15)^{7.51}、ウシCKT-1^{7.61}、イヌMDCK^{7.71}、シリアハムスター BHK-21^{7.81}、ウサギLLC-RK₁^{7.91}、ラットNRK-49F^{8.01}、及びマウス副腎皮質由来Y-1^{8.11}は、細胞バンク（東京）より得た。腎由来の3細胞株、すなわちアフリカミドリザルCV-1^{8.21}、rheususサルLLC-MK₂^{8.31}、ウサギRK₁₃^{8.41}は、国立予防衛生医学研究所棚林氏より頂いた。マウス繊維芽細胞NIH3T3^{8.51}、ヒトBリンパ球BJAB^{8.61}、IL-2依存性ヒトT細胞ILT-mor^{8.71}は、東北大学医学部微生物研究室より頂いた。ヒト単球系白血病細胞株THP-1TIB202^{8.81}は東北大学結核癌研究所小児科の土屋博士に頂いた。ヒト乳ガン由来のT47D^{8.91}はAmerican Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) より購入した。ヒト前骨髄芽球系白血病細胞株HL60^{9.01}、マクロファージ系細胞株J-111^{9.11}、ヒトBリンパ球系細胞株のDaudi^{9.21}、IM-9^{9.31}、Raji^{9.41}、RPMI 1788^{9.51}、WIL2-NS^{9.61}、ヒトTリンパ球系細胞株Molt 3^{9.71}、Molt 4^{9.71}、Molt 4F^{9.71}は細胞バンクより得た。

LLC-PK₁、JTC-12.P3(F)、MIH/3T3は、ポリスチレン培養フラスコを用い、加熱不活化した10% (V/V) 牛胎児血清 (FBS) を含むDoulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 中で継代した。CV-1、LLC-MK₂、CKT-1、MDCK、BHK-21、LLC-RK₁、RK₁₃は10%FBSを

含む minimum essential medium (MEM) 中で継代した。NRK49Fは10%FBS、非必須アミノ酸を含むDMEM中で継代した。PK(15)はDMEMとHam's F-12の等量混合物にFBSを10%添加した培地、T47Dは10%FBS、 $10\mu\text{g/ml}$ インシュリンを含むRPMI 1640培地、Y-1は10%FBSを含むHam's F-10培地をそれぞれ用いた。L-M及びL-41は、5% (V/V) の加熱不活化子牛血清及び0.2% (W/V) グルコースを含むRPMI 1640を用いて継代培養した。

ILT-morは10%FBS、200u/mlのinterleukin-2を含むRPMI 1640培地中で培養し、他のヒトT及びBリンパ球細胞株、J-111、U937、HL-60は10%FBSを含むRPMI 1640培地を用いて培養した。HL 60RG、THP-1-T、THP-1-Sの培養には2%FBSを含むHyMedium 606を用いた。

細胞は水蒸気飽和状態で5%CO₂供給下37度において培養を行った。また、用いた細胞は全てHoechst dye 33258を用いたDNA染色法によりマイコプラズマに感染していないことを確認した。

3) cAMP産生反応

付着細胞の場合、 $5-8 \times 10^8$ 個の細胞を24well multi plate中で3日間培養し、confluentな状態で実験に用いた。細胞はリン酸緩衝生理食塩水（

PBS, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na_2HPO_4 , 1.5mM KH_2PO_4 , pH 7.2) で一回洗浄した後、1mg/ml BSA, 4mM MgCl_2 , 2mM 3-isobutyl-1-methylxanthineを含むPBS (反応緩衝液) に溶解した刺激剤500 μl を添加してtriplicateで37度30分間反応させた。浮遊細胞の場合、対数増殖期の細胞 10^6 あるいは 10^7 個をPBSで遠心洗浄した後250 μl のPBSに懸濁し、反応緩衝液を同量添加して同様に反応させた。沸騰水浴上5分間加熱することで反応を停止した後、plateごと3回凍結融解を行って細胞を完全に破碎し、cAMP定量に供した。cAMPの定量にはヤマサ醤油のimmunoassay kitを用い、標準品の定量曲線から試料中のcAMP量を求めた。

4) 細胞数の計数

付着細胞については、25 cm^2 フラスコ中で24時間培養した細胞に試料溶液を添加してさらに培養した。培養終了後、細胞は0.25% (W/V) トリプシン (Difco Laboratories, Detroit, USA) あるいは0.53mMのエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含む0.05%トリプシン溶液によりフラスコ面より剥離させ、PBSで一回洗浄した後0.2%トリパンブルー及び10%FBSを含む培地に懸濁して血球計算板にて計数した。浮遊細胞は、やはり25 cm^2

フラスコ中で24時間培養した後、コールターカウンター (model ZM, Coulter electronics, Luton Bends, England) を用いて計数した。

5) 細胞形態の観察

5×10^4 個の細胞を 25cm^2 フラスコ中で2日間培養し、細胞を培地で洗浄した後さらに各種試料を含む培地に交換して培養を続行した。浸透圧保護剤を用いる場合は、0.2Mのショ糖あるいはraffinoseを添加した。細胞の形態は定期的に位相差顕微鏡を用いて観察した。電子顕微鏡による観察を行う場合、フラスコ中の細胞を1%グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液 ($19\text{mM NaH}_2\text{PO}_4$, $81\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, pH7.4) 中で固定し、さらに1%四酸化オスミウムで後固定を行った。その後skrapetを用いて細胞をフラスコ面から剥離し、遠心してpelletとした細胞を乾燥してPoly/Bed 812 (Polyscience Co. Ltd.) 上に塗抹した。超薄切片は酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色し、電子顕微鏡JEM-100S (JEOL) を用いて観察した。

6) 細胞のグルコース消費定量

2.5×10^5 cells/2mlのLLC-PK₁細胞を12well plate中で3日間培養してconfluentな状態にまで増殖させた。培地を除去して無血清DMEMで細胞

を洗浄し、無血清DMEM中でさらに4時間培養し、その後CT等各種刺激剤を含む無血清DMEM1mlに培地を交換することで反応を開始した。一定時間後に培養上清を回収し、培地中に残存するグルコース量を和光純薬（東京）のグルコースCIIテストワコーを用い、ムロターゼGOD法により定量することで消費されたグルコース量を求めた。阻害剤を用いた実験では、CTを添加する10分前に阻害剤を加えた。

7) eCTの¹²⁵I標識

eCTはクロラミンT法により¹²⁵I標識を行った。反応は全て0.5Mナトリウムリン酸緩衝液（pH 7.5）中で行った。eCT25 μgを200 μlの緩衝液に溶解し、74MBqのNa¹²⁵Iを含む緩衝液200 μlと混合した。これに1mg クロラミンT/200 μlを加えて反応を開始し、室温で20秒攪拌した。直ちに2.5mg/mlの重亜硫酸ナトリウム溶液200 μlを添加して反応を停止し、室温で15秒静置した。10%ウシ血清アルブミンを含む緩衝液200 μlを加えた後Bio-gel P2ゲル濾過カラム（Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA）でボイドに溶出する¹²⁵I-eCTを回収した。LLC-PK₁細胞の増殖阻害活性によりこの画分の定量を行ったところ、比放射活性は2.9-4MBq/nmolであった。

eCTと¹²⁵I-eCTとの生理活性に違いが無いことを確認するため、非放射性NaIを用いてI-eCTを調製し、その生理活性を検討した。Bio-gel P2ゲル濾過カラムで得られた画分をTSKgel ODS80TMカラム（東ソー、東京）を用いた逆相HPLCにより0.1%トリフルオロ酢酸中、20-50%アセトニトリル濃度勾配を用いてさらに精製し、mono-iodo-eCT (I-eCT) と di-iodo-eCT (I₂-eCT) を得た。これらの画分中のペプチドの構造は、HPLC-Mass spectrum（日本電子、昭島）を用いて同定している。I-eCT、I₂-eCTの生理活性は、LLC-PK₁細胞でのcAMP産生活性及び増殖阻害活性により検定を行い、eCTと同一であることを確認した。

8) LLC-PK₁細胞への¹²⁵I-eCTの結合実験

ほぼconfluentな状態にまで増殖したLLC-PK₁は、0.05% (w/v) / 0.53mM EDTA / リン酸緩衝液で37 °Cで1.5分間処理して回収した、細胞を反応用緩衝液（15mM Tris塩酸、120mM塩化ナトリウム、4mM塩化カリウム、1.6mM硫酸マグネシウム、2mMリン酸二水素ナトリウム、10mMグルコース、0.1%(w/v)ウシ血清アルブミン、pH 7.4）で洗浄し、同緩衝液に 1.6×10^7 cells/mlとなるよう懸濁した。細胞懸濁液100 μlと、¹²⁵I-eCT約 10^5 cpm/100 μlとを混合し、0°Cで一時間反応させにた。これ

を1mlの1Mショ糖溶液上に重層し、12,000 x gで2分間遠心した。上清を除去し、沈澱した細胞に結合した¹²⁵I-eCTの放射活性をγ-counter (1282 Compugamma CS, LKB, Finland) を用いて測定した。特異的結合量は、全¹²⁵I-eCT結合量から、1 μMの非放射性eCT存在下での¹²⁵I-eCT結合量を除いて求めた。また非特異的結合は、Arg-vasopressin、ウシインシュリン、ヒト副甲状腺ホルモン、ヒト心房性ナトリウム利尿ホルモン、副腎皮質ホルモン、グルカゴン等のペプチドで影響を受けないことを確認している。

この条件下での¹²⁵I-eCT結合実験から、LLC-PK₁細胞のeCTのKd値及び細胞当りの受容体数は、それぞれ 2.44×10^{-8} Mと 3.76×10^4 個であった。

II-3. 各種株化細胞に対するeCTの作用

1) cAMP産生

腎由来及び血液幹細胞由来細胞株について、eCTあるいはadenylate cyclase活性化剤forskolin (FK)⁹⁸⁾によるcAMP産生量を【表II-1】に示した。全体に腎由来細胞株はFKによるcAMP産生量が高く、adenylate cyclase活性が高いと考えられる。これらの細胞株の中で、eCT刺激により特に著しいcAMP産生の増大が観察されたのは、すでに報告があるブタ腎尿細管上皮由来のLLC-PK₁⁶³⁾、ヒト乳ガン由来T47D⁶³⁾と、CTによるcAMP産生の報告のないウサギ腎尿細管上皮由来RK₁₃であった。CTによるcAMP産生量増大が報告されているPK(15)⁶⁴⁾、MDBK⁶⁵⁾では今回それを確認できなかった。過去の報告と必ずしも一致しない原因としては、用いた培地や血清のlotの違いによる成分の違い、あるいは細胞が継代を重ねるうちにその性質が変化した可能性が考えられる。

一方血液幹細胞由来細胞株では多くの場合未分化の細胞を用いているせいもあり、FKによってcAMP産生量が増大する細胞は少なく、adenylate cyclase蛋白の発現量が少ないかあるいは活性が十分発現しにくい状態にあると考えられた。eCT刺激によるcAMP産生量増加も見い出されなかった。

【表II-1】各種動物細胞株でのeCTによるcAMP産生

Cell line	Increase of cAMP (fold)		Cell line	Increase of cAMP (fold)	
	eCT (10^{-8} M)	forskolin (10^{-6} M)		eCT (10^{-8} M)	forskolin (10^{-6} M)
Kidney			Myeloid		
CV-1	1.1	4.3	HL-60	1.3	3.8
LLC-MK2	0.9	4.4	HL-60RG	1.1*	not done
JTC-12.P3(F)	1.9	not done	U-937	2.3*	20.0
CKT-1	0.8	23.0	THP-1 TIB202	1.0	5.8
LLC-PK ₁	27.9	25.5	THP-1	1.4	2.4
PK(15) ₁	1.1	3.9	THP-1-S	1.2	3.0
MDCK	0.7	72.5	THP-1-T	1.4	2.9
BHK-21	1.7	12.9	J-111 (suspended)	1.5	12.5
LLC-RK ₁	1.0	9.4	J-111 (adhered)	1.1	42.8
RK13	14.6	15.9			
NRK-49F	2.1	not done	Lymphoid		
Others			BJAB	1.2	16.3
T47D	25.8	132.4	Daudi	1.2*	10.5
Y-1	1.8	12.4	IM-9	1.0	2.8
NIH/3T3	0.7	not done	RPMI 1788	1.4	7.4
L-M	1.1	9.5	WIL2-NS	1.3	6
HUT-78	1.0	not done	CCRF-CEM	0.9	not done
L-41	0.9	5.1	HUT-102	0.7	12.5
			ILT-mor	1.0	not done
			Molt 3	1.8*	47.7
			Molt 4	2.0	327.1
			Molt 4F	1.4	25.6

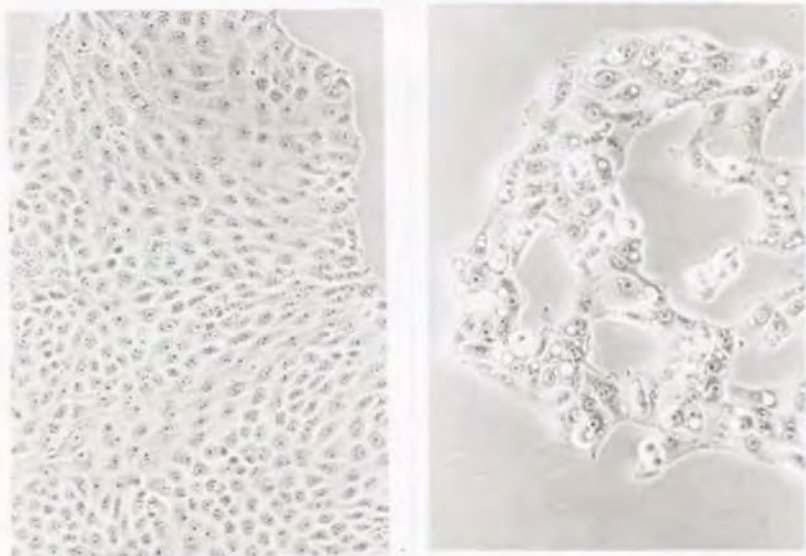
4mMの3-isobutyl-1-methylxanthine存在下に、*は 10^{-7} M、他は 10^{-8} MのeCTあるいは 10^{-6} Mのforskolinで各細胞を37°Cで30分間刺激した際のcAMP産生量をradioimmunoassayにより定量し、非刺激時のcAMP量に対する比で表した。

2) eCT共存下での長期培養の効果

前項においてcAMP産生反応を調べた細胞株をeCT共存下に3日間培養し、その長期作用を検討した。まず増殖期の細胞に対して 10^{-9} MのeCTを培地に添加して培養し、その細胞形態を顕微鏡下に観察したところ、LLC-PK₁においてのみ【図II-1B】に示すような著しい形態変化が認められ、またフラスコ面から剥離して死滅細胞が多数観察された。【表II-2】に示すように残存細胞数も他の細胞に比べて少なく、増殖が阻害されていた。

一方、既にconfluentになった定常状態の細胞にeCTを添加した場合、やはりLLC-PK₁においてのみ培地が黄色くなり著しく酸性化している様子が観察されたが、細胞形態には変化は見られなかった。以上のようなCT作用はこれまでに報告がなく、そこで以下にLLC-PK₁細胞におけるeCTの影響について、さらに詳細に検討することにした。すなわち「II-4」においてLLC-PK₁細胞に対するeCTの形態異常誘導及び増殖阻害作用、そして「II-5」において培地の酸性化作用について検討し、「II-6」ではこれらのLLC-PK₁細胞に対する作用を、新たなCTの*in vitro*活性評価系へ応用することを試みた。

【図II-1】 LLC-PK₁細胞形態に及ぼすeCTの効果



25cm²のフラスコを用い、10%ウシ胎児血清を含むDMEM中で、10⁶個のLLC-PK₁細胞を培養した。左は対照細胞の培養5日目、右は2日目にeCT 10⁻⁹Mを添加し、さらに3日間培養を行った細胞の位相差顕微鏡による観察結果を示した(70倍)。

