



ナトリウム利尿ペプチドファミリーの発見

—— 寒川賢治先生に聞く

ゲスト：寒川賢治先生(国立循環器病センター研究所長)

ホスト：吉村道博先生(東京慈恵会医科大学循環器内科)

心臓から分泌されるナトリウム利尿ペプチド(natriuretic peptide；NP)ファミリーは、心不全の診断と治療に大きな進歩をもたらしました。本日は、このNPファミリーの発見をはじめ、アドレノメデュリン、グレリンと、世界に先駆け新しいペプチドを発見し続けているペプチド研究のトップランナーである寒川賢治先生をゲストに迎え、NPファミリーの心不全への臨床応用のスペシャリストである吉村道博先生をホストに、その発見に関するさまざまなエピソードをおうかがいしました。



植物からペプチドへ——松尾先生との出会い

吉村 本日は世界のペプチド研究のトップランナーである寒川先生に、NPファミリーの発見を中心にお話をうかがいます。

先生は徳島のご出身だとお聞きしていますが、愛媛大学、大阪大学におられました。その当時のお話をお聞かせいただけますか。

寒川 私は、愛媛大学理学部で、天然物有機化学として植物の研究をしていました。例えばクスノキの葉やみかんの皮など、いわゆるエッセンシャルオイル(精油)です。その頃は天然物有機化学が非常に盛んで、自然植物の中から未知の物質を抽出して構造決定をして、合成するという研究をしていました。

私は偶然、大学の卒業論文にこのテーマを選択しまして、それが現在も有機化学に通じる研究をしていることと関連しています。現在はペプチドを探す

研究をしています。天然の中からある物質を抽出、構造決定をして合成するという部分では、通じる部分があります。

その後、愛媛大学大学院の修士課程では、私の恩師である山崎信行先生(生物化学)のもとで、ウシの成長ホルモンの特定部分のペプチド断面を分離してヒトにも有効な活性部位の構造を決める研究をしました。

吉村 最初はエッセンシャルオイルで、それがペプチドの研究につながっていく。素人的にみますと、ずいぶん違うように思えますが。

寒川 研究の中身はかなり違うのですが、その当時は、ペプチドの研究も現在とはかなり違って、ケミカルな手法で構造を決めたり、ペプチドを精製したりするところなど、非常に通じる部分があったのです。ただ、私が研究していた有機化学は水とはなじまないもので、ペプチドは水の中という大きな



写真1 松尾先生と出会ったところ

後列右から2人目が松尾先生、前列左端が寒川先生

違いはありましたが、技術的な面では非常に似ていましたね。

その当時、私は研究者になろうとはまったく思っていないませんでした。中学、高校とサッカーをやっていたので、大学に入ってもサッカーをやって、その後は高校の先生にでもなって、サッカー部の監督になって全国大会でも出ようかなというのが、その頃の私の夢でしたね(笑)。

その後、もう少し研究を続けてみようと思い、ちょうど山崎先生が大阪大学の蛋白質研究所でも兼任で研究をしていましたので、その関係で蛋白研の、有名な成田耕造先生の研究室にドクターコースの院生として行きました。そうしましたら、松尾壽之先生がそこにいたのです。松尾先生はちょうどアメリカで黄体形成ホルモン放出ホルモン(luteinizing hormone releasing hormone; LH-RH)の構造を決められて帰国した直後でしたが、当時の私はお会いするまで、先生のご活躍はあまり知りませんでした(写真1)。

研究所では、すぐにペプチドの研究を始めたわけではなく、松尾先生のやっていた蛋白質中のヒスチジンという、触媒部位として非常に重要な働きをするアミノ酸がありますが、その周辺の微細な環境を探るマイクロ環境解析を行っていました。

3年間その研究を進め、大学院の間に松尾先生が宮崎医科大学(現・宮崎大学医学部)の新設の講座に



写真2 宮崎医大研究室当時

赴任する予定になり、大学院卒業後はそちらに一緒に行って研究をしようかという話になりました。

吉村 宮崎医大に行かれたのが、1977年ですね。

寒川 そうです。ただ、大学院を卒業してから宮崎に行くまでの約2年間は、松尾先生が阪大医学部の薬理学の助教授をされていたので、そこにいました。宮崎に行ってから、新しい仕事をしようと松尾先生と話してしまして、その阪大の薬理学教室の、和田 博教授のところで宮崎で行うテーマとしてのペプチドの仕事を始めたわけです。これがその後の研究に非常に関連してくるわけですね(写真2)。

当時、群馬大学産婦人科の五十嵐先生と一緒に、ブタの脳からFSH(卵胞刺激ホルモン)を特異的に分泌刺激をする働きのホルモンがあるのではないかと、LH-RHと異なるFSHに特異的なホルモンを探す研究をしていたのです。

それがなかなかうまくいかなかったのですが、学生の薬理学の実習で使われた残りの動物や組織を利用して活性を測ってみたところ、ウサギの血圧を下げたり、モルモットの回腸を弛緩させる活性物質の存在がわかってきました。それが、私たちが脳内からいちばん最初に精製したペプチドである α ネオエンドルフィンです¹⁾。

その当時、その分野の研究が非常に盛んで、エンケファリンというペプチドが1975年、内因性のオピ

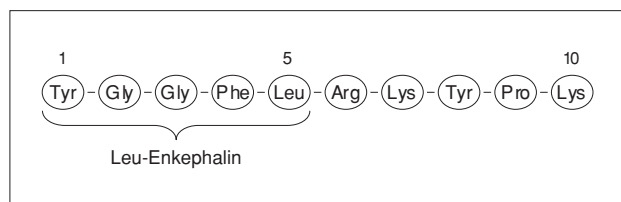


図1 αネオエンドルフィンの構造

モルモット回腸の弛緩活性を指標としてブタ視床下部35,000頭(約7 kg)より精製

オイドペプチドとして同定されました。それに関連するペプチドということがわかったわけです。

αネオエンドルフィンとその構造決定の苦労

吉村 αネオエンドルフィンへの思い入れもかなり大きいですね。

寒川 1978年に宮崎に行った後、αネオエンドルフィンはほぼ精製できていて構造決定も進めていました。ただその当時の微量ペプチドの構造決定というのは、今のようにシーケンサーで簡単に決まるものではなく、マニュアルのエドマン分解でアミノ酸を1つずつ外して、その後ダンシル化して同定する方法(エドマン・ダンシル法)ですが、この方法で非常に重要なものの構造を決めていきます。

