

氏名	カーン モハメド アンワール アルフィーン KHAN MD. ANWAR ARFIEN
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	甲第307号
学位授与年月日	平成15年 9月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Studies on Biogenic Amine Receptors and Their Ligands in the Silkworm <i>Bombyx mori</i> (カイコ生体アミンレセプターとそのリガンドに関する 研究)
学位論文審査委員	(主査) 尾添嘉久 (副査) 松井佳久 中島廣光 持田和男 松井健二

## 学位論文の内容の要旨

Biogenic amines and their receptors, which are linked to adenylyl cyclase via G-protein, play important physiological roles in neurotransmitter, neuromodulatory, or neurohormonal signal transduction pathways in animals. In the current research, which deals with insect biogenic amine receptors and their ligands, it was observed that the signal transduction system mediated by octopamine (OCT) is significantly different from those by tyramine (TYR) and dopamine (DPM) in the silkworm *Bombyx mori*. OCT positively modulates adenylyl cyclase to increase intracellular cAMP levels in *B. mori* larvae, while both TYR and DPM negatively modulate adenylyl cyclase to reduce cAMP levels. These fundamentals might provide an opportunity to discover ligands that specifically act at the OCT, TYR, or DPM receptor. On the basis of an idea that such ligands might be among biogenic amine mimics, several classes of compounds were designed, synthesized, and examined for their effects on cAMP production in the head membrane homogenates of *B. mori* larvae.

First of all, 18 analogues of phenethylamine were synthesized as OCT/TYR analogues and examined for their abilities to modulate cAMP levels through the interaction with adenylyl cyclase-linked receptors. The assay results show that small structural changes in OCT and TYR lead to three types of OCT/TYR analogues: i) compounds that increase the cAMP level by themselves and also depress OCT-stimulated cAMP production, ii) compounds that do not produce cAMP by themselves but inhibit OCT-stimulated cAMP production, and iii) compounds that are not active in either the stimulation of cAMP production. These findings indicate that the analogues act on OCT and/or TYR receptors in a substituent-dependent fashion.

Nineteen 5-phenyloxazoles were next designed so as to structurally mimic OCT, synthesized, and examined for their activity. Among the compounds tested, 5-(4-methoxyphenyl) oxazole (PO9)

proved most effective in stimulating cAMP production, while 5-(4-hydroxyphenyl)oxazole (PO8) and 5-(4-cyanophenyl)oxazole (PO13) led to a marked reduction in cAMP levels. The OCT receptor antagonist chlorpromazine (CPZ), mianserin (MS), and metoclopramide (MC) depressed the cAMP production stimulated by PO9. The TYR receptor antagonist yohimbine (YHM) inhibited the negative effect of PO8, whereas the OCT/DPM receptor antagonist CPZ and the DPM receptor antagonist R-(+)-SCH-23390 (SCH) failed to inhibit the PO8 attenuation of cAMP production. These findings indicate that the 5PO class of compounds includes both positive and negative modulators of adenylate cyclase in the heads of *B. mori* larvae, and that PO9 and PO8 are specific OCT and TYR receptor agonists, respectively.

As the third class of ligands, four hydrazones and six semicarbazones of substituted benzaldehyde were designed as mimics of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor agonist guanabenz, synthesized, and similarly assayed. From the assay results, two analogues, the hydrazone (HZ-1) and semicarbazone (SCZ-3) of 4-hydroxybenzaldehyde, were found to reduce the basal levels of cAMP. SCZ-3 dose-dependently attenuated not only basal but also forskolin-stimulated cAMP levels. The attenuating effect of SCZ-3 was inhibited by both the DPM receptor antagonists (CPZ, SCH) and the TYR receptor antagonist (YHM). These findings indicate that SCZ-3 acts as a non-selective agonist for DPM and/or TYR receptors in *B. mori* larvae. In addition, two analogues of fenmetazole, an  $\alpha_2$ -adrenergic receptor blocker, were synthesized and examined for their effects on cAMP production. Both compounds showed positive effects on cAMP production, although the effects were poor.

Four classes of compounds synthesized in the present study apparently include a variety of OCT, TYR, and DPM receptor agonists as well as antagonists for these receptors. Particularly, PO8 is the first reported TYR receptor agonists. The use of these ligands should facilitate the physiological study of biogenic amine receptors in invertebrates.