【表11-2】各種動物細胞の増殖に及ぼすeCTの効果

Cell line	Cultured period (day)	eCT (M)	Cell number ($\times 10^5$)	% of control
LLC-PK ₁	3	none	26.9	100
	3	10^{-8}	8.6	31.2
RK ₁₃	4	none	58.0	100
	4	10^{-8}	55.6	95.9
	4	10^{-7}	51.8	89.3
JTC-12P.3(F)	4	none	21.3	100
	4	10^{-8}	23.2	108.9
NRK-49F	2	none	15.0	100
	2	10^{-8}	14.3	95.3
T47D	6	none	2.6	100
	6	10^{-7}	1.8	70.6
	6	10^{-6}	1.8	70.6
U-937	3	none	14.8	100
	3	10^{-7}	14.3	96.6
Molt 4	3	none	14.6	100
	3	10^{-7}	14.0	95.9

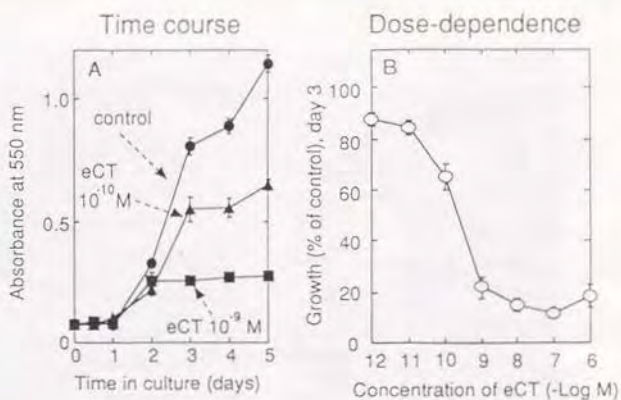
II-4. CTによるLLC-PK₁の細胞形態異常・増殖阻害作用

1) eCTのLLC-PK₁細胞形態に及ぼす影響

10⁵個のLLC-PK₁細胞にeCTを添加して250 mlのフラスコを用いて3日間培養し、細胞の形態を位相差顕微鏡で観察した。【図II-1A】はcontrolの細胞であるが、比較的小さい細胞がシート状に密になって増殖している上皮細胞様の形態が観察される。10⁻⁹ MのeCTを培地に添加した場合、フラスコ面から剥がれて死滅し、浮遊している細胞が多数観察された。残存細胞も【図II-1B】に見られるように、細胞の円形化が観察され、細胞内に空胞が出現して形態が著しく変化していた。すなわちeCTはLLC-PK₁細胞の形態異常を誘導し、これが細胞死につながる可能性が考えられた。これまでに二つのグループからサケCT (sCT) によるLLC-PK₁細胞の増殖抑制の報告がなされているが^{99) 100)}、いずれの場合も細胞数についてのみの観察で、本研究により見いだされたような細胞形態の異常誘導についての記載はない。

このeCTによる細胞死誘導を、残存細胞の染色により定量化して観察したのが【図II-2】である。Aの経時変化では、eCT濃度が10⁻¹⁰ Mでは培養3日目で、10⁻⁹ Mでは2日目で増殖が阻害されていた。また、培養3日目

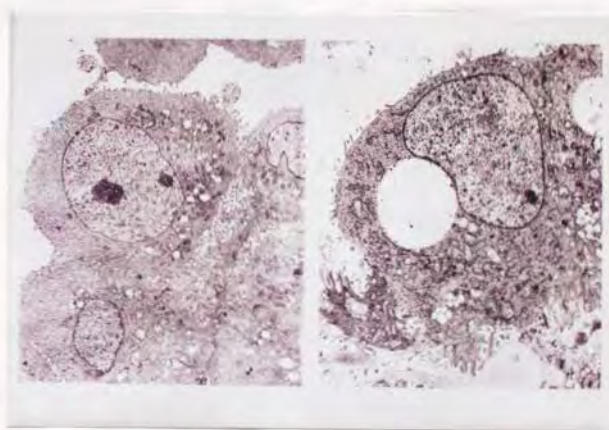
【図11-2】 eCTによるLLC-PK₁増殖阻害の経時変化と濃度依存性



DMEM/10%ウシ胎児血清中に懸濁したLLC-PK₁細胞 3×10^4 個/200 μ lを96well plateに加えてincubationし、6時間後にeCTを添加して培養を開始した。残存している細胞を固定した後crystal violetで染色し、洗浄後に残っている色素量を550nmの吸光度により定量した。1 O.D. は約 5.7×10^4 個の細胞に相当する。(n = 4)

容量依存性は、eCTを添加後3日間の培養での結果を無添加対照での数値に対する%値で表わした。

【図11-3】 eCT処理したLLC-PK₁の透過型電顕による観察



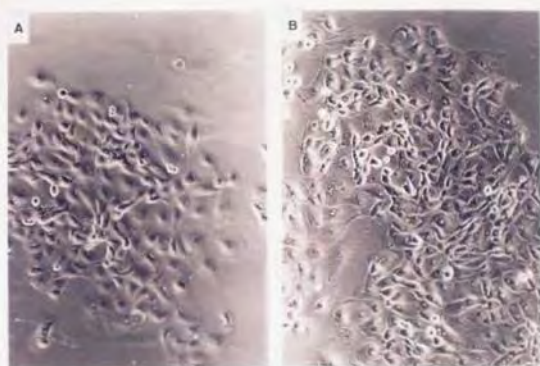
eCT非存在下（左）、存在下（右）で3日間培養したLLC-PK₁細胞をOSO₄で固定して超薄切片を作成し、酢酸ウラン、クエン酸鉛で二重染色を行った後透過型電子顕微鏡で観察を行なった（6000倍）。

でのeCT濃度依存性を見た【図II-2B】では、 10^{-10} M以上の濃度で増殖阻害作用が現れ、 10^{-8} Mではほぼ完全に阻害されている。このようにeCTによるLLC-PK₁細胞の増殖阻害は時間と濃度に依存していることが確認された。

eCTにより惹起されたLLC-PK₁細胞形態を、透過型電子顕微鏡を用いて観察したのが【図II-3】である。 10^{-9} MのeCT共存下に培養した細胞（【図II-3B】）の最も特徴的な変化は、対照細胞（【図II-3A】）に比較して粗面小胞体が著しく膨張している点である。その内容物の電子密度がきわめて希薄であることから、これは水分であると推察され、eCTが作用することで細胞外から極端な水分の流入が起こったことが予測された。

そこで次に浸透圧保護剤である糖を培地に添加して、同様にeCTのLLC-PK₁細胞形態に及ぼす効果を調べた。【図II-4】がその結果であるが、0.2M ショ糖を培地に添加して高張に保った【図II-4B】の細胞ではeCTを共存させて培養しても【図II-4A】の対照細胞と形態にほとんど違いはなく、eCTによる形態異常及び細胞死の誘導は抑制されていた。すなわち、LLC-PK₁細胞にeCTを作用させると粗面小胞体内に浸透圧活性を有する物質が蓄積して細胞外から多量の水が流入し、形態異常が誘導され細胞死に至ったことが示唆された。この場合、RER内部に蓄積する浸透圧活性を有する物質の可能性としては、glucose-regulated protein (grp) 78が考え

【図II-4】 ショ糖によるeCTのLLC-PK₁細胞
異常形態誘導の抑制



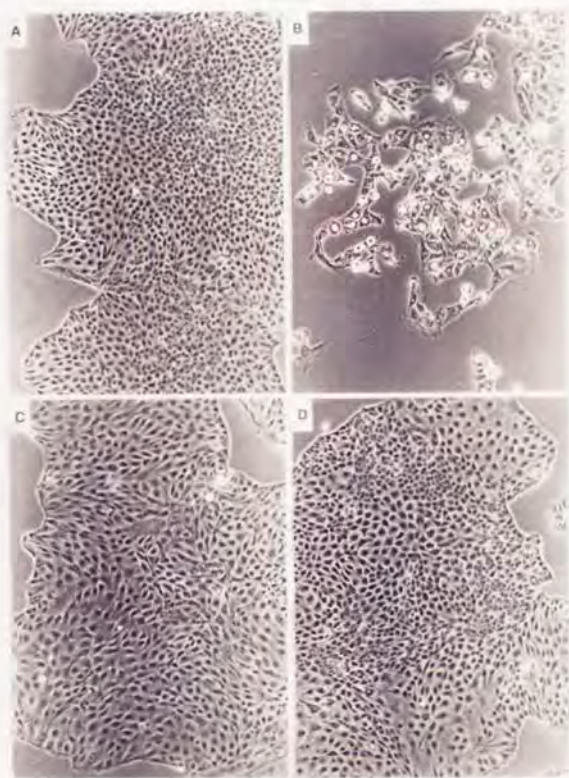
0.2Mショ糖存在下に3日間培養したLLC-PK₁細胞の形態（70倍）。左はeCT非存在下、右はeCT10⁻⁹M共存下での様子を表わす。

られる。grp78はER内に存在し¹⁰¹⁾、翻訳された蛋白質のN-グリコシル化が何らかの原因で阻害されると増加して、さらにERの膨張が起こることが報告されている¹⁰²⁾。さらにLLC-PK₁細胞において、サケCT (sCT)によりDrosophila熱ショック蛋白質hsp70に類似のmRNAが誘導され、これはcycloheximideで阻害される¹⁰³⁾という報告がなされているが、一般にhsp70mRNA合成はcycloheximideで阻害されないがgrp78は阻害されること^{104) 105) 106)}、sCTにより誘導されるmRNAの配列がこれまでに報告されている他の動物 (LLC-PK₁はブタ由来) のgrp78の配列に類似している^{102) 103) 107)} こと等から、sCTにより誘導されていたのはgrp78のmRNAである可能性が高い。すなわち、本研究で観察されたeCTによるLLC-PK₁細胞の形態異常誘導について、以下のように考えられる。eCTによる刺激が翻訳された蛋白質のN-グリコシル化の阻害につながってRER内にgrp78が蓄積し、さらに細胞外から水分が流入がしてRERの膨張、細胞の円形化を伴う著しい形態異常を誘導し、最終的に細胞死に至るものと推察される。

2) 各種動物由来CTとcAMP増加刺激のLLC-PK₁細胞形態に及ぼす効果

eCT以外の各種CTおよびcAMP増加刺激についても、LLC-PK₁細胞形

【図II-5】 eCT、hCTおよびFKの
LLC-PK₁形態に及ぼす効果



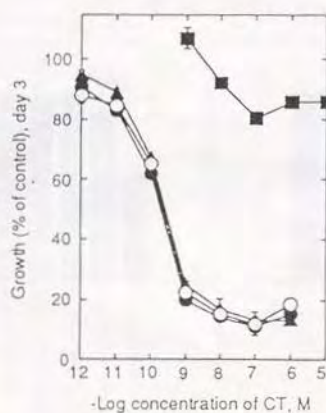
実験条件は【図II-1】と同一である。Aは対照細胞、B、C、Dはそれぞれ $eCT10^{-5}M$ 、 $hCT10^{-6}M$ 、 $FK10^{-4}M$ を添加して培養した細胞の形態を示す（70倍）。

態に及ぼす効果を検討したところ、【図II-5C】、【図II-5D】に示すようにヒトCT (hCT)、FK存在下に培養した場合、controlの【図II-5A】に比べ若干細胞が大きくなり数が減少しているが、【図II-5B】eCTの場合のような顕著な細胞形態の変化・増殖阻害は観察されなかった。残存細胞の色素染色でもhCTの増殖阻害効果は弱く、ウナギ、サケ、トリの魚類鳥類CTのみがほぼ同程度の強い増殖阻害作用を示した(【図II-6】)。

さらに種々の刺激剤についてcAMP産生と増殖阻害作用をまとめたのが【図II-7】である。各種CT、arginine-vasopressin (AVP) はLLC-PK₁のcAMP産生を増大させる。しかしその内で著しい増殖阻害を起こしたのは魚類鳥類CTのみで、ブタ、ヒトの哺乳類CT、AVP、FK、8-bromo-cAMP (8-Br-cAMP) では若干細胞数は減少するが形態異常や強い増殖阻害は観察されなかった。即ち、LLC-PK₁の著しい形態変化・増殖阻害は魚類鳥類CTに特徴的な作用で、しかもcAMP以外の細胞内情報伝達経路の活性化を必要とすることが示唆された。前項においてsCT刺激によりLLC-PK₁細胞でhsp70に類似のmRNAが誘導される報告を引用したが、これはやはり8-Br-cAMPでは惹起されないことが知られており¹⁰³⁾、やはりcAMP以外の細胞内情報伝達経路が活性化されていると考えられる。さらに本研究で得られた結果は、哺乳類CTはこの第二の経路を活性化しな

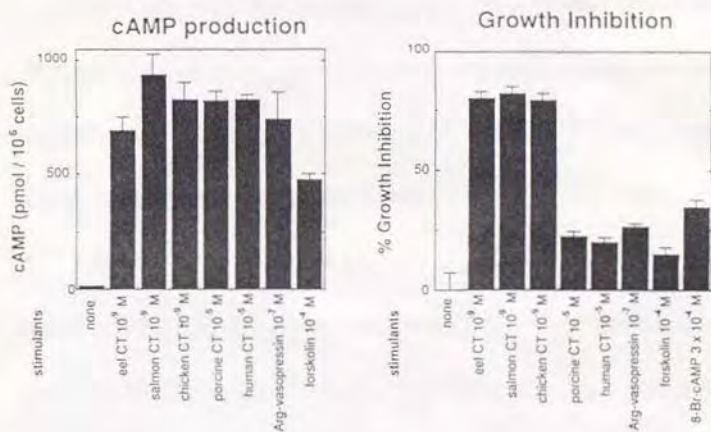
いことを示唆している。そこで以下にこのcAMP以外の第二の経路についてさらに解析を行なった。

【図II-6】 各種CTのLLC-PK₁増殖阻害濃度依存性



実験条件はすべて【図II-2B】と同一である。○はeCT、●はsCT、▲はcCT、■はhCTの結果を表わす。

【図II-7】 LLC-PK₁細胞のcAMP産生、増殖阻害に及ぼす各種刺激剤の効果



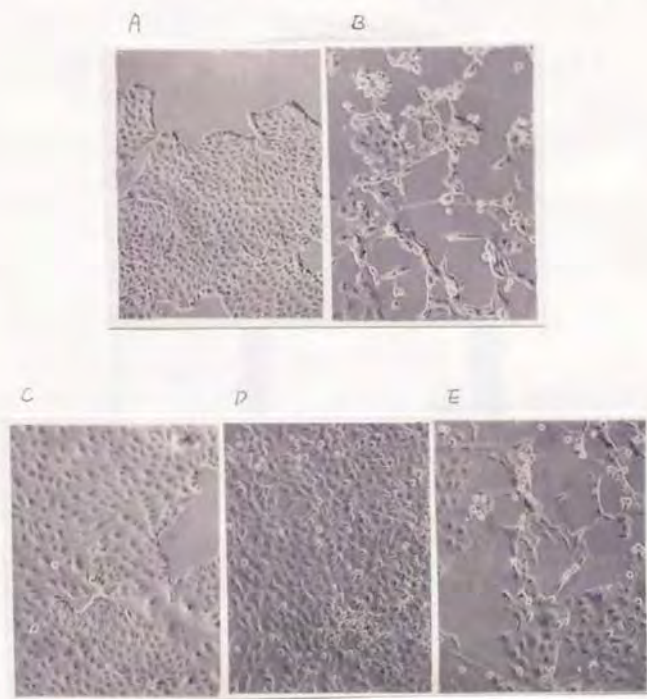
cAMPは、24well plate中のconfluent LLC-PK₁に各刺激剤を添加し、37°C 20分間の反応で産生されたcAMP量をradioimmunoassayにより定量した。増殖阻害は【図II-2】の方法により、刺激剤添加後3日培養での増殖阻害活性をあらわした。

