

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大和田 智彦

平成19（2007）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・チャン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ンネルに対するリスク評価に関する研究	-----	12
赤羽 悟美		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	15
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	17

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した。

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に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

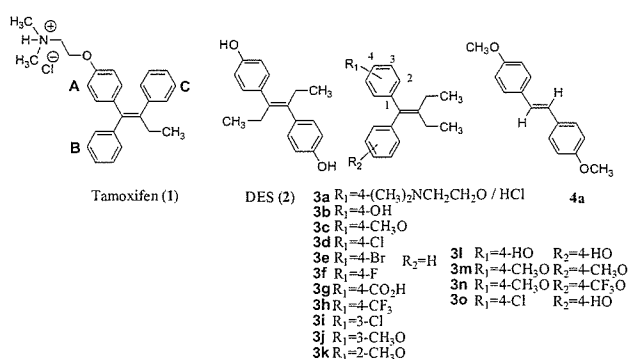


図1

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および2)。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3)。

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

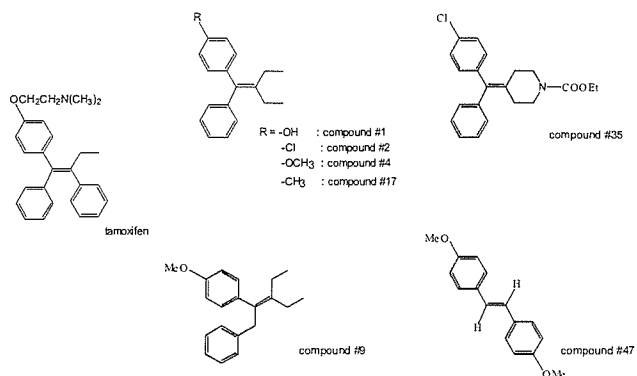


図2

た。実験に用いたタモキシフェンおよび関連化合物の構造式を図2に示す。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⁺チャネル(hSlo α , rSlo α , hSlo β ₁, rSlo β ₁, hSlo β ₄)、遅延整流性K⁺チャネル(HERG, KvLQT1, minK)、電位依存性Ca²⁺チャネル(Ca_v1.2, Ca_v1.3, Ca_v2.1, Ca_v2.2)、電位依存性Na⁺チャネル(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。実験に用いたタモキシフェンおよび関連化合物の構造式を図1および図3に示す。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。

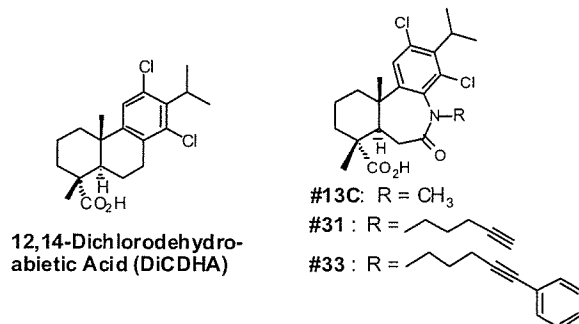


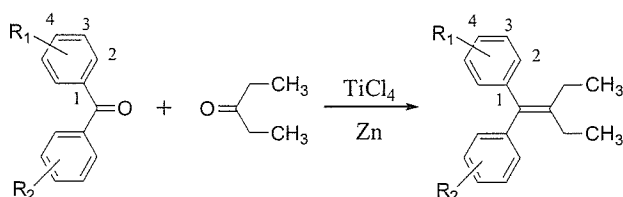
図3

(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

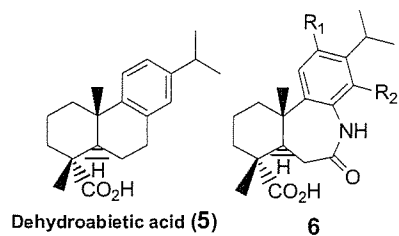


図4

されるヘキサヒドロジベンツアゼピノン誘導体(6)を合成しイオンチャンネルへの効果を調べた(図4)。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。

使用した薬物(図2)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(以下図3)。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。

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。

Ca²⁺依存性K⁺チャン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 μ Mの濃度で弱い増強を示した。compound 4a(図1)は1~10 μ 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 μ Mにおいて弱い増強作用を示したのに対し(図3)、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Ca²⁺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赤羽、中澤によってチャンネルへの効果を調査した。ヘキサヒドロジベンツアゼピノン誘導体(6)は遅延整流性カリウムチャン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ン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ン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種のイオンチャン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をに対し、検討した化合物

のほとんどが影響を与えた。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。

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ン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) 国内 1件

1) 山越葉子, 中澤憲一, 土屋利江: 原子間力顕微鏡(AFM)によるタンパク質のイメージング, 日本臨床 65: 270-277 (2007)

(2) 海外 5件

1) 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) 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).

