(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4323006号
(P4323006)
(45)発行日　平成21年9月2日(2009.9.2)　(24)登録日　平成21年6月12日(2009.6.12)

(51)Int.Cl.　F I
C07K 5/103 (2006.01)　C07K 5/103 ZNA

請求項の数 2 (全 14 頁)

(21)出願番号　特願平11-157700
(22)出願日　平成11年6月4日(1999.6.4)
(65)公開番号　特開2000-344795(P2000-344795A)
(43)公開日　平成12年12月12日(2000.12.12)
審査請求日　平成18年5月19日(2006.5.19)

(73)特許権者　309007911
サントリーホールディングス株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜二丁目１番４０号
(74)代理人　100083301
弁理士　草間　攻
(72)発明者　南方　宏之
大阪府三島郡島本町若山台１丁目１番１号　財団法人サントリー生物有機科学研究所内
(72)発明者　岩越　栄子
大阪府三島郡島本町若山台１丁目１番１号　財団法人サントリー生物有機科学研究所内

審査官　田中　晴絵

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規神経ペプチド

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
次の式（ＩＩ）
Ｈ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ａｓｐ－ＯＨ　　（ＩＩ）
［式中、アミノ酸残基は特に明記しない限りＬ体を表わす（以下同じ）］
で表わされ、軟体動物の心臓の拍動を増強する活性を有するペプチド。
【請求項２】
タコの脳から得られる、次の式（ＩＩ）
Ｈ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ａｓｐ－ＯＨ　　（ＩＩ）
で表わされ、軟体動物の心臓の拍動を増強する活性を有するペプチド。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は新規な神経ペプチドに関し、さらに詳細には、テナガダコ（Ｏｃｔｏｐｕｓ　ｍｉｎｏｒ）の脳から得られる、軟体動物の心臓の拍動を増強する活性を有する新規ペプチドに関する。
【０００２】
【従来の技術】
無脊椎動物は、神経内分泌系が発達しており、様々な内在性ペプチドが、神経伝達物質、神経修飾物質または神経ホルモンとして働いていることが知られている。

【０００３】
また、無脊椎動物の代表である軟体動物の神経系は、高等動物に比べて比較的単純であるために、情報処理の機構の解明に利用することができる。特に、軟体動物より得られた情報処理機構に関する知見が、細胞下レベルにおける機構に関するものであれば、高等動物の神経系における情報処理機構の解明に、その知見が一般化できると考えられることから、軟体動物の神経伝達物質の探索が精力的に行われている。
【０００４】
例えば、特開平１－２２１３９２号公報にはムラサキイガイより得られる内因性神経ペプチドが開示されている。また、特開平２－２８６６９６号公報にはアフリカマイマイの神経節から得られる内在性神経伝達物質として、Ｄ－アミノ酸を含む新規ペプチドが開示されており、さらに特開平６－５６８９０号公報にはハンガリー産マイマイの神経節から得られる神経ペプチドが開示されている。
【０００５】
この他、軟体動物からは、Ｈ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｔｒｐ－NH_2、ミオモジュリン－ＣＡＲＰ、心筋作動性小ペプチド（ＳＣＰ）、バッカリンなどの多数の神経ペプチドが単離、同定されている（Ｍ．Ｋｏｂａｙａｓｈｉ ａｎｄＹ．Ｍｕｎｅｏｋａ，Ｚｏｏｌ．Ｓｃｉ．，７，８０１（１９９０）；Ｙ．Ｍｕｎｅｏｋａ ａｎｄ Ｍ．Ｋｏｂａｙａｓｈｉ，Ｅｘｐｅｒｉｅｎｔｉａ ４８，４４８（１９９２）；宗岡洋二郎、日本農薬学会誌 １８，Ｓ１９１（１９９３）；Ｙ．Ｍｕｎｅｏｋａ，Ｔ．Ｔａｋａｈａｓｈｉ，Ｍ．Ｋｏｂａｙａｓｈｉ，“Ｐｅｒｓｐｅｃｔｉｖｅ ｉｎ Ｃｏｍｐａｒａｔｉｖｅ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ”，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｕｎｃｉｌ ｏｆ Ｃａｎａｄａ １９９４，ｐ１０９）。
なお、本明細書中においては、アミノ酸残基はＩＵＰＡＣおよびＩＵＢの定める３文字表記にて表記する。また、アミノ酸残基がＤ体の場合には３文字表記の前に大文字のＤ－を用いて表記し、表記なき場合はＬ体を表す。
【０００６】
このように、軟体動物からは幾つかの神経ペプチドが得られているが、これらの神経ペプチドの構造－活性相関や、種特異性を明らかにして、高等動物の神経系にも一般化できる情報を得るためには、種々の軟体動物から、さらに多くの神経ペプチドを見出すことが必要とされている。
【０００７】
ところで、軟体動物のうち、頭足類に分類されるタコ類は、高度に発達した脳を持ち、他の軟体動物に比べて運動機能や知覚機能において格段の進化を遂げている。特に循環系は、軟体動物では唯一、閉鎖血管系であり、体循環のための心臓（体心臓）に加えて、鰓に血液を循環させる鰓心臓を持つ。しかしながら、タコ類のペプチド性制御物質としては、Ｈ－Ｐｈｅ－Ｍｅｔ－Ａｒｇ－Ｐｈｅ－NH_2とその同族ペプチドの幾つかが知られているのみであり（Ｒ．Ｍａｒｔｉｎａｎｄ Ｋ．Ｈ．Ｖｏｉｇｔ，Ｅｘｐｅｒｉｅｎｔｉａ ４３，５３７（１９８７））、詳細には検討されていないのが現状である。
【０００８】
【発明が解決しようとする課題】
したがって、本発明は、軟体動物としてこれまであまり検討されていなかったテナガダコより新たな神経ペプチドを見い出し、その構造を明らかにするとともに、そのタコ自身の中での作用や、他の軟体動物に対する作用を解明し、高等動物の神経系における情報処理機構の解明用の試薬や、農薬または医薬品開発における基礎化合物として利用可能な、新規ペプチドを得ることを課題とする。
【０００９】
【課題を解決するための手段】
かかる課題を解決するために、本発明者らはタコ類から新たな神経ペプチドを得るべく、テナガダコの脳から、その心臓に対する活性を指標に、テナガダコの内因性神経ペプチドを単離すべく鋭意研究を行い、次のアミノ酸配列式（１）～（４）：