3) 魚類鳥類CTによるLLC-PK₁細胞の形態異常・増殖阻害に関与する細胞内情報伝達経路の検討

最近、LLC-PK₁でのeCTによるリン酸取り込み亢進にC-kinaseの活性化^{8,21)}の関与を示唆する報告がなされている。そこで今回見いだされたLLC-PK₁の細胞形態異常及び増殖阻害にもC-kinaseが関与している可能性を検討した。【図II-8】は、C-kinase活性化剤のphorbolmyristate-acetate (PMA)の効果を見たものであるが、PMA共存下に培養した細胞では若干の形態変化は認められたが細胞数はむしろcontrolより増加していた(【図II-8D】)。【図II-8C】に示すように8-Br-cAMPのみでもFKの場合(【図II-5D】)と同様若干細胞は大きくなっていたのみであった。ところがPMAに8-Br-cAMPを共存させた【図II-8E】は、【図II-8B】のeCTの場合とよく似た形態異常が再現され、残存細胞も減少していた。これを色素染色により定量化したのが【図II-9】である。PMA単独ではやはり強い増殖促進作用が認められ、 3×10^{-4} Mの8-Br-cAMPとの共存下においてもPMA濃度が低い場合はやはり増殖は促進する。ところが 3×10^{-4} Mの8-Br-cAMPと 10^{-9} M以上のPMAが共存するとeCTの場合と同様の顕著な増殖阻害が再現された。

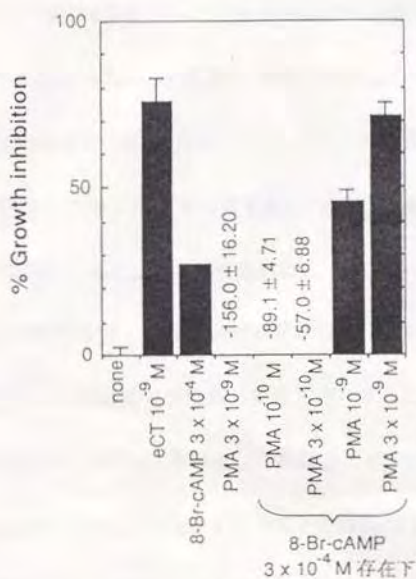
【図II-8】、【図II-9】の場合、細胞を培養している期間中すべてに

【図II-8】 eCTによるLLC-PK細胞形態異常誘導における
C-kinase関与の可能性



実験条件は【図II-1】と同一である。Aは対照細胞、B、C、DはそれぞれeCT 10^{-9} M、8-Br-cAMP 3×10^{-4} M、PMA 10^{-9} M存在下に培養した細胞を、Eは8-Br-cAMP 3×10^{-4} MおよびPMA 10^{-9} Mを添加して培養した細胞の形態を示す（50倍）。

【図II-9】 eCTによるLLC-PK₁細胞増殖阻害における
C-kinase関与の可能性



【図II-2】の方法により、刺激剤添加後3日培養での増殖阻害活性をあらわした。数値にマイナス(-)を付したものは、増殖促進が観察されたことを示す。

8-Br-cAMPとPMAが存在しているが、eCT刺激の場合にadenylate cyclaseとC-kinaseの活性化が持続して起こっているとは考えにくい。またphosphodiesteraseやprotein phosphatase等による逆反応や、他の情報伝達経路とのクロストークの影響も除外できるものではない。しかし以上の結果は、あるバランスでadenylatecyclaseの活性化とC-kinaseの活性化が起こった場合にのみ、LLC-PK₁の形態異常が惹起されることを示唆するものである。すなわち魚類・鳥類CTはLLC-PK₁細胞においてadenylatecyclaseとC-kinaseの両方をちょうど形態異常誘導を惹起するバランスで活性化すること、また哺乳類CTはcAMP産生は増大させるがC-kinaseを活性化しないことが示唆された。

さらに、この形態異常・細胞死は増殖期のLLC-PK₁においてのみ観察されるが、一旦confluentにまで増殖して定常期に入った細胞では起こらない。この点に関して本研究においてはこれ以上の解析は行っていないが、最近ChakrabortyらによりLLC-PK₁のCT受容体は細胞周期によってcouplingするG-タンパクや、regulationのメカニズムが異なる事が報告されており¹⁰⁸⁾、CTの作用が細胞周期によって変る可能性は十分考えられる。

CTの種差と細胞内情報伝達経路については「II-5」の結果も併せて、「

II-6」においてさらに考察する。

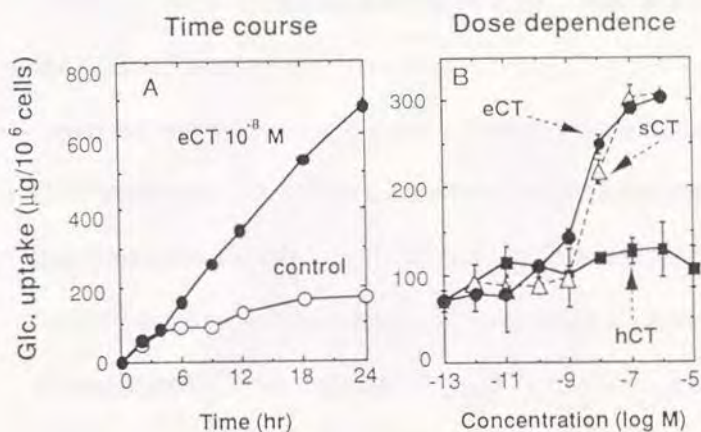
II-5. CTによるLLC-PK₁細胞の培地酸性化

1) グルコース消費亢進の検討

「II-3」において記載したように、LLC-PK₁細胞をconfluentな状態にまで増殖させてからeCTを添加してさらに2~3日培養すると、細胞形態に変化は見られないが培地が著しく黄色くなり、酸性物質が蓄積していることが予測された。その原因としてまず、解糖系の亢進による乳酸の蓄積の可能性を考えた。予備的検討により、ガスクロマトグラフィーで培地中の乳酸の増加を確認できたため、次に培地中のグルコースが消費されて減少するか否かを検討することにした。

まず【図II-10】は、eCTによるグルコース消費亢進の経時変化と濃度依存性を検討したものである。一旦confluentになった細胞の培地を新しく交換し、さらに培養した後に培地中のグルコースを定量してその消費量を求めた。Aに経時変化を示したが、controlの細胞ではグルコース消費の増加はごくわずかであるのに比べ、 10^{-8} MのeCTを添加して培養した細胞では培養24時間まで直線的にグルコース消費が増加し、eCTによりLLC-PK₁のグルコース消費が著しく亢進することが確認された。従ってeCTによる培地酸性化の原因は、LLC-PK₁細胞での解糖系亢進による乳酸

【図II-10】 CTによるconfluent LLC-PK₁細胞の
 グルコース消費亢進の経時変化と容量依存性



10⁻⁸MeCTによるLLC-PK₁細胞のグルコース消費経時変化 (A) および 8時間のグルコース消費量に対する各種CT濃度依存性 (B)。12well plate中でconfluentまで培養したLLC-PK₁細胞を無血清DMEMに培地交換後、4時間培養した。その後CTを添加してさらに培養し、上清中のグルコース量をムロターゼGOD法を用いて定量した (n=3)。

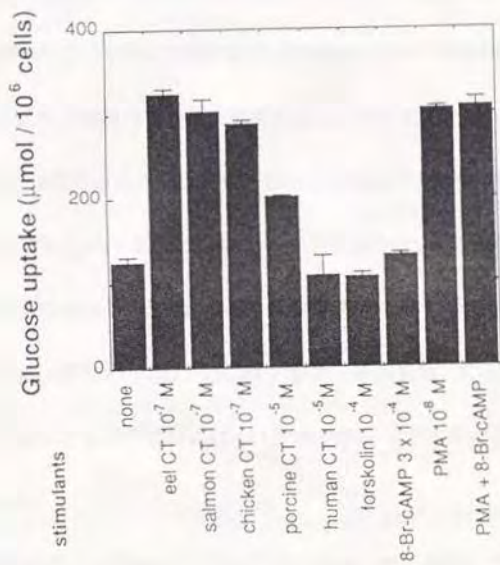
蓄積に由来する可能性が考慮される。しかし、このグルコース消費の亢進が解糖系亢進を意味しているか否かについては、解糖系の律速酵素である6-ホスホフルクトキナーゼの活性を比較しなければ確実な判断はできない。今回得られた実験結果からは、eCTによりLLC-PK₁のグルコース消費亢進作用と、おそらく乳酸増加に由来すると考えられる培地の酸性化が確認されたにとどまる。

Bは培養8時間でのLLC-PK₁のグルコース消費についてeCT、sCT、hCTの濃度依存性を見たものである。II-4において検討した細胞形態異常誘導・増殖阻害作用と同様に、eCT、sCTは 10^{-8} M以上の濃度でグルコース消費を亢進するが、hCTには高濃度においてもその作用を示さなかった。すなわち細胞形態異常誘導・増殖阻害作用と同様、CTのグルコース消費亢進作用にもC-kinaseが関与している可能性が予測される。そこで次項においてこの点を検討した。

2) 魚類・鳥類CTによるLLC-PK₁グルコース消費亢進作用におけるcAMP及びC-kinase関与の可能性

まず【図II-11】において、各種カルシトニンによるLLC-PK₁の培養8時間のグルコース消費を比較した。魚類・鳥類CTではcontrolに比べグル

【図II-11】 LLC-PK₁細胞のグルコース消費亢進における
cAMPおよびC-kinase関与の可能性の検討

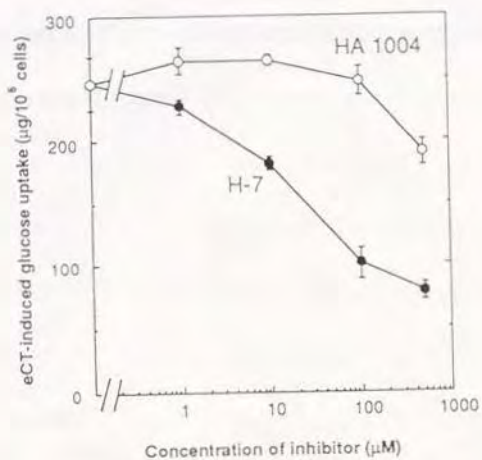


【図II-10】と同一の条件で、各刺激剤添加8時間後のグルコース消費量を定量した。

コース消費量は約 $200 \mu\text{mol}/10^6\text{cells}$ 増加していた。一方哺乳類CTでは、ブタCT (pCT) で $70 \mu\text{mol}/10^6\text{cells}$ 程度の増加が観察されたが、hCTは、LLC-PK₁のcAMP量を最大限上昇させる濃度であるにもかかわらず、グルコース消費亢進は全く見られなかった。さらにFK、8-Br-cAMPもグルコース消費には全く影響を及ぼさないことから、LLC-PK₁のグルコース消費亢進作用についても、前項の細胞形態異常の誘導・増殖阻害作用と同様、cAMP以外の細胞内情報伝達経路の活性化が必要である可能性が考えられた。そこでこの反応においてもC-kinaseの関与の可能性を検討したところ、【図II-11】に示すようにC-kinase活性化剤のPMAにより顕著にグルコース消費量は増加し、8-Br-cAMPを共存させてもその効果に違いは見られなかった。すなわちLLC-PK₁のグルコース消費は、C-kinaseの活性化により惹起されるがその反応にcAMP産生が関与する可能性は低いことが示唆された。

そこで次にこの細胞でのグルコース消費亢進におけるC-kinase関与の可能性を確認するため、protein kinase阻害剤の効果を見たのが【図II-12】である。LLC-PK₁細胞を各濃度のprotein kinase阻害剤で10分間処理した後、 10^{-7}M のeCTを添加してその後8時間のグルコース消費を見た。A-kinase、C-kinase、G-kinase、myosin light chain kinaseを同程度に

【図11-12】 eCTによるLLC-PK₁細胞グルコース消費
亢進に対するprotein kinase阻害剤の効果



10⁻⁷M eCTを添加する10分前に各阻害剤を添加し、8時間後のグルコース消費量を表わした。

阻害するH-7¹⁰⁹⁾はこの反応を容量依存的に阻害してたことから、この反応にいずれかのprotein kinase活性化が関与する可能性が考えられた。さらにC-kinaseに対してのみ阻害活性の弱いHA1004¹¹⁰⁾の効果を検討したところ、阻害作用はH-7よりはるかに弱かった。以上の結果から、LLC-PK₁細胞のグルコース消費反応にはC-kinase活性化の段階が含まれていることが示唆された。

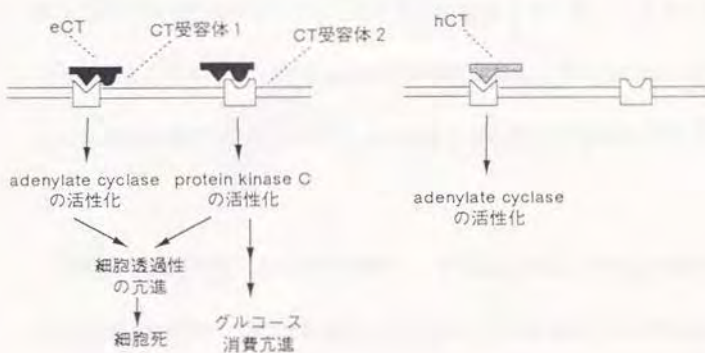
II-6. CT受容体と細胞内情報伝達経路に関する解析

1) 放射標識CTを用いたLLC-PK₁細胞受容体結合実験

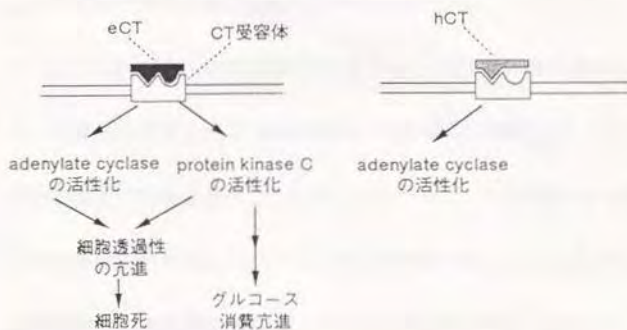
「II-4」、 「II-5」の結果から、魚類・鳥類CTによる増殖期のLLC-PK₁細胞の形態異常誘導・増殖阻害、及び定常期LLC-PK₁でのグルコース消費の亢進には、C-kinaseの活性化の段階が関与することが示唆された。さらに、哺乳類CTはadenylatecyclaseを活性化するにもかかわらずこれらの作用を示さないことから、魚類・鳥類CTはadenylatecyclaseとC-kinaseの両方を活性化すること、哺乳類CTはadenylatecyclaseを活性化するがC-kinaseを活性化しないことが示唆された。ではCT受容体と、これら二つの細胞内情報伝達経路の活性化との関連はどのようになっているのであろうか。まず考えられるのは、【図II-1 3A】に示すように、LLC-PK₁細胞膜上には各々adenylatecyclaseとC-kinaseにlinkした2種類のCT受容体が存在し、魚類・鳥類CTはこの2つの受容体の両方に結合して2つの経路を活性化するが、哺乳類CTはadenylatecyclaseにlinkした受容体とのみ結合するというモデルである。一方【図II-1 3B】に示すモデルも否定できない。すなわちLLC-PK₁細胞のCT受容体は1種類で、おそらく異なるG-蛋白質を介してadenylate cyclaseとC-kinaseとがこの受容体にlinkす