ですから、αネオエンドルフィンはたかだか10個のアミノ酸からなるペプチドですが、それでもなかなか構造が決まりませんでした。その中に含まれている非常に微量に存在するほかのペプチドが邪魔をするのです。その当時は、部分構造はわかっても最終的な構造が決まらないということがあり、それがかなりのストレスでした。

そこで、ちょうどその当時、いろいろな化合物の分析に使い始められていた高速液体クロマトグラフィ(high performance liquid chromatography; HPLC)を応用して精製してはどうだろうかと考えまして、1年かけて、いろいろなテストを行って検討いたしました。そしてようやく1981年、最初に単離してから約3年を経て、HPLCを応用して最終的な構

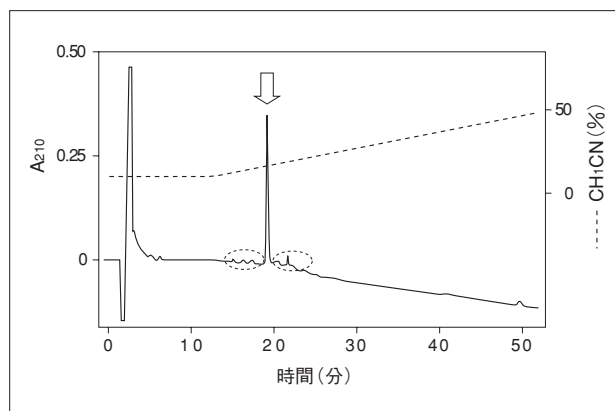


図2 αネオエンドルフィンの精製(逆相HPLCによる最終精製)

このHPLCにより少量の不純物を除去できた。

造を決めて論文にしました²⁾。

αネオエンドルフィンの最終的な構造決定には非常に苦労しましたが、それが今改めて考えますと、いろいろな面で、ペプチドの精製の基盤になる経験をしたことになりますね(図1, 2)。

シンプルかつ大胆な発想転換 —煮沸による抽出法の発見

吉村 こうした先生方のお仕事のいわば副産物として、精製の方法論が一気に確立しましたよね。

寒川 それには理由があります。微量の脳内ペプチドを精製するためには、数十万頭の動物の組織が必要なのです。1971年に松尾先生らがLH-RHをアメリカで単離・構造決定した時には、16万5,000頭のブタの視床下部を使ったそうです。αネオエンドルフィンの時は、ある程度技術も進歩したので、3万頭くらいのブタの視床下部を使って構造決定ができました。

吉村 ものすごい数ですね。

寒川 アメリカのような大きな国であれば、このような数を集めることが可能ですが、日本ではなかなか困難です。ですから、実験室レベルでできるような精製方法、あるいは構造決定というものを確立しな

生理活性ペプチドの精製法と構造決定法

Tissue
 ↓ Boil for 10 min in water
 ↓ Homogenization in 1M acetic acid
 ↓ Sep-Pak C18 cartridge
 ↓ SP-Sephadex C-25
 SP-I SP-II SP-III
 ↓ Sephadex G-50
 ↓ CM-ion exchange HPLC
 ↓ Reverse-phase HPLC
 Protein sequence
 Mass spectrometric analysis



図 3
煮沸による抽出法

い限り、新しいペプチドを探していくということは難しいと思いました。特に α ネオエンドルフィンの精製、構造決定の中でそのことを痛切に感じまして、さらに進展させるためには、私たち自身で技術的な開発をしなければならないことがわかりました。

その中で特に大きかったのは抽出の方法です。それまで動物の組織は採取してから使うまで、冷凍保存していました。それを抽出する時には解凍して、できるだけプロテアーゼの作用を防ぐために、1規定酢酸など酸性の溶媒で抽出していました。 α ネオエンドルフィンもそうでした。

ところが、解凍や抽出の過程で非常に多くの蛋白などがプロテアーゼで分解されて小さく断片化されたペプチドになります。逆に生体内に非常に微量しかない生理活性ペプチドは分解され、減ってしまうのです。ですから、本来、生体内に存在するペプチドから、抽出によって要らないものがたくさん増えて、必要なものは減ってしまうわけです。

それを解決するために、私たちが確立した方法が「煮沸」です。新しい組織をできるだけ早く沸騰している湯の中に入れて煮沸すると、一瞬にして組織中に存在しているいろいろな酵素、蛋白分解酵素が失活します。一方、ペプチドは熱に非常に強いので、そのままの状態が保たれます。蛋白の断片化を非常に減らすことが可能なので、活性物質はそのまま残るのです(図3)。

吉村 そのことを最初に聞いた時は驚きました。ある意味とてもシンプルな方法で発想の大転換をされ

たわけですね。煮沸することなんて思いもしないというか、そこは思考の柔軟性というか。

寒川 そのきっかけになったのは、当時、大学院生だった北村和雄先生(現宮崎大学教授)が、脳内の α ネオエンドルフィンの含量を測るために、組織を抽出してラジオイムノアッセイで測定している時、測定のたびにかなり値が異なり、安定しなかったことでした。その原因を検討すると、酸性抽出でも仕方によって、生理活性ペプチドの量はかなり違っていることがわかったのです。これが、抽出時にまず熱処理をすることを確立するためのきっかけになりましたね。

吉村 先生は若いころに誰も超えることのできなかった困難に直面されて、その解決を後回しにせずに、時間をかけてじっくりと研究されたことが、次の大きなステップになったのですね。

寒川 そうですね。1970年代の終わりから80年代の初めにかけて、ちょうど私が30過ぎの時でしたが、かなり時間をかけて自分たちが納得できる方法論を確立するということがなかったら、その後の生理活性ペプチドの探索研究はまだまだいろいろな問題を抱えたままだったのではないかと思います。

新しい医大のアクティビティと Guillemin博士の言葉

吉村 当時は宮崎に医科大学が新設されたということで、非常に優秀な人が全国から集まりました。ゼ

口からの出発にもかかわらず皆さんアクティビティが高く、現在ではものすごい数の教授が宮崎医大から出ていますね。その頃は、新しい時代をつくり出こうという雰囲気に満ちあふれていました。もちろん、現在もその意志は引きつがれていますが。

寒川 そうですね。特に研究室もできたばかりで、たくさんの大学院生が入ってきましたので、とにかく「何かをしよう」といった気持ちは非常にありました。私自身もまだ若く、彼らと年齢も比較的近かったものですから、マンツーマンでいろいろな面で指導をしたり、一緒に研究をやっていくことができたとは思っています。