3) Tashima T, Toriumi Y, Mochizuki Y, Nonomura T, Nagaoka S, Furukawa K, Tsuru H, Adachi-Akahane S, Ohwada T.: Design, synthesis, and BK channel-opening activity of hexahydrodibenzazepinone derivatives. *Bioorg Med Chem.* 14(23):8014-31 (2006).

4) Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K, β -Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. *Brain Res.*, (in press)

5) Usami, M., Mitsunaga, K. and Nakazawa, K. Two-dimensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for developmental toxicity studies. *Toxicology In Vitro* (in press)

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)

Sato K, Ohno Y, Goldman JE, Nakazawa K. The establishment of the organotypic slice culture of postnatal rat forebrain involving neural progenitors labeled by eGFP-encoding retrovirus 2006 Annual meeting of society for neuroscience (Oct 2007)

佐藤 薫, 大野泰雄, James E. Goldman, 中澤憲一. 「神経系前駆細胞の遊走および分化の薬理的検討に適した実験系の確立」第80回 日本薬理学会年会 (2007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

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

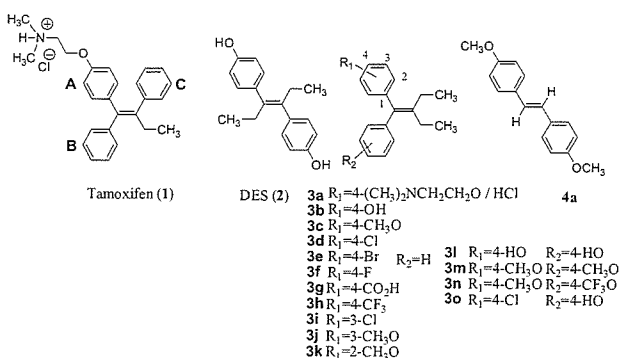
エストロゲンアンタゴニストであるタモキシフェンは、その活性は比較的弱いものの非ステロイド作用としてカルシウム依存性カリウムチャネル(BKチャネル)開口活性を持つことが報告されている。タモキシフェンの作用点はイオンチャネルのポアを形成する α サブユニットではなく、 β サブユニットであると報告されている。本分担研究ではタモキシフェンの構造から基本部分構造を抽出し、簡略化して、より汎用化学物質の構造に近い構造を設計し、その化学物質を合成した。また製紙表面加工等に汎用され自然界に豊富に存在する松脂の成分であるデヒドロアビエチン酸の誘導体の化学合成を行った。

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(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。

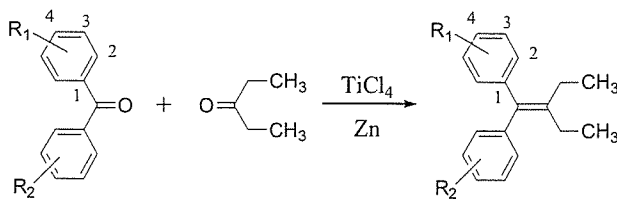
そこで、合成的に簡便で誘導体合成に有用で、かつ一般に汎用されている化学物質の部分構造となりうるジアリールエチレン構造を抽出してその誘導体の合成に着手した。なお、ステロイドアンタゴニストであるDESもBKチャネル開口活性が報告されており、スチルベン誘導体について今年度はその一部の検討を行った。また製紙表面加工等に汎用され自然界に豊富に存在する松脂の成分であるデヒドロアビエチン酸(5)の誘導体の化学合成を行った。

(倫理面への配慮)

特になし。

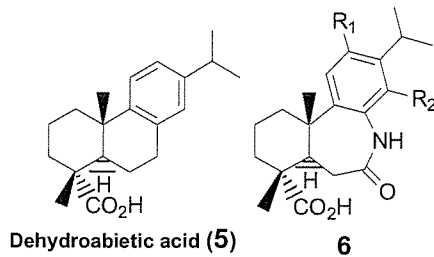
C. 研究結果

化合物3は基本的には置換ベンゾフェノンとペンタ-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



されるヘキサヒドロジベンツアゼピノン誘導体(6)を合成しイオンチャ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した。ヘキサヒドロジベンツアゼピノン誘導体(6)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をに対し、検討した化合物のほとんどが影響を与えた。

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

1) 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) Tashima T, Toriumi Y, Mochizuki Y, Nonomura T, Nagaoka S, Furukawa K, Tsuru H, Adachi-Akahane S, Ohwada T.: Design, synthesis, and BK channel-opening activity of hexahydrodibenzazepinone derivatives. *Bioorg Med Chem.* 14(23):8014-31 (2006).