【図II-13】 LLC-PK, 細胞CT受容体と
細胞内情報伝達経路のモデル図

A. 2種類を受容体の存在を想定したモデル



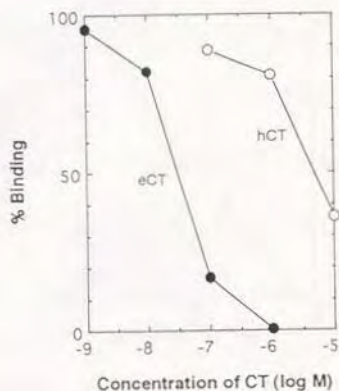
B. 1種類を受容体のみを想定したモデル



るという考え方である。この場合、魚類・鳥類CTが受容体に結合すると、同時であるか時間的ずれがあるかは分からないが、両方の経路が活性化される。哺乳類CTがこの受容体に結合すると、adenylatecyclaseの活性化にはつながるがC-kinaseは活性化されないと考えられる。LLC-PK₁細胞ではこれら二つのモデルのうちどちらが存在するのかを知るため、以下に受容体結合実験を行ってLLC-PK₁のCT受容体に関する情報を得るとにした。

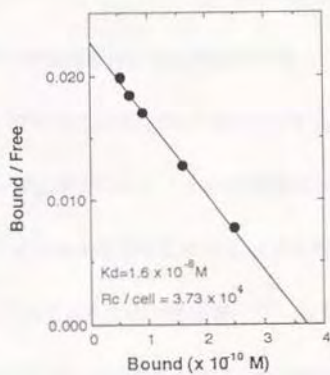
¹²⁵Iにより放射標識したeCTを調製し、そのLLC-PK₁への特異的結合に対するeCT及びhCTの競合を検討した。LLC-PK₁細胞膜上のCT受容体が1種類であれば、hCTはeCTと同様に¹²⁵I-eCTの受容体結合を完全に阻害し、受容体が2種類あればhCTは¹²⁵I-eCTの受容体結合の一部しか阻害しないことが予測される。実際の実験結果を【図II-14】に示した。eCTは 10^{-6} Mで完全に¹²⁵I-eCTの結合を阻害する。hCTは塩酸塩試料を用いており、大量に使用すると反応液が酸性になり細胞に障害を与えるため 10^{-5} M以上の濃度では実験を行うことができなかった。この範囲内で見ると、その受容体結合の強さはeCTより約100倍弱いが、eCTの場合とほぼ同じ傾斜の競合曲線が観察され、LLC-PK₁細胞膜上のCT受容体は1種類である可能性が示唆された。さらに¹²⁵I-eCTのLLC-PK₁への結合の

【図II-14】 ^{125}I -eCTのLLC-PK₁受容体結合に対する
eCT、hCTによる競合



cold CTの存在下に、trypsin処理したLLC-PK₁細胞 1.6×10^6 個/ $200 \mu\text{l}$ に対する ^{125}I -eCT (10^5 cpm / $5 \times 10^{-9}\text{M}$) の結合の割合を表わした。specific bindingは、 ^{125}I -eCT結合値から 10^{-6}M cold eCT存在下での結合値を除去して求めた。

【図II-15】 ^{125}I -eCTのLLC-PK₁受容体結合のScatchard解析



【図II-14】と同様の条件下にて得られた結果を元にScatchard解析を行った。

Scachard analysisをおこなったところ、【図II-1 5】に示すようにやはり受容体は一種類である可能性が示唆された。従ってLLC-PK₁細胞におけるCT受容体とその細胞内情報伝達経路との関連は、【図II-1 3 B】のタイプであると推察された。

2) CT受容体と細胞内情報伝達に関する考察

これまでに知られているG-蛋白質にlinkする受容体は、一種類の受容体に一種類のG-蛋白質がlinkし、その受容体にligandが結合すると一種類の細胞内情報伝達経路が活性化されるというものがほとんどであった。しかし最近になってm2ムスカリン受容体¹¹³⁾、 α 2アドレナリン受容体¹¹²⁾、thyrotropin (TSH) 受容体について、一つの受容体が複数のsignalにリンクすることが報告されるようになった。TSH受容体は、複数のG-蛋白質にlinkすること¹¹³⁾、一種類のTSH受容体cDNAを発現させた細胞でcAMPとPIP₂の両方が生成する¹¹⁴⁾ことが知られている。PTH受容体⁵⁹⁾についても同様にcDNAを発現させた細胞でcAMPとPIP₂の両方が生成することが報告されている¹¹⁵⁾。

CTについても、破骨細胞に対するeCTの作用がその運動性を抑制するQ (quiescence) effectと細胞を収縮させるR (retraction) effectに分け

られるが、前者の反応のみがcAMPを介すること、しかし両方の反応ともG-蛋白質へのGTP結合を阻害する Li^+ ^{11,6)}で抑制されることから、異なるG-蛋白質が関与する可能性が示されていた^{11,7)}。最近になってCT受容体も最近LLC-PK₁細胞からcloningされ^{5,8)}、その情報伝達に関する研究も急速に進展した。他の受容体の場合と同様、ChabreらはCT受容体cDNAを発現させた細胞をsCTで刺激するとやはりcAMP産生とイノシトールリン酸産生の両方が起こることを示している^{11,8)}。彼等はそのED₅₀が各々0.16nMと3.7nMで10倍以上異なることから、やはり受容体に異なるG-蛋白質がlinkして各々の反応を制御している可能性を考察している。

イノシトールリン酸産生は、phosphatidylinositolあるいはその分子内のinositolがリン酸化されたものがphospholipase Cによって分解される反応から始まる。その際にはdiglycerideが共に生成するため、従ってこれらの受容体の活性化に伴いC-kinaseも活性化されることも充分予測される。従って本研究により明かにされた魚類・鳥類CTによるLLC-PK₁細胞における細胞形態異常誘導・増殖阻害作用およびグルコース消費亢進作用にC-kinase活性化が関与することは十分考えられる。

ところが哺乳類CTの場合のように、ligandによってその片方のみを活性化させるという例はこれまでに知られていない。複数のG-蛋白質とlinkす

る受容体において、その一部のみが活性化されるという現象は起こりえるのであろうか。その可能性を示す報告がいくつかの受容体についてなされている。Kosugiらは、TSH受容体細胞内domainの一つであるAla623をGluあるいはLysに変異させたものをCos7細胞に発現させたところ、thyrotropinによる PIP_2 産生は保持されていたがcAMP産生は起こらないことを示した¹¹⁹⁾。また β -adrenalin受容体においても222-229と258-257のアミノ酸を欠失することで、G-蛋白質を介したadenylate cyclase活性化は消失するがG-蛋白質非依存性のNa-Hポンプは影響されない¹²⁰⁾こと、 α_2 -adrenalin受容体のAsp79に変異を起こすとagonist刺激によるpotassium currentが増大するがadenylate cyclase抑制、カルシウム流入には影響を及ぼさない¹²¹⁾ことが知られている。すなわちこれらの受容体においては、受容体分子内の全く異なる部位が二つのsignalの活性化に独立して関与すると考えられ、あるligandの刺激によって片方のsignalのみが活性化される、という現象も、まったく起こりえないことではない。

3) CTの種差に関する考察

従来、哺乳動物での血中カルシウム濃度低下作用の強さは哺乳動物由来CTより魚類・鳥類CTの方がはるかに強いことが知られている。*in vitro*で

の魚類・鳥類CTの受容体結合、cAMP産生活性も哺乳動物由来CTのそれより1,000倍ほど強いことも知られており、これまでは*in vivo*活性の差もcAMP産生能の差も受容体結合の違いに由来すると説明されてきた。しかし本研究により、哺乳動物であるブタ由来のLLC-PK₁細胞において、魚類・鳥類CTは少なくとも二つの細胞内情報伝達経路を活性化し得るが、哺乳類CTはその一方のみしか活性化する能力を持たないという結果が得られ、活性化し得る細胞内情報伝達経路の違いという、細胞レベルでの活性の質的な違いが*in vivo*活性の強さの差の原因である可能性が示唆された。しかしこの可能性について明確な結論を得るためには、CTの細胞レベルでの活性と組織・生体レベルでの活性を結び付けるような知見の集積を待たねばならない。これまでに得られている知見からは、CTによるcAMP産生あるいはC-kinaseの活性化、イノシトールリン酸生成、細胞内カルシウム濃度上昇が、各々組織レベル、生体レベルのどのような作用と結び付いているかについては、ほとんど想像することすらできない。解答が得られるのはかなり先のことになるであろう。

しかし哺乳動物での活性を見ているのにもかかわらず、なぜ魚類・鳥類CTのほうが哺乳類CTより*in vitro*活性が多様であり、*in vivo*活性も強いのであろうか。序論において、下等動物でのCTの生理学的意義はほとんど不

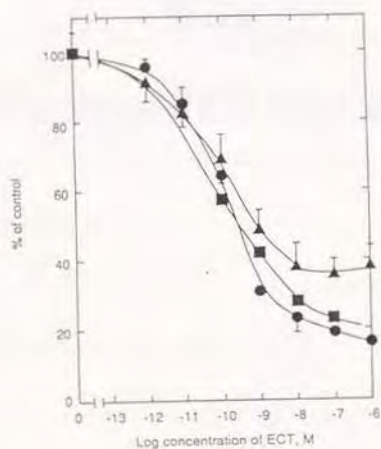
明であることを述べたが、哺乳動物でも臨床応用を念頭においた研究が中心で、本来の生理学的作用についての研究はあまり進んでいない。ヒト体内でのCT量は新生児期に高く、その後下降して成人でのCT量は低値にとどまるが、体外から投与したCTに反応する受容体が発現していることから、何らかの役割を果たしていると想像されてきた。さらに10年ほど前から、sCTに特異的な抗体に反応する物質がヒト^{1,2,2)}、ラット^{1,2,3)}、甲状腺等に検出されたという報告がされており、下等動物CTに近い一次配列を有するCTが哺乳動物でも発現している可能性が示唆されていた。またLasmolex^{1,2,5)}は、ヒトやラットにおいてトリCTのmRNAにきわめて近い配列のmRNAが発現していることを示しており、哺乳動物において従来下等動物CTとされてきた物質が活性を発現している可能性はきわめて高い。本研究により明らかになった、魚類・鳥類CTと哺乳動物CTとが活性化し得る細胞内情報伝達経路の違いは、哺乳動物体内で両CTがそれぞれに異なる役割を担っている可能性を示唆するものである。近い将来、哺乳動物における、いわゆる哺乳動物CTと下等動物CTの生理的意義が明らかになることを期待したい。

II-7. CTの新しい*in vitro*活性測定法の確立

「II-4」から「II-6」までの解析により、LLC-PK₁細胞において魚類・鳥類CTは形態異常誘導に起因する増殖阻害およびグルコース消費亢進を惹起すること、さらにこの反応にはcAMP以外の経路、おそらくC-kinaseが関与する可能性が示唆された。すでにCTによるイノシトールリン酸生成、細胞内カルシウム濃度上昇が報告されているが、いずれの手法も操作が繁雑で数値がばらつく。そこで本研究により見いだされた反応のうち、簡便かつ安価で再現性が良い色素染色による増殖阻害作用測定法について、*in vitro*活性指標への応用を検討した。

【図II-16】は、eCTによるLLC-PK₁細胞増殖阻害作用を、³H-thymidineの取り込み及び残存細胞数を血球計算板による計数、あるいは色素染色による定量する3種類の方法により評価したものである。いずれの方法でも得られた結果に大きな差異はなく、色素染色法を用いることに問題は無いと判断された。そこでこの方法をCT活性の新たな側面を評価する指標に加え、受容体結合反応、cAMP産生反応とともに第三章で各種CT誘導体の活性測定系として用いることにした。

【図II-16】 eCTによるLLC-PK₁細胞増殖阻害の各種定量法の比較



3日間培養でのeCTのLLC-PK₁増殖阻害活性を、色素染色法(●)、細胞数の計数(■)、DNAへの³H-thymidine取り込み(▲)の各手法により定量した。100%に相当するeCT非存在下での数値は、色素染色法で550nmの吸光度 1.25 ± 0.07 (n=4)、細胞数の計数で 2.69×10^6 個/25cm² (n=1)、³H-thymidine取り込みで 1.057 ± 0.041 kBq/well (n=3)であった。

第三章

カルシトニンの構造活性相関に関する研究

III-1. はじめに

CTは比較的早く臨床応用が進んだせいもあり、かなり古くから魚類CTを中心に構造活性相関を知ろうとする試みがなされてきた。当初は血中カルシウム濃度の低下を測定するin vivoでの作用によりその活性を評価しており、cAMP産生や受容体結合実験による活性評価が行われるようになったのはようやく1980年代に入ってからである。【表III-1】¹²⁶⁾⁻¹³²⁾ 【表III-2】^{126) 130) 132) -134)} 【表III-3】^{135) -160)} に、各種CTの構造活性相関についてのこれまでの主な報告をまとめた。

古くは【表III-1】に見られるように、活性発現に必要な残基を特定する目的で1個ないしは数個の残基の欠失や置換を行っていたが、この方法では系統的な情報の入手は全く期待できない。また【表III-2】のように、hCTをより高比活性のsCTの配列に近づける試みもなされた。例えばhCTにおいて、Y12、F16、F19、F22を各々L12、L16、L19、Y22に変換した場合、これらのうち一か所を置換すると、活性は変化しないかあるいは4-5倍上昇する。2箇所あるいは3箇所の置換を行った場合、置換する残基のいずれの組み合わせにおいても活性は10倍ほど上昇し、4箇所全てを置換すると活性上昇は15から20倍になる。この結果は、活性発現に必要な残基の特定とい

【表III-1】CTの活性を低下させる変異

5		10		15		20		25		30		活性 (%)	変異
CGNLS ⁵ TCMLG ¹⁰ TYTQ ¹⁵ DFNK ²⁰ FHTFP ²⁵ QTAIG ³⁰ VGAP-NH ₂												100	
SMe		SMe										0.18	s-sをMe化
			MO									0	Mを酸化
										A	V	6	VをAに、AをVに
							R					10	QをRに
										-OMe		0.13	C端メトキシ化
										d		0.06	C端遊離カルボン酸
										d		0.12	P欠失
										dd		0.02	P-NH ₂ 欠失
			d									0.12	G欠失
S		V										0	GをSに、MをVに

活性は、すべてラット血中カルシウム濃度低下作用により評価されている。dは欠失を表わす。

【表III-2】 hCTの配列をsCTに近づけた誘導体の活性

hCT	5	10	15	20	25	30	活性 (倍)
CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP-NH ₂							1
	V						4-5
		K					3
		L					4-5
			L				1
				L			1
					Y		4-5
	V				Y		4-5
		L	L	L			10
	V	L	L	L			10
		L	L	L	Y		15-20
						S T	5
sCT	CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRNTNTGSGTP-NH ₂						50

活性は、すべてラット血中カルシウム濃度低下作用により評価されている。

【表III-3】 Armour社のグループにより合成されたCT誘導体

#	10			20			30			Biological Activity α -helicity ¹⁾			
	CSNLSTCVL	GKLSQELIKL	QTYPRNTGSGTP	CSNLSTCVL	GKLSQELIKL	QTYPRNTGSGTP	CSNLSTCVL	GKLSQELIKL	QTYPRNTGSGTP	in vivo ²⁾	cAMP ³⁾	binding ⁴⁾	
										4,400	1	1	
1	GS	G			d					8,600			
2		S			d					8,400			
3					d					7,900	R 10 ⁻¹		↓
4				A	A					7,200			
5					ddd					7,100	R 10 ⁻¹		↓
6	d	G			d					6,900	T 1	T 0.7	→
7					dd					6,900	R 10 ⁻¹		
8		G								6,500	T 1	T 1	↓
9	Ac ⁵⁾	A								6,300	R 10 ⁻¹		↓
10					dddd					6,300	R 10 ⁻¹		
11				A						6,200			↓
12		G			d					6,000	T 1.3	T 1	↓
13	A	A								5,500	R 10 ⁻²		→
14		X								5,500			→
15		d								5,400			
16					d					5,400	R 10 ⁻¹		→
17					d					5,000	R 10 ⁻¹	T 1	↓
18						R				5,000			→
19	Sp ⁶⁾	G								4,750			
20					d					4,650			
21	d				d					4,400	T 1	T 0.6	
22	dd									4,350			
23	d									4,300	R 10 ⁻¹	R 1	
24	d	G								4,300	T 1.3	T 0.7	
25	d									4,300			
26	Ac									4,250	R 10 ⁻²		↓
27	d					L				4,100			→
28					d					4,000	R 10 ⁻¹		
29						L				3,800			
30		G				L+R				3,500			↓
31						Y				2,900			
32					d					588	T 10 ⁻¹	T 0.2	↓
33										400			
34							dddddddddd			12			
35	G	L	QQQKL	Q	QQL					x 10 ⁻²			→
36		LLQQ	QKL	Q	QQ					x 1	R 1	R 1 0.2	↑
37		LLQQ	QK	Q	QQ					x 3		B 10 ⁻¹	↑

