MSH に関する薬理学的研究

α -MSH ならびにそのフラグメント L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophylglycine の蛙メラノサイト暗色化作用について

小井田雅夫 羽野 寿

(大阪大学薬学部薬理学教室)

(昭和40年11月6日受付) (特)

緒 言

Melanocyte-stimulating hormone (MSH) は脳下垂体から単離されたペプチドホルモンで、その名の示す如く魚類、両棲類などのメラノサイトを暗色化する特異な作用をもっている。現在 MSH には13のアミノ酸からなる α -MSH ならびに18又は22のアミノ酸からなる β -MSH の2種類が知られ^{1)~5)}、MSH 作用を併有する ACTH と共に既に1次構造が明らかにされている。

1960年 Hofmann ら⁶⁾ によって行なわれた α -MSH ならびにそのフラグメントの合成はこれらホルモンの MSH 作用と構造の関係について詳細な情報をもたらした。すなわち α -MSH のアミノ酸配列のうちN末端から6位の histidine より10位の glycine に至る L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophylglycine (以下 all-L) に MSH 活性を認め、また all-L のNもしくはC末端に α -MSH の分子と同じ順序でアミノ酸を加えていくに従って活性が次第に上昇するが、9位の tryptophane を欠く α -MSH の1~8位に相当する octapeptide 或いは6位の histidine を欠き7~13位に相当する heptapeptide には MSH 活性のないことを認めた。これらの結果から彼らは MSH 作用に関する限り all-L に相当するアミノ酸配列中に MSH, ACTH の作用中心があり、他の構成アミノ酸はメラノサイトへの結合を強めるものであると提唱した。

しかし乍ら Hofmann らの結論は、これらフラグメントの比活性のみに基づいて導かれたのであって、果してこれらフラグメントが α -MSH と同一の機作によってメラノサイトの暗色化を起すかどうかは不明である。

そこでわれわれは α -MSH の最小の活性フラグメントの一つ all-L とその立体異性体の MSH 様作用を α -MSH の作用と比較した。

実験材料及び方法

ペプチド： α -MSH は天然品、all-L ならびにその立体異性体は合成品を使用し、各ペプチドのアミノ酸配列ならびに all-L を1.0としたときの比活性⁷⁾⁸⁾ は Tab. 1 に掲げた。

Table 1. Amino acid sequences and relative activities of peptides used in this experiment.

Amino acid sequences													Activity/Mol*
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂ (α -MSH)													1.4×10 ⁶
His-Phe-Arg-Try-Gly(all-L)													1.0
His-D-Phe-Arg-Try-Gly													1.6×10 ²
His-D-Phe-D-Arg-Try-Gly													1.0×10
alkali-treated all-L													4.0×10
Ac-Ser-Tyr-Ser-Met													0
Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂													0

* Here the activity of the all-L pentapeptide was taken as 1.0

作用測定法: 体重30~50gの雄トノサマガエル (*Rana nigromaculata* H.) を用いた。

用量—反応曲線は次の方法で求めた。蛙1匹から大腿部の皮膚各2枚をとって片方を対照とし、片方に検体を作作用させる。1枚の皮膚に40^{mm} 間隔で3段階の用量を連続して作用させ、 α -MSH または all-L いずれの場合も最後に α -MSH の大量 (1.0×10^{-8} M, 蛙皮膚の half-maximum response を起す量の約100倍量) を作用させ、各皮膚の maximum response を測定し、 α -MSH all-L の各用量による反応度 (反射の減少) を maximum response の百分率として算出した。その他の作用測定は全て蛙4匹を用いる Lerner ら⁹⁾ のデザインに従って行った。蛙皮膚の反射測定法ならびに測定機器は他に述べた⁹⁾。

使用した蛙用 NaCl-リンゲル液ならびに4種の脱 Na-リンゲル液の組成 (水1ℓ当りのg数を示す) は次の通りである。

NaCl-リンゲル液: NaCl 6.50; KCl 0.14; CaCl₂ 0.12; NaHCO₃ 0.20

Sucrose-リンゲル液: Sucrose 76.13; KCl 0.14; CaCl₂ 0.12; KHCO₃ 0.24

CholineCl-リンゲル液: CholineCl 15.53; KCl 0.14; CaCl₂ 0.12; KHCO₃ 0.24

KCl-リンゲル液: KCl 8.37; CaCl₂ 0.12; KHCO₃ 0.24

LiCl-リンゲル液: LiCl 4.71; KCl 0.14; CaCl₂ 0.12; KHCO₃ 0.24

実験成績

(1) NaCl-リンゲル液における α -MSH と all-L の作用比較

Fig. 1. Comparison of dose-response curves of α -MSH and all-L.