2. 学会発表

なし

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

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

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・部長

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。実験に用いたタモキシフェンおよび関連化合物の構造式を図 1 に示す。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。

(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附着し、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 μM の濃度で弱い増強を示した。compound #1は1 nMから100 μM 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 μM でのみ弱い増強作用を示した。compound #4は100 nMから100 μM の濃度範囲で増強作用を示し、最も強い増強は100 μM で認められた。compound #9は100 nMおよび1 μM で弱い増強作用を示した。compound #17は1 μM と100 μM で弱い増強を示したが、10 μM では逆に弱い抑制を示した。compound #35では10 nMで弱い増強、1 μM および100 μM 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 μM 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 μM 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

Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K,
 β -Estradiol induces synaptogenesis in the
hippocampus by enhancing brain-derived
neurotrophic factor release from dentate gyrus granule
cells. Brain Res., (in press)

Usami, M., Mitsunaga, K. and Nakazawa, K.
Two-dimensional electrophoresis of protein from
cultured postimplantation rat embryos for
developmental toxicity studies. Toxicology In Vitro
(in press)

2. 学会発表

Sato K, Ohno Y, Goldman JE, Nakazawa K. The
establishment of the organotypic slice culture of
postnatal rat forebrain involving neural progenitors
labeled by eGFP-encoding retrovirus 2006 Annual
meeting of society for neuroscience (Oct 2007)

佐藤 薫, 大野泰雄, James E. Goldman, 中澤憲一.
「神経系前駆細胞の遊走および分化の薬理学的
検討に適した実験系の確立」第80回 日本薬理
学会年会 (2007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

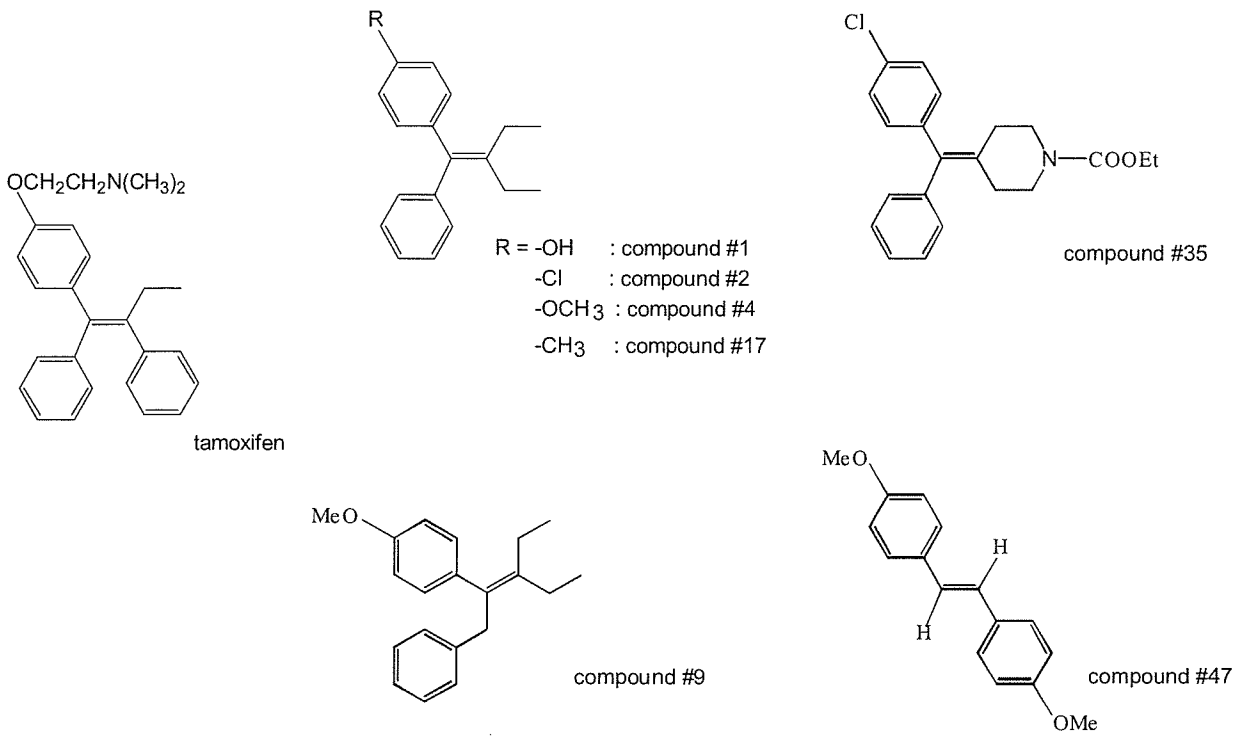
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

