

200501167A

厚生労働科学研究研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質の標的としての膜機能タンパク質発現系を利用したリスク評価法に関する研究
に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大和田 智彦

平成18(2006)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

化学物質の標的としての膜機能タンパク質発現系を利用したリスク評価法
に関する研究 ----- 1

大和田 智彦

II. 分担研究報告

1. タモキシフェンや松脂の成分の誘導体合成に関する研究

----- 6

大和田 智彦

2. 発現系を利用したイオン・チャネル型受容体に対するリスク評価に関する研究

----- 8

中澤 憲一

3. 発現系を利用したイオンチャネルに対するリスク評価に関する研究

----- 11

赤羽 悟美

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 13

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 15

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費(化学物質リスク研究事業)

総括報告研究報告書

化学物質の標的としての膜機能タンパク質発現系を利用したリスク評価法に関する研究

研究者代表者 大和田 智彦 東京大学大学院薬学系研究科薬化学教室・教授

研究要旨

化学物質のリスクの作用点の解明および評価系開発を目的として、ヒトおよびラット等の膜タンパク質を cDNA より細胞系に発現させ、膜タンパク質の機能に対する各種化合物の影響を検討する。膜タンパク質は化学物質の最初の作用点である。リスクの作用点を解明する目的で、化学物質およびその標的となる膜タンパク質の両者の構造を段階的に改変させ、化学物質の標的膜蛋白に対する作用を定量的に解析する目的で、(目的1) 化学物質の膜タンパク質の機能に対するリスク評価系の開発、(目的2) 化学物質の膜タンパク質への作用点や作用メカニズムの解明および化学物質の構造特性の解明を行った。

A. 研究目的

エストロゲンアンタゴニストであるタモキシフェンに含まれるジアリールエチレン構造を有する化合物を合成し非ステロイド作用として電位依存性あるいはリガンド依存性イオンチャネルに対する作用を調査する。また製紙表面加工等に汎用され自然界に豊富に存在する松脂の成分であるデヒドロアビエチン酸の誘導体の化学合成を行い、天然資源誘導体が持つイオンチャネルに対する作用を調査する。

アフリカツメガエル卵母細胞は遺伝子クローニングされた cDNA を利用することにより、目的とするタンパク質を簡便に発現できる系として広く用いられている。発現させたタンパク質は均一であり、各種化合物の作用の比較を確実に行うことができる。野生型の cDNA を分子生物学的手法により改変を加え、変異型のタンパク質を発現することも容易である。この変異型タンパク質に対する作用を調べることにより、化合物の作用点を特定することも可能である。これらの利点をリスク評価に活かすことを目的とし、アンチエスト

ロゲンであるタモキシフェンおよびその関連物質のイオン・チャネル型 ATP 受容体に対する作用を一部検討し、評価系としての有用性を確認した。

また、化学物質のリスク評価のハイスループット化へ向けてその基盤となる評価系の構築と評価プロトコル確立のための基礎実験を行った。細胞膜に発現するイオンチャネル・トランスポーター・受容体に対する化学物質のリスク評価を行う系として、ヒト由来培養細胞(HEK293 細胞)を用いた発現系を構築した。この系を用いて一部の化学物質の作用を検討した。

B. 研究方法

タモキシフェンモ (1) は 4 置換オレフィンでありステロイド活性には、アンモニウム基の結合し

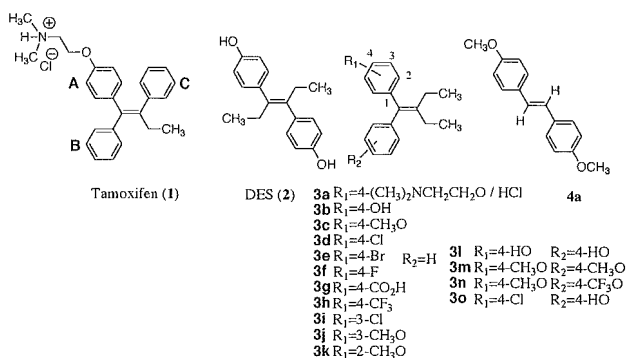
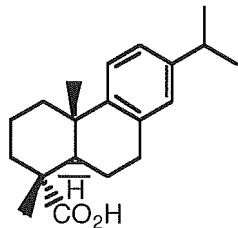


図1

たベンゼン環(A)と同じオレフィン炭素に結合するベンゼン環(B)のパラ位の生体内での酸化による、フェノール基の生成が必須であることが分かっている。このようなフェノール基の存在が膜タンパク質との相互作用に重要であるかは不明である。

そこで、合成的に簡便で誘導体合成に有用で、かつ一般に汎用されている化学物質の部分構造となりうるジアリールエチレン構造を抽出してその誘導体の合成に着手した。なお、ステロイドアンタゴニストである DES も BK チャンネル開口活性が報告されており、スチルベン誘導体について今年度はその一部の検討を行った (図1)。また製紙表面加工等に汎用され自然界に豊富に存在する松脂の成分であるデヒドロアビエチン酸(5)の誘導体の化学合成を行った (図2)。



Dehydroabietic acid (5)

図2

ATP 受容体チャンネル(P2X2 受容体)をコードするcDNA を Bluescript II SK(-)にサブクローニングした。これを Not I で直鎖化し、鋳型として、RNA をインビトロ合成した。コラゲナーゼ処理により濾胞細胞を除去したアフリカツメガエル卵母細胞に、実体顕微鏡下、RNA を注入し、18°C で4-6日インキュベートすることにより、受容体を発現させた。この卵母細胞に双ガラス電極膜電位固定法を適用し膜電流測定を行なった。なお、タモキシフェンをのぞく化合物は本研究事業の主任研究者である大和田の研究室で合成されたものであり、化合物の番号は研究室における通し番号に従った。

また、Ca²⁺依存性 K⁺チャンネル(hSlo α, rSlo α, hSlo β₁, rSlo β₁, hSlo β₄)、遅延整流性 K⁺チャンネル(HERG, KvLQT1, minK)、電位依存性 Ca²⁺チャンネル(Ca_v1.2,

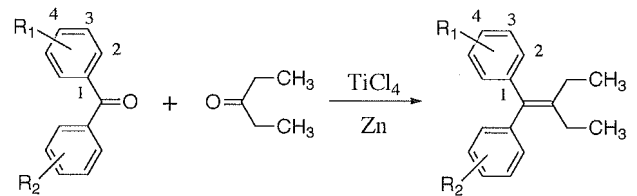
Ca_v1.3, Ca_v2.1, Ca_v2.2)、電位依存性 Na⁺チャンネル(SCN5A)、Na⁺-Ca²⁺交換体(NCX1.1)を pcDNA3 にサブクローニングし、哺乳動物細胞を用いた一過性発現系の構築を行った。さらにこの系を用いてタモキシフェン類縁化合物およびスチルベン誘導体ならびに松脂の成分について化合物の作用を評価した。評価は 1) 膜電位感受性色素を用い化合物の(主としてカリウムチャンネルに対する)作用による膜電位変化を蛍光プレートリーダーを用いてハイスループットに行い、さらに 2) ホールセルパッチクランプ法およびインサイドアウトパッチクランプ法により詳細に検討した。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