【００１０】
Ｈ－Ｇｌｙ－Ｄ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ－ＯＨ　　（１）
（以下、このペプチドを化合物（１）と称する。）
【００１１】
Ｈ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ－ＯＨ　　（２）
（以下、このペプチドを化合物（２）と称する。）
【００１２】
Ｈ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｔｒｐ－Ａｓｐ－ＯＨ　　（３）
（以下、このペプチドを化合物（３）と称する。）
【００１３】
Ｈ－Ｇｌｙ－Ｄ－Ｓｅｒ－Ｔｒｐ－Ａｓｐ－ＯＨ　　（４）
（以下、このペプチドを化合物（４）と称する。）
【００１４】
で表されるペプチドを分離、精製し、その化学構造を決定するとともに、全合成によりその構造を確認し、さらにこれらのペプチドのタコおよびハマグリなどの軟体動物の心臓に対する作用を確認して本発明を完成した。
【００１５】
【発明の実施の形態】
これらの新規ペプチドは、テナガダコの心臓の心拍頻度と収縮高を増強させる内因性神経ペプチドであり、テナガダコから、以下の方法により単離、精製することができる。
【００１６】
すなわち、テナガダコの脳を熱水抽出し、その抽出液に酢酸を３％濃度となるように加えた後、冷却し、遠心分離して粗抽出物を得る。この粗抽出物をＣ１８カートリッジ（例えばＳｅｐ－Ｐａｋ（登録商標）Ｃａｒｔｒｉｄｇｅｓ：ウォーターズ社製）に吸着させた後、６０％メタノールで溶出してペプチド画分を分取し、この画分をイオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等に付して、目的とするペプチドを分離、精製することができる。
【００１７】
また、本発明のペプチドはアミノ酸残基数４のオリゴペプチドであるため、通常のペプチド合成機（例えばＰＥバイオシステムズジャパン社製ペプチド合成機４３３Ａ型）を用いた固相合成法や、通常の有機合成化学的手法による合成により容易に合成することができる。これらの方法で得られた粗ペプチドは、必要であれば逆相高速液体クロマトグラフィーや結晶化等の通常の精製手法によって、精製することができる。
【００１８】
【作用】
本発明のペプチドは、テナガダコの心臓の心拍頻度および収縮高を増強させる内因性の神経ペプチドであるが、別の軟体動物であるハマグリの心臓に対しても同様の効果を及ぼすことから、神経伝達系研究用の試薬としてだけでなく、医薬および農薬等への新たなアプローチを与える有用な化合物として利用することができる。
【００１９】
例えば、本発明のペプチドを有効成分とする医薬としては、製剤学的に慣用されている賦形剤と共にカプセル剤、錠剤、注射剤等の適当な剤形で、経口的または非経口的に投与することができる。具体的には、本発明のペプチドを、乳糖、デンプンまたはその誘導体、セルロース誘導体等の賦形剤と混合したのち、ゼラチンカプセルに充填することによりカプセル剤を調整することができる。
【００２０】
また錠剤は、上記の賦形剤の他に、カルボキシメチルセルロースナトリウム、アルギン酸、アラビアゴム等の結合剤と水を加えて練合し、必要により顆粒として造粒したのち、さらにタルク、ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤を添加して、通常の圧縮打錠機を用いて錠剤に調整することができる。