- A: α -MSH (1.6×10^{-4} μ g/ml)
- B: α -MSH (1.6×10^{-4} μ g/ml) + washing
- C: all-L (99 μ g/ml)
- D: all-L (99 μ g/ml) + washing

Fig. 2. Comparison of time-response curves of α -MSH and all-L.

α -MSH と all-L の用量—反応曲線 (Fig. 1) の間に著差はなかった。all-L は 3.65×10^{-4} M (256 μ g/ml) の高濃度でも蛙皮膚の maximum response を起し得なかった。 α -MSH と all-L の 1/2 Max はそれぞれ 0.97×10^{-10} M (1.6×10^{-4} μ g/ml) と 1.4×10^{-4} M (99 μ g/ml) で以下の実験には全てこの用量を用いた。

Fig. 2 が示すように α -MSH と all-L による蛙皮膚の暗化速度と新鮮なリンゲル液の洗滌による暗色の消失速度との間に著明な差はみられなかった。

われわれはさきに α -MSH ならびに all-L の作用が D-histidyl-D-phenylalanyl-D-arginyl-D-tryptophylglycine (all-D) をはじめ all-L の他の2つの立体異性体によって抑制されることを報告した⁸⁾¹⁰⁾が、 α -MSH のN末端 tetrapeptide とC末端 heptapeptide について all-D と同様な作用があるかどうかを検討した。前者には Hofmann⁶⁾ のいう α -MSH の活性部位は全く含まれていない。

α -MSH 及び all-L の作用は heptapeptide (10 μ g/ml) によって完全に抑えられたが (Fig. 3), tetrapeptide は 40 μ g/ml の濃度でも両者の作用に何ら影響を示さなかった。

また melatonin¹¹⁾, 3, 5, 3'-triiodothyronine¹²⁾ の影響も調べたが、 α -MSH, all-L いずれの作用も抑えられ、両者の作用の間に著差はみられなかった。

以上のように NaCl-リンゲル液中での all-L と α -MSH の作用の間には力価の差以外何ら著差を認めることは出

- A : α -MSH ($1.6 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$)
 B : α -MSH ($1.6 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$) + heptapeptide
 C : all-L ($99 \mu\text{g/ml}$)
 D : all-L ($99 \mu\text{g/ml}$) + heptapeptide

Fig. 3. Effect of C-terminal heptapeptide of α -MSH on frog skin darkened with α -MSH or all-L.

- A : no treatment
 B : α -MSH ($1.6 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$) + melatonin
 C : all-L ($99 \mu\text{g/ml}$) + melatonin
 D : caffeine (1.0mg/ml) + melatonin

Fig. 4. The effect of melatonin on frog skin darkened with α -MSH, all-L or caffeine.

来なかった。しかし caffeine の作用は melatonin によってのみ抑えられた。

(2) 脱 Na-リンゲル液における α -MSH と all-L との作用比較

α -MSH は比較的高濃度 ($0.02 \mu\text{g/ml}$) を用いても sucrose-リンゲル液に浸漬した蛙皮膚に何ら作用を示さなかった (Fig. 6)。この濃度は NaCl-リンゲル液では蛙皮膚の maximum response を起すに充分な量である。

他の3種の脱 Na-リンゲル液を用いたときも、この用量では α -MSH の作用は全く認められなかった。

- A : no treatment
 B : α -MSH ($1.6 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$) + T_3
 C : all-L ($99 \mu\text{g/ml}$) + T_3
 D : caffeine (1.0mg/ml) + T_3

Fig. 5. The effect of 3, 5, 3'-triiodothyronine (T_3) on frog skin previously darkened with α -MSH, all-L or caffeine.

- A : no treatment
 B : α -MSH ($0.02 \mu\text{g/ml}$)
 C : alkali-treated all-L ($0.2 \mu\text{g/ml}$)
 D : L-His-D-Phe-D-Arg-L-Try-Gly ($10 \mu\text{g/ml}$)

Fig. 6. Darkening effect of alkali-treated all-L and L-His-D-Phe-D-Arg-L-Try-Gly (D-Phe) on frog skin in sucrose-Ringer solution.