图 1. 使用藥物



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(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

Ca²⁺依存性K⁺チャネル(hSlo α , rSlo α , hSlo β ₁, rSlo β ₁, hSlo β ₄)、遅延整流性K⁺チャネル(HERG, KvLQT1, minK)、電位依存性Ca²⁺チャネル(Ca_v1.2, Ca_v1.3, Ca_v2.1, Ca_v2.2)、電位依存性Na⁺チャネル(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た化合物の(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。

実験に用いたタモキシフェンおよび関連化合物の構造式を図1に示す。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。

(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。

Ca²⁺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 μ Mの濃度で弱い増強を示した。compound 4aは1~10 μ 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 μ 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Ca²⁺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⁺チャン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⁺チャン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⁺チャンネルファミリーはイオンチャン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ンネル (Ca²⁺チャンネル、Na⁺チャンネル、K⁺チャンネル、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⁺チャン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) 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：新規ジヒドロアビエチン酸誘導体の BK チャンネル開口作用 (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

なし

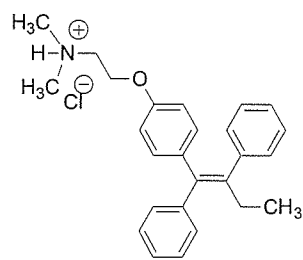
2. 実用新案登録

なし

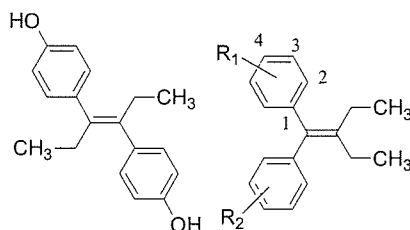
3. その他

なし

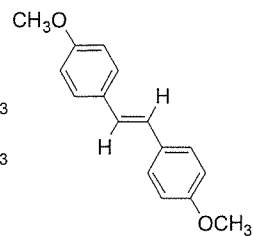
Fig 1 評価した化合物



Tamoxifen (1)

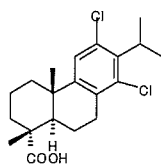


DES (2)

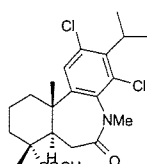


4a

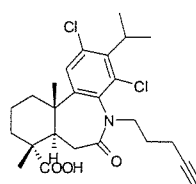
- 3a** R₁=4-(CH₃)₂NCH₂CH₂O / HCl
3b R₁=4-OH
3c R₁=4-CH₃O
3d R₁=4-Cl
3e R₁=4-Br R₂=H
3f R₁=4-F
3g R₁=4-CO₂H
3h R₁=4-CF₃
3i R₁=3-Cl
3j R₁=3-CH₃O
3k R₁=2-CH₃O
3l R₁=4-HO R₂=4-HO
3m R₁=4-CH₃O R₂=4-CH₃O
3n R₁=4-CH₃O R₂=4-CF₃O
3o R₁=4-Cl R₂=4-HO



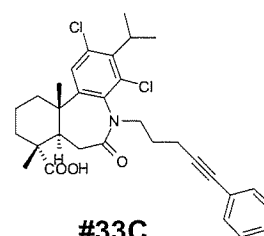
12,14-ジクロロデヒドロ
アビエチン酸 (DiCDHA)



#13C



#31



#33C

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
Tashima T, Toriumi Y, Mochizuki Y, Nonomura T, Nagaoka S, Furukawa K, Tsuru H, <u>Adachi-Akahane S</u> , <u>Ohwada T.</u> :	Design, synthesis, and BK channel-opening activity of hexahydrodibenzazepin-one derivatives.	<i>Bioorg Med Chem.</i>	14	8014-31	2006
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-dichlorodehydro-abietic acid	<i>J. Pharmacol. Exper. Ther.</i>	316	144-153	2006
Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K	β -Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells.	<i>Brain Res.</i>			in press
Usami, M., Mitsunaga, K. and Nakazawa, K.	Two-demensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for developmental toxicity studies.	<i>Toxicology In Vitro</i>			in press
Yokoyama, U., Minamisawa, S., <u>Adachi-Akahane, 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