化合物3(図1)は基本的には置換ベンゾフェノンとペンタン-3-オンとの McMurry カップリング反応によって合成した。収率は50~80%で生成物を得ることが出来た。カラムクロマトグラフィーによって精製した。



一方スチルベン誘導体は購入した。置換基を有する様々なスチルベン誘導体の合成については今後の検討課題である。

またデヒドロアビエチン酸(5)から容易に誘導化される誘導体を合成しイオンチャンネルへの効果を調べた。以前デヒドロアビエチン酸(5)のチャンネルへの効果を調査した経緯があるためである。

使用したタモキシフェン誘導体(図1参照)はすべて脂溶性が高く、溶解には DMSO の補助が必要であった。この溶液を用いて ATP により誘発されイオン電流に対する作用を検討したところ、影響は認められるものの、濃度依存性等に再現性がうまく得られない例が見られた。このことから、電流測定の実験系として

普通に用いられるポリプロピレン等のプラスチック製品の壁に化合物が付着し、遊離濃度が一定に保たれない可能性が考えられた。そこで、水溶液の作製、希釈、保管をすべてガラス容器を用いて行なった。この方法により、再現性の高いデータを得ることができた。

ATPにより誘発される電流に対し、タモキシフェンは $10 \mu\text{M}$ の濃度で弱い増強を示した。compound #1 は 1 nM から $100 \mu\text{M}$ の濃度範囲で増強作用を示したが、最も強い増強は 10 nM で認められた。compound #2 は $100 \mu\text{M}$ でのみ弱い増強作用を示した。compound #4 は 100 nM から $100 \mu\text{M}$ の濃度範囲で増強作用を示し、最も強い増強は $100 \mu\text{M}$ で認められた。compound #9 は 100 nM および $1 \mu\text{M}$ で弱い増強作用を示した。compound #17 は $1 \mu\text{M}$ と $100 \mu\text{M}$ で弱い増強を示したが、 $10 \mu\text{M}$ では逆に弱い抑制を示した。compound #35 では 10 nM で弱い増強、 $1 \mu\text{M}$ および $100 \mu\text{M}$ でこれよりも強い増強が認められた。compound #47 は、 10 nM で比較的強い増強を示し、 $1 \mu\text{M}$ および 100 nM でこれより弱い増強が認められた。以上の作用はいずれも可逆的であった。

低濃度で比較的強い増強を示した compound #1 を用いて、作用の ATP 濃度依存性、電位依存性を解析した。ATP 濃度を変えた場合、最も強い増強は $30 \mu\text{M}$ で得られ、これより高くても低くても作用は減弱した。膜電位を -50 mV から -110 mV へと変化させる実験では、compound #1 の作用に電位に依存した変化は認められなかった。

各種イオンチャンネルおよび交換体のヒト培養細胞における発現系を構築した。

Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャンネルの活性に対するタモキシフェン誘導体化合物の作用を検討した。タモキシフェンは $10 \mu\text{M}$ の濃度で弱い増強を示した。compound 4a (図 1) は $1 \sim 10 \mu\text{M}$ において増強作用を示した。一方、12,14 ジクロロデヒドロアピエチン酸は $10 \mu\text{M}$ において弱い増強作用を示したのに対し、化合物#13C はほとんど作用を示さず、これに対し#31 は弱い増強作用を示した。

しかしながら、#33C は著明な Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャンネル開口作用を示した。この化合物は HEK293 細胞に内在性に発現する電位依存性 K^{+} チャンネルに対してはむしろ弱い遮断作用を示した。これらの結果から、電位依存性 K^{+} チャンネルファミリーの中でもサブタイプ特異的に遮断作用あるいは開口作用を示すことが明らかとなった。

D. 考察

合成した化合物を分担研究者の中澤、赤羽によってチャンネルへの効果を調査した。

タモキシフェン誘導体について通常のプラスチック製品を溶解、保存等に用いた場合では再現性のあるデータは得られなかったが、ガラス製品に替えたところ再現性のあるデータが得られた。このことは、脂溶性の化合物、特に、今回用いたような複雑な濃度依存性を示す化合物については、水溶液から器具への付着に注意する必要があることを示している。

関連化合物のうち、compound #2 以外はタモキシフェンより低濃度で作用を示した。compound #1, 2, 4, 17 の 4 つの化合物は置換基がひとつ異なるだけで構造的に近いが、共通して増強作用をしめすものの、作用を示す濃度にはばらつきが見られた。 10 nM で増強を示したのは compound #1, 47 の 2 化合物であったが、この 2 つの構造はあまり似通っていない。このように、今回の検討では、化合物の構造と作用の間に強い相関は見いだされなかった。このことから、1) これらの化合物の作用点はひとつではない、さらに、2) 化合物の作用態度がひとつではない、などの可能性が考えられる。compound #1 のように高濃度側で増強作用が減弱する、あるいは、compound #35 のように濃度を次第に上げていくと作用がジグザク状に増減する、という複雑な濃度依存性が見られたことから考えて、これらの化合物の作用態度が増強だけではなく、この増強を自ら抑制すると推察される。このような作用態度は古典的な薬理学の濃度-作用関係から逸脱しているが、化学物質のリスクを考える上で正しく評価する必要があると考えられる。

compound #17 について行なった詳細な検討から、この化合物の増強作用は ATP あるいは電位に依存

しないことが示された。この結果はこれらの化合物は ATP の受容体に対する結合やイオンのイオン・チャネル透過を単純に抑制するものではないことを示している。また、このイオン・チャネル型 ATP 受容体に存在することが知られている、電位依存性活性化機構はこれらの化合物では影響を受けないことが示唆される。

compound #1, 47 などが 1 nM あるいは 10 nM という極めて低い濃度で効果を示したことは注目すべきであるかも知れない。非ホルモン性の急性の作用がこのような低濃度で認められることはこれまで看過されていた可能性もあり、種々の化学物質の有害性を検討する上で考慮に入れる可能性も考えられる。

以上、このような検討を通じ、この発現系は各種化学物質の細胞機能への影響を評価するのに有用であることが示された。

電位依存性 K⁺チャネルファミリーは蛋白分子内に相同性の高い領域とサブタイプ固有の領域を有する。よってこれら一連の K⁺チャネルサブタイプに対する化合物#33C の作用をさらに検討することにより、化合物#33C の特異的な結合に関与するアミノ酸を特定することができ、化合物#33C が認識する蛋白構造を推定することができるであろう。特に K⁺チャネルファミリーはイオンチャネルの中でも早くから X 線結晶回折による 3 次元構造の解析が進んでいることから、化学物質の構造とそれが結合する蛋白の高次構造を計算する上で有用なプラットフォームとなる。今後、さらに低濃度での作用や構造の異なる受容体等に対する作用も検討する必要がある。

E. 結論

アンチエストロゲンであるタモキシフェンおよびその関連化合物のイオン・チャネル型 ATP 受容体に対する作用をアフリカツメガエル卵母細胞発現系で行ない、この系が各種化学物質のリスク評価に有用となりうることを示した。また、nM という低濃度で作用を示す化合物も確認された。この低濃度での作用、および複雑な濃度-作用が認められる例があることから、