吉村 そうですね。マンツーマンでしたから本当に目が届いていました。そして、私は思うのですが、組織がいい組織になる時は、やはりそれをリードする偉人がいますね。先生は宮崎に来られて大発見をされましたが、先生の恩師が松尾先生でその松尾先生を呼んだのは初代学長の勝木司馬之助先生だったと思います。すばらしい歴史ですね。

寒川 その当時、非常に思い出に残っているのが1978年のことです。LH-RHなどの研究でノーベル賞を取ったRoger Guillemin博士(写真3)、これは松尾先生と一緒に研究したAndrew Schally先生の競争相手ですが、彼がノーベル賞を取った翌年に東京に来日した時のことです。松尾先生が宮崎にいるということで、急きょ宮崎まで来てくれたのです。宮崎医大の講堂で講演をしていただき、その後、研究室の中でもいろいろディスカッションしました。

彼自身もその当時 β エンドルフィンの研究をしていて、私たちが新しいペプチドを精製して構造決定をしている最中で、彼と実験しながら、いろいろアッセイの仕方などについてもディスカッションしました。若い時にそういう経験があったということも、その後の私自身の非常に大きな経験になっています。

吉村 GuilleminとSchallyといえ、ノーベル賞の研究で、まさしく口もきかず、まさに決闘をやったと聞いています。

寒川 特にGuillemin先生は松尾先生を非常に高く評

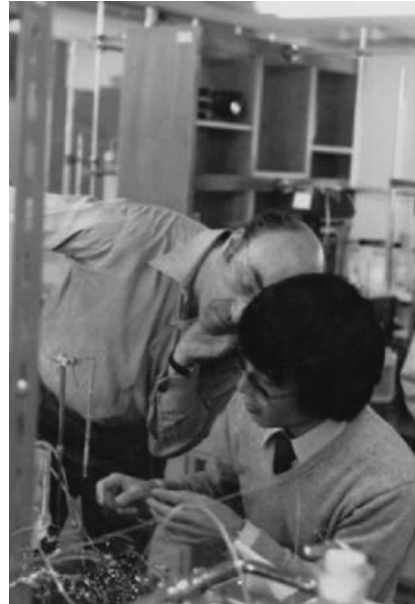


写真3 Roger Guillemin博士と寒川先生(1978年宮崎医科大学第2生化学研究室)

寒川先生は、当時30歳で α ネオエンドルフィンの構造解析を進めていた。R. Guillemin博士は視床下部ホルモンの発見により1977年度のノーベル賞を受賞されている。

価していました。彼いわくSchallyは大したことなく、松尾がSchallyのグループにいたから、われわれはLH-RHの競争で負けたのだと(笑)。

吉村 はっきりいわれますね。

寒川 そういうスタンスでしたから、その後も私と松尾先生は、サンディエゴのラ・ホイヤにいる彼を訪ねたりして交流がありました。

吉村 すばらしいですね。かつてのライバルも次の世代と一緒に育てていくということですね。すごくいい話を聞きました。Guillemin先生が宮崎に来られたことは知りませんでした。

寒川 その時にGuillemin先生に、若い研究者に贈る言葉、何かエンカレッジするような言葉をぜひ書いてほしいとお願いしました。すると彼は、人からエンカレッジされる、あるいはするようなのは研究者に必要なということです。必要なのは研究の中、あ

To the young people of the Matsuo laboratory:

I know that you do not need any encouragement. Good scientists find their encouragement in themselves, in contact with others, and above all, in their own research.

These two small bottles of Sake are thus as an encouragement but a small reward to be had and shared, the day you complete the primary structure of α -NEO-ENDORPHIN.

With my personal regards and anticipated congratulations
December 7, 1978 Roger Guillemin
in Miyazaki

To the young people of the Matsuo laboratory:

I know that you do not need any encouragement. Good scientists find their encouragement in themselves, in contact with others, and above all, in their own research.

These two small bottles of Sake are so encouragement but a small reward to be had and shared, the day you complete the primary structure of α -NEO-ENDORPHIN.

With my personal regards and anticipated congratulation.

December 7, 1978 Roger Guillemin
in Miyazaki

写真 4
Roger Guillemin博士の
言葉

るいは一緒にやっている仲間とのディスカッションの中で、研究自体にエンカレッジするようなものを自分自身で見つけることだと、そういう言葉が書かれています。その言葉は私自身今でも壁に貼っています(写真4)。

吉村 研究者はいろいろ人に教えられることもありますが、そこにたどり着いて、そのサイエンスが面白いと思った瞬間に、はじけますよね。そこに行くまでにちょっと時間がありますね。

寒川 そうですね。研究そのものが面白くなるにはある程度の時間がかかりますね。これはいつの時代でもですけど、面白いと思ってやる、何かをやっていてわからないから、さらにわかるように進める、そういう気持ちが出てきて、それを自分自身の中で消化して次につなげる、それが必要なのではないかと思います。

吉村 そうですね。本当に素晴らしいお話ですね。

寒川 ただ同時に、私も今の自分の年齢になると、若い人にいろいろ細かいことをいう必要はないけれども、やはり何かそういった一言が若い人に大きな影響も与えるということも重要なことだと思います。

脳から心臓へ～ANPの発見

吉村 次に、研究が心房性ナトリウム利尿ペプチド(atrial natriuretic peptide; ANP)の発見につながっていくあたりのお話をお聞かせいただけますか。

寒川 私自身はその後、1980年代の初めですが、 α ネオエンドルフィンに続いて、ブタの脊髄、あるいは脳から新しいペプチドの精製を続けました。その中でニューロメジンという一連のペプチドを脳内から抽出して構造決定をしました。ニューロンのメディエーターという意味で、私自身が名づけました。ニューロメジンA、ニューロメジンB、あるいはニューロメジンCと、それぞれ関連のあるペプチドの略語を使って名前をつけています。

その当時は私自身、非常に苦勞して、脳内から新しいペプチドを見つけてきました。ところがその時代は、脳自体の研究はあまり進んでおらず、新しいペプチドが見つかったも、自分で思っているほどには評価されないのです。現在では、グレリンやほかのペプチドでもいろいろな中枢性の作用が解析できるようになり、以前と比べると格段にその重要性が

変わってきています。しかし、当時は違いました。ですから、せっかくこれだけ苦勞して新しいペプチドを見つけてきたのに、この程度の評価しか得られないと思ってしまったのです。

吉村 ある意味、早過ぎたのですね。

寒川 そういう意識がありましたから、何かを見つけてくると、病気との関係や生理的な意味合いのあるペプチドはないだろうかと、いろいろ考えていました。そうしますと、ちょうどその頃、1983年の*Science*誌にアメリカのNeedleman教授のグループが、ラットの心臓、特に心房の抽出物を分析したところ、ウサギの大動脈を弛緩させる活性があり、ヒヨコの直腸でも弛緩する活性があるという論文³⁾を発表したのです。さらにそれは、同時に利尿活性と重なるということでした。

