

## 論文の内容の要旨

論文題目 新規高親和性 1,5-ベンゾチアゼピン類  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルブロッカー結合部位の解析

氏名 萩原 雅文

### 【背景】

$\text{Ca}^{2+}$ チャネルブロッカー ( $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗薬) は、高血圧、狭心症、不整脈などの心血管系疾患の治療に広く用いられている。臨床的に有効である最大の理由は組織・病態選択性であり、冠血管、血管平滑筋、洞房結節、虚血心筋などの膜電位の低い組織の電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルに選択的に働く。Nifedipine、verapamil および diltiazem に代表される第一世代  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルブロッカーは、化学構造の異なる 3 つのクラス、1,4-dihydropyridine (DHP)、phenylalkylamine (PAA) および 1,5-benzothiazepine (BTZ) 類に分類され、電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル  $\alpha_1$  サブユニット上の異なるアロステリックに共役した結合部位にそれぞれ結合し、異なる作用を発揮すると考えられてきた。DHP 類は、ポアを塞ぐというよりもドメイン III および IV の domain interface 近傍の結合領域を介して、チャネルを open (活性薬) または closed (拮抗薬) の状態に遷移させるようにアロステリックに調節し、PAA 類は  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの細胞内側から入り込み、ポアもブロックする可能性が高い。これら 2 種特に DHP 結合については、bacterial  $\text{K}^+$ チャネル (KcsA) をプロトタイプとした結合領域の分子モデリングの検討が進んでいるが、一方、BTZ 結合についてはモデルを構築できる段階に至っていない。しかしながら BTZ には、PAA と異なり細胞外側から作用し易いことや DHP 拮抗薬/活性薬との温度依存的な結合促進/抑制の相互作用などの特徴があるため、BTZ 結合部位の解析が、未だ実体の解明されていない電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの構造とゲーティング機構の究明のブレークスルーとなる可能性がある。

本研究では、高親和性 BTZ 誘導体が、BTZ 結合部位を介する  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの分子メカニズム解明の強力な手段となると考え、diltiazem に 3,4-dimethoxyphenylethyl 基を導入した 3-(acetyloxy)-5-[2-[[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]-methylamino]ethyl]-2,3-dihydro-2-(4-methoxyphenyl)-1,5-benzothiazepine-4(5H)-one、(DTZ323) およびその放射標識リガンド [ $^3\text{H}$ ]DTZ323、さらには 4 級アンモニウム誘導体 (DTZ417) を開発し、新規リガンドとしての詳細な性状解析ならびに 3 種の結合部位間の相互作用に着目して、リガンド-受容体相互作用の面から明らかとすることを目的とした。

## 【方法・結果】

### 1. DTZ323 の [ $^3\text{H}$ ]diltiazem 結合部位への親和性

BTZ である [ $^3\text{H}$ ]diltiazem を用いて、結合部位の密度が高く歴史的に  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルブロッカーの研究が数多く行われているウサギ背筋 T 管膜粗標本に対する結合実験を行った結果、DTZ323 は  $37^\circ\text{C}$  における [ $^3\text{H}$ ]diltiazem 特異的結合を競合的に抑制し、その  $K_i$  値は 6.6 nM であり、BTZ 結合部位に対して diltiazem の 48 倍、clentiazem の 9 倍高い親和性を示した。 $2^\circ\text{C}$  における [ $^3\text{H}$ ]diltiazem 結合の解離反応に対し、30  $\mu\text{M}$  verapamil は解離速度を速めたが、1  $\mu\text{M}$  の DTZ323 は影響を与えなかった。この DTZ323 の結果は、[ $^3\text{H}$ ]diltiazem と競合的に拮抗することが報告されている化合物と同様のプロファイルであった。以上より、DTZ323 が、これまでに報告された diltiazem 誘導体の中で BTZ 結合部位に最も高い親和性を持つ化合物であることが明らかとなった。

### 2. DHP、PAA 結合部位に対する DTZ323 の調節様式

Diltiazem の特徴として  $37^\circ\text{C}$  における DHP 結合促進作用が知られるが、薬理作用を持つ diltiazem 誘導体がすべて DHP 結合促進作用を持つわけではない。放射標識 DHP である (+)-[ $^3\text{H}$ ]PN200-110 結合を、DTZ323 は  $37^\circ\text{C}$  において濃度依存的に不完全に抑制した。この調節様式を詳細に検討した結果、diltiazem の DHP 促進作用および DTZ323 の DHP 抑制作用は、標識 DHP の濃度が高くなるにつれ、最大反応が共に減弱した。これより diltiazem および DTZ323 は正負の方向性が異なるものの、共にアロステリック相互作用を介して DHP 結合部位を調節することが明確に示された。

DTZ323 および diltiazem は、放射標識 PAA である (-)-[ $^3\text{H}$ ]D888 特異的結合を Hill 係数 1 で濃度依存的に完全に抑制した。