一方 all-L ならびに L-histidyl-D-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophylglycine (D-Phe-penta) は sucrose-, cholineCl-, または KCl-リンゲル液のいずれにおいても, NaCl-リンゲル液の場合と同程度の暗色化作用を示した (Fig. 6, 7). LiCl-リンゲル液では all-L の作用は他の リンゲル液を用いたときよりも弱く現われた. しかし D-Phe-penta の $20\mu\text{g/ml}$ は LiCl-リンゲル液でも蛙メラノサイトに 著明な暗色化を起した (Fig. 8).

- A : no treatment
B : α -MSH ($0.02\mu\text{g/ml}$)
C : all-L ($99\mu\text{g/ml}$)
D : D-Phe-isomer ($0.8\mu\text{g/ml}$)

Fig. 7. The effect of all-L, its D-Phe-isomer and α -MSH on frog skin in cholineCl-or KCl-Ringer solution.

- A : no treatment
B : all-L ($99\mu\text{g/ml}$)
C : D-Phe-isomer ($0.8\mu\text{g/ml}$)
D : D-Phe-isomer ($20\mu\text{g/ml}$)

Fig. 8. Darkening effect of all-L and its D-Phe-isomer on frog skin in LiCl-Ringer solution.

- A : no treatment
B : α -MSH ($0.02\mu\text{g/ml}$)
C : alkali-treated all-L ($2.0\mu\text{g/ml}$)
D : L-His-D-Phe-D-Arg-L-Try-Gly ($10\mu\text{g/ml}$)

Fig. 9. Darkening effect of alkali-treated all-L and L-His-D-Phe-D-Arg-L-Try-Gly on frog skin in sucrose-Ringer solution.

Fig. 10. Darkening effect of α -MSH in sucrose-Ringer solution when applied in large doses.

Fig. 11. Darkening effect of α -MSH in choline Cl- Ringer solution when applied in large doses

て最も dramatic なものの一つである。蛙メラノサイトは脳下垂体ホルモン以外に caffeine, mersaryl, 水銀イオンなど数多くの物質によって暗色化することが知られているが¹³⁾¹⁴⁾、これらの物質の作用はMSH に比較して遙かに弱く、また作用機作の上での差異を示唆する成績が得られている。

Lerner ら¹²⁾は下垂体抽出物の作用は甲状腺ホルモンによって抑えられるが、caffeine の作用は抑えられないと報告している。我々も α -MSH, all-L の作用はいずれも all-L の3種の異性体によって抑制されるが、caffeine の作用は全く影響を受けないことを認め、MSH 様 peptide と caffeine の作用機作の相違を明らかにしている⁹⁾。今回の実験で T₃ に関する Lerner らの成績を確認すると共に α -MSH の作用が heptapeptide によって抑えられることを見出した。

一方 α -MSH の作用を抑えるが、all-L の作用には影響がないであろうという想定の下に、 α -MSH のN末端 tetrapeptide について調べたが、両者の作用は何ら影響を受けなかった。これには使用濃度が低いという可能性もあるが、これらのペプチドがメラノサイトに何らかの作用をもつためには、少なくとも all-L のアミノ酸配列の一部が分子内に存在しなければならないという事も考えられる。いずれにしても Na-リンゲル液を用いたとき α -MSH と all-L のメラノサイト暗色化作用の間に力価の相違以外に何ら差異を見出し得なかった。

Novalles ら¹⁵⁾は比較的高濃度を用いても脳下垂体ペプチドの暗色化作用は脱 Na-リンゲル液では認められないが、caffeine その他の物質の作用はリンゲル液中の Na イオンの有無によってあまり影響を受けないことを認め、MSH や ACTH の作用における Na-イオンの介在を指摘した。そして脳下垂体ペプチドとその他のメラノサイト暗色化物質の作用機作の相違を Na-イオン要求性の面から指摘した。