心臓に利尿ホルモンが存在するらしいということは、それ以前の、1970年代の終わりからカナダの細胞学者であるde Bold先生が研究を進めていました。つまり、心房の抽出物をラットに投与すると尿量が増えるということ、もう1つは、解剖学的にもラットの体液量と心房の筋細胞に存在する顆粒に関連していることから、何か新しい物質が存在しているといわれていたのです。

同時にその当時、私は循環系のことをあまり知らなかったのですが、いわゆるthird factor(第3因子)といったものの存在もいわれていたのですね。

私自身も*Science*の論文を読んで、何か面白そうな因子が心臓にあるらしいという認識を持って、それまで脳の組織ばかりを探していたけれども、末梢から新しい物質を精製して構造決定しても面白いではないかと、突如方向転換したわけです。

いろいろ論文を調べてみますと、心臓由来の利尿物質をすでに探しているグループは世界中に非常にたくさんありましたが、彼らはすべてラットの心臓を使っていました。

私たちは、最終的にはヒトの研究も必要と考えて、宮崎医大の病理学教室にお願ひし、病理解剖の時にヒトの心臓を研究材料として提供していただくこと

にして、ヒトの心臓からの抽出する方法で始めたのです。

吉村 当時の病理の河野 正先生ですね。

寒川 はい。毎回病理解剖の心臓の一部をいただくことになりました。循環器疾患に関連して亡くなった方の心臓は、標本として残しておく必要がありますのでもらえませんが、それ以外の原因で亡くなった方の心臓をいただけることになりました。

どういう方法で活性を測定するかですが、私たちはそれまで脳内ペプチドを探すための手法としてモルモットの回腸を使っていましたので、腸管を使ってのアッセイは非常に慣れていました。ですから、ヒヨコの直腸を使って活性が測れるのであれば、精製できるのではないかと考え、まずその測定法をつくりました。

そうしますと非常に簡単といったらい過ぎですが、最初の4、5例目くらいの心臓からの抽出物を測ると非常に強い活性が見られたのです。それを用いて精製を進めていきました。

この時のノートを見てみますと、最初の心臓をいただいたのが7月ですが、その月の終わり、あるいは翌月の8月頃にはANPは精製ができていました。ほぼ構造決定もできていました(写真5)。最終的な細かな構造はもう少しかかりましたが、私がそれまでやってきたペプチドの中では非常に簡単でしたね。なぜなら、私たちはそれまで脳内の非常に少ない量で抽出・精製していましたが、心臓のANPは非常に量が多かったのです。

もう1つ重要なことは、私たちはヒトの心臓で抽出したことが非常に有利に働きました。それは、その後いろいろとANPの構造を研究室で検討した結果、ラットの心臓の中では、ほとんどのANPは前駆体のγ-formといわれるアミノ酸が126個の状態で存在していて、matureな28個のペプチドは非常に少量なのです。ラットというよりも、おそらく健康な心臓の場合はヒトでも同様なのです。

その後、例えば交通事故や突然の事故で亡くなった人の心房を見ますと、心臓がまだ健康な方は前駆

19 of 3.68 mg

7/28 HAC(5) 39.578.

胆管腫 5 hr.

↓ 生食 2 weeks
 ↓ NaOH 197.85ml (x5)
 ↓ Boil 10 min
 ↓ 水洗
 ↓ homogenize 2 times 70ml NaOH Total 270ml (7 volumes)
 ↓ centrifuge 16000 rpm x 60 min
 ↓ sup. ↓ pat.
 ↓ freeze.
 1/2 ↓ centrifuge 16000 rpm x 60 min
 ↓ sup. ↓ pat.
 Total 液量 254.3ml → bioassay 用 0.29 g 1.25ml pipet unit.
 ↓ SEP-PAK H₂O: CH₃CO₂H: 10:1 TFA= 60:60:12
 ↓ elute
 ↓ dry up. boph (735.7) 148 (170)
 ↓ freeze.
 7/30 ↓ 100% 生食に dissolve - assay へ HAC(5)-I

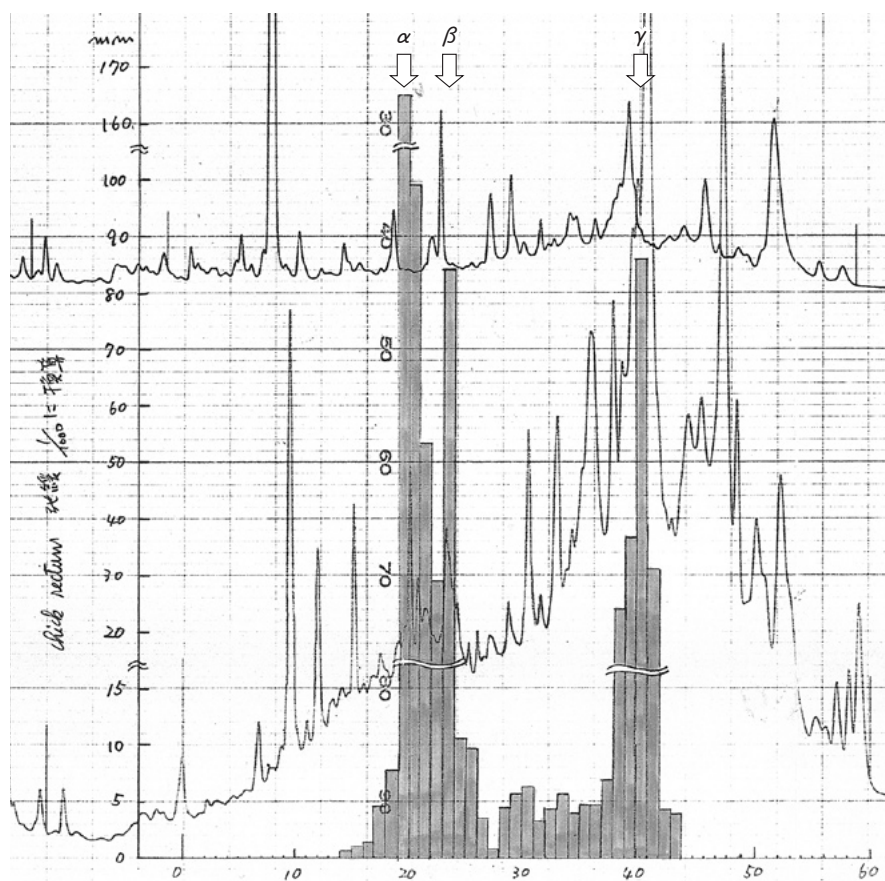


写真 5

最終的な構造決定に使用した
 ヒト心房[HA(5)]の抽出記録
 (1983年7月28日)(上)と
 HPLCによる分離と活性測定
 (下)