- 1) [θ]₂₂₂値の変動より判断した。↓は減少、→は殆ど不変、↑は増加を表す。
- 2) ラット血中Ca濃度低下作用, 1-34については 10⁴ugで, 35-37については SCT に対する相対活性で表わした。
- 3) R は rat renal plasma membrane, T は T47D cell line を用いた実験。SCT に対する相対活性で表わした。
- 4) B は rat brain particulate membrane を用いた実験。SCT に対する相対活性で表わした。
- 5) S-acetamidomethyl-L-cysteine
- 6) 3-Mercaptopropionic acid

う視点のみではなく、各残基の相対的位置関係も重要な因子として考慮する必要性を示唆するものである。

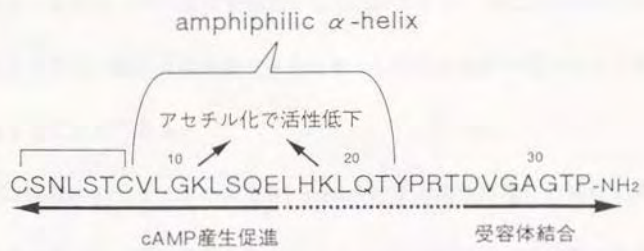
【表III-3】はArmour社のグループが合成した各種sCTの構造とその活性をまとめたものである。彼らは臨床応用を念頭に置いてかなり系統的な検討を行っており、ラット血中カルシウム濃度の低下作用を見る *in vivo*での活性測定と、rat腎臓膜画分あるいは培養細胞を用いた受容体結合実験及びcAMP産生反応の *in vitro*活性測定とにより、各sCT誘導体の活性を評価した。ところが各誘導体の活性について *in vivo*と *in vitro*での活性の強さを比較すると、必ずしも一致していない。また彼らは各CT誘導体の物理的性質、おもにcircular dichroism (CD) を測定し、その二次構造と *in vivo*での血中Ca⁺⁺濃度低下作用との相関を調べ、CTの活性発現にはα-ヘリックス構造を取る必要があが、強固な二次構造よりある程度構造上のflexibilityを有する誘導体の方が活性が強いと主張している¹⁶¹⁾⁻¹⁶⁹⁾。しかし一般に *in vivo*での活性の強さは、生体内での安定性、作用の持続性が大きな要因となる他、目的とする作用以外の活性を有する場合の影響、feedback等も関与してくる可能性がある。従ってCT分子内の各部位が担う役割、即ち構造活性相関を論じる場合、*in vivo*活性を指標とすることは適当とは言えない。CT分子が細胞受容体に作用するところ即ち受容体結合反応とそれに引き続いて活性

化される細胞内情報伝達経路を検討するべきである。

このような視点に立ってCTの構造活性相関を検討した数少ない例の一つとして、Kaiserらの報告がある¹⁷⁰⁾⁻¹⁷²⁾。彼らはsCT分子の8位から22位の α -ヘリックス形成部位を、 α -ヘリックス形成能を保持したまま全く異なる配列に置換したpeptideを合成した。このpeptideはrat腎膜画分での受容体結合活性、cAMP産生能を十分保持していたことから、sCT分子の8位から22位は α -ヘリックスを形成することが活性発現に必須であるとしている。またYamamotoら¹⁷³⁾は、eCTあるいはその分子内シスチン結合を共有結合におきかえることで安定性を強化した[Asu¹⁷]-eCT¹⁻⁹³について、分子内の各部位と同じ配列を有する部分ペプチドを合成し、それぞれについてラット腎臓膜画分を用いて受容体結合活性、cAMP産生活性を調べた。その結果から彼らは、1位から15位までの部分にcAMP産生促進に関与する部位が、またC末端側の27位から32位までに受容体結合に関与する部位が存在すると推定している。しかしそれ以上の部位の限定は行われていない。以上の主な知見を【図III-1】にまとめて示す。

そこで本章においては、eCTの構造活性相関を明かにすることを目的とし、新たに考案した“挿入失活法”により誘導体のデザインをおこなった。この方法は、まず活性発現に必須とされている残基に注目し、これを欠失した誘

【図III-1】本研究以前に得られている
eCT構造活性相関に関する知見



導体を合成してその活性が低いことを確認する。次にこの一旦欠失した残基を連続的にずらした位置に再挿入した誘導体を合成し、その活性を調べる。活性発現に必要な配列中に挿入された場合は活性は低下するが、活性発現に直接関与しない部位に挿入された場合、大きな活性低下は起こらないと予測されることから、その部位を特定することができる。またこの方法では分子の長さやアミノ酸組成は不変であるため、これらの因子の変化による影響も除外することができる。

eCT誘導体のデザインにあたり、targetとする活性発現に必須な残基としては塩基性アミノ酸に注目した。eCT分子内での塩基性アミノ酸の重要性はD'Santosらにより示されている¹⁷⁴⁾。彼らはsCTの11位および18位のLys側鎖をアセチル化あるいはazidobenzoyl化することで*in vitro*での活性がほとんど消失すること、11位、18位のLysをArgに、14位のGlnをLysに置換した誘導体はsCTと同等の*in vitro*活性を有することを報告している。そこで以下の実験においてはeCTの18位Lysを欠失した誘導体を合成してその活性が低下することを確認し、さらに【図III-2】に示したように、Lysを連続的にずらした位置に再挿入した誘導体を合成した。この場合、1位と7位の間のシスチン結合に挟まれた部位やその周辺は、立体構造が固定されていると考えられるため、Lysを挿入する位置は10位のGlyよりC末端側に限定した。

eCT誘導体の活性評価系としては、前章において確立したLLC-PK₁細胞での増殖阻害、受容体結合反応、cAMP産生反応の3つの*in vitro*活性指標を用いてeCTの各種誘導体の活性を評価を行った。

【図III-2】挿入失活法によるeCT誘導体のデザイン

Peptide	Position of the reinserted lysine residue	Sequence		
		10	20	30
K12	12	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K13	13	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K14	14	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K15	15	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K16	16	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K17	17	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
eCT	18	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K19	19	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K20	20	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K21	21	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K22	22	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K23	23	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K24	24	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K25	25	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K26	26	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K27	27	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K28	28	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K29	29	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K30	30	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K31	31	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I
K32	32	CSNLSTCVLGKLSQELHLQTYPR	TDV	GAGTP- ¹²⁵ I

図中省略したが、すべてのペプチドはCys¹とCys⁷の間にdisulfide結合を形成している。

III-2. 実験の部

1) 試薬

sCTはNova biochem (スイスLufelfingen) より、Arg-バソプレシン (AVP)、ウシインシュリンはSigma (St. Louis, MO) より、グルカゴンはPeninsula Laboratories (Belmont, CA) より購入した。ヒト副甲状腺ホルモン (PTH) 1-34、ヒトナトリウム性利尿ホルモン (ANP)、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 1-24はペプチド研究所 (養生) より購入した。脂肪酸フリーウシ血清アルブミン (BSA) は千葉畜産工業より購入した。

2) ペプチド合成

eCT及び【図III-2】に示したeCT誘導体は、Applied Biochemicals社 (Foster City, CA) 製全自動ペプチド合成機Model 430AあるいはModel 431Aを用い、固相法により合成した。樹脂はを、アミノ酸はt-butoxycarbonyl基を用い、トリフルオロ酢酸/トリフルオロメタンスルホン酸により樹脂からの切りだし及びアミノ酸脱保護を行った。得られた粗ペプチド画分は10%酢酸に溶解した後Bio-gel P-2 (Bio-Rad

Laboratories, Richmond, CA) ゲル濾過カラム (φ25mm x 30cm) に添加し、10%酢酸により溶出を行って低分子混合物を除去した。ペプチドを6M塩酸グアニジン溶液 (pH 7.5) に溶解して室温で一昼夜攪拌し、空気酸化により分子内ジスルフィド結合を形成した。未反応の遊離SH量は、cysteineを標準物質とし、5',5'-dirhiobis(2-nitrobenzoic acid)を用いて定量した。さらにC₁₈逆相HPLC (TSK gel ODS 80TM, φ 21.5mm x 30cm, 東ソー、東京) により、0.1%trifluoroacetic acid中、20-50%のアセトニトリル濃度勾配を用い分画した。次いで陽イオン交換HPLC (ES-502C、φ 7.6mm x 10cm, 旭化成工業、川崎) に添加し、0-500mM NaCl / 50mM ギ酸アンモニウム (pH4.5) / 20%アセトニトリルで溶出し、さらにもう一度逆相HPLCにより精製を行った。

このようにして得られたペプチドは、6M塩酸中110 °Cで20時間反応させることで加水分解し、全自動アミノ酸分析機 (ModelA-8700、イリカ工業、京都) によりアミノ酸分析を行った。配列分析は、Applied Biochemicals社 (Foster City, CA) 製アミノ酸シーケンサーModel 477Aを用い、Edman分解法により行った。

3) 円偏光二色性 (circular dichroism, 以下CD)

一般にペプチドのCDを測定する場合、スペクトルの安定性を優先して数100 $\mu\text{g/ml}$ から数 mg/ml の濃度の試料を用いるが、ペプチドの生理活性との関連を論じる場合にはなるべく生理的濃度に近い濃度での測定を行なうべきである。eCTのin vitro生理活性は 10^{-7}M (約0.3 $\mu\text{g/ml}$) という低濃度で完全にmaximumに達する。なるべく低濃度で、かつ安定したCDスペクトルが得られる限界が10 $\mu\text{g/ml}$ であった。そこでペプチドは0.15M NaClを含む20mM PIPES緩衝液 (pH 7.4) に10 $\mu\text{g/ml}$ となるよう溶解し、必要に応じて50%trifluoroethanolを添加した。光路長1mmのセルを用い、25°CでのCDスペクトルを日本分光 (東京) Model J600 polarimeterにより測定した。各ペプチドの α -helix含量は、日本分光の計算プログラムModel SSE302により算出した。

4) eCT誘導体の生理活性

合成した各ペプチドの生理活性は、ブタ腎尿管上皮由来細胞株LLC-PK₁細胞を用いた受容体結合実験、cAMP産生反応及び細胞形態異常誘導に起因する増殖阻害反応により測定した。方法の詳細は、2章の実験の部を参照されたい。

III-3. Lys18欠失誘導体とLys再挿入誘導体の*in vitro*生理活性

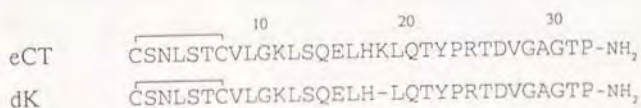
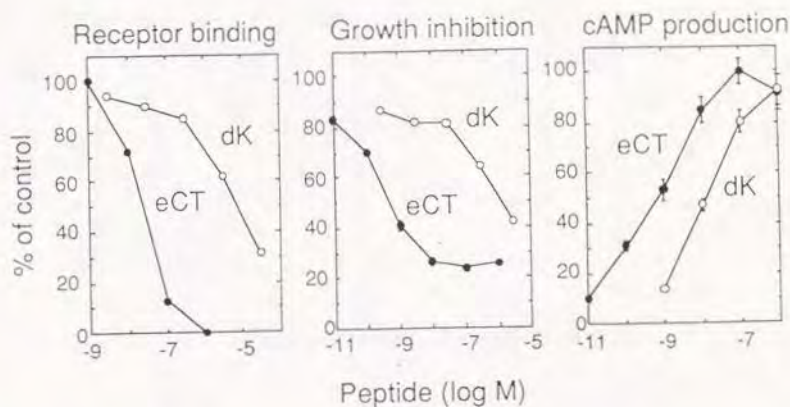
1) Lys18欠失誘導体の*in vitro*活性

まずLys18欠失誘導体 (dK) のLLC-PK₁細胞における¹²⁵I-eCTの受容体結合阻害、増殖阻害、cAMP産生の各活性をeCTと比較した。【図III-3】に示すように、dKは各反応において容量に依存した活性を示し、受容体結合阻害、増殖阻害のID₅₀及びcAMP産生反応ED₅₀は、 7.1×10^{-9} M、 1.32×10^{-6} M、 1.11×10^{-8} Mであった。一方eCTのそれは 2.2×10^{-8} M、 4.8×10^{-10} M、 6.81×10^{-10} Mで、dKの各活性はeCTに比べてそれぞれ320倍、2,700倍、16.1倍弱かった。すなわち18位のLysを削除することで、eCTの三種類の*in vitro*測定系での活性がすべて大きく低下することが確認され、この残基の重要性が確認された。

2) Lys再挿入誘導体の*in vitro*活性

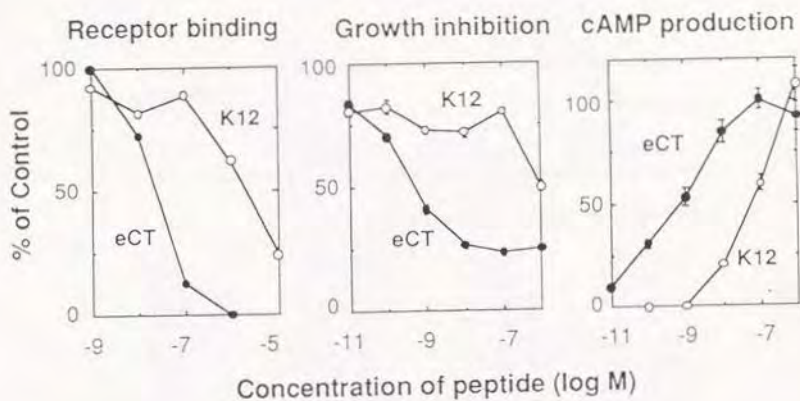
次いで、このLysをeCTの12位から32位まで連続して再挿入した20個の誘導体（【図III-2】）を合成した。これらの誘導体は、Lysを挿入した位置の番号でK12、K13、K14、・・・、K32と表したが、同様に各活性の容量依存性を検討した。【図III-4】がその容量依曲線で、この結果か

【図III-3】 Lys18欠失誘導体の活性



すべての反応にはLLC-PK₁細胞を用いた。受容体結合反応は、¹²⁵I-eCT (約10⁵cpm / 5 × 10⁻⁹M) の結合に対する競合阻害で表わした (n=3)。増殖阻害活性は、3日間培養後の残存細胞量を色素染色法により定量した (n=4)。cAMP産生は37℃20分間の反応で生じたcAMP量をradio-immunoassayで定量した。100%は10⁻⁷MのeCTで産生されるcAMP量を表わす (n=3)。

