

## 論文の内容の要旨

論文題目 電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルモジュレーターによる修飾機構の解明

氏名 山口 真司

### 【背景】

電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルは筋・神経細胞など興奮性細胞に存在し、興奮収縮連関を始め生体内において重要な役割を担っている。この電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルは少なくとも4つのサブユニット、つまり、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2/\delta$ 及び $\beta$ サブユニットから構成されており、 $\alpha_1$ サブユニットがイオンの透過路である孔（ポア）を形成している (Fig. 1)。この  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルは電位に依存して開閉状態を遷移するが、その開閉の分子メカニズム（ゲーティング）は未解明である。抗高血圧薬等として临床上頻用される  $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗薬（アンタゴニスト）はこの  $\alpha_1$ サブユニットに結合し、そのゲーティングを修飾して不活性化状態へ遷移させることで作用を発現する。修飾メカニズムの解明は、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルのゲーティング制御機構の解明につながる。私は以前、新規 DHP 作用部位として Ser<sup>1115</sup> を同定した。Ser<sup>1115</sup> はこれまでに決定された結合・作用部位とは異なる、ポア部位という特徴的な領域に位置していた。そこで本研究では、この Ser<sup>1115</sup> の位置するリンカー部分に焦点をあて、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルモジュレーターによる  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル機能修飾における役割を明らかにすることを目的とした。

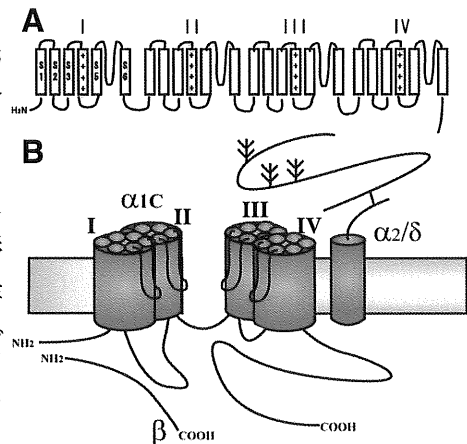


Fig. 1 (A, B) Schematic drawing of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_1$  subunits.

【方法・結果】

1. DHP 系薬物による Ca<sup>2+</sup>チャネルの修飾作用

DHP にはアンタゴニストの他に、電流増強作用を示すアゴニストも存在する。そこで、Ser<sup>1115</sup> を欠く変異 Ca<sup>2+</sup>チャネル S1115A が Ca<sup>2+</sup>チャネルアゴニストの作用も減弱しているかどうかをまず確認した。野生型 Ca<sup>2+</sup>チャネル (rbCII) 及びその点変異 Ca<sup>2+</sup>チャネルをβ<sub>1a</sub> 及びα<sub>2</sub>/δサブユニットを安定発現している BHK6 細胞に一過性に発現させ、whole-cell patch clamp 法で解析した。S1115A は DHP アゴニスト、S(-)-Bay k 8644 及び非 DHP アゴニスト、FPL-64176 の増強作用がほとんどみられなかった (Fig. 2)。Ca<sup>2+</sup>アゴニストは Ca<sup>2+</sup>チャネルの平均開口時間を延長し、開口確率を増加させることで電流増強作用を示す。そこで、Ca<sup>2+</sup>アゴニストによる Ca<sup>2+</sup>チャネルのゲーティングの修飾に Ser<sup>1115</sup> がどのような役割を担っているのかを明らかにする目的で、S1115A におけるアゴニスト作用の欠如を single channel 解析法で解析した。rbCII は Ca<sup>2+</sup>アゴニストにより開口確率、平均開口時間共に大きく増強されたが、S1115A はほとんど増強されなかった (Fig. 3)。

Ser<sup>1115</sup> のわずか 3 残基下流には Ca<sup>2+</sup>選択性フィルターである Glu<sup>1118</sup> が存在する。Ca<sup>2+</sup>アゴニストによる開口状態の安定化を考えた場合、イオン透過路のごく近傍を修飾することは合理的である。そこでこの Ser<sup>1115</sup> 周辺の領域に Ca<sup>2+</sup>アゴニストとの結合の際 Ser<sup>1115</sup> 以外にも協調的に働くアミノ酸残基があると考え、アラニン置換スキャンニングを行った。Ser<sup>1115</sup> よりさらに 3 残基上流に位置する Phe<sup>1112</sup> を Ala に置換した F1112A は、verapamil、diltiazem の Ca<sup>2+</sup>チャネル電流抑制作用が rbCII と変わらなかったが、nitrendipine の作用が有意に減弱しており、さらに Ca<sup>2+</sup>アゴニストの作用がほとんど見られなかった (Fig. 2)。つまり、Phe<sup>1112</sup> もまた、Ser<sup>1115</sup> と同様に DHP 類、特に Ca<sup>2+</sup>アゴニストの作用発現に重要な役割を果たしている事を見出し