Design, synthesis, and BK channel-opening activity of hexahydrodibenzazepinone derivatives

Toshihiko Tashima,^a Yoshimi Toriumi,^a Yumi Mochizuki,^a Taro Nonomura,^a
Satoru Nagaoka,^a Katsuo Furukawa,^b Hiromichi Tsuru,^b
Satomi Adachi-Akahane^b and Tomohiko Ohwada^{a,*}

^aGraduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Laboratory of Organic and Medicinal Chemistry, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

^bDepartment of Pharmacology, Faculty of Medicine, School of Medicine, Toho University, 5-21-16, Omori-Nishi, Ota-ku, Tokyo 143-8540, Japan

Received 19 June 2006; revised 21 July 2006; accepted 22 July 2006
Available online 10 August 2006

Abstract—In order to explore new scaffolds for large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel (BK channel) openers, we carried out molecular design and synthesis on the basis of the following two concepts: (1) introduction of a heteroatom into the dehydroabiatic acid (BK channel opener) skeleton would allow easier introduction of substituents. (2) Because of the fourfold symmetrical structure of BK channels, dimeric compounds in which two pharmacophores are linked through a tether are expected to have a greater binding probability to the channels, resulting in increased channel-opening activity. Herein, we explore the usefulness of the hexahydrodibenzazepinone structure as a new scaffold for BK channel openers. The synthesized monomer compounds of hexahydrodibenzazepinone derivatives, which can be derived from dehydroabiatic acid, were subjected to electrophysiological patch-clamp studies, followed by Magnus contraction–relaxation assay using rabbit urinary bladder smooth muscle strips to assess overall activities. Dimeric compounds were designed by linking the monomeric hexahydrodibenzazepinone derivatives through a diacetylenebenzene tether, and their channel-opening activities were evaluated by electrophysiological methods. Finally, we concluded that the critical structure for BK channel-opening activity is the hexahydrodibenzazepinone monomer substituted with a phenyl-bearing alkynyl substituent on the lactam amide.
© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ion-selective channels are membrane proteins, which generate electrical ionic signals and regulate signal transduction events in living systems. Among such channels, K^+ channels are widely expressed in various tissues, such as smooth muscles and neurons, and play an important role in modulating membrane potential. In particular, large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (BK channels) elicit such a large K^+ conductance that depolarized membrane potential can be effectively quenched by the opening of BK channels.¹ The BK channels are distributed in both excitable and non-excitable cells, which are involved in many cellular functions,² such as

action potential repolarization, neuronal excitability, neurotransmitter release, hormone secretion, tuning of cochlear hair cells,³ innate immunity,⁴ and modulation of the tone of vascular, airway, uterine, gastrointestinal, and urinary bladder smooth muscle tissues. Since BK channels are activated by both elevation of intracellular Ca^{2+} concentration and membrane depolarization, the K^+ efflux via BK channels results in membrane repolarization and the suppression of Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels. Accordingly, BK channels serve as a negative-feedback mechanism to relax excessive muscle contraction in smooth muscles⁵ and to prevent aberrant cellular excitability of neurons.

Like other members of the voltage-dependent K^+ channel superfamily, BK channels are tetrameric proteins composed of pore-forming α -subunits and auxiliary β -subunits.⁶ Thus, the K^+ channels are fourfold symmetrical. Each BK channel α -subunit contains seven transmembrane spanning segments S0–S6 at the N-terminus

Keywords: BK channel opener; Hexahydrodibenzazepinones; Dimeric compound; K^+ channel.

* Corresponding author. Tel.: +81 3 5841 4730; fax: +81 3 5841 4735; e-mail: ohwada@mol.f.u-tokyo.ac.jp

and the four hydrophobic segments S7–S10 at the large intracellular C-terminus. Unlike other classes of Ca^{2+} -activated K^+ channels, SK (small-conductance) and IK (intermediate conductance) channels, the α -subunit of the BK channels has an extra hydrophobic transmembrane segment (S0) that leads to the extracellular N-terminus. The N-terminus acts as a binding domain for β -subunits.⁷ Each α -subunit has a S4 voltage sensor⁸ and a pore-forming region formed by S5–S6 and the P-loop.