有害作用を検討する上で注意が必要であると考えられた。

哺乳類細胞発現系を用いた化学物質リスク評価系として各種イオンチャネル (Ca²⁺チャネル、Na⁺チャネル、K⁺チャネル、Na⁺-Ca²⁺交換体) の一過性発現系を構築した。その一部を用いてステロイドのフラグメント構造を持つ化合物および自然界に豊富に存在するデヒドロアビエチン酸の誘導体について作用を検討し、いくつかの化合物がカルシウム依存性 K⁺チャネルに対して著明な開口作用を示すことを見出した。

基本的な構造を有するタモキシフェン誘導体および自然界に豊富に存在するデヒドロアビエチン酸誘導体はチャネルへの開口活性を有し、生物学的な応答を引き起こすことが判明しつつある。さらにコンビナトリアルな合成法を取り入れ、基本部分構造の組み合わせた多種類の化合物合成を行う必要がある。

F. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yu, S., Tashima, T., Mochizuki, Y., Toriumi, Y., Adachi-Akahane, S., Nonomura, T., Cheng, M., Ohwada, T. Compounds Structurally Related to Tamoxifen as Openers of Large-Conductance Calcium-Activated K⁺ Channel *Chem. Pharm. Bull.*, 53, 1372-1373 (2005).

Sakamoto, K., Nonomura, T., Ohya, S., Muraki, K., Ohwada T., Imaizumi, Y.

Mechanisms of BK channel activation by a novel BK channel opener, 12, 14-dichlorodehydroabietic acid *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 316, 144-153 (2006)

Nakazawa, K. and Ohno, Y. Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel. *Eur. J. Pharmacol.* 508, 23-30 (2005)

Nakazawa, K., Yamakoshi, Y., Tsuchiya, T. and Ohno, Y. Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 518, 107-110 (2005)

Uemura, K., Adachi-Akahane, S., Shintani-Ishida, K., Yoshida, K.: Carbon monoxide protects cardiomyogenic cells against ischemic death through L-type Ca²⁺ channel inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334(2): 661-668 (2005).

Maekawa, K., Saito, Y., Ozawa, S., Adachi-Akahane, S., Kawamoto, M., Komamura, K., Shimizu, W., Ueno, K., Kamakura, S., Kamatani, N., Kitakaze, M., Sawada, J.: Genetic polymorphisms and haplotypes of the human cardiac sodium channel alpha subunit gene (SCN5A) in Japanese and their association with arrhythmia. *Ann. Hum. Genet.* 69(4): 413-28 (2005).

Yokoyama, U., Minamisawa, S., Adachi-Akahane, S., Akaike, Toru, et al.: Multiple transcripts of Ca²⁺ channel subunits and a novel spliced variant of α_{1C} subunit in the rat ductus arteriosus. *Am. J. Physiol.* 290: H1660-H1667 (2006).

2. 学会発表

鳥海佳美, 田島俊彦, 水流弘道, 大和田智彦, 赤羽悟美. 新規デヒドロアビエチン酸誘導体のBKチャンネル開口作用 (講演番号 O3G1-5) 第79回日本薬理学会年会 (2006年3月, 横浜)

中澤憲一, 山越葉子, 土屋利江, 大野泰雄. 原子間力顕微鏡観察による P2X2 受容体が孔形成タンパク質であることの確認. 第79回日本薬理学会年会 (2006年3月, 横浜)

佐藤薫, 大野泰雄, 中澤憲一. エストロゲンは歯状回顆粒細胞からの BDNF release を PKA 依存的に促進する. 第79回日本薬理学会年会 (2006年

3月, 横浜)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

大和田 智彦, 赤羽 悟美 ら

発明名称: カリウムチャンネル開口物質

出願日: 2006/01/16

出願番号: 特願 2006-007994

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費(化学物質リスク研究事業)

分担報告研究報告書

タモキシフェンや松脂の成分の誘導体合成に関する研究

分担研究者 大和田 智彦 東京大学大学院薬学系研究科薬化学教室・教授

研究要旨

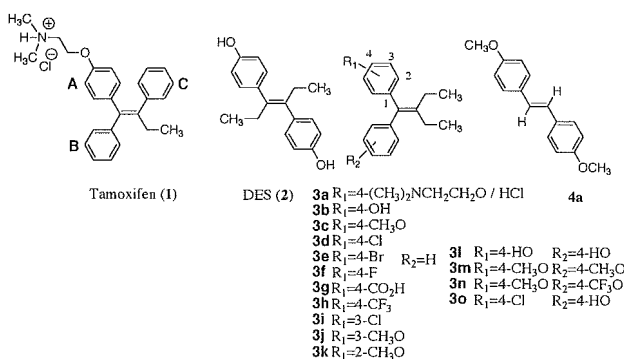
エストロゲンアンタゴニストであるタモキシフェンは、その活性は比較的弱いものの非ステロイド作用としてカルシウム依存性カリウムチャンネル(BKチャンネル)開口活性を持つことが報告されている。タモキシフェンの作用点はイオンチャンネルのポアを形成する α サブユニットではなく、 β サブユニットであると報告されている。本分担研究ではタモキシフェンの構造から基本部分構造を抽出し、簡略化して、より汎用化学物質の構造に近い構造を設計し、その化学物質を合成した。また製紙表面加工等に汎用され自然界に豊富に存在する松脂の成分であるデヒドロアビエチン酸の誘導体の化学合成を行った。

A. 研究目的

エストロゲンアンタゴニストであるタモキシフェンに含まれるジアリールエチレン構造を有する化合物を合成し非ステロイド作用として電位依存性あるいはリガンド依存性イオンチャンネルに対する作用を調査する。また製紙表面加工等に汎用され自然界に豊富に存在する松脂の成分であるデヒドロアビエチン酸の誘導体の化学合成を行い、天然資源誘導体を持つイオンチャンネルに対する作用を調査する。本分担者は化合物の設計と合成を行った。

B. 研究方法

タモキシフェンモ(1)は4置換オレフィンでありステロイド活性には、アンモニウム基の結合し



たベンゼン環(A)と同じオレフィン炭素に結合するべ

ンゼン環(B)のパラ位の生体内での酸化による、フェノール基の生成が必須であることが分かっている。このようなフェノール基の存在が膜タンパク質であるイオンチャンネルとの相互作用に重要であるかは不明である。

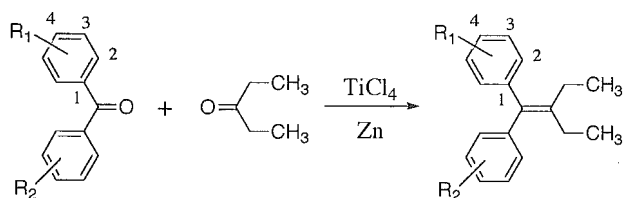
そこで、合成的に簡便で誘導体合成に有用で、かつ一般に汎用されている化学物質の部分構造となりうるジアリールエチレン構造を抽出してその誘導体の合成に着手した。なお、ステロイドアンタゴニストであるDESもBKチャンネル開口活性が報告されており、スチルベン誘導体について今年度はその一部の検討を行った。また製紙表面加工等に汎用され自然界に豊富に存在する松脂の成分であるデヒドロアビエチン酸(5)の誘導体の化学合成を行った。