【図III-4】 Lys再挿入誘導体の各活性の容量依存曲線

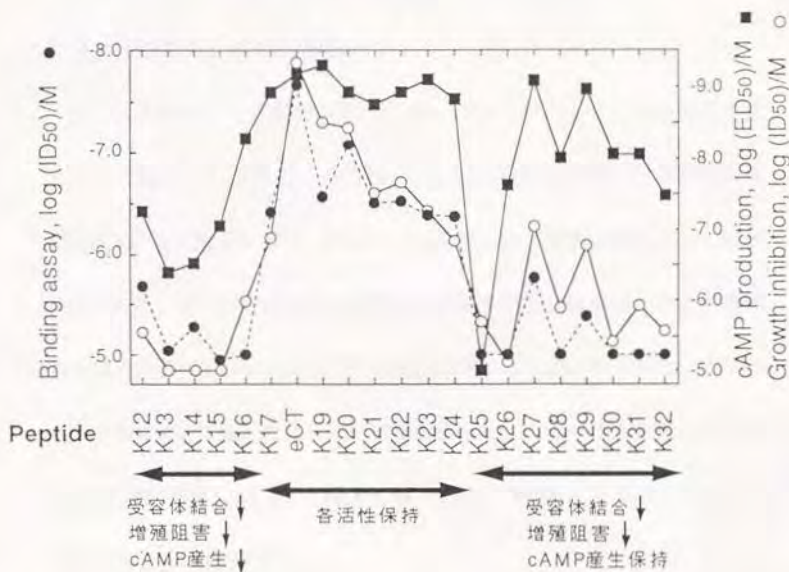


ここには代表例としてK12の容量依存曲線を示す。実験法はすべて【図III-3】と同一である。

【表III-4】Lys再挿入誘導体の各活性のID₅₀値、ED₅₀値

Peptide	ID ₅₀		ED ₅₀
	binding inhibition	growth inhibition	cAMP production
M			
eCT	2.2×10^{-8}	4.8×10^{-10}	6.8×10^{-10}
K12	2.1×10^{-6}	2.9×10^{-6}	5.5×10^{-8}
K13	9.1×10^{-6}	$> 1.0 \times 10^{-5}$	4.1×10^{-7}
K14	5.2×10^{-6}	$> 1.0 \times 10^{-5}$	3.0×10^{-7}
K15	$> 1.0 \times 10^{-5}$	$> 1.0 \times 10^{-5}$	8.8×10^{-8}
K16	$> 1.0 \times 10^{-5}$	1.0×10^{-6}	5.2×10^{-9}
K17	3.8×10^{-7}	1.3×10^{-7}	1.2×10^{-9}
K19	2.7×10^{-7}	3.1×10^{-9}	5.1×10^{-10}
K20	8.3×10^{-8}	3.7×10^{-9}	1.2×10^{-9}
K21	3.2×10^{-7}	3.2×10^{-8}	1.8×10^{-9}
K22	3.0×10^{-7}	2.2×10^{-8}	1.2×10^{-9}
K23	4.1×10^{-7}	5.4×10^{-8}	8.1×10^{-10}
K24	4.2×10^{-7}	1.5×10^{-7}	1.5×10^{-9}
K25	$> 1.0 \times 10^{-5}$	2.0×10^{-6}	$> 1.0 \times 10^{-5}$
K26	$> 1.0 \times 10^{-5}$	7.7×10^{-6}	2.4×10^{-8}
K27	1.7×10^{-6}	8.9×10^{-8}	8.2×10^{-10}
K28	$> 1.0 \times 10^{-5}$	1.3×10^{-6}	1.0×10^{-8}
K29	4.1×10^{-6}	1.7×10^{-7}	1.1×10^{-9}
K30	$> 1.0 \times 10^{-5}$	3.9×10^{-6}	8.7×10^{-9}
K31	$> 1.0 \times 10^{-5}$	1.2×10^{-6}	8.5×10^{-9}
K32	$> 1.0 \times 10^{-5}$	2.7×10^{-6}	3.3×10^{-8}

【図III-5】 Lys再挿入誘導体の各活性のまとめ

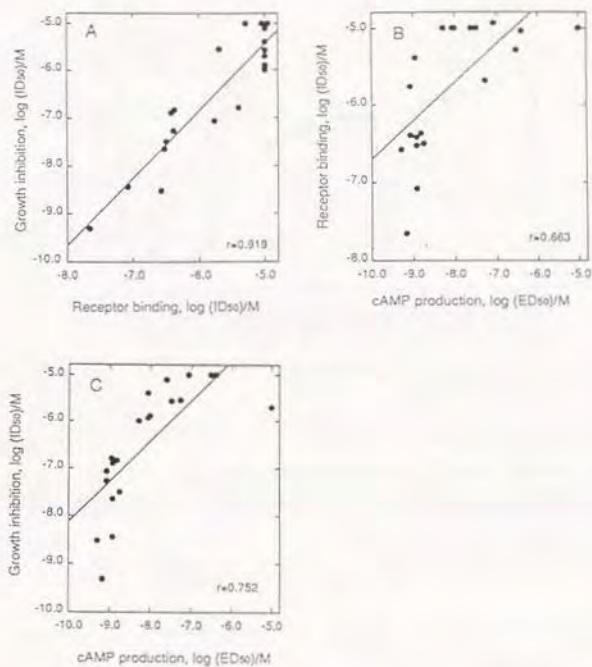


【図III-3】に記載した条件により求めた各誘導体の受容体結合 (●)、増殖阻害 (○) のID₅₀値、およびcAMP産生 (■) のED₅₀値を示した。

の解析から、魚類・鳥類CTによるLLC-PK₁細胞増殖阻害活性にはcAMP産生とC-kinaseの両方の活性化が関与することを示している。すなわち第二領域にLysが挿入された誘導体はcAMP産生活性は保持されていることから、受容体結合およびC-kinaseの活性化に関与していると考えられる。以上を【図III-6】にまとめた。

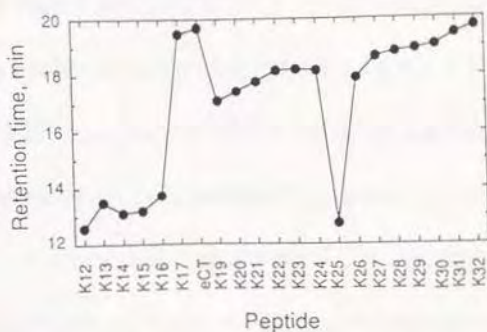
一方、【表III-4】の結果をもとに各in vitro活性についての相関性を見たのが【図III-7】である。受容体結合活性と増殖阻害活性との相関係数は0.919と高い数値を示し、これら二つ活性は高い相関関係にあることが確認された。cAMP産生活性と増殖阻害活性及び受容体結合活性との相関係数はそれぞれ0.752、0.663で、相関性は低いことが示唆された。すなわち第2章において論じたように、各種動物由来CTのcAMP産生能の差は受容体結合能の差によるという従来の捉え方は、やはり正しくないことがこの結果からも示唆された。

【図III-7】 Lys再挿入誘導体の各活性のID₅₀値、ED₅₀値の相関



【図III-3】に記載した条件により求めた各誘導体の受容体結合、増殖阻害のID₅₀値、およびcAMP産生(■)のED₅₀値の相関を示した。A; 受容体結合 vs 増殖阻害、B; 受容体結合 vs cAMP産生、C; 増殖阻害 vs cAMP産生。図中に相関係数(r)を示した。

【図III-8】 逆相HPLC上retention time比較による
Lys再挿入誘導体の両親媒性の検討



【図III-8】

C₁₈カラム（東ソー、ODS-80TM φ4.6mm×15cm）を用い、0.1%トリフルオロ酢酸を含む20-50%アセトニトリルの直線濃度勾配により溶出を行なった。

2) 各Lys再挿入誘導体の α -ヘリックス含量の検討

前項で両親媒性の低下が確認されたペプチドでは α -ヘリックスが形成されていなかったのであろうか？これを確認するため、eCTおよび代表的ないくつかの誘導体についてCDスペクトルの測定を行い、その α -ヘリックス含量を比較することにした。トリフルオロメタノール存在下非存在下で得られた222nmのモル楕円率およびトリフルオロメタノール存在下での数値より算出した α -ヘリックス含量を【表III-5】にまとめた。eCTや活性、両親媒性の保持されていた誘導体K17、K19の α -ヘリックス含量は51.1%、52.7%、74.2%であるが、両親媒性が低下していたK25は37.2%と α -ヘリックス含量が低かった。Lysは α -ヘリックス形成能の強いアミノ酸である¹⁷⁾ため、25位に挿入されたLysによってその周辺部位の α -ヘリックスを形成しにくくなるとは考えにくい。おそらく25位のLys側鎖が他の残基側鎖、例えば15位のGlnと相互作用をするなど、より高次の立体的要因のため α -ヘリックスを形成しにくくなり、その結果生理活性が低下したと考えられる。

一方やはり両親媒性の低い誘導体のK13の α -ヘリックス含量は61.2%と、eCTや活性の高い誘導体ほぼ同程度の α -ヘリックス構造を有しており（【表III-5】）、K13は、 α -ヘリックスは形成していたが両親媒性は成

立していないことが示された。

【表III-5】 Circular Dichroismより求めた
代表的誘導体の α -ヘリックス含量

Peptide	α -helix content (%)
eCT	51.1
K13	61.2
K17	52.7
K19	74.2
K25	37.2

3) 車輪プロットによる解析

前項において、 α -ヘリックスは形成しているが両親媒性は成立していないことが示唆された誘導体について、さらに車輪プロットによる解析を試みた。これは α -ヘリックスの軸方向から見たアミノ酸の配置を表わすものである。【図III-9A】は、これまでにEpandら及びKaiserらにより両親媒性 α -ヘリックス構造をとることが活性発現に必須とされた8位から22位の範囲についてプロットしたものであるが、この図で表わされた両親媒性の成立と【図III-8】の逆相HPLC上の挙動より示唆された両親媒性の強さあるいは各種*in vitro*生理活性の強さとは一致しない。プロットする範囲をいろいろ変えて検討したところ、【図III-9B】示すように8-17位の10個のアミノ酸の範囲をプロットした場合にその両親媒性の成立が【図III-8】で得られた結果に一致し、これ以上の長い範囲についてプロットした場合はまったく一致しなかった。以上の結果から、両親媒性 α -ヘリックス構造をとることが活性発現に必須であるeCT分子内の範囲は、8-17位の10個のアミノ酸であることが明らかとなり、Epandらのグループ及びKaiserらのグループにより8位から22位とされた範囲を5残基短く限定することができた。

【図III-9】 eCTおよび各誘導体の車輪plot解析

A. 8位～22位

活性が低下した誘導体 (K12～K16)



活性を保持していた誘導体 (K17～K24) およびeCT

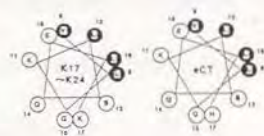


B. 8位～17位

活性が低下した誘導体 (K12～K16)



活性を保持していた誘導体 (K17～K24) およびeCT



疎水性残基を黒塗で表わした。Aは8位から22位、Bは8位から17位までについて検討した。

III-5. 第二領域に関する解析

24位あるいは25位から32位までの第二領域であるが、これはYamamotoら¹⁷³⁾により報告された22位から32位の受容体結合活性を有するeCT部分ペプチドの範囲に含まれることから、この第二領域は受容体結合部位である可能性が予測される。また、CTの遺伝子から異なるsplicingにより発現するカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は、LLC-PK₁細胞のCT受容体に親和性がある¹⁷⁸⁾ことが知られており、eCTの受容体結合部位に相同性の高い配列がCGRPに存在すると予測される。そこで魚類・鳥類CTとCGRPで配列相同性の高い部位を調べたところ、【図III-10】に示すように、CGRPの Thr30-Asn31-Val32-Gly33-Ser34が eCTの Thr25-Asp26-Val27-Gly28-Ala29およびsCTのThr25-Asn26-Thr27- Gly28-Ser29と高い相同性を示していた。すなわちこの少なくとも5残基の範囲は、受容体結合に関与する部位に含まれる可能性が高い。【図III-5】でLysを25位から32位にまで挿入した誘導体で受容体結合活性が大きく低下していたことから、eCT分子内の受容体結合に関与する部位は25位から32位であると結論づけられた。

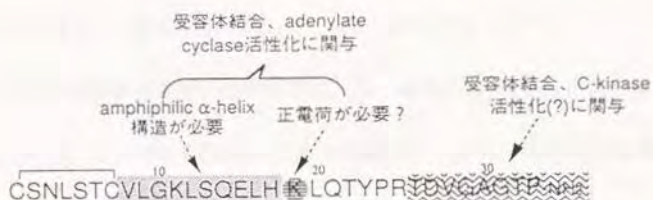
ところが活性の保持されていたK24であるが、これはもともとArgであっ

【図III-10】 sCT、eCT、CGRPのアミノ酸配列の比較

CGRP	³⁰ TNVGS
eCT	²⁵ TDVGA
sCT	²⁹ TNTGS

た24位に同じ塩基性アミノ酸のLysが挿入されたものである。24位のArgは受容体結合に関与する部位に含まれていても、LysがArgの代わりを果たしたために活性が低下しなかった可能性が考えられる。すなわち以上の結果からのみでは受容体結合に関与する部位は24位Argからであるか25位Thrからであるのかは判断できなかった。

【図III-11】挿入失活誘導体の解析で得られた結論



III-6. 欠失誘導体による解析

前節までの検討で得られた情報を【図III-11】にまとめたが、受容体結合に関与する部位のC末端側が24位のArgからか、あるいは25位のThrからなのかは結論づけられなかった。また第一領域と第二領域の間には含まれた部分の役割についても、情報は得られていない。そこで本節においては、これらの点を検討するため、第一領域と第二領域の間を欠失した誘導体を合成してその*in vitro*生理活性を比較することにした。【図III-12】にeCT、dKおよび新たに合成した欠失誘導体のアミノ酸配列を示す。欠失誘導体の名称は、欠失したアミノ酸の個数でd6、d7、d8、d9と表わしている。

これらの誘導体を用いた検討では、第一領域の α -ヘリックスの保持が前提となる。そこでまずCDスペクトルを測定し、 α -ヘリックス含量の確認を行った。【表III-6】に222nmのモル楕円率とその値から算出した α -ヘリックス含量を示したが、各欠失誘導体はeCTと同等以上の α -ヘリックス含量を有することが確認された。たとえばd6の場合、全残基数が26個であるためその49%、すなわち13個のアミノ酸にわたる範囲が α -ヘリックスを形成していることになる。N末端側7個のアミノ酸はシスチン結合内に存在し、GlyやProの多いC末端側は α -ヘリックスを形成しにくいと考えられ、すな

【図III-12】 eCT欠失誘導体のデザイン

	10	20	30	
eCT	<u>CSNLSTC</u> VLGKLSQELHKLQTYPRTDVGAGTP-NH ₂			
dK	<u>CSNLSTC</u> VLGKLSQELH-LQTYPRTDVGAGTP-NH ₂			
d6	<u>CSNLSTC</u> VLGKLSQELH-----RTDVGAGTP-NH ₂			
d7	<u>CSNLSTC</u> VLGKLSQELH-----TDVGAGTP-NH ₂			
d8	<u>CSNLSTC</u> VLGKLSQE--K-----TDVGAGTP-NH ₂			
d9	<u>CSNLSTC</u> VLGKLSQE-----TDVGAGTP-NH ₂			

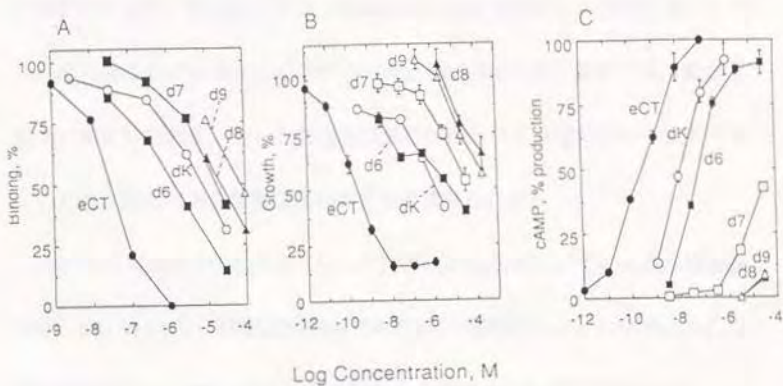
【表III-6】 Circular Dichroismより求めた
eCT欠失誘導体の α -ヘリックス含量

Peptides	$-\Theta]_{222}$ (deg cm ² mol ⁻¹)	α -helix content (%)
eCT	15749	49
dK	16141	45
d6	14697	49
d7	19980	74
d8	19796	60
d9	16854	55

わち第一領域を含む分子中央部分に α -ヘリックス構造が形成されていると推察される。他の欠失誘導体についても同様に、第一領域の α -ヘリックスは十分保持されていると考えられた。