われわれも α -MSH について同様な結果を得た。すなわち Na-リンゲル液では蛙皮膚に最高の暗色化を起す量を用いても α -MSH は脱 Na-リンゲル液に浸漬した蛙皮膚に対して何ら作用をもたなかった。しかし all-L をはじめ、他の3つの pentapeptide は全てリンゲル液中の Na-イオンの有無に拘らず同程度の暗色化作用をもつことを認めた。LiCl-リンゲル液を用いたとき pentapeptide の作用は抑えられたが、暗色化作用は明瞭に認められた。

そこで α -MSH の濃度をさらに上げて脱 Na-リンゲル液中の作用をみた。 $0.7 \times 10^{-5}M$ という高濃度を用いると、 α -MSH もまた all-L の $1.4 \times 10^{-4}M$ と同程度の暗色化作用を示すことが明らかとなった。したがって α -MSH が蛙メラノサイトの暗色化を越すためには必ずしも Na-イオンの存在を必要とせず、脱 Na-リンゲル液ではその力価が 0.7×10^{-5} 分の1に低下するものと考えられる。しかし脱 Na-リンゲル液でみられる α -MSH や pentapeptide の暗色化作用が、Na-リンゲル液での作用と同一の機作によって起るかどうかは不明であり、

用いた他の2つの pentapeptide, L-histidyl-D-phenylalanyl-D-arginyl-L-tryptophylglycine とアルカリ処理 all-L, いずれも sucrose-リンゲル液で、Na-リンゲル液でみられると同程度の暗色化を示した (Fig. 9)。

そこで α -MSH の濃度をさらに上げて、sucrose-リンゲル液中での作用を検べた。

Fig. 10 に示したように $12 \mu g/ml$ ($0.7 \times 10^{-5}M$) という高濃度を用いると、 α -MSH は all-L の $1.4 \times 10^{-4}M$ と同程度の暗色化作用を現わすことを見出した。sucrose-リンゲル液の代りに cholineCl-リンゲル液を用いたときも同様な結果を得た (Fig. 11)。

総括及び考察

MSH の蛙メラノサイト暗色化作用は、極めて微量でしかも肉眼で容易に観察されるのでホルモン作用とし

またリンゲル液中の Na-イオンの有無によってみられる α -MSH と all-L の力価の比の変化が、そのまま α -MSH と all-L の作用の違いを示すとは考えられない。

ところで Hofmann ら⁹ は all-L の両端に α -MSH の分子と同じ順序でアミノ酸を加えていくに従い、その MSH 活性が段階的に上昇することを認めている。【また all-D の一定量によって完全に作用が抑えられる α -MSH と all-L のモル比はほぼその力価の比に反比例する¹⁰】ことから考えて、Na-リンゲル液での α -MSH と all-L の力価の差は作用機作の相違よりもむしろメラノサイトへの affinity の差によるものと考えられる。また4つの pentapeptide の活性比がリンゲル液中の Na-イオンの有無によって変化しないことは、Na-リンゲル液または脱 Na-リンゲル液いずれを用いたときも、pentapeptide の蛙メラノサイト暗色化作用の機序が同一であることを示すように思われる。したがって Na-イオンの有無による α -MSH の作用の変化を次のように説明することも出来る。

リンゲル液中の NaCl を他の溶質で置き換えると蛙メラノサイトの反応性に変化が起る。

これは Fig. 12 の実験で証明した。すなわち 30^m 間 sucrose-リンゲル液に浸漬した蛙皮膚に Na-リンゲル液中で α -MSH を作用させると α -MSH の作用は大きく低下した。

Group A served as control in NaCl-Ringer solution. Group B which also remained in NaCl-Ringer solution, was treated with α -MSH ($1.0 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$) at time 30. Groups C and D were transferred in sucrose-Ringer solution alone and in sucrose-Ringer solution + α -MSH ($1.0 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$) respectively. At time 30, groups C and D were returned in NaCl-Ringer solution containing α -MSH ($1.0 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$).

Fig. 12. The effect of α -MSH on frog skin previously immersed in sucrose Ringer solution.