活性ピークの α , β , γ よりそれぞ
 れ α -hANP, β -hANP, γ -hANP
 を精製した。

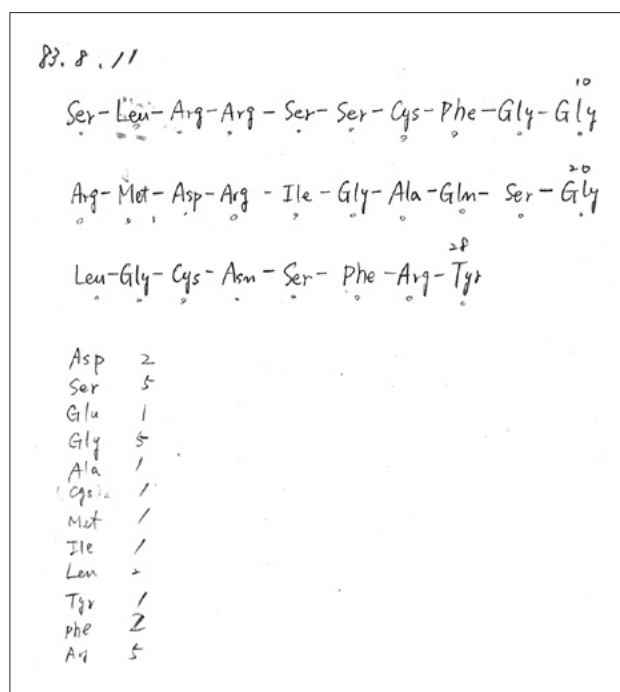


写真 6 α-hANPのアミノ酸配列を最終的に決定した時の記録(1983年 8 月11日)

体が多くてmatureが少ないことがわかりました。ところが私たちが研究用にいただいていた心臓は、入院後に亡くなった方で、心臓が心不全的な状態になっていますから、ANPのmatureなタイプ、また心房のgranuleが多い状態であったことが、結果的には非常に幸いしたのではないかと考えています。

ですから、私たち自身は非常に多量のANPのmatureなフォームを精製できて、構造決定も比較的簡単でした。ただ構造決定した後には、必ず合成して、その構造が正しいかどうかを確認する必要があります。それに少し時間がかかりました。その間に9月頃ですが、学生実習がありまして、研究を中断しました。

吉村 1983年の9月ですね。

寒川 はい。数週間の中断後、最終的に構造決定をして、論文に投稿したのが12月です。パブリッシュされたのが、1984年1月でした⁴⁾。

吉村 そうでしたね。

寒川 私たちはよく知らなかったのですが、私たちの論文が掲載された1つ前の12月号に、カナダのde

Bold先生らがラットの心臓から精製して構造を決めていたのです。彼らはANFと名前をつけていました。しかし、彼らの場合は合成して構造の再確認もしていませんし、28個の最後から2番目にあるアルギニン残基については不確定でした。

ですから、私たちは1号後の掲載になりましたが、完全に構造を決めたのは私たちのほうがおそらく早かったと思っています。

吉村 構造を完全に決定したのはもちろん寒川先生で、1月号の論文は歴史に残るものです。ANPは本当に一気に構造決定されたと思いますが。

寒川 ANPについては、私たちはその当時、そんなに重要なペプチドだと意識していなかったのではないかと思います。そうでなければ、もう少し早くという気があったと思います。ただ、ANPの構造決定が世界中で非常に競争になっていることはある程度は認識していました。しかし、役割について現在のような非常に重要な作用を持つものとは思いませんでした。私自身、循環器の研究をその当時やっていただけではありませんし、新しいペプチド、特に脳内のペプチドを探していました。それを末梢でも新しいのを探そうということで心臓から見つけてきた、そういう感覚でした。

吉村 当時、大きなインパクトでしたね。講堂で、松尾先生が特別講演をされたことを覚えています。心臓からホルモンが出るということで本当におどろきました。

寒川 私たちにとってANPの発見は非常に幸運だったのです。なぜかといいますと、その当時、心臓にANPにあたるものがあるのではないかとあって、循環器領域の人たちが世界中で研究していました。

ただ、微量なものを精製するという面では、視床下部の微量のホルモンを精製していた、例えばSchally先生とかGuillemin先生、彼らのような内分泌学者のほうが技術を持っていました。もし、彼らが心臓から新しい物質を探そうとしていれば、ANPもおそらく1970年代の中ごろには精製、構造決定をされていたのではないかと思います。

8/16. Bioassay 7 E.O. HA(5)-100-SEP-PAK → HPLC → dry up → 100µl ± 2					
8/10	8/11 × 0.625	8/12 × 2	10µl/1000に標準	mm	
13					
14					
15	20µl/1000 + 2		+ 3.5	0.77	
16	" " + 9		+ 4.5	0.77	
17	10µl/1000 + 6		+ 6	1.32	
18	" " + 21		+ 21	4.62	
19	2.5µl/1000 + 9		+ 36	2.22	
20	0.2µl/10000 + 15	0.2µl/10000 + 24 + 15	+ 750	165	
21	0.4µl/10000 + 18		+ 450	99	
22	0.5µl/10000 + 12		+ 240	52.8	
23	1µl/10000 + 13		+ 130	28.6	
24	0.5µl/10000 + 19		+ 380	83.6	
25	5µl/1000 + 24		+ 48	10.56	
26	" " + 22		+ 44	9.68	
27	" " + 8		+ 16	3.52	
28	10µl/1000 + 4		+ 4	0.88	
29	" " + 20	10µl/1000 + 11 + 22	+ 21	4.62	
30	" " + 10	" " + 13 + 26	+ 26	5.72	
31	" " + 12	" " + 14 + 28	+ 28	6.16	
32	" " + 7	" " + 7 + 14	+ 14	3.08	
33	" " + 9	" " + 10 + 20	+ 20	4.4	
34	" " + 8	" " + 13 + 26	+ 26	5.72	
35	" " + 4	" " + 9 + 18	+ 18	3.96	
36	" " + 14	" " + 11 + 22	+ 22	4.84	
37	5µl/10000 + 14 + 8.75 + 9	5µl/10000 + 7 + 14	+ 22	4.84	
38	2.5µl/10000 + 12 + 2.5 + 8		+ 32	7.04	
39	1µl/10000 + 17 + 10.5 + 11		+ 110	24.2	
40	" " + 27 + 16.5 + 17		+ 170	37.4	
41	2.5µl/10000 + 36 + 22.5 + 23	2.5µl/10000 + 8 + 16	+ 390	85.8	
42	1µl/10000 + 23 + 14.25 + 14		+ 140	20.8	
43		10µl/1000 + 10 + 20	+ 20	4.4	
44		" " + 9 + 18	+ 18	3.96	

