

氏名	まつむら かずき 松村 一輝
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第 号
学位授与の日付	2021年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Gating-modifier toxin APETx1による電位依存性カリウムイオンチャンネル hERG 阻害機構の解析
論文審査委員	(主査) 教授 大澤 匡範 (博士(学術)) (副査) 教授 三澤 日出巳 (博士(薬学)) 教授 鈴木 岳之 (薬学博士)

論文内容の要旨

【背景・目的】

Human *ether-à-go-go-related gene 1* (hERG) は主に心臓や脳、がん細胞に発現する電位依存性カリウムイオンチャンネル (K_v チャンネル) である。hERG は細胞膜の脱分極に伴ってカリウムイオン (K⁺) を細胞内側から細胞外側へと膜透過させることで、活動電位の再分極過程に関与する。hERG の機能は心臓の正常な拍動に必須であり、その機能低下は QT 延長症候群に伴う致命的な不整脈の原因となる。また、hERG の機能が統合失調症や発がんプロセスにも関与していることや、hERG 阻害剤が膠芽腫患者の生存率を向上させたことが報告されている。これらのことから、リガンドによる hERG 阻害メカニズムを解明することは医学・薬学的に重要な課題である。

hERG は全長 1159 残基からなり、4 量体を形成して K_v チャンネルとして機能する膜タンパク質である。4 量体のそれぞれのサブユニットには、6 本の膜貫通ヘリックス S1-S6 が存在する。S1-S4 は電位センサードメイン (VSD)、S5-S6 はポアドメイン (PD) を形成する。PD は 4 量体の中心に K⁺ の透過路を形成しており、細胞内側には K⁺ の透過を制御するゲートが存在する。PD のゲートの開閉は VSD の膜電位の変化に応じた構造変化により調節されている。この VSD の膜電位の変化に応じた構造変化には、S4 に存在する複数の塩基性残基の正電荷が関わっている。静止膜電位下では細胞内側が負の膜電位を有するため、正電荷を帯びた S4 は細胞内側に引き付けられた down conformation をとり、これに伴って PD のゲートが閉じた resting state をとる。一方で、膜電位が脱分極すると S4 が細胞外側に移動して up conformation をとるとともに、ゲートが開いた activated state をとる。従来の立体構造解析手法では、膜電位を形成させた条件での解析が困難であり、hERG の resting state の構造は明らかとなっていない。

イソギンチャク *Anthopleura elegantissima* が産生する 42 残基のペプチド毒素に APETx1 がある。APETx1 は hERG の VSD に結合し、resting state を安定化することで、hERG の膜電位依存的な活性化を阻害する gating-modifier toxin である。APETx1 による hERG 阻害機構を解明することは、hERG の VSD に結合し、その機能を調節するリガンドを創製することに繋がると期待される。しかしながら、これまでにリコンビナント APETx1 の調製法は確立されておらず、変異体解析が困難であったことから、APETx1 がどのようにして hERG の resting state に結合し、阻害するのかは解明されていない。そこで本研究では、リコンビナント APETx1 の調製法を確立し、変異体を用いた電気生理学的解析を行うことで、APETx1 による hERG 阻害メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】

• 大腸菌発現系を利用したリコンビナント APETx1 の調製

APETx1 およびその変異体にはヒスチジン (His) タグを融合し、大腸菌発現系を利用して凝集性の沈殿物である封入体として発現させた。尿素を用いて可溶化し、His タグでのアフィニティー精製を行なった後、酸化還元バッファー中で透析することにより立体構造を形成させた。タグ切断後に逆相高速液体クロマトグラフィー (逆相 HPLC) で精製した。