【００２１】
さらに、非経口投与に際しては、本発明のペプチドを溶解補助剤と共に滅菌蒸留水あるいは滅菌生理食塩水に溶解し、アンプルに封入して注射用製剤とすることができる。この場合、必要により安定化剤、緩衝物質等を含有させてもよい。また、粉末のままバイアル充填し、滅菌蒸留水により用時溶解型の製剤とすることもできる。これらの非経口投与製剤は、静脈内投与、あるいは点滴静注により投与することができる。
【００２２】
なお本発明の有効成分であるペプチドの投与量は、種々の要因、例えば治療すべき病態、患者の症状、重篤度、患者の年齢、さらには投与経路等を考慮して、適宜設定すればよい。一般的に経口投与の場合には、有効成分として通常０．１～１０００ｍｇ／日／ヒト、好ましくは１～５００ｍｇ／日／ヒトの範囲内で、また非経口投与の場合には、経口投与の場合における投与量の約１／１００～１／２程度の範囲内で適宜選択し投与することができる。
【００２３】
【実施例】
次に実施例によって本発明をさらに説明するが、本発明の範囲はこれのみに限定されるものではない。
【００２４】
実施例１：テナガダコから心拍動増強活性を有するペプチド類の分離
（ａ）：粗抽出
テナガダコ（Ｏｃｔｏｐｕｓ　ｍｉｎｏｒ）２００匹から脳（視葉を含む）を摘出し、液体窒素にて凍結保存した。凍結保存した摘出組織を、沸騰した蒸留水１Ｌ中に入れ、１０分間煮沸した。放冷後、酢酸を３％濃度になるように加え、ホモジナイズした後、４℃で３５分間、１２，０００×ｇで遠心分離して、上清を得た。この操作をもう一度繰り返し、沈殿物に２００ｍｌの３％酢酸を加えて再びホモジナイズした後、同じ操作条件で遠心分離して上清を得た。集めた上清を、減圧下に約２００ｍｌになるまで濃縮し、粗抽出物とした。
【００２５】
（ｂ）：Ｃ１８カートリッジへの吸着
（ａ）で得られた粗抽出物に、０．１Ｍ－ＨＣｌ濃度となるように１．０Ｍ－ＨＣｌを加え、４℃で３０分間、３０，０００×ｇで遠心分離した。得られた上清を、Ｓｅｐ－Ｐａｋ（登録商標）Ｖａｃ３５ｃｃ（１０ｇ）Ｃ１８カートリッジ（ウォーターズ社製）に通した。カートリッジを０．１％トリフロロ酢酸（以下、ＴＦＡと略す）２００ｍｌで洗浄した後、保持物質を６０％メタノール／０．１％ＴＦＡ　１００ｍｌで溶出し、溶出液を減圧下に約４ｍｌになるまで濃縮した。
【００２６】
（ｃ）：逆相高速液体カラムクロマトグラフィー（１）
（ｂ）で得られた濃縮液を濾過して微粒子を除き、Ｃａｐｃｅｌｌ　ｐａｋ　Ｃ１８　ＵＧ８０（５μｍ、Φ１０×２５０ｍｍ、資生堂製）を用いた逆相高速液体カラムクロマトグラフィー（逆相ＨＰＬＣ）に付し、流速１．５ｍｌ／ｍｉｎで、０．１％ＴＦＡ（ｐＨ２．２）中、６０分間で０％から６０％のアセトニトリルの直線濃度勾配で溶出した。２１５ｎｍの紫外線吸収のモニターにより、３ｍｌずつ分画した。各画分を後記する実施例７に示した生物検定に付したところ、アセトニトリル１５～２１％に溶出される画分に、心拍動増強活性が見られた。
【００２７】
（ｄ）：陽イオン交換カラムクロマトグラフィー
（ｃ）で得られた活性画分を、ＴＳＫｇｅｌ　ＳＰ－５ＰＷ（１０μｍ、Φ７．５×７５ｍｍ、東ソー製）を用いた陽イオン交換カラムクロマトグラフィー（陽イオン交換ＨＰＬＣ）に付し、流速１．０ｍｌ／ｍｉｎで、１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）中、６０分間で０Ｍから０．６ＭのＮａＣｌの直線濃度勾配で溶出した。２ｍｌずつの画分を生物