### 3. 放射標識 [ $^3\text{H}$ ]DTZ323 の結合特性

ウサギ背筋 T 管膜標本に対する [ $^3\text{H}$ ]DTZ323 特異的結合は飽和性があり可逆的であった。2 つの異なる速度論的実験から同等の  $K_{+1}$ 、 $K_{-1}$  値が得られ、 $K_d$  値は 1.5 および 2.0 nM とほぼ一致し高親和性であった。等温結合曲線に対するスカッチャード解析の結果より [ $^3\text{H}$ ]DTZ323 は単一の結合部位に結合し、 $25^\circ\text{C}$  と  $37^\circ\text{C}$  における  $K_d$  値はそれぞれ 1.4 nM と 1.8 nM と高親和性であった。 $25^\circ\text{C}$  における  $K_d$  値は速度論的実験で得た 2 種の  $K_d$  値と良く一致しており、放射リガンドとしての良好な性状を示した。

37°Cにおける<sup>3</sup>H]DTZ323結合のB<sub>max</sub>値は、<sup>3</sup>H]diltiazem結合のB<sub>max</sub>値とほぼ同等であり、同じ結合部位を標識していることを支持した。さらに(+)-<sup>3</sup>H]PN200-110結合および(-)-<sup>3</sup>H]D888結合のB<sub>max</sub>値との比較より、α<sub>1</sub>サブユニット上に3種の結合部位が1:1:1の比率で存在することが示された。

<sup>3</sup>H]DTZ323は、骨格筋L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルに対し最も親和性の高い放射標識BTZであった。

#### 4. <sup>3</sup>H]DTZ323競合実験におけるDTZ323誘導体および他の調節薬の特性

DTZ323においてもdiltiazemと同様な*d-cis*体を選択的な立体特異性が見られた。DTZ323およびDTZ417の結合親和性は、それぞれ51倍および4倍diltiazemより強かった。<sup>3</sup>H]DTZ323結合により得られたK<sub>i</sub>値は、<sup>3</sup>H]diltiazem結合で得られた結果と良く一致していた。

DTZ323は、PAAリガンドとの間でdiltiazemと同様にreciprocalな相互作用を示すことが確認された。

<sup>3</sup>H]Diltiazem結合を完全に阻害し<sup>3</sup>H]PAA結合に対しては不完全に阻害する中国薬草由来のアルカロイドtetrandrineが<sup>3</sup>H]DTZ323結合を完全に阻害し、その効力は25°Cから37°Cに温度が上昇するに従って増加した。

#### 5. <sup>3</sup>H]DTZ323結合部位に対するCa<sup>2+</sup>チャンネルブロッカーの相互作用に与えるCa<sup>2+</sup>の影響

Ca<sup>2+</sup>は、L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルに対するBTZ類とPAA類の結合親和性を減少させるが、DHP類の結合親和性を増加させることが知られている。1 mM Ca<sup>2+</sup>存在下において<sup>3</sup>H]DTZ323結合のB<sub>max</sub>値に変化はないがK<sub>d</sub>値は有意に減少した。1 mMのCa<sup>2+</sup>は、<sup>3</sup>H]DTZ323結合に対するdiltiazem、tetrandrineおよびverapamilの抑制曲線を右方シフトさせた一方、nicardipineによる抑制曲線を左方シフトさせ最大反応を減少させた。Ca<sup>2+</sup>チャンネルブロッカーの結合親和性に対するCa<sup>2+</sup>による調節において観察された差異は、α<sub>1</sub>サブユニット上のDHP結合部位がポアを形成するイオン選択フィルターを含むIIIS5-S6リンカー領域によって明確に影響を受けることを反映していると考えられた。

#### 6. 心筋L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルに対するDTZ323の結合特性

Ca<sup>2+</sup>チャンネルブロッカーの標的組織の一つである心筋の膜標本におけるL型Ca<sup>2+</sup>チャンネルと関連する<sup>3</sup>H]DTZ323高親和性結合部位についても、DTZ323に関する*d-cis*異性体への立体選択性が観察された。DTZ323およびDTZ417は心筋Ca<sup>2+</sup>チャンネル高親和性結合部位においてdiltiazemに比較してそれぞれ22倍と1.1倍効力が強く、この結合親和性はモルモット単離心室筋細胞におけるL型Ca<sup>2+</sup>チャンネル抑制作用のIC<sub>50</sub>値の報告と良く一致していた。

<sup>3</sup>H]DTZ323は、心筋L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルに対し最も親和性の高い放射標識BTZであった。

#### 【まとめ】

本研究は、新規高親和性BTZリガンドDTZ323の骨格筋L型Ca<sup>2+</sup>チャンネル上の3種の古典的Ca<sup>2+</sup>チャンネルブロッカー結合部位に対する選択性と高親和性、<sup>3</sup>H]DTZ323の放射リガンドとしての性状解析ならびに<sup>3</sup>H]DTZ323を用いた心筋L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルにおけるDTZ323と

DTZ417 を含むその誘導体の BTZ 結合部位への結合様式について初めて明らかとしたものである。さらに、DTZ323 を用いて、DHP 結合部位に対する diltiazem 誘導体のアロステリック作用の解析および BTZ 結合部位に対する DHP のアロステリック作用の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性を中心に新たな知見を得た。本研究において開発した DTZ323、 $[\text{}^3\text{H}]\text{DTZ323}$  および DTZ417 等を用いて行った、異なるクラスの  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルブロッカーとの相互作用の性状解析は、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルおよび BTZ の作用メカニズムの解明に重要であり、これらの高親和性リガンドは電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの構造と機能を解明するツールとして有用である。