• リコンビナント APETx1 およびその変異体の核磁気共鳴 (NMR) 法による解析

三重共鳴 NMR スペクトルを利用して、均一 ^{13}C , ^{15}N 標識を施した APETx1 の主鎖と側鎖の NMR シグナルを pH 6.0, 298 K 条件下で帰属した。pH 滴定測定と温度可変測定を行い、この帰属を pH 3.0, 280 K 条件下のスペクトルに移し、先行研究において同条件下で帰属されている天然物の APETx1 との間で化学シフト値を比較した。核オーバーハウザー効果 (NOE) のシグナルを利用して、pH 6.0, 298 K 条件下でリコンビナント APETx1 の立体構造を決定した。APETx1 の変異体については、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定し、WT のスペクトルと比較することで主鎖アミドシグナルの化学シフト値を評価した。

• ホールセルパッチクランプ法による APETx1 の変異体解析

hERG を安定発現した HEK293 細胞を用いたホールセルパッチクランプ法によって hERG 電流を測定し、APETx1 の野生型 (WT) および変異体の hERG 阻害活性を評価

した。

- 二本刺し膜電位固定法による hERG の変異体解析

hERG の WT および変異体を強制発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞の巨視的電流を二本刺し膜電位固定法によって測定し、APETx1 による阻害活性を評価した。

- APETx1-VSD 複合体の構造モデルの構築

ラット由来の K_v チャンネル *ether-à-go-go gene 1* (rEAG1) の立体構造を鋳型にしたホモロジーモデリングを MODELLER 9.23 を用いて行い、hERG の S4 の up conformation および 2 種の down conformation の構造モデルを作製した。これらの構造モデルに対する APETx1 のドッキングシミュレーションを HADDOCK 2.4 web server を用いて行い、APETx1 と hERG の VSD の複合体構造モデルを構築した。

【結果】

1. リコンビナント APETx1 の調製法の確立と NMR 構造の決定

リコンビナント APETx1 を封入体として発現させ、変性状態からリフォールディングさせることで調製した。調製したリコンビナント APETx1 の立体構造が天然物のものと同等であることを確認するために、NMR 法による解析を行った。その結果、pH 3.0, 280 K 条件下での主鎖アミドプロトンの化学シフト値が両者でほとんど同じであったことから、リコンビナント APETx1 が天然物と同等の構造を形成していることが示唆された。さらに、リコンビナント APETx1 の立体構造を pH 6.0 条件下で決定し、天然物の構造との重ね合わせることで比較した。その結果、両者の立体構造には主鎖 RMSD 値 (残基番号 2-41 での値) で 0.7~1.5 Å ほどしか差がないことを確認した。このことは、リコンビナント APETx1 の立体構造が天然物のものと同等であることを示している。

2. ホールセルパッチクランプ法による APETx1 変異体の hERG 阻害活性の評価

ホールセルパッチクランプ法によってリコンビナント APETx1 の hERG 阻害活性を調べた。濃度 10 μ M のリコンビナント APETx1 は hERG 電流を減少させた。さらに、hERG の活性化曲線の評価したところ、50%活性化電位 ($V_{1/2}$) を高電位側にシフト (ポジティブシフト) させた ($\Delta V_{1/2} = 23.9 \pm 2.5$ mV)。

そこで、APETx1 の hERG 阻害に関わるアミノ酸残基を同定するため、APETx1 の立体構造上で側鎖が分子表面に露出している 15 個のアミノ酸残基について変異体 (T3P,

Y5A, K8A, F15A, K18A, T19A, S22A, N23A, R24A, T27A, S29A, Y32A, F33A, L34A, D42A) を作製した。全ての変異体で、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルのシグナルの化学シフト値が WT のものと近い値を示していたことから、WT との間で立体構造に大きな差がないことを確認した。濃度 $10\ \mu\text{M}$ の APETx1 変異体を添加したときの hERG 電流をホールセルパッチクランプ法により測定し、 $\Delta V_{1/2}$ の値を評価した。その結果、APETx1 の F15A, Y32A, F33A, L34A の 4 個の疎水性残基の変異体で WT と比較して $\Delta V_{1/2}$ の値が有意に減少した。これらの 4 個の疎水性残基は APETx1 の分子表面上で局在し、疎水性表面を形成している。そのため、この疎水性表面が hERG の VSD との結合に関与していることが示唆された。