検定したところ、０ＭのＮａＣｌ濃度で溶出された画分に活性が見られた。
【００２８】
（ｅ）：逆相ＨＰＬＣ（２）
（ｄ）で得られた画分を、Ｌ－ｃｏｌｕｍｎ　ＯＤＳ（５μｍ、Φ４．６×１５０ｍｍ、財団法人化学品検査協会製）を用いた逆相ＨＰＬＣに付し、流速１．０ｍｌ／ｍｉｎで、０．１％ＴＦＡ（ｐＨ２．２）中、４０分間で、５～２５％のアセトニトリルの直線濃度勾配で溶出した。１ｍｌずつ分画し、アセトニトリル濃度約７～８％に溶出する画分（以下、画分Ａという）およびアセトニトリル濃度約９％に溶出する画分（以下、画分Ｂという）に活性を認めた。
【００２９】
実施例２：活性画分からペプチド類の精製（その１：活性画分Ａからの精製）
実施例１の分離操作により得られた活性画分Ａについて、更に以下の操作を行い、ペプチド類を精製した。
【００３０】
（ａ）：陰イオン交換カラムクロマトグラフィー
実施例１の（ｅ）で得られた活性画分Ａを、ＴＳＫｇｅｌ　ＤＥＡＥ－５ＰＷ（１０μｍ、Φ７．５×７５ｍｍ、東ソー製）を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー（陰イオン交換ＨＰＬＣ）に付し、流速１．０ｍｌ／ｍｉｎで、１０ｍＭトリス－塩酸緩衝液（ｐＨ９．７）中、７０分間で０Ｍから０．７ＭのＮａＣｌの直線濃度勾配で溶出した。２ｍｌずつ分画し、活性を示した０．０８～０．１０ＭのＮａＣｌ濃度で溶出された画分を集めた。
【００３１】
（ｂ）：逆相ＨＰＬＣ（１）
（ａ）で得られた画分を、Ｌ－ｃｏｌｕｍｎ　ＯＤＳ（５μｍ、Φ４．６×１５０ｍｍ、財団法人化学品検査協会製）を用いた逆相ＨＰＬＣに付し、流速１．０ｍｌ／ｍｉｎで、０．１％ＴＦＡ（ｐＨ２．２）中、３０分間で、０～１５％のアセトニトリルの直線濃度勾配で溶出した。アセトニトリル濃度８．５～９％で溶出した隣接したピークＡ－１およびピークＡ－２を分取した。
【００３２】
（ｃ）：逆相ＨＰＬＣ（２）
（ｂ）で得られた画分をそれぞれ、Ｌ－ｃｏｌｕｍｎ　ＯＤＳ（５μｍ、Φ４．６×１５０ｍｍ、財団法人化学品検査協会製）を用いた逆相ＨＰＬＣに付し、流速０．５ｍｌ／ｍｉｎで、０．１％ＴＦＡ（ｐＨ２．２）中、アセトニトリル６．６％で展開した。ピークＡ－１からは保持時間２４．９分に、ピークＡ－２からは保持時間２５．８分に単一の紫外線吸収を示す化合物（ペプチド）がそれぞれ得られた。前者を化合物（１）、後者を化合物（２）とした。
【００３３】
実施例３．神経ペプチド類の同定（その１）
実施例２で純化した化合物（１）および（２）の構造を、Ｓｈｉｍａｄｚｕ　ＰＳＱ－１型気相シークエンサー（島津製作所製）によって解析した。得られたアミノ酸配列を、下記表１に示した。
【００３４】
【表１】
ペプチドのアミノ酸配列（単位：ｐｍｏｌ）