【図III-13】は、これらの誘導体のLLC-PK₁細胞における受容体結合、増殖阻害、cAMP産生反応を見たものである。前項においても示したが、dKはeCTより大きく活性が低下しており、その差は三つの活性測定系でそれぞれおよそ300倍、3,000倍、20倍であった。d6は、第一領域と24位Argを含む第二領域を残してその間の18位から23位までを欠失した誘導体である。その活性をみると、dKよりさらに5残基短いにもかかわらずd6の受容体結合活性はむしろdKよりやや高く、増殖阻害はdKとほぼ同等でcAMP産

【図III-1 3】eCT欠失誘導体の各活性容量依存曲線



実験条件はすべて【図III-3】と同一である。

生活性のみ数倍低下していた。この結果から、最低限のeCT活性の発現には第一領域と第二領域とが存在すれば十分であること、またこれら二つの領域の間にはさまれた部分は、二つの領域の位置関係をもっとも適切な長さに保つために存在していることが示唆された。dKもd6も第一領域、第二領域を完全に保存しており、もっとも適切な長さが保たれていないという点では等しいため、ほぼ同等の生理活性を有すると考えられる。

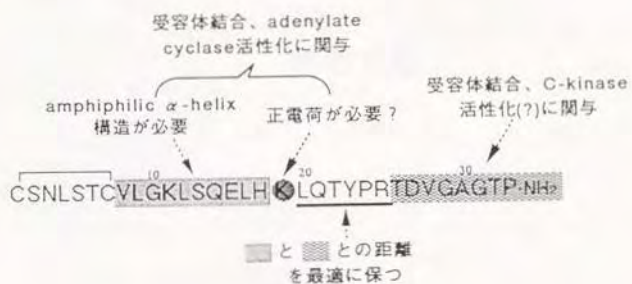
次にd6から24位のArgをも欠失した誘導体d7を合成し、その生理活性を調べた。d7はd6より一残基短いのみであるが、【図III-13】に示すようにいずれの活性においてもd6より数十倍から数百倍の活性低下が認められ、24位のArgは活性発現に必要な残基であることが示唆された。すなわち第二領域は24位のArgを含むと考えられ、その範囲は24位から32位までと結論づけられた。

さらに第一領域についても欠失誘導体を用いた検討を試みた。すなわち第一領域C末端側のLeu16、His17をも欠失したd9を合成しそのin vitro活性を調べたところ、いずれの場合においてもきわめて低く、この領域の重要性が再確認された。d9に、初めに欠失したLysを戻した配列がd8である。このd8の増殖阻害活性、cAMP産生活性はd9同様きわめて弱い、受容体結合活性のみはわずかに回復してd7と同等の強さを示した。

III-7. eCT構造活性相関に関するまとめ

本研究により、eCTの構造活性相関について、以下のような結論が得られた。すなわち第一領域とした8位から17位の両親媒性 α -ヘリックス構造は18位のLys生電荷と共に、受容体結合とadenylate cyclase活性化に関与する。第二領域とした24位から32位までについては受容体結合と、おそらくC-kinaseの活性化に関与する。そして二つの領域に挟まれた19位から23位は、この二つの領域を最も適切な距離に保つ働きをすることが示唆された。以上を【図III-14】にまとめて示した。

【図III-1 4】本研究により得られたeCT構造活性相関に関する結論



参考文献

- 1) Copp, D.H., Cameron, E.C., Cheney, B. A., *Endocrinology* 70, 638. 1962.
- 2) Hirsh, P. F., Gauthier, G. F. and Munson, P. L. *Endocrinology*, 73, 244. 1963.
- 3) Foster, G.V., Baghdiantz, A., Kumar, M., A. Thyroid origin of calcitonin. *Nature*, 202, 1303. 1964.
- 4) Hirsh, P. F., Gauthier, G. F. and Munson, P. L., *Endocrinology*, 73, 244. 1963.
- 5) Hirsch, P. F., Voelkel, E. F., and Munson, P. L., *Science* 146, 412. 1964.
- 6) Haas, H. G., Dambacher, M. A., Guncaga, J. and Lauffenburger, T.J. *Clin. Invest.*, 50, 2689. 1971.
- 7) Pearse, A. G. E. and Carvalheira, A. F., *Nature*, 214, 929. 1967.
- 8) Brewer, H. B., Jr. and Ronan, R., *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*. 63, 940. 1969.
- 9) Potts, J. T., Jr., Reisfield, R. A., Hirsch, P. F., Wasthead, A. B., Voelkel, E. F. and Munson, P. L., *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*. 58, 328-335. 1967.
- 10) Potts, J. T., Jr., Keutmann, H. T., Deftos, L. J. and Niall, H. D., *In: Progress in peptide Research*, edited by S. Lande. New York: Gordon and Breach, 1972, Vol. II, p. 93.
- 11) von Naher, R., Rinker, B., Rittel, W. and Zuber, H., *Helvetica Chimica Acta*, 31, 1900. 1968.
- 12) Burford, H. J., Ontjtes, D. A., Cooper, C. W., Parlow, A. F. and

- Hirsch, P. F., *Endocrinology*, 96, 340. 1975.
- 13) Kauttmann, H. T., Parsons, J. A., Potts, J. T. Jr. and Schlueter.,
J. Biol. Chem., 245, 1491. 1970.
- 14) Pecile, A., Ferri, S., Braga, P. C and Olgiati, V. R., *Experientia*, 31,
332. 1975
- 15) Freed, W. J., Perlow, M. J. and Wyatt, R. J., *Science*, 206, 850.
1979.
- 16) Amara, S. G., Jonas, V. and Rosenfeld M. G., *Nature*, 298, 240,
1982.
- 17) Rosenfeld, M. G., Mermod, J-J. and Amara, S. G., *Nature*, 304,
129. 1983.
- 18) 松本俊夫、尾形悦郎 *Medical Practice*, 4, 1230-1238. 1987.
- 19) Minghetti, P. P. and Norman, A. W., *FASEBJ.*, 2, 3034. 1988.
- 20) Suda, T. Shinki, T. and Takahashi, N., *Ann. Rev. Nutr.* 10, 195.
1990.
- 21) Kurihara, N. Suda, T., Miura, Y., Nakauchi, H., Kodama, H.,
Hiura, K., Hakeda, Y. and Kumegawa, M., *Blood*, 74, 1295. 1989.
- 22) Brown, E. *Physiol. Rev.*, 71, 371. 1991.
- 23) Doner, A. J. and Kemper, B., *Biochemistry*, 78, 5550. 1978.
- 24) Holtrop, M., E., Raisz, L. G. and Simmons, H. A. L. *Cell Biol.*, 60,
349. 1974.
- 25) Mundy, G. R. and Roodman, G. D. In *Bone mineral Research*,
Annual 5, ed. by Peck, W. A. Amsterdam, Elsevier Science
Publishers, p. 209. 1987.

- 26) McSheehy, P. M. J. and Chambers, T. J. *Endocrinology*, 119, 1654. 1986.
- 27) Hakeda, Y., Hiura, K., Sato, T., Ozeki, R., Matsumoto, T., Ogata, E., Ishitani, R. and Kumegawa, M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 163. 1989.
- 28) Kawasaki, H. and Kurokawa, K., *Miner. Electrolyte Metabolism*, 9, 227. 1983
- 29) Horiuchi, N., Suda, T., Takahashi, H., Shimazawa, E. and Ogata, E., *Endocrinology*, 101, 969. 1977.
- 30) Shimizu, T. and Yoshitomi, K., *Am J. Physiol.* 240, F159, 1981.
- 31) Body, J. J. and Heath, H., *J. Clin. Endocrinol Metab.* 57, 897, 1983.
- 32) Nozaki, K., Noda, S. and Obi, S., *Endocrinol. Jpn.* 23, 83, 1976.
- 33) Aliapoulis, A. Goldhaber, P. and Munson, P.L., *Science*, 151, 330, 1966.
- 34) MacGeorge, G. A., Markandu, N. D., Roulston, J. E. and Jones, J. C., *Nature*, 291, 329. 1981.
- 35) Pfeilschifter, J. Bonewald, L. and Mundy, G. R., *J. Bone Mineral Res.* 5, 49. 1990.
- 36) Perry, H. M., Skogen, W., Chappel, J., Kahn, A. J., Wilner, G. and Teitelbaum, S. L., *Endocrinology*, 125, 2075, 1990.
- 37) Morris, C. A., Mitnick, M. E., Weir, E. C., Horowitz, M. and Kreider, B. L., *Endocrinology*, 126, 1783, 1990.
- 38) Kimura, S., *J. Bone Mineral Mtab.* 6, 93, 1988.

- 39) Wisneski, L. A., *Calcif. Tissue Int.*, 46, s26, 1990.
- 40) Kimura, S., *J. Jpn. J. Cancer Res.* 77, 85, 1986.
- 41) Chesnut, C. H., *In Osteoporosis; Etiology, Diagnosis and Management.* ed. by Riggs, B. L. and Melton, L. J. New York, Raven Press, 403-414, 1988.
- 42) 吉川靖三, *In "内科医、産婦人科医のための骨粗鬆症" 東京、メディカルチャー*, 85-87, 1981.
- 43) Gennari, C., Agnusdei, D. and Gonnelli, S. *In Osteoporosis; Physical basis, assesment and Treatment.* ed. by DeLuca, H. F. and Mazes, R., New York, Elsevier, 269-274, 1990.
- 44) Gray, T. K., Bieberdorf, F. A. and Fordtran, J. S., *J. Clin. Invest.* 52, 3084, 1973.
- 45) Hesch, R.D., Schmidt, H. and Bloom, S. R., *Acta Endocrinol.* (suppl.) 155, 216, 1971.
- 46) Morly, J. E., Levine, A. S. and Silvi, S.S.E., *Science*, 214, 671, 1981.
- 47) Guidobono, F., Netti, C. and Sibilla, V., *Peptides*, 7, 315, 1986.
- 48) Freed, W. J., Perlow, M. J. and Wyatt, R. J., *Science*, 206, 850, 1979.
- 49) Oligiatti, V. R., Guidobono, F. and Netti, C., *Brain Res.*, 265, 209, 1983.
- 50) Pearse, A. G. E. and Polak, J. M., *Histochemie*, 27, 96, 1971.
- 51) Hesch, R. D., Hufner, M., Hasenhager, B. and Creutzfeldt, W., *Horm. Metab. Res.*, 3, 140, 1971.

- 52) Dipette, D. J., *Hypertension* 9, (suppl. III) 142, 1987
- 53) Otani, M., Noda, T., Yamauchi, H., Watanabe, S., Matsuda, T., Orimo, H. and Narita, K. *In Proceedings of the 5th parathyroid conference, Oxford.* ed. by Talmage, R. V., Owen, M. and Parson, J. A. Amsterdam, Excerpta, p111, 1974.
- 54) Homma, T., Watanabe, M., Hirose, S., Kanai, K. and Matsuo, H., *J. Biochem.*, 100, 459, 1986.
- 55) Takei, Y., Takahashi, A., Watanabe, T. X., Suzuki, N. and Sasayama, Y., *Biol. Bull.*, 180, 485, 1991.
- 56) Marx, S. J., Woodard, C. J. and Aurbach, G. D., *Science*, 178, 999, 1972.
- 57) Heersche, R., Marcus, R. and Aurbach, G. D., *Endocrinology*, 94, 241, 1974.
- 58) Lin, H. Y., Harris, T. L., Flanney, M. S., Kaji, E. H., Gorn, A., Kolakowski, L. F., Aruffo, A., Lodish, H. F. and Goldring, S. G., *Science*, 254, 1023, 1991.
- 59) Lefkowitz, R. J., *Nature*, 351, 353, 1991.
- 60) Jupper, H., Abou-Samara, A.-B., Freeman, M., Kong, X. F., Schipani, E., Richards, J., Kolalowski Jr., L. F., Hock, J., Potts Jr., J. T., Kronenberg, H. M. and Serge, G. V., *Science*, 254, 1024, 1991.
- 61) Kinoshita, Y., Fukase, M., Yamatani, T., Chiba, T., Nakai, M., Tsutsumi, M and Fujita, T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 144, 741, 1987.

- 62) Kinoshita, Y., Fukase, M., Hishikawa, R. and Fujita, T.,
Endocrinol. Japon., 35, 217. 1988.
- 63) Goldring, S. R., Dayer, J.-M., Dennis, A. A. and Krane, S. M.,
Biochem. Biophys. Res. Comm., 83, 434. 1978.
- 64) Kinoshita, Y., Fukase, M., Takenaka, M., Nakada, M., Miyauchi,
A. and Fujita, T., Endocrinol. Japon., 32, 819. 1985.
- 65) Ishizuka, I., Tadano, K., Nagata, N., Nimura, Y. and Nagai, Y.,
Biochim., Biophys. Acta, 541, 467. 1978.
- 66) Martin, T. J., Findlay, D. M., MacIntyre, I., Eisman, J. A.,
Michelangeli, V. P., Moseley, J. M. and Partridge, N. C., J. Biol.
Chem., 256, 12269. 1981.
- 67) Findlay, D. M., Michelangeli, V. P., Eisman, J. A., Frampton, R., J.,
Moseley, J. M., MacIntyre, I., Whitehead, R. and Martin, T. J.,
Cancer Res., 40, 4764. 1980.
- 68) Hunt, N. H., Ellison, M. L., Underwood, J. C. and Martin, T. J.,
Br. J. Cancer, 35, 777. 1977.
- 69) Nagamine, Y., Sudol, M. and Reich, E., Cell, 32, 1181. 1983.
- 70) Jans, D. A., Dierks-Ventling, C. and Hemmings, B. A., Exp. Cell
Res., 172, 76. 1987.
- 71) Schlossman, M., Brown, M. and Shapiro, E., Calif. Tissue Int.,
34, 190. 1982.
- 72) Malgaroli, A., Meldolesi, J., Zambonin-Zallone, A. and Twiti, A., J.
Biol. Chem., 264, 14342-14347. 1989.
- 73) Katsuya, H., Takaoka, T., Tagaya, I. and Kikuchi, K., Jap. J. Exp.

- Med., 30, 483. 1960.
- 74) Hull, R. N., Cherry, W. R. and Weaver, G. W., *In Vitro*, 12, 670.
1976.
- 75) M. Harris., *Am. J. Vet. Res.* 29, 153. 1968.
- 76) Kimura, S., Fukui, K., Yoshida, N. and Matsubara, Y., *Jpn. J. Microbiol.*, 12, 293. 1968.
- 77) Leighton, J., Brada, Z., Estes, L. W. and Justh, G., *Science*, 158,
472. 1969.
- 78) Macpherson, I. A. and Stoker, M. G. P., *Virology*, 16, 147. 1962.
- 79) Hull, R. N., Dwyer, A. C., Cherry, W. R. and Tritch, O. J., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 118, 1054. 1965.
- 80) Delarco, J. E. and Todaro, G. J., *J. Cell Physiol.*, 94, 335. 1978.
- 81) Yasumura Y., Bunonassisi, V. and Sato, G., *Cancer Res.* 26, 529.
1966.
- 82) Jansen, F. C., Girardi, A. J., Gilden, R. V. and Koprowski, H.,
Proc. Natl. Acad. Sci., 52, 53. 1964.
- 83) Hull, R. N., Cherry, W. R. and Johnson, I. S., *Anat. Rec.*, 124, 490.
1956.
- 84) Beale, A. J. *Lancet*, 2, 640. 1963.
- 85) Todaro, G. and Green H., *J. Cell Biol.*, 17, 299. 1963.
- 86) Menezes, J., Leibold, W., Klein, G. and Clements, G.,
Biomedicine, 22, 276. 1975.
- 87) Takeshita T., Goto, Y., Tada, K., Nagata, K., Asao, H. and
Sugamura, K., *J. Exp. Med.*, 169, 1323. 1985.