写真 7
写真 5 の活性測定
のデータ(1983年 8 月
16日)

しかし、その当時の内分泌学者は、心臓は筋肉であり、筋肉がホルモンを分泌しているはずがないと思いこんでいました。ホルモンは脳、視床下部あるいは下垂体、末梢では睪腺、そういったいわゆる内分泌細胞しか分泌しないという固定観念を内分泌学者が持っていたおかげで、80年代の初めまで発見さ

れずに残っていたといっても過言ではないと思います。

吉村 なるほど。先生方は化学、内分泌、病理、循環器、それらをうまく具合に、結果的に全部取り入れていたのですね。

寒川 私たちは化学屋といえはいえるのですが、解

剖でも薬理でも病理でも、いわゆる循環器というところで固定された領域ではなかったのです、どの分野でもやってみようかということができたのではないかと思います。

吉村 枠にこだわらずということですね。どうして先人達はしなかったのかなと、実は漠然と思っていたのです。固定観念があったのですね。

脳から見つかったBNP

吉村 その後、脳性ナトリウム利尿ペプチド(brain natriuretic peptide ; BNP), C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の発見と続きますね。

寒川 はい。でも、ANPが見つかったから、その後、BNP, CNPがすぐ見つかったのではないかと、簡単に考える方もいるのです。

例えばエンドセリンが最初見つけて、エンドセリン1, 2, 3と見つかっているのですが、それとはBNP, CNPの発見の過程は完全に違います。私たちは心臓からANPを発見しました。それから、ある程度それに関係する領域、ANPの場合、matureなフォームである α -hANP, その二量体である β -hANP, それから前駆体の γ -hANP, これはペプチドとして全部構造を決めました。その後前駆体のcDNAのクローニングもすみました。

そして、脳内にもANPが少量存在していて脳内にも機能があるということから、ブタの組織を使って、ラジオイムノアッセイ法で脳内のANPを測定、あるいは精製、構造決定することを進めていました。脳の抽出物をゲル濾過して、ラジオイムノアッセイしますと、分子量が3,000くらいのところに、ANPの免疫活性と違った箇所に、ヒヨコの直腸を弛緩する活性、ANPと同じような活性が出たのです。

これはANPに由来する活性ではないということでもさらに進めました。私たちは、BNP, CNPがあると思って進めたわけではなく、脳内の新しいペプチドを探す研究の一環として進めていったのです。それでいろいろなクロマトで分けていって構造を決める

作業をしていました。

そして、最終的にBNPにあたるもの(その時点ではBNPとは思っていませんでしたが)が精製できました。ただ非常に微量だったため、いくつか構造が決まらない部分、アミノ酸の同定がはっきりしない部分がありました。

その研究を担当していたのが、当時第一製薬の関連会社であった第一化学薬品からペプチドの研究に来ていた須藤氏です。彼は3年間、私たちと一緒に研究をしていましたが、その段階で会社に戻らなければなくなり、一時、ペンディングになりました。

その後、私自身、構造をもう一度よく見直しまして、わかっていない構造をS-S結合のシステインに置き換えてみました。また、いくつかのアミノ酸を適当に不明なところにあてはめると、ANPに類似したペプチドではないかということがわかってきました。ANPとアミノ酸の配列はずいぶん違うのですが、リングの構造や残基種が同じなど共通する部分がいくつかあったのです。

そこで、ある程度見通しがついたところで、最初に精製にかかわった須藤氏にもう一度声をかけて、再び会社から派遣されてきた彼が精製を進めたのです。

最初のBNPを精製した時にブタの脳は、200~300頭分、約20kgのブタの脳を使っていました。それではおそらく足りないというので、その倍の500頭分くらい、約40kgを集めました。

その結果、前回よりも多くのBNPを精製することができて、1987年に完全な構造を決めることができました。最終的に論文に発表したのは翌1988年です⁵⁾。その頃、ほかにも心臓からANPと違う、BNPにあたるものを研究しているグループがありました。彼らも精製して、構造決定したのですが、結果的にその構造がC末端の部分が間違っていました。学会ではそういうものがあるのではないかといられていました。