Ｎｏ．	化合物（１）	化合物（２）
１	Ｇｌｙ　２３８	Ｇｌｙ　５６９
２	Ｐｈｅ　３１９	Ｐｈｅ　８０７
３	Ｇｌｙ　２０３	Ｇｌｙ　５０８
４	Ａｓｐ　３８	Ａｓｐ　８８

【００３５】
分子量は、ＭＡＬＤＩ　ＴＯＦ－ＭＳ（Ｖｏｙａｇｅｒ　Ｅｌｉｔｅ，ＰＥバイオシステムズジャパン社製）によって確認した。その測定値を下記表２に示した。
【００３６】
【表２】
ペプチドのＭＳデータ

化合物	分子式（Ｍ＋Ｈ）　計算値	実測値（Ｍ＋Ｈ）$^+$
（１）	$C_{17}H_{23}N_4O_7$　３９５．１４	３９５．２０
（２）	$C_{17}H_{23}N_4O_7$　３９５．１４	３９５．２０

【００３７】
さらに、アミノ酸の光学活性はＦＬＥＣ法により東ソーＣＣＰ－８０２０型アミノ酸分析システムにより測定した。その結果、化合物（１）についてはＤ－ＰｈｅおよびＬ－Ａｓｐが確認され、化合物（２）からはＬ－ＰｈｅおよびＬ－Ａｓｐが確認された。
【００３８】
以上の機器分析データにより、活性画分Ａより単離、精製されたテナガダコの神経ペプチド類である化合物（１）および化合物（２）は、次のアミノ酸配列式（１）および（２）
Ｈ－Ｇｌｙ－Ｄ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ－ＯＨ　　（１）
Ｈ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ－ＯＨ　　（２）
で表されることが明らかになった。
【００３９】
実施例４：活性画分からペプチド類の精製（その２：活性画分Ｂからの精製）
実施例１の分離操作により得られた活性画分Ｂについて、更に以下の操作を行い、ペプチド類を精製した。
【００４０】
（ａ）：陰イオン交換カラムクロマトグラフィー
実施例１の（ｅ）で得られた活性画分Ｂを、ＴＳＫｇｅｌ　ＤＥＡＥ－５ＰＷ（１０μｍ、Φ７．５×７５ｍｍ、東ソー製）を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー（陰イオン交換ＨＰＬＣ）に付し、流速１．０ｍｌ／ｍｉｎで、１０ｍＭトリス－塩酸緩衝液（ｐＨ９．７）中、７０分間で０Ｍから０．７ＭのＮａＣｌの直線濃度勾配で溶出した。２ｍｌずつ分画し、活性を示した０．１２ＭのＮａＣｌ濃度で溶出された画分を集めた。
【００４１】
（ｂ）：逆相ＨＰＬＣ（１）
（ａ）で得られた画分を、Ｌ－ｃｏｌｕｍｎ　ＯＤＳ（５μｍ、Φ４．６×１５０ｍｍ、財団法人化学品検査協会製）を用いた逆相ＨＰＬＣに付し、流速１．０ｍｌ／ｍｉｎで、

０．１％ＴＦＡ（ｐＨ２．２）中、３０分間で、０～１５％のアセトニトリルの直線濃度勾配で溶出した。アセトニトリル濃度約１０．５％で溶出したピークＢ－１およびアセトニトリル濃度約１１％で溶出したピークＢ－２を分取した。

【００４２】

（ｃ）：逆相ＨＰＬＣ（２）

（ｂ）で得られた画分をそれぞれ、Ｃａｐｃｅｌｌ　ｐａｋ　Ｃ１８　ＵＧ８０（５μｍ、Φ４．６×１５０ｍｍ、資生堂製）を用いた逆相ＨＰＬＣに付し、流速０．５ｍｌ／ｍｉｎで、０．１％ＴＦＡ（ｐＨ２．２）中、アセトニトリル１０．２％で展開した。ピークＢ－１からは保持時間２０．８分に、ピークＢ－２からは保持時間２４分に単一の紫外線吸収を示す化合物（ペプチド）がそれぞれ得られた。前者を化合物（３）、後者を化合物（４）とした。

【００４３】

実施例５．神経ペプチド類の同定（その２）

実施例４で純化した化合物（３）および（４）の構造を、Ｓｈｉｍａｄｚｕ　ＰＳＱ－１型気相シークエンサー（島津製作所製）によって解析した。得られたアミノ酸配列を、下記表３に示した。