- 88) Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T. and Tada, K., *Int. J. Cancer*, 26, 171. 1980.
- 89) Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F. R., Delarea, J., Radu, M., Chaitcik, S. and Brenner, H. J., *Eur. J. Cancer.*, 15, 659. 1979.
- 90) Collins, S. J., *Nature*, 270, 347. 1977.
- 91)
- 92) Klein E. and Klein, G., *Cancer Res.*, 28, 1300. 1968.
- 93) Buell, D., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 190, 221. 1972.
- 94) Pulvertaft, R. J. V., *Lancet*, 1, 238. 1964.
- 95) Moore, G., *J. Natl. Cancer Inst.*, 43, 1119. 1969.
- 96) American Type Culture Collection, ATCC CRL 8155.
- 97) Minowada, J., Ohnuma, T. and Moore, G. E., *J. Natl. Cancer Inst.*, 49, 891. 1972.
- 98) Huang, R., *J. Cyclic Nucl. Res.*, 8, 385. 1982.
- 99) Dayer, J.-M., Vassalli, J.-D., Bobbitt, J. L., Hull, R. N., Reich, E. and Krane, S. M., *J. Cell Biol.* 91, 195. 1981.
- 100) Jans, D. A., Gajdas, E. L., Dierks-Ventling, C., Hemmings, B. A. and Fahrenholz, F., *Biochim. Biophys. Acta.*, 930, 392. 1987.
- 101) Murano, S. and Pelham, H. R. B., *Cell*, 48, 899. 1987.
- 102) Murano, S. and Pelham, H. R. B., *Cell*, 46, 291. 1986.
- 103) Andrus, L., Altus, M. S., Pearson, D., Grattman, M. and Nagamine, Y., *J. Biol. Chem.*, 263, 6183. 1988.
- 104) DiDomencio, B. J., Bugaisky, G. E. and Lindquist, S., *Cell*, 31, 593, 1982.

- 105) Resendez, E., Ting, J., Kim, K. S., Wooden, S. K. and Lee, A. S., J. Biol. Chem., 103, 2145. 1986.
- 106) Widelitz, R. B., Magun, B. E. and Gerner, E. W., Mol. Cell. Biol., 6, 1088. 1986.
- 107) Ingolia, T. D., Craig, E. A. and McCarthy, B. J., Cell, 21, 669. 1980.
- 108) Chakraborty, M., Chatterjee, D., Kellokumpu, S., Rasmussen, H. and Baron, R., Science, 251,
- 109) Kawamoto, S. and Hidaka, H., Biochem. Biophys. Res. Comm., 125, 258. 1984.
- 110) Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S. and Sasaki, Y., Biochemistry, 23, 5036. 1984.
- 111) Ashkenazi, A., Winslow, J. W., Peralta, E. G., Peterson, G. L., Schimerlik, M. I., Capon, D. J. and Ramachandran, J., Science, 238, 672. 1987.
- 112) Schwinn, D. A., Page, S. O., Middleton, J. P., Lorenz, W., Liggett, S. B., Yamamoto, K., Lapertina, E. G., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Cotecchia, S., Mol. Pharmacol., 40, 619. 1991.
- 113) Thompson, E. B., Mol. Endocrinol., 6, 501. 1992.
- 114) Van Sande, J., Raspe, E., Perret, J., Lejeune, C., Maehaut, C., Vassart, G. and Dumont, J. E., Mol. Cell. Endocrinol., 74, R1. 1990.
- 115) Abou-Samara, A.-B., Jupper, H., Force, T., Freeman, M. W., Kong, X.-F., Schipani, E., Urena, P., Richards, J., Bonventre, J. V., Potts Jr., J. T., Kronenberg, H. M. and Segre, G. V., Proc.

- Natl. Acad. Sci. USA., 89, 2732. 1992.
- 116) Avissar, S., Schreiber, G., Dannon, A. and Belmaker, R. H.,
Nature, 331, 440. 1988.
- 117) Zaidi, M., Datta, H. K., Moonga, B. S. and MacIntyre, I., J.
Endocrinol., 126, 473. 1990.
- 118) Cabre, O., Conklin, B. R., Lin, H. Y., Lodish, H. F., Wilson, E.,
Ives, H. E., Catanzariti, L., Hemmings, B. A. and Bourne, H., Mol.
Endocrinol., 6, 551. 1992.
- 119) Kosugi, S., Okajima, F., Ban, T., Hidaka, A., Shenker, A. and
Kohn, L. D., J. Biol. Chem., 267, 24135. 1992.
- 120) Barder, D. L., Ganz, M. B., Bongiorno, P. B. and Strader, C. D.,
Mol. Pharmacol., 41, 1056. 1992.
- 121) Surprenant, A., Horstman, D. A., Akbarali, H. and Limbird, L. E.,
Science, 257, 977. 1992.
- 122) Fisher, J. A., Tobler, P. H., Henke, H. and Tschopp, F. A., J. Clin.
Endocrinol. Metab., 57, 1314, 1983.
- 123) Tobler, P. H., Tschopp, F. A., Dambacher, M. A. and Fischer, J. A.,
Clin. Endocrinol., 20, 253. 1984.
- 124) Perez Cano, R., Girgis, S. I. and MacIntyre, I., Acta Endocrinol.,
100, 256. 1982.
- 125) Lasmole, F., Jullienne, A., Day, F., Minvielle, S., Milhaud, G. and
Moukhtar, M. S., EMBO J., 4, 2603. 1985.
- 126) Rittel, W., Maier, M., Brugger, B., Kamber, B., Rinker, B. and
Sieber, P., Experientia, 32, 246. 1976.

- 127) Rinker, B., Neher, R., Maier, R., Kahnt, F. W., Byfield, P. G. H., Gudmundsson, T. V., Galante, L. and MacIntyre, L., *Helv. Chim. Acta*, 51, 1738.
- 128) Merle, M., Lefevre, J. F., Staub, D., Paulais, D. and Milhaud, G., *Biochim. Biophys. Acta*, 79, 1071. 1977.
- 129) Morioka, T., Munekata, E., Sakakibara, S., Noda, T. and Otani, M., *Experientia*, 32, 1104. 1976.
- 130) Maier, R., Rinker, B. and Rittel, W., *FEBS Lett.*, 48, 68. 1974.
- 131) Maier, R., Brugger, H., Bruckner, H., Kamber, B., Rinker, B. and Rittel, R., *Acta Endocrinol.*, 85, 102. 1977.
- 132) Guttman, S., *In calcitonin 1980.*, ed. by Pecile, A. *Excerpta Medica*, N. Y., pp.11. 1981.
- 133) Maier, R., Kamber, B., Rinker, B. and Rittel, W., *Hormon Mtab. Res.*, 7, 511. 1975.
- 134) Maier, R., Kamber, B., Rinker, B. and Rittel, W., *Clin. Endocrinol.*, 5, suppl. 327s. 1976.
- 135) US patent 4606283
- 136) US patent 4632978
- 137) US patent 4639511
- 138) US patent 4639509
- 139) US patent 4597900
- 140) FR patent 2521553
- 141) US patent 4639510
- 142) US patent 4528132

- 143) US patent 4497731
- 144) US patent 4622386
- 145) US patent 4622387
- 146) US patent 4605514
- 147) US patent 4604273
- 148) US patent 4239680
- 149) US patent 4606856
- 150) US patent 4604236
- 151) US patent 4451395
- 152) US patent 4622388
- 153) US patent 4495097
- 154) US patent 4391747
- 155) US patent 4659804
- 156) US patent 4537716
- 157) US patent 4397780
- 158) US patent 4414149
- 159) US patent 4444681
- 160) US patent 4605515
- 161) Epand, R. M., Epand, R. F., Orłowski, R. C., Schlueter, R. J., Boni, L. T. and Hui, S. W., *Biochemistry*, 22, 5074. 1983.
- 162) Epand, R. M., Epand, R. F. and Orłowski, R. C., *Int. J. Pept. Protein Res.*, 25, 105. 1985.
- 163) Findlay, D. M., Michelangeli, V. P., Martin, J., Orłowski, R. C. and Seyler, J. K., *Endocrinol.*, 117, 801. 1985.

- 164) Epand, R. M., Epand, R. F., Orlowski, R. C., Seyler, J. K. and Colecott, R. L., *Biochemistry*, 25, 1964. 1986.
- 165) Orlowski, R. C., Epand, R. M. and Stafford, A. R., *Eur. J. Biochem.*, 162, 399. 1987.
- 166) Epand, R. M., Epand, R. F., Stafford, A. R. and Orlowski, R. C., *J. Exp. Med.*, 31, 1595. 1988.
- 167) Epand, R. M., Epand, R. F. and Orlowski, R. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 152, 203. 1988.
- 168) Findlay, D. M., Michelangeli, Orlowski, R. C. and Martin, T. J., *Endocrinol.*, 112, 1288. 1983.
- 169) Epand, R. M., Epand, R. F. and Orlowski, R. C., *Eur. J. Biochem.*, 188, 633. 1990.
- 170) Moe, G. R., Miller, R. J. and Kaiser, E. T., *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 4100. 1983.
- 171) Moe, G. R. and Kaiser, E. T., *Biochemistry*, 24, 1971. 1985.
- 172) Green III, F. R., Lynch, B. and Kaiser, E. T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 8340. 1987.
- 173) Yamamoto, I., Morita, R., Fukunaga, M., Dokoh, S., Shigeno, C., Totizuka, K. and Noda, T., *Endocrinol.*, 108, 698. 1981.
- 174) D'Santos, C. S., Nicholson, G. C., Moseley, J. M., Evans, T., Martin, T. J. and Kemp, B. E., *Endocrinol.*, 123, 1483. 1988.
- 175) Zhou, N. E., Mant, C. T. and Hodges, R. S., *Peptide Res.*, 3, 8. 1988.
- 176) Heinitz, L. M., Flamigan, E., Orlowski, R. C. and Regnier, F. E., J.

Chromatogr., 443, 229. 1988.

177) Chou, P. Y. and Fasman, G. D., *Adv. Enzymol.*, 47, 45. 1978.

178) Wohlwend, A., Malmstrom, K., Henke, H., Murer, H., Vassali, J.-D. and Fisher, J. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 131, 537. 1985.

謝 辞

本論文をまとめるに際し、ご指導とご高配、数々のご配慮を賜りました
東京大学薬学部衛生化学裁判化学教室 井上圭三教授ならびに工藤一郎助教
授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました井
上玲博士に衷心より感謝いたします。

本研究を行うにあたり、御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました逸見
仁道博士に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、多くのご指導、ご助言を賜りました常本大英氏、
小松靖彦博士、近藤淑博士、長尾広昌博士に心より御礼申し上げます。

細胞形態についてご助言いただき、また電子顕微鏡写真を撮影していただ
きました東京大学農学部板垣慎一助教授に心より御礼申し上げます。

HPLC/マススペクトル測定に際し、ご協力いただきました相模中央化学
研究所茂原静雄氏ならびに日本電子の方々心より御礼申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、多大なるご配慮を下さり、また終始励まして
いただきました矢沢一良博士に深く感謝いたします。

有益なる御助言をいただき、励まして下さいました相模中央化学研究所

寺島孜郎副所長に心より御礼申し上げます。

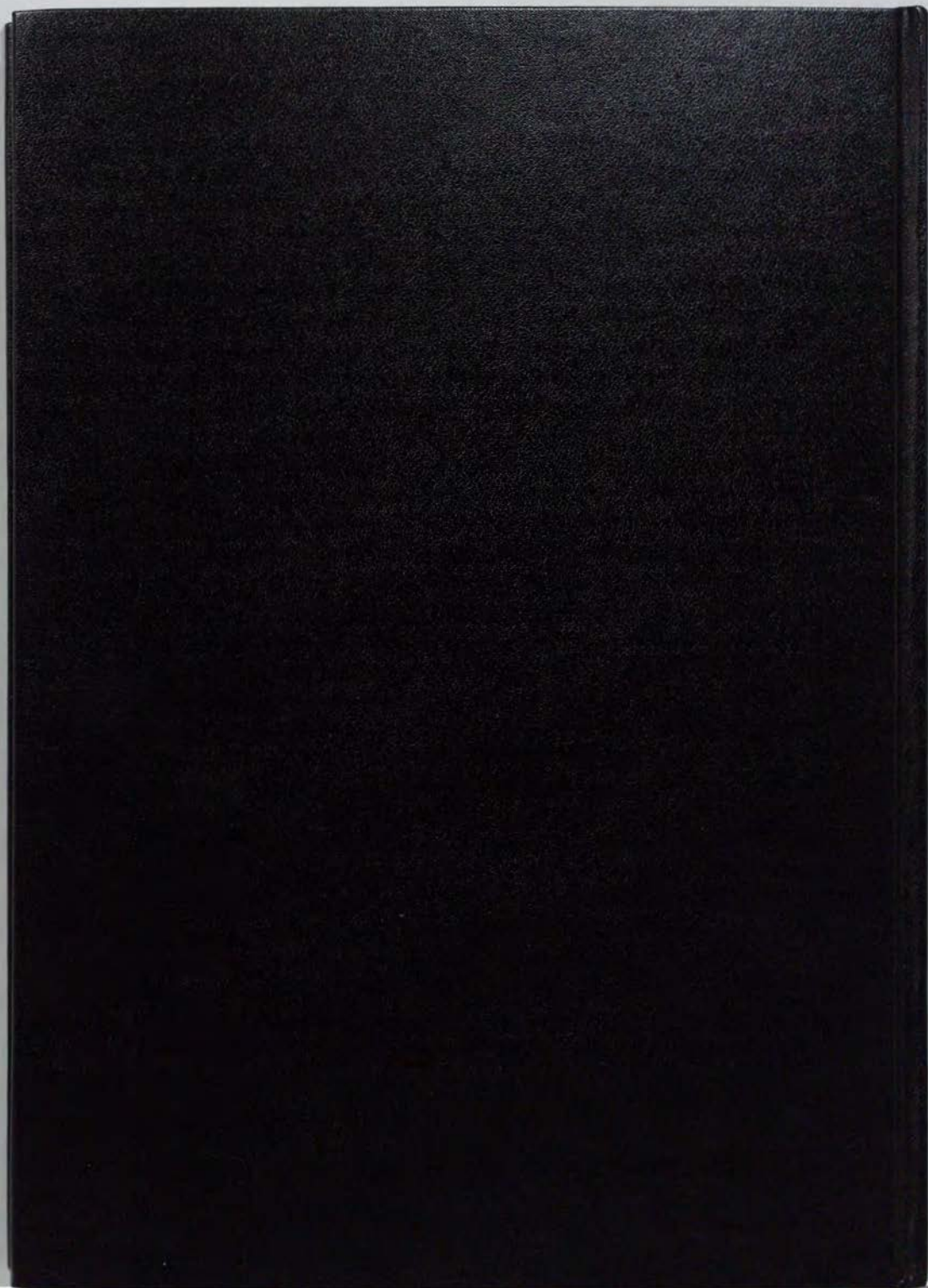
本研究をまとめるにあたり、多くのご助言、ご指導を賜りました増沢康男博士に衷心より感謝いたします。また有益なご討論、ご助言をいただき、終始励まして下さいました長田寛博士、水上由紀子博士に心より感謝いたします。

本研究をまとめるにあたり、適切なお助言、ご指導をいただきました城所俊一博士、辻智子博士、三木洋一郎博士に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、共同研究者としてご協力いただきました福田浩子氏、落合純子氏、小畑順子氏、伊藤宣子氏、ならびにご助力いただきました多くの皆様に心より感謝いたします。

本研究の遂行につき、その機会を与えて下さいました相模中央化学研究所近藤聖所長、沼尾長徳首席研究員に深謝いたします。

最後に、常に暖かく見守り協力してくれた夫 明弘、長女 真央、義父母 鹿野九平、アサ、義兄夫妻 芳弘、留美子、そして両親 小早川透、美津子に心より感謝します。





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

C Y M

© Kodak, 2007 TM, Kodak

© Kodak, 2007 TM, Kodak