(倫理面への配慮)

特になし。

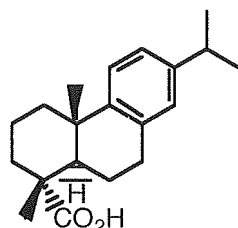
C. 研究結果

化合物3は基本的には置換ベンゾフェノンとペンタン-3-オンとのMcMurryカップリング反応によって合成した。収率は50~80%で生成物を得ることが出来た。カラムクロマトグラフィーによって精製した。



一方スチルベン誘導体は購入した。置換基を有する様々なスチルベン誘導体の合成については今後の検討課題である。

またデヒドロアビエチン酸(5)から容易に誘導化



Dehydroabietic acid (5)

される誘導体群を合成中であり、合成を終了した化合物についてイオンチャネルへの効果を調べつつある。以前デヒドロアビエチン酸(5)のチャネルへの効果を調査した経緯があるためである。

D. 考察

合成した化合物を分担研究者の赤羽、中澤によってチャネルへの効果を調査中である。誘導体の中には遅延整流性カリウムチャネルに対しては弱い抑制作用を示す一方でカルシウム依存性カリウムチャネルに対して開口作用を示す化合物を見出し、その開口活性に関わる官能基を同定しつつある。タモキシフェン誘導体についても弱いながらもカルシウム依存性カリウムチャネルに対して開口活性を示す化合物を見出した。タモキシフェンおよびこれに構造が類似した化合物7種のイオンチャネル型受容体に対する作用を検討し細胞外 ATP の受容体である P2X2 受容体を介するイオン電流に対しどのような影響を与えるか調べている。

E. 結論

基本的な構造を有するタモキシフェン誘導体および自然界に豊富に存在するデヒドロアビエチン酸誘導体はチャネルへの開口活性を有し、生物学的な応答を引き起こすことが判明しつつある。さらにコンビナトリアルな合成法を取り入れ、基本部分構造の組み合わ

せた多種類の化合物合成を行う必要がある。

F. 健康危機情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yu, S., Tashima, T., Mochizuki, Y., Toriumi, Y., Adachi-Akahane, S., Nonomura, T., Cheng, M., Ohwada, T. Compounds Structurally Related to Tamoxifen as Openers of Large-Conductance Calcium-Activated K⁺ Channel
Chem. Pharm. Bull., 53, 1372-1373 (2005).

Sakamoto, K., Nonomura, T., Ohya, S., Muraki, K.

Ohwada T., Imaizumi, Y.

Mechanisms of BK channel activation by a novel BK channel opener, 12, 14-dichlorodehydroabietic acid
J. Pharmacol. Exper. Ther., 316, 144-153 (2006)

2. 学会発表

鳥海佳美, 田島俊彦, 水流弘道, 大和田智彦, 赤羽悟美. 新規デヒドロアビエチン酸誘導体のBKチャネル開口作用 (講演番号 O3G1-5) 第79回日本薬理学会年会 (2006年3月, 横浜)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

発明名称: カリウムチャネル開口物質

出願日: 2006/01/16

出願番号: 特願 2006-007994

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

発現系を利用したイオン・チャネル型受容体に対するリスク評価に関する研究

分担研究者 中澤 憲一 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・第二室長

研究要旨

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、アンチエストロゲンであるタモキシフェンおよびこれに構造が類似した化合物 7 種のイオン・チャネル型受容体に対する作用を検討した。細胞外 ATP の受容体である P2X2 受容体を介するイオン電流をに対し、検討した化合物のほとんどが影響を与えた。いくつかの化合物では 10 nM という低濃度でこの電流を増強することが確認された。以上のことから、この系が一連の関連化合物のリスク評価に利用可能であることが示された。

A. 研究目的

アフリカツメガエル卵母細胞は遺伝子クローニングされた cDNA を利用することにより、目的とするタンパク質を簡便に発現できる系として広く用いられている。発現させたタンパク質は均一であり、各種化合物の作用の比較を確実にこなうことができる。野生型の cDNA を分子生物学的手法により改変を加え、変異型のタンパク質を発現することも容易である。この変異型タンパク質に対する作用を調べることで、化合物の作用点を特定することも可能である。これらの利点をリスク評価に活かすことを目的とし、アンチエストロゲンであるタモキシフェンおよびその関連物質のイオン・チャネル型 ATP 受容体に対する作用を検討し、評価系としての有用性を確認した。

B. 研究方法

ATP 受容体チャネル(P2X2 受容体)をコードする cDNA を Bluescript II SK(-)にサブクローニングした。これを Not I で直鎖化し、鋳型として、RNA をインビトロ合成した。コラゲナーゼ処理により濾胞細胞を除去したアフリカツメガエル卵母細胞に、実体顕微鏡下、RNA を注入し、18°C で 4-6 日インキュベートすることにより、受容体を発現させた。この卵母細胞に双ガラ

ス電極膜電位固定法を適用し膜電流測定を行なった。タモキシフェンをのぞく化合物は本研究事業の主任研究者である大和田の研究室で合成されたものであり、この報告書では研究室における通し番号で記す。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

使用した薬物はすべて脂溶性が高く、溶解には DMSO の補助が必要であった。この溶液を用いて ATP により誘発されイオン電流に対する作用を検討したところ、影響は認められるものの、濃度依存性等に再現性がうまく得られない例が見られた。このことから、電流測定の実験系として普通に用いられるポリプロピレン等のプラスチック製品の壁に化合物が付着し、遊離濃度が一定に保たれない可能性が考えられた。そこで、水溶液の作製、希釈、保管をすべてガラス容器を用いて行なった。この方法により、再現性の高いデータを得ることができた。

ATP により誘発される電流に対し、タモキシフェンは 10 μ M の濃度で弱い増強を示した。compound #1 は 1 nM から 100 μ M の濃度範囲で増強作用を

示したが、最も強い増強は 10 nM で認められた。compound #2 は 100 μ M でのみ弱い増強作用を示した。compound #4 は 100 nM から 100 μ M の濃度範囲で増強作用を示し、最も強い増強は 100 μ M で認められた。compound #9 は 100 nM および 1 μ M で弱い増強作用を示した。compound #17 は 1 μ M と 100 μ M で弱い増強を示したが、10 μ M では逆に弱い抑制を示した。compound #35 では 10 nM で弱い増強、1 μ M および 100 μ M でこれよりも強い増強が認められた。compound #47 は、10 nM で比較的強い増強を示し、1 μ M および 100 nM でこれより弱い増強が認められた。以上の作用はいずれも可逆的であった。

低濃度で比較的強い増強を示した compound #1 を用いて、作用の ATP 濃度依存性、電位依存性を解析した。ATP 濃度を変えた場合、最も強い増強は 30 μ M で得られ、これより高くても低くても作用は減弱した。膜電位を -50 mV から -110 mV へと変化させる実験では、compound #1 の作用に電位に依存した変化は認められなかった。