【００４４】

【表３】

ペプチドのアミノ酸配列（単位：ｐｍｏｌ）

Ｎｏ．	化合物（３）	化合物（４）
１	Ｇｌｙ　１２２	Ｇｌｙ　６２
２	Ｓｅｒ　１８	Ｓｅｒ　７
３	Ｔｒｐ　６５	Ｔｒｐ　３６
４	Ａｓｐ　４	Ａｓｐ　３

【００４５】

分子量は、ＭＡＬＤＩ　ＴＯＦ－ＭＳ（Ｖｏｙａｇｅｒ　Ｅｌｉｔｅ，ＰＥバイオシステムズジャパン社製）によって確認した。その測定値を下記表４に示した。

【００４６】

【表４】

ペプチドのＭＳデータ

化合物	分子式（Ｍ＋Ｈ）	計算値	実測値（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$
（３）	$C_{20}H_{26}N_5O_8$	４６４．１７	４６４．２５
（４）	$C_{20}H_{26}N_5O_8$	４６４．１７	４６４．３２

【００４７】

さらに、アミノ酸の光学活性はＦＬＥＣ法により東ソーＣＣＰ－８０２０型アミノ酸分析システムにより測定した。その結果、化合物（３）についてはＬ－ＳｅｒおよびＬ－Ａｓｐが確認され、化合物（４）からはＤ－ＳｅｒおよびＬ－Ａｓｐが確認された。トリプトファンの光学活性については、塩酸加水分解中にトリプトファンが分解されるため、Ｄ－ＴｒｐおよびＬ－Ｔｒｐを用いて合成したペプチドと化合物（３）、化合物（４）を逆相

ＨＰＬＣにて溶出位置の比較をすることにより確認した。その逆相ＨＰＬＣの展開図を、図１として示す。

【００４８】

以上の機器分析データにより、活性画分Ｂより単離、精製されたテナガダコの神経ペプチド類である化合物（３）および化合物（４）は、次のアミノ酸配列式（３）および（４）

Ｈ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｔｒｐ－Ａｓｐ－ＯＨ　　（３）

Ｈ－Ｇｌｙ－Ｄ－Ｓｅｒ－Ｔｒｐ－Ａｓｐ－ＯＨ　　（４）

で表されることが明らかになった。

【００４９】

実施例６．固相法によるテナガダコ神経ペプチド類の合成

テナガダコ神経ペプチド類の合成は、ＰＥバイオシステムズジャパン社の全自動ペプチド合成機４３３Ａ型を用い、ＦａｓｔＭｏｃ（登録商標）法により合成した。

【００５０】

なお、化合物（１）および（２）の合成には、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－Ａｌｋｏレジン（渡辺化学工業社製）を担体とし、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ、Ｆｍｏｃ－ＰｈｅおよびＦｍｏｃ－Ｄ－Ｐｈｅを用いた。

【００５１】

また、化合物（３）および（４）の合成には、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－Ａｌｋｏレジン（渡辺化学工業社製）を担体とし、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）、Ｆｍｏｃ－Ｔｒｐ（Ｂｏｃ）およびＦｍｏｃ－Ｄ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）を用いた。

【００５２】

（ただし、Ｆｍｏｃは９－Ｆｌｕｏｒｅｎｙｌｍｅｔｈｏｘｙｃａｒｂｏｎｙｌを、ｔＢｕはｔ－Ｂｕｔｙｌを、Ｂｏｃはｔ－Ｂｕｔｏｘｙｃａｒｂｏｎｙｌを示す。）

【００５３】

反応終了後のペプチド樹脂からの粗ペプチドの切離しと脱保護には、１，２－エタンジチオール２．５％／水２．５％／ＴＦＡ９５％を用いた。反応混合物を濾過し、濾液にエーテルを加えてペプチドを沈殿させ、沈殿をエーテルで３回洗浄し、粗ペプチド約１００ｍｇを得た。このうちの約１０ｍｇの粗ペプチドを逆相ＨＰＬＣにより精製し、約６ｍｇの精製ペプチドを得た。

【００５４】

精製ペプチドは、Ｃａｐｃｅｌｌ　ｐａｋ　Ｃ１８を用いる逆相ＨＰＬＣにおいて、保持時間が化合物（１）ないし（４）と全く一致した。また、テナガダコの心臓の心拍動活性においても、合成物はそれぞれの天然物と同様であった。

