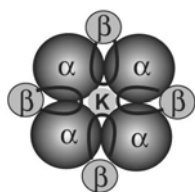


## 論文の内容の要旨

### デヒドロアビエチン酸構造を基盤としたカリウムチャンネル開口物質の創製

田島 俊彦

**目的** 大コンダクタンスカルシウム依存性カリウムチャンネル(BKチャンネル)は、細胞膜電位の脱分極や細胞内カルシウムイオン濃度上昇に応じて開口する。BKチャンネル開口による細胞外へのカリウムイオン流出は膜電位を過分極させ、膜電位依存性カルシウムチャンネルを抑制する。BKチャンネルは平滑筋・神経組織などに発現しており、 $\alpha$ サブユニットが四量体としてポアを形成し、更に四つの $\beta$ サブユニットが $\alpha$ サブユニットを取り囲んでチャンネルを構成している(図1)<sup>1</sup>。 $\alpha$ サブユニットは、膜貫通ドメイン(S0-S6)と細胞質内ドメイン(S7-S10)を持つ。S4は電位センサーで、S9-S10間の $\text{Ca}^{2+}$  bowlはカルシウムセンサーであると考えられている。 $\beta$ サブユニットは $\alpha$ サブユニットのカルシウムイオン感受性や電位感受性を増強させる。BKチャンネルの開口により、平滑筋の弛緩、神経伝達物質の放出制御などが起こるため、BKチャンネル開



口物質は高血圧・膀胱過敏症等の平滑筋関連疾患、てんかん・脳虚血等

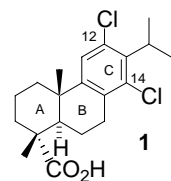
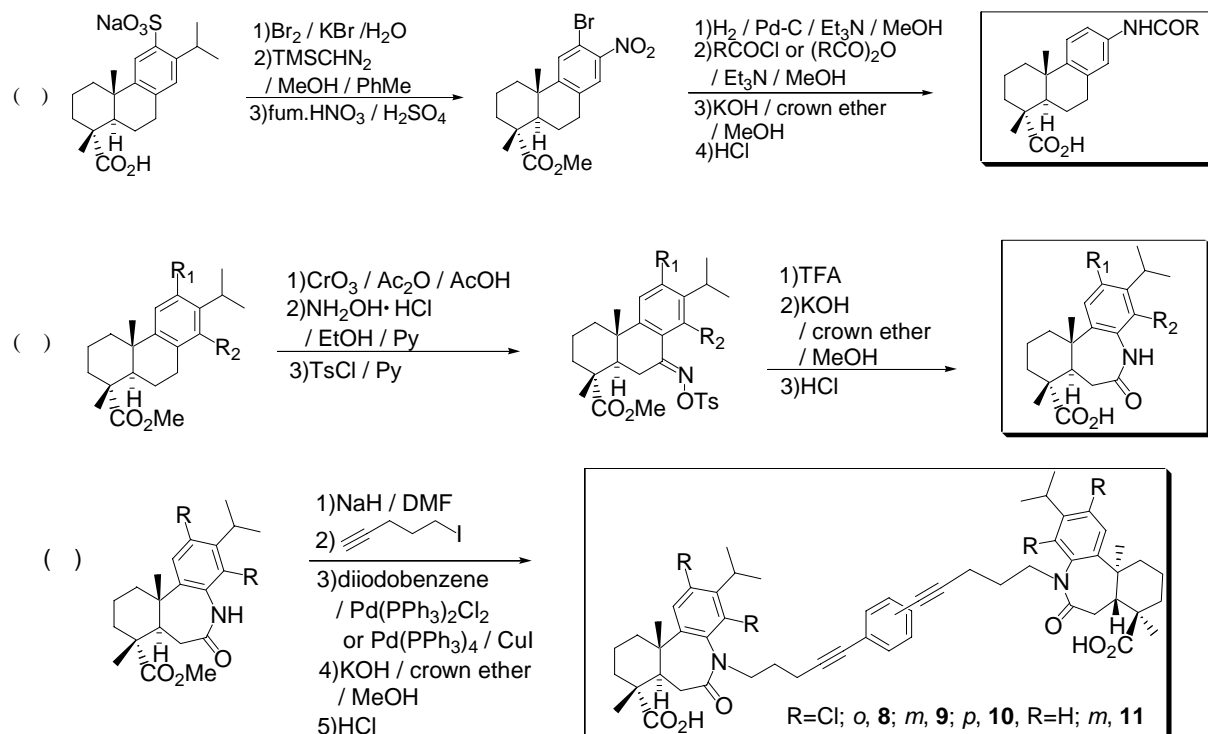


図1. BKチャンネル

の脳関連疾患などに有効であると期待される。しかしながら、化合物によるBKチャネルの開口機構は未知である。当教室では既に 12,14-ジクロロデヒドロアビエチン酸 **1** にBKチャネル開口活性を見出した<sup>2</sup>。そこで、本研究では、**1** を構造展開し、より活性の強いモノマー化合物の探索を行った。更に、得られた知見を基に、四量体から成るBKチャネルに対して二箇所の結合部位を持つことで効果的な開口活性を示すダイマー化合物を創製した。