D. 考察

通常のプラスチック製品を溶解、保存等に用いた場合では再現性のあるデータは得られなかったが、ガラス製品に替えたところ再現性のあるデータが得られた。このことは、脂溶性の化合物、特に、今回用いたような複雑な濃度依存性を示す化合物については、水溶液から器具への付着に注意する必要があることを示している。

関連化合物のうち、compound #2 以外はタモキシフェンより低濃度で作用を示した。compound #1, 2, 4, 17 の 4 つの化合物は置換基がひとつ異なるだけで構造的に近いが、共通して増強作用をしめすものの、作用を示す濃度にはばらつきが見られた。10 nM で増強を示したのは compound #1, 47 の 2 化合物であったが、この 2 つの構造はあまり似通っていない。このように、今回の検討では、化合物の構造と作用の間に強い相関は見いだされなかった。このことから、1) これらの化合物の作用点はひとつではない、さらに、2) 化合物の作用態度がひとつではない、などの

可能性が考えられる。compound #1 のように高濃度側で増強作用が減弱する、あるいは、compound #35 のように濃度を次第に上げていくと作用がジグザク状に増減する、という複雑な濃度依存性が見られたことから考えて、これらの化合物の作用態度が増強だけではなく、この増強を自ら抑制すると推察される。このような作用態度は古典的な薬理学の濃度-作用関係から逸脱しているが、化学物質のリスクを考える上で正しく評価する必要があると考えられる。

compound #17 について行なった詳細な検討から、この化合物の増強作用は ATP あるいは電位に依存しないことが示された。この結果はこれらの化合物は ATP の受容体に対する結合やイオンのイオン・チャネル透過を単純に抑制するものではないことを示している。また、このイオン・チャネル型 ATP 受容体が存在することが知られている、電位依存性活性化機構はこれらの化合物では影響を受けないことが示唆される。

compound #1, 47 などが 1 nM あるいは 10 nM という極めて低い濃度で効果を示したことは注目すべきであるかも知れない。非ホルモン性の急性の作用がこのような低濃度で認められることはこれまで看過されていた可能性もあり、種々の化学物質の有害性を検討する上で考慮に入れる可能性も考えられる。

以上、このような検討を通じ、この発現系は各種化学物質の細胞機能への影響を評価するのに有用であることが示された。

E. 結論

アンチエストロゲンであるタモキシフェンおよびその関連化合物のイオン・チャネル型 ATP 受容体に対する作用をアフリカツメガエル卵母細胞発現系で行ない、この系が各種化学物質のリスク評価に有用となりうることを示した。また、nM という低濃度で作用を示す化合物も確認された。この低濃度での作用、および複雑な濃度-作用が認められる例があることから、有害作用を検討する上で注意が必要であると考えられた。

F. 健康危機情報

なし.

F. 研究発表

1. 論文発表

Nakazawa, K. and Ohno, Y. Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel. Eur. J. Pharmacol. 508, 23-30 (2005)

Nakazawa, K., Yamakoshi, Y., Tsuchiya, T. and Ohno, Y. Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor. Eur. J. Pharmacol. 518, 107-110 (2005)

2. 学会発表

中澤憲一, 山越葉子, 土屋利江, 大野泰雄. 原子間力顕微鏡観察による P2X2 受容体が孔形成タンパク質であることの確認. 第 79 回日本薬理学会年会 (2006 年 3 月)

佐藤薫, 大野泰雄, 中澤憲一. エストロゲンは歯状回顆粒細胞からの BDNF release を PKA 依存的に促進する. 第 79 回日本薬理学会年会 (2006 年 3 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

発現系を利用したイオンチャネルに対するリスク評価に関する研究

分担研究者 赤羽 悟美 東邦大学医学部医学科薬理学講座 助教授

研究要旨

哺乳類細胞発現系を用いた化学物質リスク評価系として各種イオンチャネル(Ca^{2+} チャネル、 Na^+ チャネル、 K^+ チャネル、 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換体)の一過性発現系を構築した。その一部を用いてステロイドのフラグメント構造を持つ化合物および自然界に豊富に存在するデヒドロアビエチン酸の誘導体について作用を膜電位感受性色素を検討した。その結果、いくつかの化合物がカルシウム依存性 K^+ チャネルに対して著明な開口作用を示すことを見出した。

A. 研究目的

化学物質のリスク評価のハイスループット化へ向けその基盤となる評価系の構築と評価プロトコール確立のための基礎実験を行った。細胞膜に発現するイオンチャネル・トランスポーター・受容体に対する化学物質のリスク評価を行う系として、ヒト由来培養細胞(HEK293 細胞)を用いた発現系を構築した。この系を用いて一部の化学物質の作用を検討した。

B. 研究方法

Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル($\text{hSlo}\alpha$, $\text{rSlo}\alpha$, $\text{hSlo}\beta_1$, $\text{rSlo}\beta_1$, $\text{hSlo}\beta_4$)、遅延整流性 K^+ チャネル(HERG, KvLQT1 , minK)、電位依存性 Ca^{2+} チャネル($\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v2.2$)、電位依存性 Na^+ チャネル(SCN5A)、 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換体(NCX1.1)を pcDNA3 にサブクローニングし、哺乳動物細胞を用いた一過性発現系の構築を行った。さらにこの系を用いてタモキシフェン類縁化合物およびスチルベン誘導体ならびに松脂の成分について化合物の作用を評価した。評価は 1) 膜電位感受性色素を用い化合物の(主としてカリウムチャネルに対する)作用による膜電位変化を蛍光プレートリーダーを用いてハイスループットに行い、さらに 2) ホールセルパッチクランプ法およびインサイドアウトパッチクランプ法により詳細に検討し

た。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

各種イオンチャネルおよび交換体のヒト培養細胞における発現系を構築した。

Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルの活性に対する化合物(Fig. 1)の作用を検討した。タモキシフェンは $10 \mu\text{M}$ の濃度で弱い増強を示した。compound 4a は $1\sim 10 \mu\text{M}$ において増強作用を示した。一方、12,14 ジクロロデヒドロアビエチン酸は $10 \mu\text{M}$ において弱い増強作用を示したのに対し、化合物#13C はほとんど作用を示さず、これに対し#31 は弱い増強作用を示した。しかしながら、#33C は著明な Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル開口作用を示した。この化合物は HEK293 細胞に内在性に発現する電位依存性 K^+ チャネルに対してはむしろ弱い遮断作用を示した。これらの結果から、電位依存性 K^+ チャネルファミリーの中でもサブタイプ特異的に遮断作用あるいは開口作用を示すことが明らかとなった。

D. 考察

電位依存性 K^+ チャネルファミリーは蛋白分子内

に相同性の高い領域とサブタイプ固有の領域を有する。よってこれら一連の K⁺チャネルサブタイプに対する化合物#33C の作用をさらに検討することにより、化合物#33C の特異的な結合に関与するアミノ酸を特定することができ、化合物#33C が認識する蛋白構造を推定することができるであろう。特に K⁺チャネルファミリーはイオンチャネルの中でも早くから X 線結晶回折による 3 次元構造の解析が進んでいることから、化学物質の構造とそれが結合する蛋白の高次構造を計算する上で有用なプラットフォームとなる。今後、さらに低濃度での作用や構造の異なる受容体等に対する作用も検討する必要がある。