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、昆虫の生体アミンレセプターの特性とそれに作用するリガンド構造を明らかにしようとしたものである。生体アミンは、神経系において神経伝達物質、神経修飾物質、神経ホルモンなどとして作用する。脊椎動物の神経系でよく知られている生体アミンとして、アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン、セロトニン、ヒスタミンなどがある。本研究では、無脊椎動物に特有な生体アミンであるオクトパミンとチラミンに注目して研究を行った。オクトパミンは比較的古くから研究されていて、情報伝達機構として、レセプターを介して細胞内セカンドメッセンジャーであるサイクリック AMP (cAMP) レベルを上昇させることなどが分かっている。しかし、チラミンは単なるオクトパミンの生合成前駆体と考えられていたため、生理学的な役割やレセプターについての知見も非常に限られている。本論文では、カイコ幼虫頭部から調製した膜画分における cAMP のレベルが、生体アミンやその類縁体によってどのように変化するか、また薬理学的特徴が知られている化合物によってその変化がどのように影響を受けるかということを目指して、レセプターとリガンドの特徴を明らかにした。

最初に、オクトパミンのベンゼン環 4-位と  $\beta$ -位の置換基を変換したフェニルエチルアミン類縁体 8 化合物を合成し、これまでに合成されていた類縁体 10 化合物を含めて、カイコ頭部膜画分を使った cAMP アッセイを行った。その結果、この小さな構造変換によって類縁体は 3 つのグループに分かれることが判明した。ひとつは、単独で cAMP レベルを上昇させるが、オクトパミンの作用で上昇した cAMP レベルを抑える活性も持つものである。2 つ目は、cAMP レベルを上昇させる活性は持たないが、オクトパミン活性化 cAMP 生産を抑制するものである。3 番目は、両活性を持たない不活性化化合物である。チラミンとドーパミンは、2 番目のグループに属する活性を持っていた。このことから、カイコの頭部神経系には cAMP レベルを正と負に調節する少なくとも 2 つの生体アミン系が存在することが明らかになった。

次に、オクトパミンの  $\beta$ -水酸基の酸素原子とアミノ基の窒素原子に対応する原子を環内に持つフェニルオキサゾール類縁体 19 種を合成し、同様にアッセイした。5-(4-メトキシフェニル) オキサゾールと 2,6-ジクロロフェニル同族体が最も高い cAMP 生産を惹起したが、最大生産レベルはオクトパミンの約 50%であった。4-メトキシフェニル体によって刺激された cAMP 生産は既知のオクトパミンレセプターアンタゴニストによって抑えられたことから、この化合物はオクトパミンレセプターの部分アゴニストであると考えられた。これに対して、4-ヒドロキシフェニル同族体 (P08) と 4-シアノフェニル同族体は基底 cAMP レベルとオクトパミン活性化 cAMP レベルをともに低下させた。また、この抑制活性はチラミンレセプターアンタゴニストと報告されているヨヒンビンによって打ち消されたが、ドーパミンレセプターアンタゴニストによっては打ち消されなかった。従ってこの化合物は、チラミンレセプターアゴニストと考えられた。

3 番目のグループとして、 $\beta$ -アドレナリンレセプターアゴニスト・グアナベンズやオクトパミンレセプターアゴニスト・デメチルクロロジメホルムに似た構造を持つ 4 種のベンズアルデヒドヒドラゾンと 6 種のセミカルバゾン合成し、同様にアッセイした。フェニルオキサゾールの場合と同様に、ベンゼン環の 4 位に水酸基を持つ類縁体 2 種に基底 cAMP レベルを低下させる活性が見られた。セミカルバゾン SCZ-03 は基底値だけでなく、アデニル酸シクラーゼ活性化試薬フォルスコリンで刺激された cAMP 生産も抑制した。この cAMP レベルを低下させる活性はチラミンレセプターとドーパミンレセプターのアンタゴニストによって打ち消されたので、SCZ-03 は両レセプターに対する非選択的アゴニストと考えられた。

以上のように本論文は、少なくとも 3 種の生体アミン受容体が、カイコ神経細胞の cAMP レベルを制御していることを示すとともに、生体アミン類縁体のわずかな構造変化によって 3 種の受容体に対する作用選択性が生じることを明らかにした。とくに、本研究で合成された P08 はチラミン受容体に選択的に作用するアゴニストとして最初に報告されたものである。今後、この化合物を道具として使うことにより、チラミンレセプターの生理学的役割の解明が加速されるものと期待される。本論文で述べられている研究結果は、昆虫神経科学の発展に寄与する新知見であり、本論文は博士（農学）の学位論文に値するものであることを認める。