

## 審査の結果の要旨

氏名 萩原 雅文

電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルは、筋細胞、分泌細胞、神経細胞などの興奮性細胞に広く存在し、細胞膜の脱分極による  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を担い、電氣的興奮を筋収縮やホルモン分泌などの細胞内のプロセスに変換する重要な役割を果たす。 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルブロッカーは、生体に広く分布する本チャネルをターゲットとしながらも、高血圧や狭心症などに有効で安全な治療薬として広く用いられており、その組織・病態選択性のメカニズムの解明が  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの構造と機能の解明に重要な役割を果たしてきた。

第一世代の  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルブロッカーには、化学構造の異なる 3 つの化合物群、1,4-dihydropyridine (DHP)類 nifedipine、phenylalkylamine (PAA)類 verapamil 及び 1,5-benzothiazepine (BTZ)類 diltiazem が知られているが、その組織選択性及び薬理作用には相対的な差が見られる。このことは、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルのポアを形成する  $\alpha_1$ サブユニット上の、異なるがアロステリックに共役する 3 種の結合部位に、各々が異なる結合様式で結合することにより、異なる膜電位依存性及び刺激頻度依存性が発揮されるためと考えられる。分子生物学的な手法により各々の化合物群の結合に強く関与するアミノ酸は明らかとなってきたが、結合部位間の機能的な連関の詳細については不明な点が多く残されている。したがって、これらの部位への結合メカニズムの解明は、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの構造やゲーティング機構の解明、さらには、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルブロッカーが臨床上有効な最大の理由である組織選択性のメカニズムを解明し、より選択的で安全な新規  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルブロッカーの創出につながることを期待される。

萩原雅文の研究は、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルブロッカーによる  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル調節のメカニズム解明に切り込むツールとして、DHP 及び PAA 結合部位に比較して解析が遅れている

BTZ 結合部位に対する新規高親和性 BTZ リガンドを開発することを目的としている。また、得られた新規リガンドの高親和性の特徴を生かし、3種の結合部位間の機能的連関について検討したものである。

萩原はまず、diltiazem に 3,4-dimethoxyphenylethyl 基を導入した新規 BTZ リガンド DTZ323 についてウサギ背筋 T 管粗膜標本を用いて検討し、DTZ323 が負のアロステリック相互作用を介して<sup>[3H]</sup>diltiazem 結合解離速度を加速する verapamil と異なり、<sup>[3H]</sup>diltiazem 結合に競合的に拮抗することを明らかとした。また、DTZ323 は、効力が diltiazem の 48 倍、clentiazem の 9 倍強く、これまでに報告された diltiazem 誘導体の中で BTZ 結合部位に最も選択性の高い化合物であることを明らかとした。さらに、放射標識<sup>[3H]</sup>DHP の濃度を変化させて適用することにより、diltiazem 及び DTZ323 が、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を明確に示した。

次に萩原は、放射標識化した DTZ323 を用い、Ca<sup>2+</sup>チャンネルに対するその結合特性を直接的に明らかにした。<sup>[3H]</sup>DTZ323 特異的結合は飽和性及び可逆性を有し、等温結合曲線より単一の結合部位に高親和性 (1~2 nM) で結合した。2つの異なる速度論的実験から同等な K<sub>+1</sub> 及び K<sub>-1</sub> 値が得られ、算出された K<sub>d</sub> 値が飽和実験による K<sub>d</sub> 値と一致したことから、<sup>[3H]</sup>DTZ323 が Ca<sup>2+</sup>チャンネル解析ツールとして良好な結合特性を有することが明らかとなった。また、中国薬草由来のアルカロイド tetrandrine の結合部位選択性を用いて、<sup>[3H]</sup>DTZ323 が BTZ 結合部位をラベルすることが示唆された。<sup>[3H]</sup>DTZ323 結合阻害作用から、DTZ323 が diltiazem と同様に *d-cis* 体選択的な立体特異性を持ち、モルモット心室筋粗膜標本においても diltiazem の 22 倍という高親和性を示すことを明らかにした。さらに、BTZ 結合に対するアロステリック相互作用を Ca<sup>2+</sup>依存性の面から検討し、DHP が PAA 及び BTZ と異なる親和性変化と作用様式を示すことを明らかにした。

恒久的に荷電し細胞膜を透過しない4級アンモニウム誘導体は、Ca<sup>2+</sup>チャネルブロッカー結合部位が細胞膜の内・外側どちらに近いかを検討するツールとして有用である。萩原は、DTZ323の4級アンモニウム誘導体DTZ417が心室筋膜標本においてdiltiazemに匹敵する親和性を有することを明らかとし、低親和性に基づく非特異的結合を回避する可能性を示唆した。この新規リガンドDTZ323及びDTZ417は、後に別の電気生理学的研究に用いられ、細胞外から作用するPAAとは異なり、BTZ結合部位が細胞外から作用可能な部位にあることの証明に貢献し、実際にCa<sup>2+</sup>チャネルの解析に有用なりガンドであることが確認されている。

以上のように萩原は、DTZ323及びその4級アンモニウム誘導体DTZ417がCa<sup>2+</sup>チャネルBTZ結合部位に選択的な新規高親和性リガンドであることを初めて明らかにし、ツールとして利用する際に基礎となる結合特性を明確に示した。さらに、DTZ323及びdiltiazemが共にアロステリック相互作用を介してDHP結合を調節すること、及び、BTZ結合部位に対するアロステリック作用のCa<sup>2+</sup>依存性を明らかにした。

本研究は、Ca<sup>2+</sup>チャネルブロッカーの組織・病態選択性の構造的・機能的なメカニズムの解明に新たな知見と強力なツールを与えるものであり、Ca<sup>2+</sup>チャネルの構造と機能の解明につながる。さらには次世代の疾患部位選択的な治療薬デザインにつながるものと考えられる。故に、チャネル機能の薬理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。