E. 結論

哺乳類細胞発現系を用いた化学物質リスク評価系として各種イオンチャネル (Ca²⁺チャネル、Na⁺チャネル、K⁺チャネル、Na⁺-Ca²⁺交換体) の一過性発現系を構築した。その一部を用いてステロイドのフラグメント構造を持つ化合物および自然界に豊富に存在するデヒドロアピエチン酸の誘導体について作用を検討し、いくつかの化合物がカルシウム依存性 K⁺チャネルに対して著明な開口作用を示すことを見出した。

F. 健康危機情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sha Yu, Toshihiko Tashima, Yumi, Mochizuki, Yoshimi Toriumi, Satomi Adachi-Akahane, Taro Nonomura, Maosheng Cheng, Tomohiko Ohwada: Compounds Structurally Related to Tamoxifen as Openers of Large-Conductance Calcium-Activated K⁺ Channel. *Chem. Pharm. Bull.*, 53, 1372-1373 (2005).
- 2) Uemura, K., Adachi-Akahane, S., Shintani-Ishida, K., Yoshida, K.: Carbon monoxide protects

cardiomyogenic cells against ischemic death through L-type Ca²⁺ channel inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334(2): 661-668 (2005).

- 3) Maekawa, K., Saito, Y., Ozawa, S., Adachi-Akahane, S., Kawamoto, M., Komamura, K., Shimizu, W., Ueno, K., Kamakura, S., Kamatani, N., Kitakaze, M., Sawada, J.: Genetic polymorphisms and haplotypes of the human cardiac sodium channel alpha subunit gene (SCN5A) in Japanese and their association with arrhythmia. *Ann. Hum. Genet.* 69(4): 413-28 (2005).
- 4) Yokoyama, U., Minamisawa, S., Adachi-Akahane, S., Akaike, Toru, et al.: Multiple transcripts of Ca²⁺ channel subunits and a novel spliced variant of α_{1C} subunit in the rat ductus arteriosus. *Am. J. Physiol.* 290: H1660-H1667 (2006).

2. 学会発表

鳥海佳美、田島俊彦、水流弘通、大和田智彦、赤羽悟美：新規ジヒドロアピエチン酸誘導体の BK チャネル開口作用 (2006 年 3 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

大和田 智彦, 赤羽 悟美 ら 特許出願「BK チャネル開口物質」(2005・2006)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III.研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yu, S., Tashima, T., Mochizuki, Y., Toriumi, Y., Adachi-Akahane, S., Nonomura, T., Cheng, M., Ohwada, T.	Compounds Structurally Related to Tamoxifen as Openers of Large-Conductance Calcium-Activated K ⁺ Channel	<i>Chem. Pharm. Bull.</i>	53	1372-1373	2005
Sakamoto, K., Nonomura, T., Ohya, S., Muraki, K. Ohwada T., Imaizumi, Y.	Mechanisms of BK channel activation by a novelBK channel opener, 12, 14-dichlorodehydro- abietic acid	<i>J. Pharmacol. Exper. Ther.</i>	316	144-153	2006
Nakazawa, K. and Ohno, Y.	Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel.	<i>Eur. J. Pharmacol.</i>	508	23-30	2005
Nakazawa, K., Yamakoshi, Y., Tsuchiya, T. and Ohno, Y.	Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor.	<i>Eur. J. Pharmacol.</i>	518	107-110	2005
Uemura, K., Adachi-Akahane, S., Shintani-Ishida, K., Yoshida, K.:	Carbon monoxide protects cardiomyogenic cells against ischemic death through L-type Ca ²⁺ channel inhibition.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	334	661-668	2005
Maekawa, K., Saito, Y., Ozawa, S., Adachi-Akahane, S., Kawamoto, M., Komamura, K., Shimizu, W., Ueno, K., Kamakura, S., Kamatani, N., Kitakaze, M., Sawada, J.	Genetic polymorphisms and haplotypes of the human cardiac sodium channel alpha subunit gene (SCN5A) in Japanese and their association with arrhythmia.	<i>Ann. Hum. Genet.</i>	69	413-28	2005

Yokoyama, U., Minamisawa, S., <u>Adachi-Akahane,</u> <u>S.</u> , Akaike, Toru, et al.:	Multiple transcripts of Ca ²⁺ channel subunits and a novel spliced variant of α_{1C} subunit in the rat ductus arteriosus.	<i>Am. J. Physiol.</i>	290	H1660- H1667	2006
--	--	------------------------	-----	-----------------	------

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Compounds Structurally Related to Tamoxifen as Openers of Large-Conductance Calcium-Activated K^+ Channel

Yu SHA,^{a,b} Toshihiko TASHIMA,^a Yumi MOCHIZUKI,^a Yoshimi TORIUMI,^a Satomi ADACHI-AKAHANE,^a Taro NONOMURA,^a Maosheng CHENG,^b and Tomohiko OHWADA^{*,a}

^a Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113–0033, Japan; and ^b Shenyang Pharmaceutical University, 103 Wenhua Road, Shenyang, Liaoning, 110016, P.R. China. Received July 26, 2005; accepted August 18, 2005; published online August 22, 2005

We found that a variety of compounds containing partial structures of tamoxifen showed activity as chemical modulators of large-conductance calcium-activated K^+ channels (BK channels).

Key words large-conductance calcium-activated K^+ channel; tamoxifen; channel opener; (xeno)estrogen; electrophysiology

Large-conductance calcium-activated K^+ channels (BK channels) characteristically respond to two distinct physiological stimuli, *i.e.*, changes in membrane voltage and in cytosolic Ca^{2+} concentration.¹⁾ The BK channel opens in response to an increase in cytosolic Ca^{2+} concentration and membrane depolarization, resulting in an increase of K^+ efflux, which leads to rapid hyperpolarization of the excitatory membrane and thus reduces Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels. The BK channel is formed by a tetramer of the pore-forming α -subunit and up to four β -subunits that function to modulate the BK channel.^{2,3)} Recent cloning studies also revealed the presence of multiple splice variants of α -subunits^{4–6)} and multiple subtypes of β -subunits (β_1 , β_2/β_3 and β_4).^{7–9)} Thus, there is a large diversity of BK channels, which may be specific to tissues and organs.^{4–6)} Except for cardiac myocytes, the BK channels are expressed in a number of organ systems, such as smooth muscle cells, skeletal muscle cells, neuronal cells, and secretory epithelial cells,¹⁰⁾ and they have important physiological roles in modulating muscle contraction and neuronal activities, such as synaptic transmission.¹¹⁾

These features and the widespread distribution of the channel throughout the central nervous system and in peripheral tissues offer rich opportunities for discovering novel therapeutic agents based on BK channel modulators, particularly openers.^{12,13)} Chemical channel openers are expected to quench excitatory events that pathologically elevate the cytosolic Ca^{2+} and induce depolarization of the cell membranes, and potentially have specificity for tissues and organs of interest. Well-characterized BK channel openers could be used to treat acute stroke, epilepsy, and bladder overactivity.¹⁴⁾ There is some evidence for the utility of BK channel openers in the treatment of asthma, hypertension, gastric hypermotility and psychoses.¹⁾ Recent studies have shown that the BK channel is one of the targets for the non-genomic effects of (xeno)estrogens, such as tamoxifen and estro-

diol.^{15–19)} The stimulatory action of tamoxifen and 17 β -estradiol on the BK channel activity requires the presence of the β_1 subunit.^{15–19)} Herein, we show that compounds containing partial structures of tamoxifen can activate the human BK channels, possibly through action on the β_1 subunit.