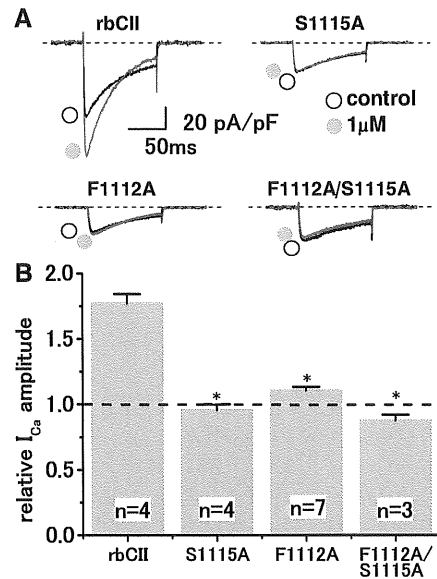


Fig. 2 (A, B) Insensitiveness of Ca<sup>2+</sup> channel currents through F1112A, S1115A, and F1112A/S1115A to S(-)-Bay k 8644.

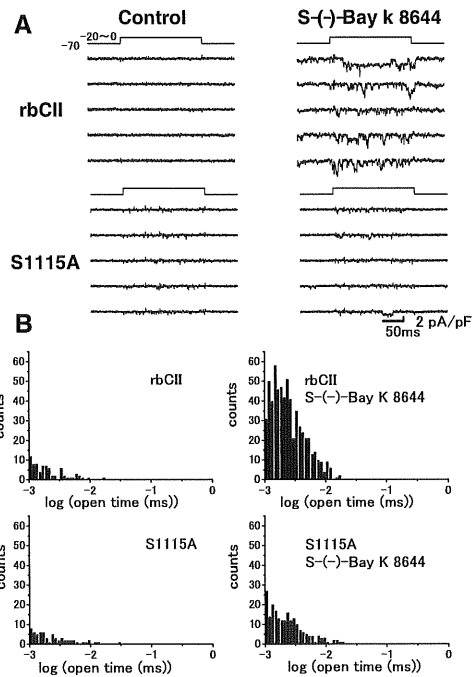


Fig. 3 Insensitiveness of unitary Ca<sup>2+</sup> channel currents through S1115A to S(-)-Bay k 8644. A. Schematic single channel traces. B. Mean open time distribution.

た。

Table. 1 Effects of alanine mutations on the binding of [<sup>3</sup>H] PN200-110.

	K <sub>d</sub> (nM)	Fold increase vs. rbCII	B <sub>max</sub> (fmol/mg protein)	n
rbCII	0.14 ± 0.017		488 ± 55.5	6
F1112A	0.84 ± 0.203	6	288 ± 37.3	4
S1115A	23.5 ± 7.28	165	562 ± 134	4

薬物の作用発現において、結合することが見かけ上の作用と一致するとは限らない。そこで、DHP作用部位と同一した Phe<sup>1112</sup> 及び Ser<sup>1115</sup> が結合部位かどうか判断するために、DHP アンタゴニスト、 [<sup>3</sup>H] PN200-110 を用いた結合実験を行った。rbCII との K<sub>d</sub> 値の比較から、F1112A, S1115A はそれぞれ 6 倍、165 倍の結合親和性の低下を示した (Table. 1)。一方で、nitrendipine の濃度作用曲線における IC<sub>50</sub> 値の比較から、F1112A, S1115A における作用の強度低下は約 5 倍、39 倍であり (Fig. 4)、これらの変異 Ca<sup>2+</sup> チャンネルにおける DHP アンタゴニストの作用の減弱は、結合親和性の低下を反映したものであった。

DHP アゴニストにおいても DHP アンタゴニスト同様に結合親和性が低下していることが予想されるが、Ca<sup>2+</sup> 電流増強作用がほとんどなかったことから、結合親和性の低下のみでは説明できない可能性がある。そこで、二重変異 Ca<sup>2+</sup> チャンネル (F1112A/S1115A) を作製し、Ca<sup>2+</sup> アゴニストの作用を検討した。もし F1112A 及び S1115A では単純に Ca<sup>2+</sup> アゴニ

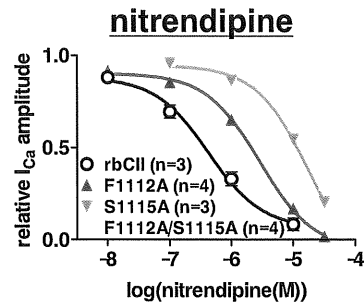


Fig. 4 Concentration response curve for nitrendipine.

