

論文の内容の要旨

論文題目 標的分子同定による生理活性化合物の作用機序解析
(Analysis of mechanism of action of bioactive molecules through target identification)
氏名 西谷陽一

1. 序

興味深い生理活性を持つ化合物の作用機序を解明することによって、これまで知られていなかった生理的メカニズムが明らかになった例は多い (FK506 による免疫シグナル伝達機構の解明、ゲルダナマイシンによる Hsp90 クライアントタンパク質の機能解明、等)。このように化合物を出発点として生命現象を解明する研究はケミカルバイオロジーと呼ばれ、学際的な分野として近年注目を集めている。

生理活性化合物の作用機序解析は、生理活性の詳細な検討と標的分子の同定から成り立っている。本論文ではこの二段階に包含される一連の研究として、ベニジピンの骨芽細胞分化促進作用の作用機序解析を行った。また、標的分子を簡便に同定する新しい手法として、化合物が結合した際に生じる標的分子のプロテアーゼ感受性変化を利用する方法について述べる。

2. ベニジピンの骨芽細胞分化促進メカニズムの解析

ベニジピンは血管平滑筋弛緩作用をもつ L 型 Ca チャンネル阻害物質であるが、ラットの骨量増加作用 (*in vivo*)、骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリホスファターゼ (ALP) の活性促進作用 (*in vitro*) も有している。しかし、他の Ca チャンネル阻害物質にはそのような作用がないとも報告されており、骨芽細胞分化におけるベニジピンの標的分子は不明であった。

そこで私は、①骨芽細胞分化に対するベニジピンの効果を検討し、②ベニジピンの標的分子を同定すること、によって作用機序の解明を試みた。

既報ではマウス頭蓋冠由来の初代培養細胞を利用しているが、細胞の調製に手間がかかること、骨芽細胞以外の線維芽細胞も含まれていること、といった難点があった。そこで骨芽細胞様細胞株の中からベニジピンによって ALP 活性が上昇する細胞として MC3T3-E1 細胞を選択し、これを用いて検討を行うことにした。

まず、ベニジピンの各種骨分化マーカーに対する影響を調べた。骨芽細胞の分化過程においては、細胞外コラーゲンマトリックスの形成をきっかけに、ALP 活性上昇、石灰化が起こることが知られている。ベニジピンは、MC3T3-E1 のコラーゲン形成には影響を及ぼさなかったが、コラーゲン形成依存的に 1 pmol/L から ALP 活性を濃度依存的に促進し、これは ALP mRNA 量の増加を伴っていた。また、骨形成の指標となる *in vitro* での石灰化も 1 nmol/L から有意に促進した。

3. ベニジピンの骨芽細胞分化促進作用における標的分子の同定

次にベニジピンの構造活性相関を調べる目的で、関連化合物の ALP 促進活性を測定した。その結果、意外にも ALP 促進活性は各関連化合物の血管平滑筋弛緩作用と相関が見られた。そこで、他の類似した構造を有する Ca チャンネル阻害物質アムロジピン・ニフェジピンの ALP 活性に対する効果を広い濃度で検討したところ、いずれも高濃度 (100 nmol/L) では ALP 活性を促進することが分かった。また、ベニジピンとはそれぞれ基本骨格が異なる L 型 Ca チャンネル阻害物質の

ジルチアゼム・ベラパミルも共に 100 nmol/L 以上で ALP 活性を促進した。さらにベニジピンの ALP 活性促進作用は過剰量の Ca チャンネル作動物質 BayK8644 存在下で完全に抑制された。これらの検討結果から、ベニジピンは L 型 Ca チャンネルに作用して骨芽細胞の分化を促進していることが明らかになった。さらに、ベニジピンの骨芽細胞分化促進作用が特に強力である理由を探るため、細胞脱分極による細胞内 Ca イオン流入に対する各化合物の阻害強度を測定したところ、ベニジピンが最も強力であった。また、トリチウム標識体を用いた検討により、ベニジピンは処理時間に応じて細胞に蓄積することも分かった。これらのことから、ベニジピンの骨芽細胞に対する作用が低濃度から見られる理由は、Ca チャンネル阻害作用が強く、かつ細胞に蓄積しやすいことに起因すると考えられた。