それと同時にBNPを精製している時に、やはりクロマトで分けて見るとBNPとまた違う部分に別の活性がありました。それはBNPよりさらに量が少なかっ

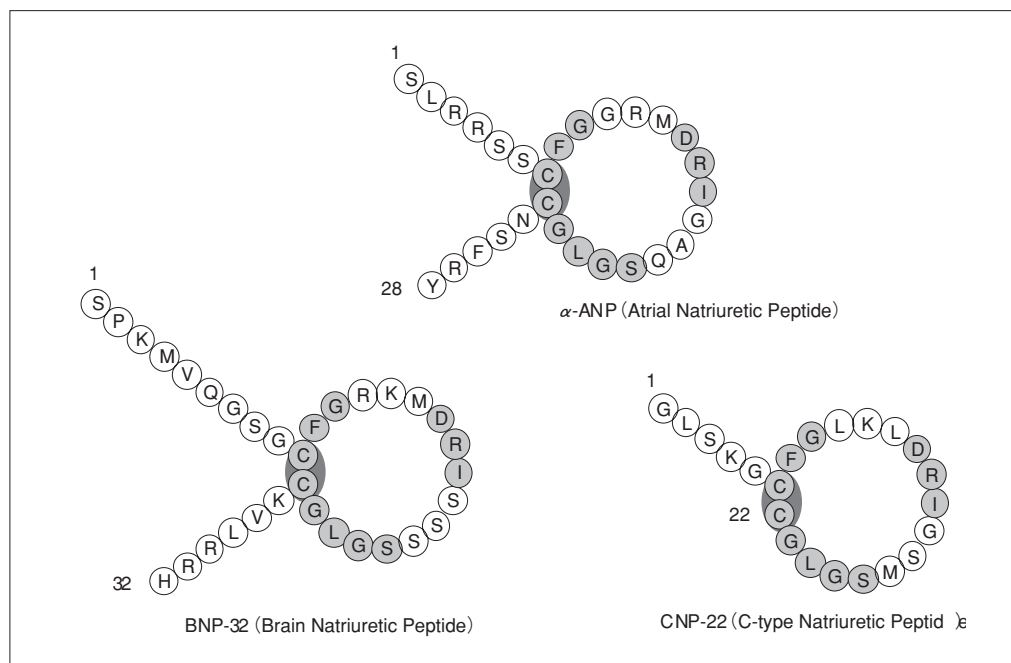


図 4
ヒトNPファミリーの構造
環状構造部で3種類共通の
配列をグレーで示している。

たということもありまして、それも構造を決めるのに苦労しましたが、それがANP、BNPの兄弟にあたるCNPです。

CNPについては2年後の1990年に発表しました。BNPの場合、いろいろな競争が激しかったので、構造を決めてからすぐに発表しました。CNPについては、その存在を考えている人がいませんでしたので、競争相手もおらず、十分研究してから発表しようと思ひまして、BNPとほぼ同じ時期に構造は決めたのですが、2年後に発表したのです⁶⁾。

ただCNPがANP、BNPと大きく違うのはリング構造からC末端に延びる配列です。ANPでは5残基、BNPは6残基ありますが、それが全くありません。それで構造を決めた時に、本当に正しいのかどうか、確認する必要がありました。最終的には私たちが精製したものを、苦労して開発した微量のものが分析できるアミノ酸分析計を使いまして、C末端の欠落した構造であるということが確信できて、合成もしてから発表しました(図4)。

吉村 BNPはそうやって見つかったのですね。その経過は初めて聞きました。

寒川 多くの研究者は、ANPがあったので、おそらく心臓からBNPの抽出を考えていたのではないかと思います。しかし、心房でのBNPの含量は、ANPの100分の1程度しか存在していません。活性を測っても大量に存在するANPの活性が邪魔してしまうのです。

私たちは、心臓にBNPが存在するとは考えていませんでしたので、脳内ペプチド研究の一環としてBNP、CNPが見つかりました。名前も脳から見つかったのでbrain natriuretic peptideです。CNPにつきましてはA、Bに続く3番目ということで単純にC-typeといういい方になっています。

吉村 ジスルフィド結合を思われたのは先生方からすると当然の流れなのですね。

寒川 最初、須藤氏が部分構造を決めて持ってきたのをひと目見たのでは、本当にANPの兄弟と思えるような構造とは思いません。

吉村 思いませんよね。全然違いますからね。

寒川 かなり違います。ANPの構造を決定した時に、ヒトのANPの情報を用いてほかの動物のANPはわりあいに簡単にクローニングでできたのですが、BNP

の場合は、ANPとも異なると同時に、種族間でもアミノ酸の配列がかなり違うのです。

吉村　そうですね。種族間でかなり違いますね。

寒川　ですから、私たちはブタから構造決定した後、ヒトのBNPのクローニングを始めたのですが、これはヒトの脳からヒトのBNPを抽出するというわけにいきませんので、いわゆるmolecular biologyを使ってクローニングをしたのですが、なかなかできませんでした。

吉村 私は今までそのような経緯を知りませんでした。が、今、事実をうかがって驚きました。すばらしいお仕事ですね。

寒川　そうですね。しかし、たしかにANP, BNPにつきましては、私たちが化学的に構造を示しました。ですが、その後、BNPが循環器疾患と関連が非常に深いということで、京大の中尾一和先生や、当時熊本大学にいた斎藤能彦先生が吉村先生のところに行って、ヒトの血液の検体を集めて疾患との関連づけ、マーカーを確立されました。

このように、私たちが新しいペプチドを精製、構造決定しても、それなりの満足感がありますが、それがどう評価されるかは、やはりその後の臨床的な関連がどれほどあるかということで評価が決まってきます。ですから、重要なペプチドを見つけた時に、よく感想を聞かれることがあります、その時はそれほど大きなことをやったと思うことはあまりありませんね。

吉村 なるほど。後で評価されてくるということですね。

寒川 非常に苦勞して決定した物質が大きな価値があるというのではなく、ペプチドの性質や、どういう役割をしているかということのほうが大きいですね。ですから、ANPとBNPの構造決定では、組織含量も非常に少ないBNPのほうが数百倍苦勞して構造決定したということになります。

しかし、それもBNPが本当に脳内のペプチドだとあまり意味がなかったのですが、心臓疾患との関連で非常に重要だということがわかってきて、それで大

きな意味合いを持ってきたのではないかと思います。

吉村 先生の発見からあっという間に臨床応用されて、心不全の診断と治療が劇的に変わりましたね。

寒川 ANPを1983年に私たちが発見して、84年に発表した後、特にANPについても京大の中尾先生らが臨床応用ということで、ヒトでの治療効果の研究をされました。BNPについても構造が決まるとすぐにペプチドに対する抗体をつくって、それを測る方法を開発して、臨床的な意味合いを見いだしたというように、日本の中でそういった基礎研究と臨床研究が非常に近いところで進められたということが大きかったと思います(写真8)。

吉村 中尾先生をはじめ京都大学の多くの先生方、そして熊本大学の泰江先生も含め、驚くほどの速さで一氣に臨床研究が進んで、これは間違いなく日本が誇るトランスレーショナルリサーチの大成功例ですね。

寒川 本当にそのとおりだと思います。

アドレノメデュリンの発見とそのエピソード

吉村 NPグループの発見の後、アドレノメデュリン、グレリンと続きますね。

寒川 アドレノメデュリンにつきましては、北村和雄先生がアメリカ留学から帰ってきて、何か新しいペプチドを探そうということで始めていました。

そのきっかけは血小板です。血液の凝固に深く関連するようなペプチドはないだろうか、血小板を使つてのアッセイをキーにしようという1つの提案だったのです。血小板はいろいろなペプチドで刺激すると、cAMPが変化しますので、それをモニターしようと決めました。これにつきましてもアッセイの時間、血小板の懸濁液にペプチドを加えてincubationして、出てきたcAMPをラジオイムノアッセイで測るのですが、最初は10分ほどincubationして測定しました。ところがいろいろな抽出物を検討しても、あるいはクロマトした結果を見ても、アッセイの安定性がありません。



写真 8
1988年，国際内分泌学会
(京都)にて

これは後でわかったことですが，血小板の刺激は，非常に短時間，数十秒でcAMPが産生されるのです。いろいろ検討して，incubationを30秒と非常に短い時間にするアッセイ法を確立して，新しいペプチドを探すことになりました。