Compounds **3a–o** were synthesized by means of McMurry condensation reaction of a substituted benzophenone derivative and 3-pentanone in the presence of $TiCl_4$ and zinc powder in dry THF with heating at reflux for 4–20 h.²⁰⁾ Preliminary assay by using the fluorescent dye method with DiBAC₄(3) was applied with rat rSlo α and β_1 stably expressing human embryonic kidney (HEK 293) cell lines.²¹⁾ The results are shown in Fig. 1. The magnitude of release of the dye from the inside of the cells upon opening of the BK channels is shown in terms of the normalized decrease of fluorescence of the dye, relative to that in the case of tamoxifen, defined as 100 (%). The observed relative magnitudes were based on a large set of data ($n=11–19$). The larger the value, the stronger the opening activity of a compound. As shown in Fig. 1, the *N,N*-dimethylaminoethoxy group of tamoxifen is not necessary for activity (see **3a**). The acidic phenol functionality is also not essential, but rather hydrophobicity, such as a methoxy (**3c**) or trifluoromethyl group (**3h**), is crucial, particularly at the *para* position. Compounds in which the two benzenes are substituted are less potent (**3l–o**). While diethylstilbestrol (DES) is more potent than tamoxifen in the dye assay, 4,4'-dimethoxystilbene, **4a**, is more potent than the present series of the compounds **3a–o**. In DES and **4a**, the arrangement of the two benzenes with

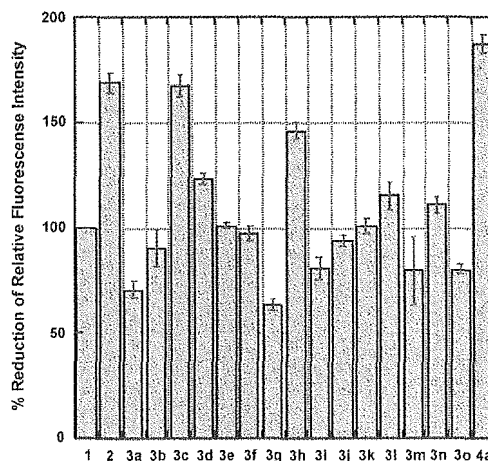
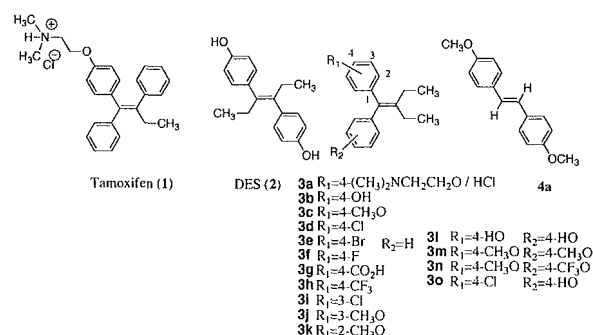


Fig. 1. Fluorescent Dye Assay Result
 $n=11–19$.

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: ohwada@mol.f.u-tokyo.ac.jp

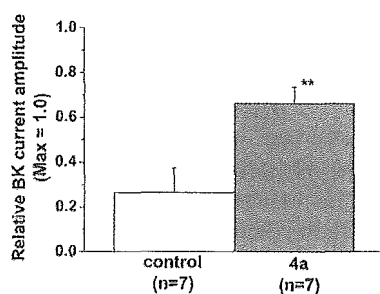


Fig. 2. Electrophysiological Effect of 4a on the BK Channel Current

Vehicle containing DMSO at 0.05–0.1% was used as control. Statistical analysis was performed with Student's *t*-test. $p < 0.05$ was accepted as statistically significant (**).

respect to the central double bond is different from that in 3a–o.

We further investigated the channel opening activity of 4a electrophysiologically (Fig. 2).

The BK channel currents were recorded by the inside-out patch-clamp technique from HEK-293 cells expressing human hSlo α and β_1 subunits.²²⁾ We also repeated the same experiment with rSlo α and β_1 subunits. Compound 4a apparently increased the relative current amplitude, activated by the test potential to 120 mV from the holding potential of -60 mV, as compared with the control. 4a did not show significant effects when hSlo α was expressed without β_1 subunit (data not shown). The half activation potential was shifted from 136.5 ± 4.9 mV ($n=7$) to 120 ± 6.1 mV ($n=7$) by 4a, indicating that the BK channel activity was facilitated by 4a. Clearly, a hydroxyl group on the aromatic ring is not essential for the BK channel opening activity of the tamoxifen derivatives. Thus, the present work suggests a simple but important criterion for the design of tamoxifen derivatives as BK channel openers.

Acknowledgments This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare (H17-Chemistry-006) to T. O. and S. A.-A. A scholarship, provided by the 21st Century Center of Excellence (COE) Program (Japan Society for the Promotion of Sciences) to Y. S. and T. T. is also gratefully acknowledged. We also thank Prof. Yuji Imaizumi, Nagoya City University, Nagoya, Japan, for the gift of the rSlo α and β_1 stably expressing HEK cells. We also appreciate the gift of hSlo α and β_1 from Prof. Ligia Toro, The University of California at Los Angeles.