3. 二本刺し膜電位固定法による APETx1 の hERG 変異体に対する阻害活性の評価

APETx1 が hERG のどのアミノ酸残基に結合するのかを調べるために、hERG の変異体解析を行った。hERG の変異体解析には、アフリカツメガエルの卵母細胞に cRNA をインジェクトするだけで、変異体を簡便に発現させることができる二本刺し膜電位固定法によって行った。二本刺し膜電位固定法においても APETx1 は hERG の電流を減少させ、濃度 $10\ \mu\text{M}$ の APETx1 による活性化曲線の $V_{1/2}$ のポジティブシフトの大きさはホールセルパッチクランプ法のと同等の結果が得られることを確認した ($\Delta V_{1/2} = 21.9 \pm 1.1\ \text{mV}$)。

続いて、APETx1 が hERG のどのアミノ酸残基に結合し、阻害するのかを調べるために、hERG の変異体解析を行なった。VSD の細胞外側に露出しており、APETx1 の結合部位となりうる S3-S4 領域のアミノ酸残基の変異体 (F508A, D509A, L510A, L511A, I512A, F513A, G514C, E518C, L520A, I521A, G522A, L523A, L524A)、および S1-S2 領域のアミノ酸残基の変異体 (L433A, K434A, E435A, E437A, E438A, D456A, D460A) を作製した。これらの変異体をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ、二本刺し膜電位固定法による電流測定を行うことで、全ての変異体で WT と同等の K^+ 電流が観測されることを確認した。このことは、WT と変異体の間で立体構造に大きな差がないことを示している。先行研究では G514C 変異体では APETx1 による阻害が増強し、E518C 変異体では APETx1 による阻害が減弱することが報告されており、いずれの変異体でも先行研究と同様の結果を得ることができた。濃度 $10\ \mu\text{M}$ の APETx1 での $\Delta V_{1/2}$ の値を評価したところ、E518C 変異体に加えて、F508A と I521A の変異体で APETx1 による阻害がほとんど消失することが分かった。一方で、hERG の G514C 変異体に加えて、I512A と G522 の変異体で APETx1 による阻害が有意に増強されることが分かった。S1-S2 領域のアミノ酸残基の変異体では、L433A と D460A で APETx1 による阻害活性が有意に減

少しした。

4. Resting state の hERG に対する APETx1 のドッキングシミュレーション

最後に、変異体解析で同定された APETx1 と hERG のアミノ酸残基同士が、hERG が resting state の立体構造のときに直接的に相互作用することが可能であるかを検証した。hERG の変異体解析に基づいて APETx1 が結合することが示唆された hERG の S3-S4 ループは、先行研究のクライオ電子顕微鏡による立体構造解析において観測されておらず、構造モデルが存在しない。そのため、rEAG1 の立体構造を鋳型としたホモロジーモデリングにより hERG の S3-S4 領域の構造モデル (up model) を作製した。さらに、S4 ヘリックスの配列を3残基もしくは6残基下側方向にずらした配列アラインメントを使用してホモロジーモデリングを行なうことで、S4 ヘリックスを一巻き分だけ細胞内側方向に移動させた one-helical-turn down model および二巻き分だけ細胞内側方向に移動させた two-helical-turn down model を作製した。これらのモデルに対して APETx1 のドッキングシミュレーションを行ったところ、up model では hERG の変異体解析で変異により阻害活性がほとんど消失したアミノ酸残基である F508, E518, I521 が分子表面にほとんど露出しておらず、APETx1 がこれらのアミノ酸残基と相互作用した複合体構造モデルを得ることができなかった。その一方で、one-helical-turn down model と two-helical-turn down model では、hERG の F508, E518, I521 が分子表面に広く露出しており、これらのアミノ酸残基が形成した窪みに対して、APETx1 の変異体解析で同定された4個の疎水性残基である F15, F33, L34 の側鎖がはまり込むように結合した複合体構造モデルを得ることができた。また、APETx1 の Y32 は hERG の E518 と近接しており、側鎖同士が水素結合を形成しうる位置にあることが分かった。One-helical-turn down model と two-helical-turn down model を利用した複合体構造モデルの間では、APETx1 と hERG の相互作用様式に大きな差は見られず、どちらの複合体構造モデルも変異体解析の結果と矛盾しないことが分かった。これらのことは、hERG の変異体解析により同定された3個のアミノ酸残基 F508, E518, I521 が、resting state において S4 ヘリックスが down conformation となったときに分子表面に露出し、APETx1 の結合部位を形成することを示唆している。