以上から、ベニジピンの骨芽細胞分化促進作用は L 型 Ca チャンネルを阻害する作用に基づき細胞内 Ca 濃度を低下させることによって、コラーゲンマトリックス形成から ALP 遺伝子転写の間の経路に作用を及ぼすことが分かった。さらに骨芽細胞の最終分化形態である石灰化を促進するという興味深い作用も有していた。これらの結果から、骨芽細胞分化・骨形成における L 型 Ca チャンネルの従来知られていなかった機能的な重要性が示唆された。

4. プロテアーゼ感受性変化を利用した化合物標的タンパク質探索法の開発

作用機序解析の最も核心的なステップは、化合物が直接相互作用する標的分子の同定である。前章のように周辺情報や関連物質の存在により比較的容易に標的分子を確認できるのは実は稀である。これまで様々な標的探索の手法が報告されているが、成否は化合物や標的分子の性質に大きく依存し、未だ決定的な方法論は存在しない。したがって既存の手法の問題点を克服できるような新しい手法を開発することには大きな意義がある。

一般に、生理活性化合物の標的分子を同定する際には、結合タンパク質のアフィニティー精製を行うことが多い。しかしこのためには構造活性相関を把握し、化合物から側鎖を伸長してビーズ上に固相化する必要があり、多大な時間と労力を要する。

精製されたタンパク質について、プロテアーゼに対する感受性が低分子リガンドの結合により変化する例が複数報告されている。これは、化合物の結合自体や結合による標的タンパク質の微細な構造変化により、プロテアーゼの切断配列へのアクセスのしやすさに変化が生じるためだと理解されている。私はこの現象を化合物の標的分子探索に応用できないかと考えた。具体的には、標的タンパク質を含む細胞抽出液を 37°C でインキュベーションし、化合物添加依存的にプロテアーゼによる分解が促進あるいは抑制されるタンパク質を標的候補として同定するというアイデアである。

大腸癌細胞株 HCT116 抽出液に、標的タンパク質が既知の 3 化合物 (オカダ酸、FK506、Radicicol、それぞれ標的は protein phosphatase 2A catalytic subunit (PP2Ac)、FKBP12、Hsp90) をそれぞれ添加し、標的タンパク質に特異的なプロテアーゼ感受性の変化が見られるかどうかを SDS-PAGE とウェスタンブロッティングにて確認した。その結果、オカダ酸は濃度依存的に PP2Ac の分解を抑制した。これはプロテアーゼ阻害剤により化合物の効果が検出されなくなったことから、内在性プロテアーゼによる分解作用を介していることが示唆された。また、FK506、Radicicol についてはプロテアーゼを外部から添加することによって、それぞれ FKBP12 に対する分解抑制作用、Hsp90 部分断片の分解促進・抑制作用を検出した。これらの作用はいずれも標的タンパク質に特異的なものであった。以上により、本手法のコンセプト検証に成功した。

そこで Src シグナル経路を阻害することが知られており直接の標的分子がよく分かっていない UCS15A について本方法を適用した。その結果、SDS-PAGE 上で化合物濃度依存的に分解が促進されるバンドを複数見出し、うち一つは以前より UCS15A の標的候補の一つと示唆されていた Sam68 であった。

以上から、化合物によって反応条件や感受性変化の方向性は様々だが、いずれの系についてもコンセプトに合致した結果を得ることができた。したがって、本法は化合物の誘導体化を必要としない簡便な標的探索技術として有効であることが示唆された。

5. 総括

生理活性化合物の作用機序解析は、化合物の生理活性の詳細な検討と標的分子の同定、という二つの研究から構成される。本論文では作用機序解析をテーマとして、ベニジピンの骨芽細胞分化促進作用の機序解析、およびベニジピンのような周辺情報や関連物質がない場合でも適用可能な新しい標的分子同定手法の開発を行った。これらの成果により、化合物を起点とした生命現象の理解に向けた研究がさらに加速されるものと期待される。