

# 論文審査の結果の要旨

氏名 西谷陽一

本論文は、緒論（第1章）、3つの主題に関する結果と考察（第2章～第4章）、総括（第5章）、引用文献および謝辞から構成されている。

第1章では、まずケミカルバイオロジー研究の意義を概説し、生理活性物質の標的分子同定が新たな生物学的知見に結びついた実例を複数紹介している。次に、第2章で標的分子を解明したベニジピンおよびその骨芽細胞分化促進活性について説明している。そして、標的分子を同定するために用いられる既存の実験手法を紹介し、第3章で用いた手法の位置づけを明確にするとともに、第4章で新しい標的分子探索手法を開発する意義を明らかにしている。これらによって、本研究全体の導入部を構成している。

第2章では、ベニジピンの骨芽細胞分化促進作用の解析結果が述べられている。ベニジピンは血管平滑筋弛緩作用を持つL型Caチャンネル阻害物質であり高血圧の治療薬としても使用されているが、他のCaチャンネル阻害物質と異なり、ラットの骨量増加作用や骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ（ALP）の活性促進作用が報告されていた。その機構を明らかにするために、論文提出者は調製と純度に問題のある骨芽細胞初代培養系に代わる新しい実験系としてMC3T3-E1細胞の系を構築し、骨芽細胞分化マーカーに対するベニジピンの効果を検討した。ベニジピンは、MC3T3-E1細胞のコラーゲン形成には影響を及ぼさないが、コラーゲン形成依存的に1 pMからALP活性を濃度依存的に促進した。この促進はALP mRNA量の増加を伴うことを明らかにした。さらに、骨形成の指標となるin vitroでの石灰化も1 nMからこれを有意に促進することを見出した。これらにより、ベニジピンの骨芽細胞分化促進作用を明確に示し、その作用点がコラーゲン蓄積とALP遺伝子転写の間にあることを明らかにした。

第3章では、ベニジピンの骨芽細胞における標的分子の探索の結果が述べられている。まず論文提出者はベニジピン類似化合物の骨芽細胞分化促進作用の評価を行った結果、その構造活性相関が各関連化合物のCaチャンネル阻害作用と相関があることを見出した。そこでCaチャンネルが標的であると推測し、骨格の異なる複数のCaチャンネル阻害物質のALP活性に対する効果を広い濃度で検討した結果、いずれも高濃度ではALP活性を促進することが分かった。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ることを示した。これらの検討結果から、論文提出者はベニジピンは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と結論している。さらに、ベニジピンの強力な骨芽細胞分化促進作用が、Caチャンネル阻害作用が強いこと、かつ細胞に蓄積しやすいことに起因する可能性があることを実験的に示し、上記結論を補強している。

第4章では、化合物と標的分子の相互作用に伴うプロテアーゼ感受性変化に着目した新しい標的探索手法を開発している。これは、ベニジピンのように周辺情報や関連物質が標的分子の探索に利用可能な場合はむしろ少ないという事実を踏まえた問題意識に基づくものである。この手法

は、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ものである。まず論文提出者は、標的タンパク質が既知の 3 化合物（オカダ酸、FK506、Radicalol）について、反応条件を詳細に検討しながら、それぞれの標的タンパク質に特異的なプロテアーゼ感受性変化を検出し、本手法のコンセプト検証に成功している。次に直接の標的分子がよく分かっていなかった UCS15A について本方法を適用し、UCS15A 濃度依存的に分解が促進されるバンドとして以前から標的分子としての可能性が示唆されていた Sam68 を同定した。さらに本手法を用いて全く新規な標的を同定する方法についての考察を加えている。

総括においては、上述のベニジピンの骨芽細胞分化促進作用の解析、ベニジピンの標的分子同定、および新しい標的分子探索手法の開発が、生理活性化合物の作用機序解析による新しい生命現象の発見に結びつく研究成果であることを議論している。実際に、ベニジピンの骨芽細胞分化促進作用が L 型 Ca チャネルの阻害による細胞内 Ca 濃度を介した ALP 遺伝子発現上昇によることを明らかにしたことは、骨芽細胞分化・骨形成における L 型 Ca チャネルの関与という新規性のある生物学的知見である。さらに、新しい標的探索手法はシンプルだが汎用性が高い独自手法であり、今後、従来法では困難であった化合物について標的分子を発見できる可能性があり、Chemical Biology のアプローチによる生命現象の分子的理解の基礎となるものである。

なお、本論文におけるベニジピンの標的分子同定研究については、協和発酵キリンの杉本整治・内井雅子・小坂信夫氏との、プロテアーゼ感受性変化を利用した標的分子同定法については、同社の柴田健志、小根山千歳、中野洋文、斎藤誠嗣、矢野敬一、スリーナス V シャーマ氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となり実験・研究を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。