さてこの変化は α -MSH の分子の -histidyl-phenylalanyl-arginyl-tryptophyl-glycyl-以外の部分と特異な反応を起し活性の上昇をもたらす部位に主に起る。したがって脱 Na-リンゲル液中では α -MSH の分子当りの活性は大きく低下し、all-L のそれに近づく。このとき α -MSH の活性が尚 all-L の約20倍であることは all-L よりも大きいペプチド例えば α -MSH の C末端 octapeptide の作用が Na-イオンの有無によって影響を受けないという可能性がある。Hofmann ら⁹ によれば octapeptide の活性は all-L の約 20 倍である。一方 pentapeptide が作用する部位またはメラノサイトの機能は殆んど変化を受けず、したがって Na-イオンの有無によって比活性は変わらないと考えられる。

メラノサイトの暗色化の機序が殆んど不明である今日、この説明は推察以上の何物でもないが、今回の実験で見出した α -MSH と all-L の作用の違いが、両者のアミノ酸配列の差異に起因することはいう迄もない。

したがって all-L から α -MSH に至る中間のフラグメント個々について、その作用に対する Na-イオンの影響を比較することによって α -MSH の作用機作についてより詳細な情報が得られると考える。

結 論

(1) α -MSH と L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycine (以下 all-L) の蛙メラノサイト暗色化作用を比較したところ、Na-リンゲル液中の作用に関し、力価の差以外に何ら差異を見出し得なかった。すなわち蛙メラノサイトに [half maximum response を起す量は] α -MSH $0.97 \times 10^{-10} \text{M}$, all-L $1.4 \times 10^{-8} \text{M}$ で、両者の用量—反応曲線、時間—反応曲線の間に著差は認められなかった。また両者の作用はいずれも melatonin ($1 \times 10^{-8} \mu\text{g/ml}$), 3, 5, 3'-triiodothyronine ($5 \mu\text{g/ml}$) または L-phenylalanyl-L-

arginyl-L-tryptophyl-L-glycyl-L-lysyl-L-prolyl-valineamide ($10\mu\text{g/ml}$) によって抑えられた。しかし acetyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionine は何ら作用を示さなかった。

(2) リンゲル液中の NaCl を等張の濃度の sucrose, cholineCl, KCl または LiCl で置き換えた脱 Na-リンゲル液中では α -MSH の作用は、比較的高濃度を用いても認められなかった。しかし作用が消失することではなく、sucrose-リンゲル液または cholineCl-リンゲル液を用いたときには、Na-リンゲル液の場合の約10万分の1に低下していることがわかった。

一方 all-L を始め L-histidyl-D-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophylglycine, L-histidyl-D-phenylalanyl-D-arginyl-L-tryptophylglycine ならびに alkali-treated all-L の作用はリンゲル液中の Na-イオンの有無によって左右されず、LiCl-リンゲルの場合を除いて他の3種の脱 Na-リンゲル液中で Na-リンゲル液中と同程度の暗色化作用を示した。

(この論文の一部は1965年9月の第23回国際生理科学連合会において発表した。)

稿を終えるに当たり MSH 関連ペプチドを合成・分与下さった京都大学薬学部、矢島治明博士、また天然の α -MSH を分与下さった Dr. Saul Lande (School of Medicine, Yale University, U. S. A.) に深く感謝する。

参 考 文 献

- 1) A. B. Lerner and T. H. Lee : J. Amer. Chem. Soc., **77**, 1066 (1955)
- 2) T. H. Lee and A. B. Lerner : J. Biol. Chem., **221**, 943 (1956)
- 3) J. I. Harris and P. Roos : Nature, **178**, 90 (1956)
- 4) J. I. Harris and A. B. Lerner : Nature, **179**, 1346 (1957)
- 5) J. I. Harris : Nature, **184**, 167 (1959)
- 6) K. Hofmann : Brookhaven Symp. Biol., **13**, 184 (1960)
- 7) K. Hano, M. Koida, H. Yajima, K. Kubo and T. Oshima : to be published.
- 8) M. Koida and K. Hano : to be published.
- 9) A. B. Lerner and M. R. Wright : Methods Biochem. Anal., **8**, 295 (1960)
- 10) K. Hano, M. Koida, K. Kubo and H. Yajima : Biochim. Biophys. Acta, **90**, 201 (1964)
- 11) A. B. Lerner and J. D. Case : Federation Proc., **19**, 590 (1960)
- 12) M. R. Wright and A. B. Lerner : Nature, **185**, 169 (1960)
- 13) 高橋善弥太 : 生体の科学, **9**, 2 (1958)
- 14) R. R. Novales : Am. Zoologist, **2**, 337 (1962)
- 15) R. R. Novales : Physiol. Zool., **32**, 15 (1959)