【００５５】

実施例７．テナガダコの心臓の拍動活性の測定

テナガダコの心臓の拍動活性は、森下ら（Ｆｕｍｉｈｉｒｏ　Ｍｏｒｉｓｈｉｔａ、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，２４０，３５４－３５８　（１９９７））の方法に準拠して実施した。すなわち、テナガダコの心臓を摘出し、２つの心房を切断して、一方の房室から心室にカニューレを差込み、チャンバー（容量１０ｍｌ）に固定し、他方を木綿の糸で縛り、張力トランスジューサーにつないで検定の標本とした。カニューレからは人工海水（１％グルコースを含む）が１～２ｍｌ／ｍｉｎ流れるようセットした。検定すべき検体は、同様の人工海水１ｍｌに溶解して、カニューレから心臓内部に到達するよう添加し、心臓の拍動の変化を記録した。

【００５６】

本発明のテナガダコ神経ペプチドである化合物（１）および化合物（２）についての結果を、図２に示した。

図中の結果からも明らかなように、本発明のペプチドはテナガダコ心臓の拍動を増強させている。化合物（１）と化合物（２）は２番目のアミノ酸がＬ体かＤ体かの違いであり、Ｄ体である化合物（１）は低濃度で強い増強活性を示したにもかかわらず、Ｌ体である化合物（２）は極く弱い活性しか示さないことが判明した。

【００５７】
一方、本発明のテナガダコの神経ペプチド類である化合物（３）および化合物（４）の結果を図３に示した。
図中の結果からも明らかなように、化合物（３）および（４）はテナガダコの心臓の拍動を増強させる。化合物（３）と（４）は２番目のアミノ酸がＬ体かＤ体かの違いであり、Ｌ体である（３）は低濃度で強い増強活性を示したにもかかわらず、Ｄ体である（４）は10^{-5}Mの高濃度でしか活性を示さなかった。
【００５８】
実施例８．ハマグリの心臓の拍動活性の測定
ハマグリの心臓の拍動活性の測定は次のように行った。ハマグリの心臓を貫通している消化管の両端を切断して心臓を摘出し、その両端を木綿糸で縛った。一方はチャンバー（容量２ｍｌ）に固定し、他方を張力トランスジューサーにつないで検定の標本とした。チャンバーは人工海水でみたし、検定すべき検体は、同様の人工海水２０μｌに溶解して、チャンバーの中に投与し、心臓の拍動の変化を記録した。
【００５９】
本発明のテナガダコ神経ペプチドである化合物（３）における結果を図４に示した。化合物（３）は、低濃度でハマグリの心臓の拍動を増強させる作用をも有するものであった。
【００６０】
実施例９．　製剤例

錠剤

組成：化合物（３）	**１０ｇ**
乳糖	**１２５ｇ**
微結晶セルロース	**２５ｇ**
トウモロコシデンプン	**２５ｇ**
５％ヒドロキシプロピルメチルセルロース	**１００ｍｌ**
ステアリン酸マグネシウム	**５ｇ**

上記成分を常法により練合、造粒、乾燥後打錠し、１錠中有効成分として化合物（３）を１０ｍｇ含有する重量１９０ｍｇの錠剤を得た。
【００６１】
【発明の効果】
本発明のテナガダコ神経ペプチド類は、低濃度でテナガダコの心臓の拍動を増強させる作用を有する神経ペプチドであり、神経伝達系を解明するための生化学試薬として有用である。また、分子レベルでの構造活性相関の研究を通じて、医薬および農薬等への新たなアプローチを与えるものである。
【００６２】
【配列表】