**構造展開** チャネル開口活性の増強を目指して、(1) デヒドロアビエチン酸構造を用い、構造活性情報を得るため、芳香環上に窒素原子を導入し、13位N-アシル誘導体を合成した(スキーム )。(2) 次に、新たな構造展開を図るべく、デヒドロアビエチン酸のB環に窒素原子を導入した七員環ラクタム(テトラヒドロベンゾアゼピン)誘導体を合成した(スキーム )。(3) ファーマコフォアをリンカーで結合したダイマー化合物をデザイン・合成した。即ち、チャネル構造の対称性から結合サイトも四箇所存在すると考えられ、ダイマー化合物は同一チャネルの結合サイトに同時に結合することが想定される。結果、モノマーよりも活性の増強が期待される。ウサギ膀胱平滑筋を用いた弛緩作用によって選別されたモノマー-5(図2参照)をダイマー化した化合物の合成法をスキーム に示した。ダイマーはベンゼン環のオルト・メタ・パラ位にアセチレンを介して連結させた。X線結晶解析により、電位依存性カリウムチャネルKcsA、KirBac、MthK、KvAPのポアの径はそれぞれ6 Å、8 Å、25 Å、19 Åであることが分かっている。前者二つが閉状態で、後者二つが開状態である。カリウムチャネルスーパーファミリー間ではポアのアミノ酸配列はよく保存されており、BKチャネルのポアの径も6-25Å程度であると予想される。BKチャネル開口物質の構造活性相関により、カルボキシル基はBKチャネル開口活性の発現に必須であることが分かっており、各ダイマーのカルボキシル基間の距離は、このポアの大きさと対応している。



**活性評価** ウサギの膀胱平滑筋の弛緩活性により、化合物のスクリーニングを行った。即ち、30 mMカリウム溶液で収縮させた状態で評価化合物を作用させ、その弛緩率を求めた(図3)。評価化合物はDMSOに溶かして10 mMストック溶液とし、評価時に精製水で希釈して最終濃度 10  $\mu$ M( DMSO 0.1% )とした。

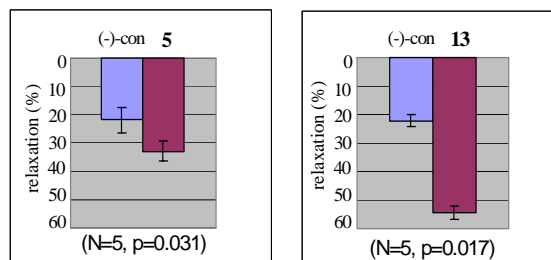
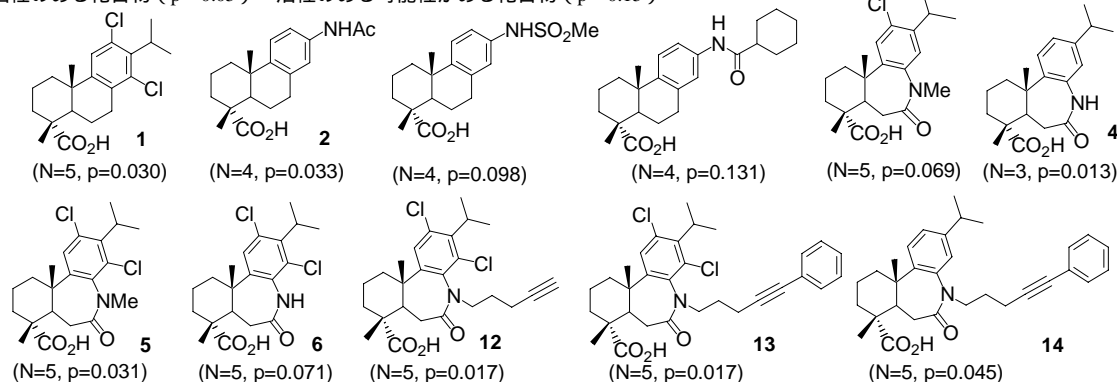


図3.ウサギ膀胱平滑筋短冊を用いた弛緩活性

よって、コントロールはDMSO 0.1%として弛緩を比較した。図2では活性を示した化合物を図の上段に、他方、活性を示さなかった化合物を下段に列挙した。1) その結果、N-アセチル体2には弛緩活性があるが、それよりも側鎖の長いN-ブチリル体3では弛緩活性が減弱するため、ダイマー化では芳香環からはリンカーが伸ばせない。2) 七員環ラクタム誘導体では、ジクロロ口体に於いてNH体6は弱い活性のある可能性があるが、N-Me体5には有意な活性が見出された。また、塩素原子のないNH体4にも有意な活性が見られた。次に、

活性のある化合物 ( $p < 0.05$ ) ・ 活性のある可能性がある化合物 ( $p < 0.15$ )