BK channel openers have potential therapeutic applications because of possible involvement of BK channels in various pathophysiological conditions such as hypertension,⁹ coronary artery spasm, urinary incontinence,¹⁰ progressive deafness,¹¹ and several neurological disorders.¹² The BK channel has an advantage as a therapeutic target compared to other K^+ channels, such as the

ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}), because it is mostly absent in cardiac myocytes, except for mitochondria.¹³ The BK channel openers comprise a large series of synthetic benzimidazolone derivatives (Chart 1), such as NS004¹⁴ and NS1619,¹⁵ the biaryl amines, such as mefenamic and flufenamic acids,¹⁶ the biarylureas, such as NS1608,¹⁷ the aryloxindoles (BMS-204352),¹⁸ the arylpyrroles (NS-8),¹⁹ indole-3-carboxylic acid esters (CGS-7184, CGS-7181)²⁰ and natural modulators, including dihydrosoyasaponin-1 (dehydrosoyasaponin-1, DHS-1),²¹ and terpenes such as maxikdiol (**1**, Chart 2).²² Most of these compounds activate BK channels as a subsidiary action in addition to their primary action.²³ In this context, the available scaffolds for BK channel openers are rather limited in structural diversity. Both of the pioneering drugs NS004 and NS1619 are α -subunit-selective BK openers. We have found that

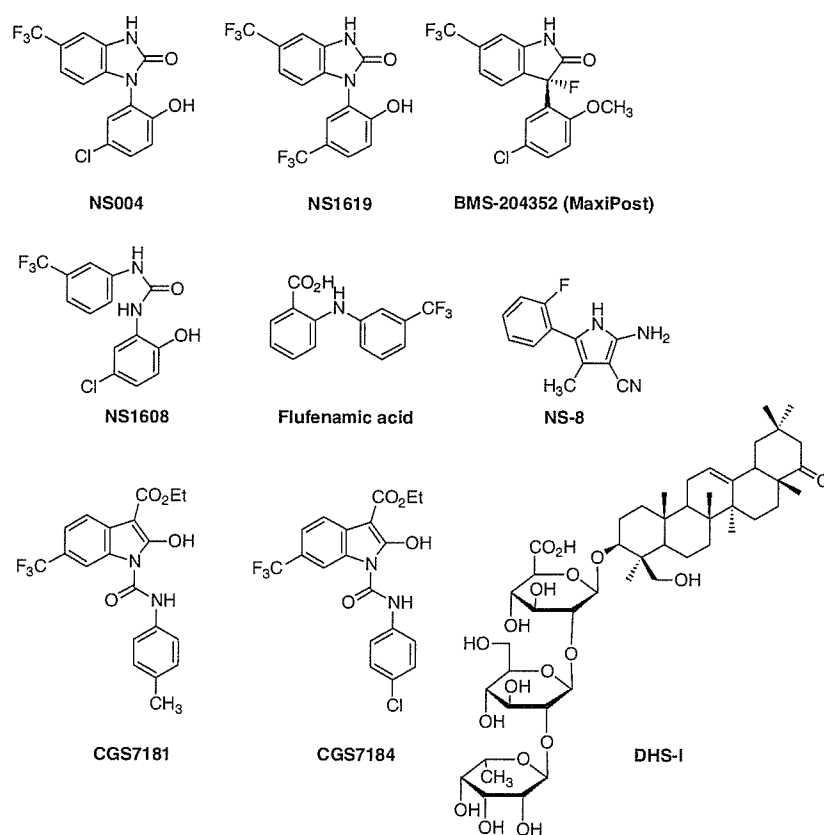


Chart 1.

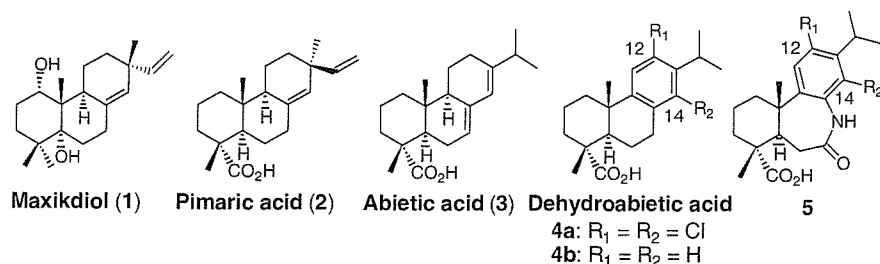


Chart 2.