

審査の結果の要旨

氏名 山口 真 司

電位依存性 L 型 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 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。近年、 Ca^{2+} チャネルの進化上の祖先といわれ、よく似た構造をとる K^{+} チャネル（KcsA）のポア部分の結晶構造解析がなされ、イオン透過の概念が得られた。おおまかな構造については Ca^{2+} チャネルにあてはめることができるが、 Ca^{2+} チャネルのイオン選択フィルターの相違や電位依存性などは KcsA チャネルとは異なるため、 Ca^{2+} チャネルの構造の対比には限界がある。 Ca^{2+} チャネルは临床上重要なターゲットであり、抗高血圧薬・抗不整脈薬として頻用される Ca^{2+} 拮抗薬（アンタゴニスト）、そしてその誘導体である Ca^{2+} チャネルアゴニストは、そのゲーティングを修飾することで作用を発現すると考えられている。薬物によるゲーティング修飾メカニズムの解明は、 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ことを期待される。

山口真司の研究は、dihydropyridine（DHP）系薬物による L 型 Ca^{2+} チャネル修飾機構の解明を通じ、 Ca^{2+} チャネルのゲーティング制御機構を明らかにすることを目的としている。新規 DHP 結合・作用部位の同定を試み、また、 Ca^{2+} チャネルアゴニストの作用と結びつけることで、 Ca^{2+} チャネルのゲーティングに対する関与を検討したものである。

1. 新規 DHP 結合・作用部位の同定

山口はまず、 $\alpha 1$ サブユニット IIS5-S6 リンカーに位置する Ser¹¹¹⁵が DHP アンタゴニストの作用発現に重要な役割を担う事を whole-cell patch-clamp 法を用いて明らかにした。さらに、この Ser¹¹¹⁵ 周辺の IIS5-S6 リンカー領域においてアラニン置換スクヤニングを行うことで、Ser¹¹¹⁵ の3残基隣に位置する Phe¹¹¹² もまた、DHP アンタゴニストの作用部位であると同定した。Phe¹¹¹² 及び Ser¹¹¹⁵ は、Ca²⁺チャンネルにおいて非常に保存度が高く、非L型 Ca²⁺チャンネルにおいても保存されていた。次に、[³H](+)PN200-110 を用いた結合実験と、電気生理学の実験における点変異 Ca²⁺チャンネル (F1112A, S1115A) の DHP アンタゴニストの電流抑制作用の減弱は、その結合親和性の低下を反映したものであることを明らかにした。DHP の結合には、比較的 Ser¹¹¹⁵ の寄与が大きかった。一方、Ca²⁺チャンネルアゴニスト、FPL-64176 の作用を、whole-cell patch-clamp 法及び single channel recording 法を用いて確認したところ、F1112A, S1115A ともに、電流増強作用はほとんどみられなかった。特に、Ca²⁺チャンネルアゴニストによる平均開口時間延長作用がほとんどみられなかった。

2. Ca²⁺チャンネルアゴニストによる修飾メカニズムの検討

もし、F1112A 及び S1115A におけるアゴニストの作用低下が結合親和性のみ依存している、と仮定すると二重変異 Ca²⁺チャンネル、F1112A/S1115A において、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。この仮定に基づいて山口は、二重変異 Ca²⁺チャンネル、F1112A/S1115A におけるアゴニスト作用を測定した。Ca²⁺チャンネルアゴニストによる電流増強作用は完全に消失し、逆に電流抑制作用が見られた。single channel recording 法による測定においても、平均開口時間延長作用は全く確認されなかった。このことから、F1112A 及び S1115A における Ca²⁺チャンネルアゴニストの作用減弱はアンタゴニ

ストの場合とは異なり、結合親和性の低下にのみ基づくわけではなく、その開口状態安定化作用を発現しづらいことに起因することを明らかにした。即ち、 Ca^{2+} チャネルアゴニストにとって、 Ca^{2+} チャネルの開口状態の安定化の実現は、IIS5-S6 リンカー、つまり、ポア部分との相互作用に基づくことを意味する。また、これら二つのアミノ酸における点変異実験から、Ser¹¹⁵ のなかでもその水酸基が、Phe¹¹² においてはその芳香環が、 Ca^{2+} チャネルアゴニストの作用発現に重要な役割を果たすことを明らかにした。最後に、これまで同定された DHP 結合部位及びその結合モデルに基づき、新たな DHP 結合モデルを提唱した。

以上のように山口は、L 型 Ca^{2+} チャネルのポアを構成する IIS5-S6 リンカーに位置する二つのアミノ酸、Phe¹¹² 及び Ser¹¹⁵ が DHP 類による結合・作用部位であること、及び、 Ca^{2+} チャネル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。さらに Ca^{2+} チャネルアゴニストは、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うる、という新たなモデルを提示した。

本研究は、 Ca^{2+} チャネルの開口状態、ひいては開閉メカニズムの解明に新たな知見を与えるものであり、 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。さらには次世代の L 型あるいはその他のサブタイプ特異的な Ca^{2+} チャネルモジュレーターの開発につながるものと考えられる。故に、チャネルの構造生物学の進展に寄与するところ大であり、博士（薬学）の学位を受けるに値すると判断した。