活性の見られない化合物 ( $p > 0.15$ )

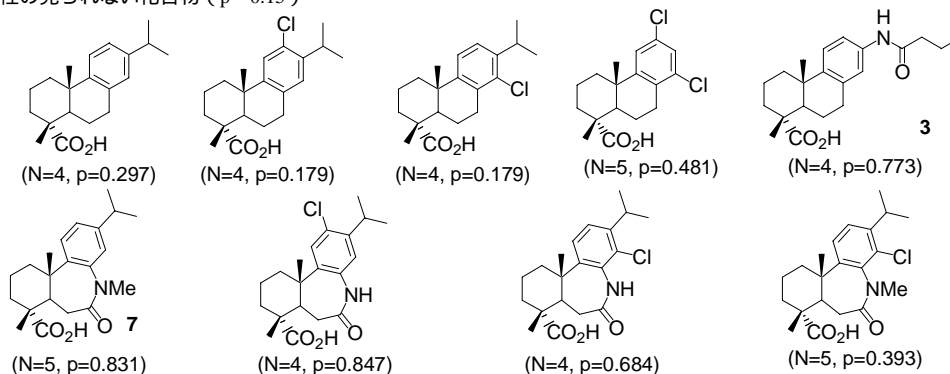


図2.膀胱平滑筋の弛緩活性評価

平滑筋弛緩が実際にBKチャネル開口によるものなのかを、ヒトBKチャネル $\alpha\beta_1$ サブユニットを発現させたtsA201細胞を用いたパッチクランプ実験で確認した。その際、最大電流の半値を活性化する電圧を $V_{1/2}$ と称するが、BKチャネルが開き易くなると電流電圧曲線が過分極側にシフトするので、負の $V_{1/2}$ 値を与えるほど化合物の活性は強い(図4)。ジクロロ口体のN-Me体5に開口活性があり、塩素のないN-Me体7には活性がなかった。そこで、ベンゼン環に塩素原子を持つダイマーについて評価したところ、オルト8、メタ9、パラ10で活性が保持されたが、 $V_{1/2}$ 値にそれほど相違はなかった。 $V_{1/2}$ 値の差が小さいため、化合

物の共通構造が一つの結合サイトと相互作用していると考えられる。一方、塩素原子を含まないダイマー11を合成して評価したところ、活性が確認された。従って、7と11の比較からリンカー自体もBKチャネル開口活性に關与する可能性が示唆され、12-14(図2参照)のような部分構造を合成し、平滑筋弛緩作用を評価したところ、活性を示した(図3)。更にパッチクランプ法によっても、13や14に5や7よりも大きな活性増大が見られ、側鎖のベンゼン環も含めてBKチャネル開口活性に關与していることが判明した。

**結論** BKチャネルが四量体を成すという構造学的知見から、5をリンカーで締結したダイマーをデザイン・合成して生物学的評価を行った。ダイマーはBKチャネル開口活性を保持しているが、BKチャネルに二箇所ではなく、一箇所では結合し、その結合には共通構造のリンカー部分も關与してBKチャネル開口活性を示していることが示唆された。つまり、ダイマーの共通構造を有する化合物13に1を上回るBKチャネル開口活性のあることが明らかになった。デヒドロアピエチン酸B環を七員環ラクタムにしたテトラヒドロベンゾアゼピン骨格がBKチャネル開口物質創製の新たなファーマコフォアであることを見出した。

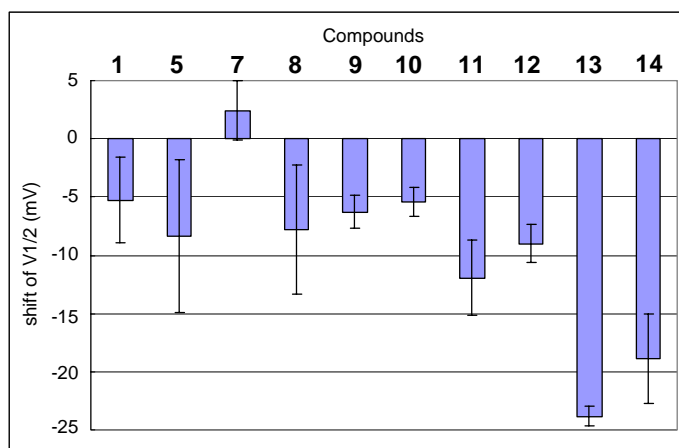


図4. 電流電圧曲線の $V_{1/2}$ のシフト値(パッチクランプ法)  
負の値が過分極側方向へのシフトを表す。

- 参照**
1. Sha. Y., Tashima. T., et al. *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 1372-1373 (2005).
  2. Ohwada. T., et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **13**, 3971-3974 (2003).
  3. Tashima. T., et al. "Design, Synthesis and BK Channel Opening Activity of 7a,8,9,10,11,11a-Hexahydro-5H,7H-dibenzo[b,d]azepin-6-one Derivatives", *in preparation*