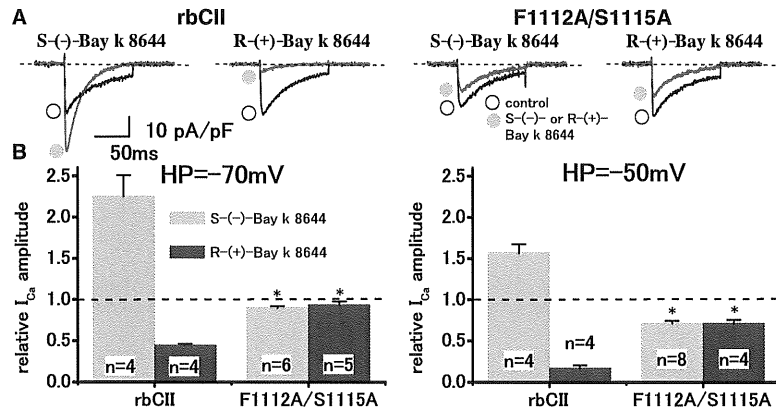


Fig. 5 A. Typical current traces elicited by test pulses from holding potential of -50mV. B. Ca<sup>2+</sup> channel currents through FS-AA were not enhanced but inhibited by Ca<sup>2+</sup> agonist as a Ca<sup>2+</sup> antagonist. \*p<0.05 vs. rbCII.

ストの親和性が低下しただけと仮定すると、F1112A/S1115A において、Ca<sup>2+</sup> アゴニストはごく弱い増強作用を示すか、まったく作用がないはずである。F1112A/S1115A において、予想に反し、S(-)-Bay k 8644 及び FPL-64176 により DHP アンタゴニストと同様の Ca<sup>2+</sup> チャンネル電流遮断作用が見られた (Fig. 2)。single channel レベルでも Ca<sup>2+</sup> アゴニストの Ca<sup>2+</sup> チャンネル電流増強作用は完全に消失していたため、開口状態の安定化が全く発現出来ていない、といえる。また、同一の構造式を持ち、立体異性体の関係にあるアゴニスト (S(-)-Bay k 8644) ・アンタゴニスト (R(+)-Bay k 8644) の作用を比較すると、F1112A/S1115A において両者は共に同程度の Ca<sup>2+</sup> 電流遮断作用を示した (Fig. 5)。つまり、

F1112A/S1115A はアゴニスト・アンタゴニストの区別がつかなくなったといえる。また、DHP アゴニストによりアンタゴニスト様作用がみられていることから、DHP アゴニストの結合親和性は、DHP アンタゴニストと同程度保持されていることが予想された。以上の結果から、両アミノ酸は DHP 類の結合親和性を定める部位であると同時に、Ca<sup>2+</sup>アゴニストによる電流増強作用に必須の部位であると結論付けた。

## 2. Ca<sup>2+</sup>チャネルアゴニストの作用点に関する検討

Ca<sup>2+</sup>アゴニストは、Ca<sup>2+</sup>チャネル電流の電流電圧曲線を負電荷側へシフトさせることから、Ca<sup>2+</sup>チャネルの電位感受性を変化させている可能性がある。Ca<sup>2+</sup>チャネルにおける電位の感知は、電位センサーである S4 が担う。そこで、S4 の動きに由来する gating charge に対する Ca<sup>2+</sup>アゴニストの作用を測定することで、Ca<sup>2+</sup>アゴニストが S4 の動きを修飾しているか、ひいては Ca<sup>2+</sup>チャネルの電位感受性を変化させているかどうかを検討した。Ca<sup>2+</sup>チャネルの開口ステップに関わる gating charge の on 成分は、FPL-64176 の有無で全く変化がなく、大きさ、減衰速度ともに完全に一致した。即ち、Ca<sup>2+</sup>アゴニストは Ca<sup>2+</sup>チャネルの電位感受性を変化させないことが示された。

また、受容体結合実験の報告で、選択性フィルターへの Ca<sup>2+</sup>の結合が DHP の結合に必要な可能性が示唆されてきた。そこで、選択性フィルターが Ca<sup>2+</sup>アゴニストの作用点かどうかを、透過イオンを変化させることで間接的に検討した。透過イオンを Ba<sup>2+</sup>及び Na<sup>+</sup>にした場合でも、rbCII は FPL-64176 によって大きく同程度に増強され、S1115A は全く増強されなかった。よって、Ca<sup>2+</sup>アゴニストの作用は透過イオンには依存せず、また、変異による親和性の変化も透過イオンには依存しなかった。

