

論文の内容の要旨

ホウ素を有する新規ストア作動性カルシウム流入阻害薬の開発、及びそれらを用いたストア作動性カルシウム流入活性化機構の解明

指導教員 御子柴 克彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

鈴木 商信

ストア作動性 Ca^{2+} 流入 (store-operated calcium entry : SOCE) は、容量性 Ca^{2+} 流入 (capacitative calcium entry : CCE) とも呼ばれ、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵庫の枯渇に伴って、細胞外から細胞内へと Ca^{2+} を流入させる機構であり、細胞内 Ca^{2+} シグナルを長期的に持続させる上で重要な手段である。SOCE は、電気生理学的に ICRAC 型と non-ICRAC 型の 2 つに大別できる。ICRAC (calcium release-activated current) は、小胞体内の Ca^{2+} の枯渇に伴い流れる電流として電気生理学的に観察され、透過するイオンの Ca^{2+} 選択性が非常に高く、単一チャネルコンダクタンスが極めて低いというような特徴を持ち、小胞体内の Ca^{2+} の枯渇や細胞膜受容体のアゴニスト刺激により活性化される non-ICRAC 型のチャネルとは明確に異なる性質を持つ。また、重症複合型免疫不全症 (severe combined immunodeficiency : SCID) の患者の T 細胞では ICRAC 及び SOCE が欠損していることが明らかになっていることから、ICRAC 型の SOCE は T 細胞の免疫応答に重要な役割を持つことがわかっている。最近、SOCE を引き起こすのに必要な分子が次々に明らかにされ、STIM1 というタンパク質が小胞体内の Ca^{2+} の枯渇を感知してその情報を細胞膜へと伝え、細胞膜に存在し ICRAC 型のストア作動性チャネル (store-operated channel : SOC) のポアを形成している CRACM1 (Orai1) を活性化するという大まかな分子メカニズムもわかってきた。特に、

CRACM1 は、上記の SCID 患者の家系で変異があるタンパク質として、一塩基多系解析によりクローニングされており、I_{CRAC} 型 SOCE の活性化機構の解明及びその病態との関連は、非常に注目されている研究分野となっている。

2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB) は、元々は IP₃ 誘導 Ca²⁺ 放出 (IP₃-induced calcium release : IICR) の阻害薬として報告された化合物であるが、後の研究において SOCE に対しても阻害作用を持つことが報告され、現在では両者の阻害薬として世界中で用いられている化合物である。また、2-APB は、IICR や SOCE に対する阻害作用以外にも、non-I_{CRAC} 型 Ca²⁺ 流入の阻害、TRPV1~3 の活性化、さらにミトコンドリアの膨張や、細胞内 Ca²⁺ ストアからの Ca²⁺ のリークなどの作用が報告されている。このように 2-APB は多彩な生理作用を持つが、SOCE 阻害薬として広く利用されている理由として I_{CRAC} に対する特徴的な 2 相性の作用、すなわち低濃度 (5 μ M) では I_{CRAC} を亢進し高濃度 (30~50 μ M) で I_{CRAC} を完全に抑制するという作用を示すため、I_{CRAC} の電気生理学的同定 (さらには I_{CRAC} 型の SOCE による Ca²⁺ 流入の同定) のための判断基準の一つとして極めて重用されていることが挙げられる。実際、CRACM1 と STIM1 の共発現により再構成された I_{CRAC} に対しても、2-APB は同様の 2 相性の作用を示すことがわかっている。

しかしながら、2-APB はこれほど一般的に使われている阻害薬にもかかわらず、2-APB が、どのタンパク質のどの部位と結合し、上記のような多彩な生理活性を発揮しているかについては、未だに調べられていない。本研究では、特に 2-APB の I_{CRAC} 型の SOCE に対する阻害作用に焦点を当て、2-APB の誘導体をプローブとして結合するタンパク質を分離することにより、その標的タンパク質の同定及び SOCE に対する作用機序を解明することを目的として研究を行った。

阻害薬の親和性を用いたタンパク質の精製には、その精製の操作において標的タンパク質との結合を保持し続けるためにも、なるべく強力なものが要求される。私は始めに、2-APB と同じく分子内にホウ素を持つ様々な化合物を合成し、強力な SOCE 阻害薬を Jurkat T 細胞を用いてスクリーニングした。その結果、2-APB の基本骨格であるジフェニルボリン酸エステルを分子内に 2 つ持つ化合物 (ビスホウ素化合物) が、2-APB よりも 30~40 倍以上という強力な

