

氏名	三木 春奈
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博第24号
学位授与の日付	平成25年10月7日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項
学位論文題目	Towards the Development of Potentiators of Disease-Associated Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Mutants 嚢胞性線維症膜透過性制御因子の疾患関連変異体の活性増強薬の開発に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 林 哲也 (副査) 教授 島本 史夫 (副査) 教授 大野 行弘 (副査) 准教授 井尻 好雄

論文内容の要旨

Cystic Fibrosis Transmembrane-conductance Regulator (CFTR : 嚢胞性線維症膜透過性制御因子) は、白人種に多く見られる常染色体性劣性遺伝の致死性疾患、Cystic Fibrosis (CF : 嚢胞性線維症) の原因遺伝子産物である。CFTR は、呼吸上皮細胞、膵導管細胞や腸管上皮細胞をはじめとする輸送上皮組織に広く発現して、PKA (プロテインキナーゼ A) 活性化 ATP 依存性陰イオンチャネルとして機能している。CFTR チャネルは、その発現している輸送上皮の水・電解質輸送システムの要としての役割を果たしているために、その機能不全は臓器レベルでの重大な疾患を引き起こす。白人種には CFTR 機能不全につながる CFTR 遺伝子異常の系統がある。その中で最も多いのが 508 番目のフェニルアラニンの欠損($\Delta F508$)であり、この変異は CFTR 蛋白の形質膜への移送障害およびチャネル開口障害を引き起こす。また、三番目に多い 551 番目のグリシンのアスパラギン酸へのミスセンス変異 (G551D-CFTR) は、形質膜への移送は正常であ

るが重度のチャネル開口障害（開口確率が野生型の 1/100 以下）を引き起こす。現在、この 2 つの変異体 $\Delta F508$ -CFTR と G551D-CFTR が、薬物治療の対象として研究され、これらの活性増強薬の開発が望まれている。

CFTR は ATP の結合、加水分解、ADP とリン酸 (Pi) の解離のサイクルに伴って、チャネルポアの開閉を繰り返している。そこで本研究では、2 つの ATP 類似物 2'-deoxy ATP (dATP) 、 N^6 -(2-phenylethyl)-ATP (P-ATP) と新規に合成した dATP と P-ATP の特徴を併せ持つ N^6 -(2-phenylethyl)-2-deoxy-ATP (P-dATP) 、さらに実践的アプローチとしてショウガ科の食物ウコンの根茎中に含まれる色素であるクルクミンとマメ科の植物に多く含まれるイソフラボンの一つであるゲニステインの G551D-CFTR のチャネル活性に与える影響と ATP 類似物の $\Delta F508$ -CFTR のチャネル活性に与える影響を調べた。

dATP, P-ATP は、それぞれ G551D-CFTR のチャネル活性を共に約 7~8 倍増加させ、P-dATP は、G551D-CFTR のチャネル活性を約 36 倍増加させた。クルクミンの G551D-CFTR チャネル活性の増強効果（約 10 倍）は、ゲニステインの G551D-CFTR チャネル活性の増強効果（約 20 倍）より小さかったが、クルクミンは、ゲニステインによって最大限に活性化された G551D-CFTR のチャネル活性をさらに増強（約 40 倍）させた。このことより、クルクミンとゲニステインの作用機序（結合部位）が異なることのみならず、複数の CFTR 活性増強薬を併用することにより、より強い増強効果を得ることができる可能性が示された。さらに P-dATP は $\Delta F508$ -CFTR のチャネル活性も約 20 倍増加させた。以上のことは、CFTR の ATP 依存性ゲーティング機構の解明に役立つと共に、ATP 類似型 CFTR 活性増強薬の開発の端緒ともなる重要な発見である。

以上より、本研究の成果は、 $\Delta F508$ および G551D 変異による CF の新規治療法の開発に役立つ重要な知見であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

Cystic Fibrosis Transmembrane-conductance Regulator (CFTR : 嚢胞性線維症膜透過性制御因子) は、白人種に多く見られる常染色体性劣性遺伝の致死性疾患、Cystic Fibrosis (CF : 嚢胞性線維症) の原因遺伝子産物で、呼吸上皮細胞、膵導管細胞や腸管上皮細胞をはじめとする輸送上皮組織に広く発現し、水・電解質輸送システムの要としての役割を果たしておりその機能不全は臓器レベルでの重大な疾患を引き起こす。しかし、CF に対する対症療法は存在するものの原因療法は未だ確立されていない。そこで今回、CFTR 遺伝子異常の系統で最も多い 508 番目のフェニルアラニンの欠損 ($\Delta F508$) と三番目に多い 551 番目のグリシンのアスパラギン酸へのミスセンス変異 (G551D-CFTR) を用いて活性増強薬の開発に関する研究を行った。

現在 CFTR は ATP の二ヶ所の ATP Binding Pocket (ABP:ATP 結合部位) への結合、加水分解、ADP とリン酸 (Pi) の解離のサイクルに伴って、チャンネルポアの開閉を繰り返しており ABP1 への ATP 結合がチャンネルの開口時間に、また ABP2 がチャンネル開口頻度に関わることが報告されている。そこでさらなるゲーティング機構の解明に焦点をおき 2 つの ATP 類似物 2'-deoxy ATP (dATP)、N⁶-(2-phenylethyl)-ATP (P-ATP) と新規に dATP と P-ATP の特徴を併せ持つ N⁶-(2-phenylethyl)-2-deoxy-ATP (P-dATP) を合成し、それぞれの変異体における活性効果と結合部位の検討を行った。その結果、d-ATP と P-ATP の G551D-CFTR のチャンネル活性の増強効果がそれぞれ約 8 倍および約 7 倍であったのに対し、P-dATP では約 36 倍と有意に大きく、その主な要因はチャンネル開口時間の延長であった。また、それぞれの ABP への P-dATP の親和性を低下させる変異体導入により、その G551D-CFTR 結合部位が ABP1 であることが示唆された。一方で、P-dATP の $\Delta F508$ -CFTR のチャンネル活性の増強効果は約 20 倍であり、その主な要因はチャンネル開口頻度の増加であった。同様に P-dATP の結合部位を検討した結果、P-dATP の $\Delta F508$ -CFTR 結合部位は ABP1 と ABP2 であることが示唆された。以上の結果は、CFTR の ATP 依存性ゲーティング機構の解明に役立つと共に、ATP 類似型 CFTR 活

性増強薬の開発の端緒ともなる重要な発見である。

さらに実践的アプローチとして、CFTR の天然活性物質として知られるクルクミノイドの一種であるクルクミンとイソフラボンの一種であるゲニステインの G551D-CFTR のチャンネル活性に与える影響を調べた。クルクミンの G551D-CFTR チャンネル活性の増強効果（約 10 倍）は、ゲニステインの G551D-CFTR チャンネル活性の増強効果（約 20 倍）より小さかったが、クルクミンは、ゲニステインによって最大限に活性化された G551D-CFTR のチャンネル活性をさらに増強（約 40 倍）させた。このことより、クルクミンとゲニステインの作用機序（結合部位）が異なることのみならず、複数の CFTR 活性増強薬を併用することにより、より強い増強効果を得ることができる可能性が示された。

以上より、本研究の成果は、 $\Delta F508$ および G551D 変異による CF の新規治療法の開発に役立つ重要な知見であると考えられる。よって上記の論文は、審査の結果、博士（薬学）論文として十分にその価値を有するものと認める。