SEQUENCE LISTING

⟨110⟩ SUNTORY LIMITED

⟨120⟩ NEUROPEPTIDE ORIGINATING OCTOPUS MINOR

⟨130⟩ SN-125

⟨160⟩ 4

⟨170⟩ PatentIn Ver. 2.0

⟨210⟩ 1
⟨211⟩ 4
⟨212⟩ PRT
⟨213⟩ Octopus minor

⟨220⟩
⟨221⟩ PEPTIDE
⟨222⟩ (1)..(4)
⟨223⟩ Include D-amino acid, Position : 2

⟨400⟩ 1
Gly Phe Gly Asp
1

⟨210⟩ 2
⟨211⟩ 4
⟨212⟩ PRT

〈213〉 Octopus minor

〈400〉 2
Gly Phe Gly Asp
1

〈210〉 3
〈211〉 4
〈212〉 PRT
〈213〉 Octopus minor

〈400〉 3
Gly Ser Trp Asp
1

〈210〉 4
〈211〉 4
〈212〉 PRT
〈213〉 Octopus minor

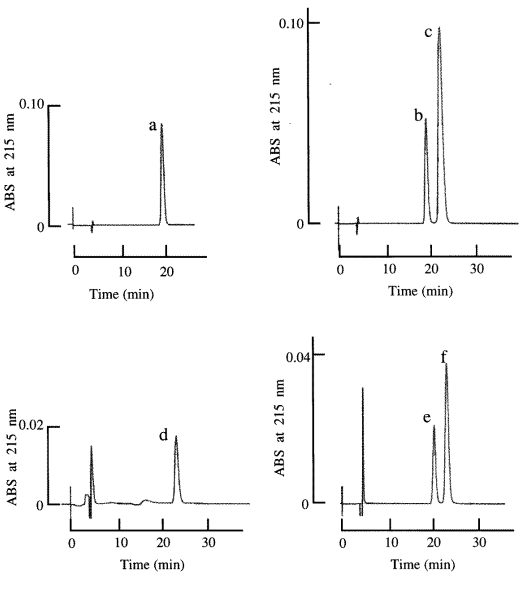
〈220〉
〈221〉 PEPTIDE
〈222〉 (1)..(4)
〈223〉 Include D-amino acid, Position : 2

〈400〉 4
Gly Ser Trp Asp
1

【図面の簡単な説明】
【図１】本発明の化合物（３）および（４）におけるＴｒｐがＬ体であることを確認するために、単離・精製した化合物と、合成化合物とのそれぞれを、逆相ＨＰＬＣに付した展開図である。なお、図中の凡例における化合物の表記においては、１文字表記を用いてい

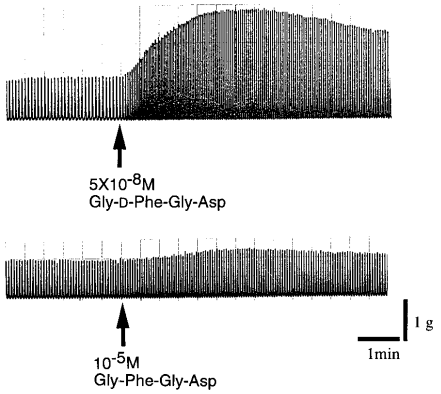
る。
【図２】テナガダコより単離したペプチドに基づいて合成した化合物（１）および（２）の、テナガダコの心臓の拍動を増強させる活性結果を示し、拍動による心収縮高と収縮頻度の変化を記録した図である。
【図３】テナガダコより単離したペプチドに基づいて合成した化合物（３）および（４）の、テナガダコの心臓の拍動を増強させる活性結果を示し、拍動による心収縮高と収縮頻度の変化を記録した図である。
【図４】テナガダコより単離したペプチドに基づいて合成した化合物（３）について、ハマグリの心臓の拍動を増強させる活性結果を示し、拍動による心収縮高と収縮頻度の変化を記録した図である。

【図１】

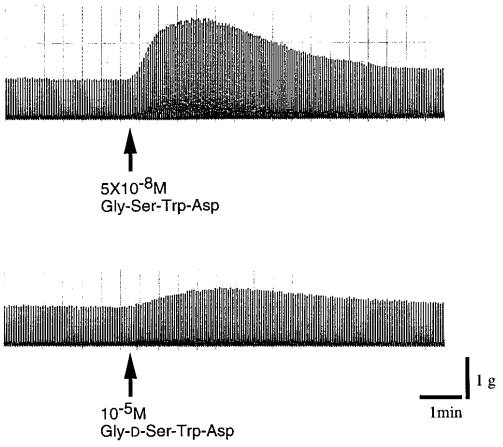


a : 化合物３　b : 合成物GSWD　c: 合成物GSDWD
d : 化合物４　e : 合成物GDSDWD　f : 合成物GDSWD

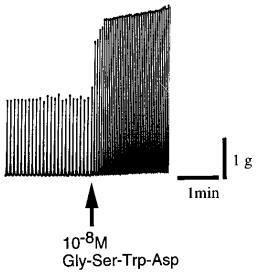
【図２】



【図３】



【図４】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平０２－２８６６９６（ＪＰ，Ａ）
Biosci. Biotech. Biochem., １９９４年, Vol.58, No.6, p.1123-1127
日本化学会誌, １９９６年, No.7, p.595-608

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C07K 5/103
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
PubMed
JSTPlus(JDreamII)