以上のことから、Ca<sup>2+</sup>アゴニストは電位センサーや選択性フィルターに対する作用はなく、あくまで開口確率増強・時間延長作用によって Ca<sup>2+</sup>電流増強作用を奏功すると結論づけた。

## 3. DHP 結合モデルに向けて

Ca<sup>2+</sup>アゴニストの作用発現に対し、Phe<sup>1112</sup>及びSer<sup>1115</sup>の何が重要かを明らかにするため、Ser<sup>1115</sup>を Asp、Thr、Val に、Phe<sup>1112</sup>を Tyr に置換して Ca<sup>2+</sup>アゴニストの作用を検討した。Ser 同様、水酸基を持つ S1115T のみわずかではあるが有意に S(-)-Bay k 8644 による増強作用が見られた (Fig. 6)。つまり Ser<sup>1115</sup>のなかでも、極性や物理的な大きさではなく水酸基が、Ca<sup>2+</sup>チャネルアゴニストの作用発現に必須である事が明らかになった。一方

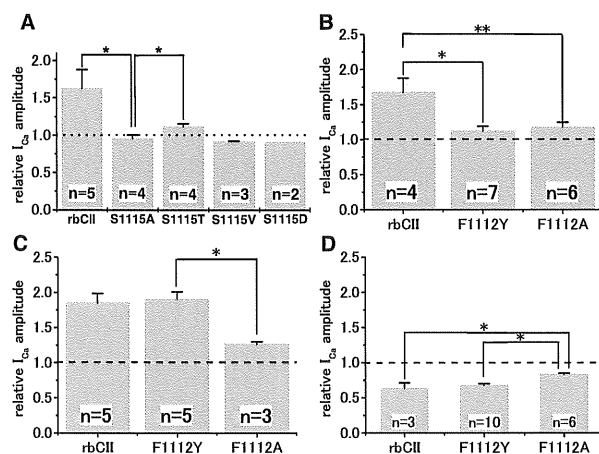
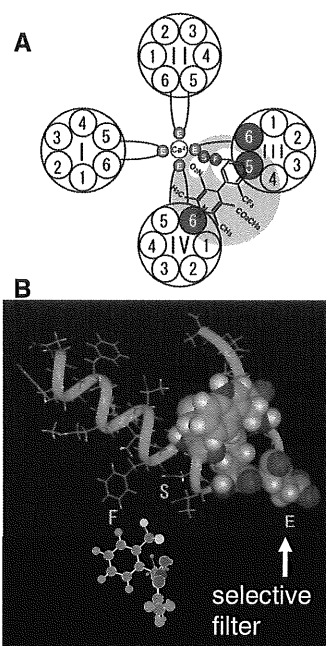


Fig. 6 Effects of S(-)-Bay k 8644 (1μM, A, C), FPL-64176 (1μM, B), and R-(+)-Bay k 8644 (1μM, D) on mutant Ca<sup>2+</sup> channels. \*p<0.05

F1112Yは、S(-)-Bay k 8644 と R(+)-Bay k 8644 の作用が共に rbCII と同等に保存されていたが、FPL-64176 の作用は F1112A と同等まで減弱していた (Fig. 6)。この結果から、FPL-64176 と Bay k 8644 の作用の違いは、その構造に基づくものと想定された。さらに、これまでの結果から推定される DHP 結合モデルを提唱した (Fig. 7)。

【まとめ】

私は、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルのポアを構成すると推定されている IIIS5-S6 リンカーに位置する二つのアミノ酸、Phe<sup>1112</sup> 及び Ser<sup>1115</sup> が DHP 類の作用・結合部位であり、かつ  $\text{Ca}^{2+}$ アゴニストの作用発現に必須の部位であることを初めて明らかにした。 $\text{Ca}^{2+}$ アゴニストは、ポアのごく近傍を修飾することでポアの開口状態を安定化し電流増強作用を示すという新たなモデルを提示した。このことは、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの開口状態、ひいては開閉メカニズムと薬物によるその修飾機構の解明に新たな知見を与えるものである。



Lipkind GM and Fozzard HA, *BIOCHEMISTRY* vol. 40, p6786-6794, 2001 より改変

Fig. 7 Possible orientation of DHP agonist, S(-)-Bay k 8644 in L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_{1C}$  subunit. A. Top view of DHP binding pocket. B. Side view of DHP binding pocket.