SOCE 阻害能を示すことを発見した。また、それらを短時間・高収率で合成するための簡便な合成法を確立することにも成功した。

阻害薬を用いたタンパク質を精製には、阻害薬にビオチンを導入した化合物を用いるのが便利であるが、私は、本研究で開発したホウ素を持つ強力な SOCE 阻害薬にビオチンを導入した化合物（以降ビオチン化 SOCE 阻害薬と呼ぶ）を合成することにも成功した。

このビオチン化 SOCE 阻害薬を用いて、Jurkat T 細胞の内在性タンパク質中からビオチン化 SOCE 阻害薬に結合する分子を分離し、得られたタンパク質を western-blot により解析した。その結果、IICR を担う分子である IP₃ 受容体、さらには小胞体内 Ca²⁺の枯渇を感知し SOCE を引き起こすのに必須な分子である STIM1 も、ビオチン化 SOCE 阻害薬で分離されることがわかった。

STIM1 と CRACM1 の共発現により SOCE が再現されることから、この2つの分子が SOCE の最小構成単位であることがわかっているが、これらのタンパク質をそれぞれ COS-7 細胞に強制発現し、ビオチン化 SOCE 阻害薬によりタンパク質を分離した結果、STIM1 と CRACM1 は両者ともビオチン化 SOCE 阻害薬により分離されることがわかった。今までの報告では、2-APB が SOCE を阻害する際の標的分子はチャンネルであろうという予想が多かったため、SOCE の活性化分子である STIM1 がビオチン化 SOCE 阻害薬により分離されることは予想外であった。そのため、私は、STIM1 とビオチン化 SOCE 阻害薬の相互作用を詳しく調べることにした。ホウ素を有する SOCE 阻害薬を過剰量存在させた状態でビオチン化 SOCE 阻害薬により STIM1 を分離した結果、その SOCE 阻害薬の濃度依存的にビオチン化 SOCE 阻害薬と STIM1 の結合がブロックされた。すなわち、ビオチン化 SOCE 阻害薬は、直接か間接かは不明であるものの、その分子中の SOCE 阻害薬部位を介して STIM1 と結合していることがわかった。また、ビオチン化 SOCE 阻害薬による STIM1 欠損変異体の分離実験の結果、ビオチン化 SOCE 阻害薬は、STIM1 の膜貫通領域付近と膜貫通領域を除く C 末側の 2ヶ所と相互作用していることも判明した。

non-ICRAC 型の Ca²⁺流入は、電気生理学的性質が異なる数種のチャンネルの存在が確認されており、その分子実体は TRPC タンパク質と考えられている。2-APB は、non-ICRAC 型の Ca²⁺流入も阻害することが報告されているため、ビオチン化

SOCE 阻害薬を用いて、COS-7 細胞に強制発現させた TRPC1~7 を分離する実験を行った。その結果、TRPC1~7 の全てのサブタイプがビオチン化 SOCE 阻害薬により分離されることがわかった。また、Jurkat T 細胞の内在性タンパク質中からビオチン化 SOCE 阻害薬により分離されたタンパク質を LC-MS/MS により解析した結果、exportin、karyopherin β 1, 3 のような核内・核外輸送を担う分子など、2-APB の阻害効果が報告されていない種々のタンパク質が同定された。以上のように、ビオチン化 SOCE 阻害薬は、SOCE を活性化する STIM1 や ICRAC 型の SOC である CARCM1 以外にも、多様なタンパク質と相互作用することがわかった。この結果は、ビオチン化 SOCE 阻害薬のリード化合物である 2-APB が持つ、多彩な生理作用を反映するものと示唆された。

本研究は、2-APB を始めとするホウ素を有する阻害薬の挙動を、その阻害薬とタンパク質の相互作用から研究した初めての例であり、2-APB を始めとするホウ素を有する SOCE 阻害薬は、直接か間接かは不明であるが、2-APB により阻害される現象の分子実体である IP₃R、TRPC、STIM1、CRACM1 といったタンパク質を標的としていることを、生化学的に初めて示唆したものである。特に、ホウ素を有する SOCE 阻害薬が ICRAC 型の SOCE を阻害する機構としては、チャネルである CRACM1 のみならず、小胞体内の Ca²⁺の枯渇を感知しその情報を細胞膜伝え SOCE を活性化する STIM1 タンパク質も、阻害薬の標的になる可能性が示唆された。今後は、本研究で用いた手法と化合物を応用することで、ホウ素を有する阻害薬が標的タンパク質へ直接結合する部位や、それらの阻害薬の作用メカニズムが解明できるものと期待される。また、本研究により開発したホウ素を持つ阻害薬の簡便な合成法を応用し、SOCE、ICRAC または non-ICRAC 型 Ca²⁺流入のような現象に対して、より選択的な阻害作用を持つ薬剤の開発が期待でき、さらには LC-MS/MS により同定された exportin のようなタンパク質に対する新たな創薬にもつながる研究になると言える。