偶然，第一内科に褐色細胞腫の患者さんが入院して，手術で摘出した褐色細胞腫の組織を測って見たところ，いろいろなペプチドを含んでいて，非常に強い活性があったのです。

アドレノメデュリンの精製・構造決定についてもいろいろ苦勞し，2～3年かかりましたが，最終的に52残基の全構造を決めることができました。

これもやはり，その後の研究で，アドレノメデュリンは血管の内皮細胞や平滑筋，そのほかにもいろいろな細胞がつくっているということがわかり，循環器領域に非常に関連してきたのです。93年に発表して⁷⁾，もう15年以上経ちましたが，今でもいろいろな生理的な意味合い，重要性が明らかになってきています。今後もアドレノメデュリンの研究はまだまだ進んでいくのではないかと思います。

吉村 そうですね。

寒川 アドレノメデュリンは最初，*Nature*に投稿したのです。私たちはその論文の中にすでにcDNAをク

ローニングしており，前駆体の構造も決めていると書きました。ペプチドの研究は，まずペプチドを決定して，それから前駆体の構造が決まると，またその研究が広がっていくのです。ただ，私たち自身はペプチドとしての意義づけをある程度きちとした形で発表してから，次に前駆体という考えでした。

しかし，*Nature*のほうから前駆体の構造も一緒に論文に載せないと採択しないといってきましたが，新しいペプチドについての論文発表でやり取りを長くしていると情報が漏れるおそれがあり，前駆体をペプチドと一緒に発表すると，ペプチドの意義づけが軽くなると思いましたので，*Nature*をやめて，*Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)*に変更して発表しました。

吉村 論文発表の裏に，そのような経緯があったのですね。

新しいペプチド発見への挑戦と 若い研究者への支援

吉村 先生はその後，グレリンも発見され⁸⁾，世界的な業績を残されています。グレリンにつきましてはまた別の機会といたしまして，現在のことを少しお

うかがいます。国立循環器病センター、その後、京都大学でもご活躍されていますが、現在はあるような方向を目指されているのですか。

寒川 私自身はアドレノメデュリンの後、循環器病センターに移りまして、児島将康先生を中心にグレリンを見つけました。現在も、方向としては、新しいペプチドを見つけていくことが基本です(写真9)。

ただ一方で、最近はトランスレーショナルリサーチの推進が強く望まれていますので、循環器領域におけるアドレノメデュリン、摂食あるいはエネルギー代謝におけるグレリンを、循環器病センターや京大の探索医療センター、あるいはほかのグループとも協力して、できるだけこれらの臨床応用、1つでも新しい治療法に結びつけたいと思っています。

私自身はあと何年ペプチドの研究ができるかわかりませんが、1つでも新しいペプチドを見つけて世に送り出すことができたいと思っています。若い人にも続いてほしいとは思いますが、新しい物質(ペプチド)を探すという研究は、必ず発見できる保証があるわけではありません。ですから、若い人にこちらからやれといってできる仕事ではないのです。

しかし、それでも誰かそういったチャレンジする若い人がいれば、それをサポートして、できるだけ新しい物質に結びつくような研究が今後も進展できればと思っています。

吉村 先ほどおっしゃいましたが、研究は自分から見つけよう、内から湧くエネルギーが必要ですね。はたからいってもだめですものね。そうしたことも含め、最後に若い研究者へ何かお言葉をいただけますか。

寒川 私たちが新しい物質にチャレンジを始めた時代と現在では環境も状況も非常に違います。いろいろな分析機器あるいは技術がずいぶん進歩しているので、非常に微量なものでも構造を決めることができます。

一方で、かなりのペプチドがすでに明らかになっているので、新しいものを発見できる確率が低いともいえます。



写真9 グレリン発見に導いたチーム(2000年6月カナダ・トロントにて)(撮影・中尾一和先生)
左から児島先生、寒川先生、細田先生

そういう中で、自分自身で何かを探索したい、あるいは見つけたいという気持ちがあって、自分なりの方向性でやる姿勢を持つことが、その後の研究にも大きな影響があるのではないかと思います。こうやればこういう結果が出るという研究が最近はけっこう多いですし、それであれば自分でなくても誰がやっても同じだろうと。

そういうといい過ぎかもしれませんが、私は、保証はないけれども自分自身で見つけていくものにチャレンジするような研究者が今後も出てくることを祈っています。

吉村 オリジナリティを出すということですね。敷かれた線路に乗るのではなくて、新しいものにチャレンジしようという気持ちですね。

寒川 それगतとえうまういかなくても、チャレンジしたというプロセスは本人に残ります。

吉村 私もそう思います。先生は最近立て続けに成功されていますが、やはり若い時経験した苦労がずっと生きていますね。

寒川 若い時に苦労といいますか、あまり苦労だったとは思っていません。

吉村 苦労というより、常にサイエンスを楽しんでおられたのでしょうかね。

寒川 そうですね。非常に楽天的ですから(笑)。

吉村 それは大事ですね。私もそうですが(笑)。

寒川 何かをやっていれば、どうにか何かに結びつ



くだらうという姿勢は持っています。ただうまくいかなくても、そこから何かを学び取るということは常に心がけています。それをまた次に生かすということがどの分野の研究でも非常に重要だと思いますね。

吉村 そうですね。くじけないというかやっぱり明るさですね。

今日は長時間にわたって貴重なお話をお聞かせいただきまして。読者には非常に益するところが多いと思います。どうもありがとうございました。

文 献

- 1) Kangawa K, Matsuo H : α -Neo-endorphin : a "big" Leu-enkephalin with potent opiate activity from porcine hypothalami. *Biochem Biophys Res Commun* ; **86** : 153-160
- 2) Kangawa K, Minamino N, Chino N, et al : The complete amino acid sequence of α -neo-endorphin. *Biochem Biophys Res Commun* 1981 ; **99** : 871-878
- 3) Currie MG, Geller DM, Cole BR, et al : Bioactive cardiac substances : potent vasorelaxant activity in mammalian atria. *Science* 1983 ; **221** : 71-73
- 4) Kangawa K, Matsuo H : Purification and complete amino acid sequence of α -human atrial natriuretic polypeptide (α -hANP). *Biochem Biophys Res Commun* 1984 ; **118** : 131-139
- 5) Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H : A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988 ; **332** : 78-81
- 6) Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H : C-type natriuretic peptide (CNP) : a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 ; **168** : 863-870
- 7) Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al : Adrenomedullin : a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 ; **192** : 553-560
- 8) Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al : Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999 ; **402** : 656-660