References

- Gribkoff V. K., Starrett J. E., Jr., Dwoertzky S. I., "Advances in Pharmacology," Vol. 37, ed. by Augst J. T., Anders M. W., Murad F., Coyle J. T., Academic Press, San Diego, 1997, pp. 319–349.
- Niu X., Magleby K. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 11441–11446 (2002).
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chalt B. T., MacKinnon R., *Nature* (London), **417**, 515–522 (2002).
- Garica-Calvo M., Knaus H.-G., McManus O. B., Giangiacomo K. M., Kaczorowski G. J., Garcia M. L., *J. Biol. Chem.*, **269**, 676–682 (1994).
- Tian L., Duncan R. R., Hammond M. S., Coghill L. S., Wen H., Rusinova R., Clark A. G., Levitan I. B., Shipston M. J., *J. Biol. Chem.*, **276**, 7717–7720 (2001).
- Zarei M. M., Eghbali M., Alioua A., Song M., Knaus H. G., Stefani E., Toro L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 10072–10077 (2004).
- Knaus H.-G., Folander K., Garcia-Calvo M., Garcia M. L., Kaczorowski G. J., Smith M., Swanson R., *J. Biol. Chem.*, **269**, 17274–17278 (1994).
- Tanaka Y., Koike K., Alioua A., Shigenobu K., Stefani E., Taro L., *J. Pharmacol. Sci.*, **94**, 339–347 (2004).
- Tseng-Crank J., Godinot N., Johansen T. E., Ahring P. K., Støbæk D., Mertz R., Foster C. D., Olesen S.-P., Reinhart P. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 9200–9205 (1996).
- Knaus H.-G., Schwarzer C., Koch R. O. A., Eberhart A., Kaczorowski G. J., Glossmann H., Wunder F., Pongs O., Garcia M. L., Sperk G., *J. Neurosci.*, **16**, 955–963 (1996).
- Sah P., Faber E. S. L., *Prog. Neurobiol.*, **66**, 345–353 (2002).
- Coghlan M. J., Carroll W. A., Gopalakrishnan M., *J. Med. Chem.*, **44**, 1627–1653 (2001).
- Shieh C.-C., Coghlan M., Sullivan J. P., Gopalakrishnan M., *Pharmacol. Rev.*, **52**, 557–593 (2000).
- Gribkoff V. K., Starrett J. E., Jr., Dwoertzky S. I., Hewawasam P., Boisard C. G. J. R., Huston K., Johnson G., Krishnan B. S., Kinney G. G., Lombardo L. A., Meanwell N. A., Molinoff P. B., Myers R. A., Moon S. L., Ortiz A., Pajor L., Pieschl R. L., Post-Munson D. J., Signor L. J., Srinivas N., Taber M. T., Thalody G., Trojnacki J. T., Wiener H., Yeleswarm K., Yeola S. W., *Nature Medicine*, **7**, 471–477 (2001).
- Tamoxifen derivatives: Valverde M. A., Rojas P., Amigo J., Cosmelli D., Orio P., Bahamonde M. I., Mann G. E., Vergara C., Latorre R., *Science*, **285**, 1929–1931 (1999).
- Tamoxifen derivatives: Dick G. M., Rossow C. F., Smirnov S., Horowitz B., Sanders K. M., *J. Biol. Chem.*, **276**, 34594–34599 (2001).
- Tamoxifen derivatives: Dick G. M., Sanders K. M., *J. Biol. Chem.*, **276**, 44835–44840 (2001).
- Tamoxifen derivatives: Dick G. M., Hunter A. C., Sanders K. M., *Mol. Pharmacol.*, **61**, 1105–1113 (2002).
- Dunncan R. K., *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 47–58 (2005).
- McMurry coupling: Detsi A., Koufaki M., Calogeropoulou T., *J. Org. Chem.*, **67**, 4608–4611 (2002).
- Yamada A., Gaja N., Ohya S., Muraki K., Narita H., Ohwada T., Imaizumi Y., *Jpn. J. Pharmacol.*, **86**, 342–350 (2001).
- Nishimaru K., Eghbali M., Lu R., Marjic J., Stefani E., Toro L., *J. Physiol.*, **559**, 849–862 (2004).

Molecular Mechanisms for Large Conductance Ca^{2+} -Activated K^+ Channel Activation by a Novel Opener, 12,14-Dichlorodehydroabiatic Acid

Kazuho Sakamoto, Taro Nonomura, Susumu Ohya, Katsuhiko Muraki, Tomohiko Ohwada, and Yuji Imaizumi

Department of Molecular and Cellular Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Nagoya, Japan (K.S., S.O., K.M., Y.I.); and Laboratory of Organic and Medicinal Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan (T.N., T.O.)

Received August 4, 2005; accepted September 28, 2005

ABSTRACT

Our recent study has revealed that 12,14-dichlorodehydroabiatic acid (diCl-DHAA), which is synthetically derived from a natural product, abiatic acid, is a potent opener of large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) channel. Here, we examined, by using a channel expression system in human embryonic kidney 293 cells, the mechanisms underlying the BK channel opening action of diCl-DHAA and which subunit of the BK channel (α or $\beta 1$) is the site of action for diCl-DHAA. BK channel activity was significantly enhanced by diCl-DHAA at concentrations of 0.1 μM and higher in a concentration-dependent manner. diCl-DHAA enhanced the activity of $\text{BK}\alpha$ by increasing sensitivity to both Ca^{2+} and membrane potential without changing the single channel conductance. It is notable that the

increase in BK channel open probability by diCl-DHAA showed significant inverse voltage dependence, i.e., larger potentiation at lower potentials. Since coexpression of $\beta 1$ subunit with $\text{BK}\alpha$ did not affect the potency of diCl-DHAA, the site of action for diCl-DHAA is suggested to be $\text{BK}\alpha$ subunit. Moreover, kinetic analysis of single channel currents indicates that diCl-DHAA opens $\text{BK}\alpha$ mainly by decreasing the time staying in a long closed state. Although reconstituted voltage-dependent Ca^{2+} channel current was significantly reduced by 1 μM diCl-DHAA, BK channels were selectively activated at lower concentrations. These results indicate that diCl-DHAA is one of the most potent BK channel openers acting on $\text{BK}\alpha$ and a useful prototype compound to develop a novel BK channel opener.

Large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) channels are expressed in many different types of excitable cells and have significant physiological roles in the regulation of frequency of firing, action potential repolarization, and/or afterhyperpolarization (for reviews, see Vergara et al., 1998; Kaczorowski and Garcia, 1999). BK channel activation by the Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release during excitation-contraction coupling significantly contributes to action potential repolarization/afterhyperpolarization in some smooth muscle cells (Imaizumi et al., 1998; Ohi et al., 2001).

In addition, the negative feedback control of intracellular

Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) by BK channels works to protect cells from Ca^{2+} overload during pathophysiological conditions (Lawson, 2000). Hyperpolarization of neuronal cells by BK channel activation down-regulates the activity of voltage-dependent Na^+ and Ca^{2+} channels and may prevent cell death, which is mainly caused by excess intracellular Ca^{2+} in the setting of brain ischemia following stroke. In smooth muscle cells, BK channels are also activated by spontaneous Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum (Nelson and Quayle, 1995; Bolton and Imaizumi, 1996; Imaizumi et al., 1999) and are thought to be one of the essential regulators of resting membrane potential. Accumulated evidence indicates that the control of BK channel activity in arterial smooth muscle is one of the major determinants of vascular tone and that its abnormality can be a cause of hypertension (Brenner

Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/jpet.105.093856.

ABBREVIATIONS: BK, large conductance Ca^{2+} -activated K^+ ; $[\text{Ca}^{2+}]_i$, intracellular Ca^{2+} concentration; BMS-204352, (3S)-(+)-(5-chloro-2-methoxyphenyl)-1,3-dihydro-3-fluoro-6-(trifluoromethyl)-2H-indole-2-one; L-735,334, 14-hydroxy 8-daucene-3,4-diol oleate; diCl-DHAA, 12,14-dichlorodehydroabiatic acid; CaV, voltage-dependent Ca^{2+} ; HEK, human embryonic kidney; I-V, current-voltage; SK, small conductance Ca^{2+} -activated K^+ ; IK, intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^+ ; CGS-7181, ethyl 2-hydroxy-1-[[[4-methylphenyl]amino]oxo]-6-trifluoromethyl-1H-indole-3-carboxylate; CGS-7184, ethyl 1-[[[4-chlorophenyl]amino]oxo]-2-hydroxy-6-trifluoromethyl-1H-indole-3-carboxylate; NS-1608, N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-N'-(2-hydroxy-5-chlorophenyl)urea; NS-1619, 1,3-dihydro-1-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]-5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazol-2-one; NS-8, 2-amino-3-cyano-5-(2-fluorophenyl)-4-methylpyrrole.