【考察】

本研究では、天然物の APETx1 と同等の立体構造を有するリコンビナント APETx1 の調製法を確立し、その変異体解析を行うことで、APETx1 の分子表面上で hERG 阻害に

寄与するアミノ酸残基として F15, Y32, F33, L34 を同定した。これらの 4 個の疎水性残基は分子表面上で局在しており、疎水性表面を形成していることから、APETx1 による hERG 阻害にはこの疎水性表面が重要であると考えた。さらに、hERG の変異体解析を行うことで、APETx1 による阻害活性に変化がみられた変異残基が多数存在する S3-S4 ループが APETx1 の結合部位となっていると考えた。各機能状態での VSD の構造モデルの構築と、それらに対するドッキングシミュレーションにより、hERG の F508, E518, I521 の 3 つのアミノ酸残基は S4 が up conformation から down conformation へと構造変化するのに伴って分子表面に露出し、APETx1 の結合部位を形成することが示唆された。この APETx1 の結合部位が activated state の立体構造上にはみられず resting state の立体構造上だけに現れることが、APETx1 による hERG の resting state の安定化のメカニズムに重要であることを提唱した。

論文審査結果の要旨

本論文は、イソギンチャク由来のペプチド毒素 APETx1 による電位依存性 K⁺チャネル hERG の阻害に関わる両者のアミノ酸残基を同定し、APETx1 が hERG の resting state を安定化するメカニズムを明らかにしようとしたものである。hERG は心臓や脳、がん細胞に発現する電位依存性 K⁺チャネルであり、近年、hERG の機能が発がんプロセスとの関連することが示唆されていることから、創薬標的として注目されている。APETx1 は hERG の電位センサードメイン (VSD) に対して細胞外側から結合し、hERG の K⁺の透過ゲートが閉じた状態である resting state を安定化することで阻害する。しかしながら、これまでの APETx1 の調製法はイソギンチャクから単離した天然物でしか報告がなく、その変異体解析は困難であった。そのため、APETx1 が hERG の resting state に対してどのように結合し阻害するのかは不明である。申請者は、大腸菌発現系を利用したリコンビナント APETx1 の調製法を確立し、APETx1 と hERG のそれぞれの変異体を利用した電気生理学的解析を行い、ドッキングシミュレーションによる検証に基づいて APETx1 による hERG の resting state の安定化のメカニズムを明らかにした。

申請者は、まず、大腸菌発現系を利用して APETx1 を凝集性の沈殿物として発現させ、尿素により変性させた後、酸化還元バッファー中でリフォールディングを行うことで、リコンビナント APETx1 を調製した。リコンビナント APETx1 の立体構造を核磁気共鳴 (NMR) 法により決定し、天然物と同等の立体構造を形成していることを確認した。次に、APETx1 の立体構造上で分子表面に露出する 15 個のアミノ酸残基について変異体を調製し、これらの APETx1 変異体の hERG 阻害活性をホールセルパッチクランプ法により評価することで、APETx1 の F15, Y32, F33, L34 が hERG 阻害活性に寄与していることを明らかにした。さらに、二本刺し膜電位固定法により、hERG の VSD の細胞外側に露出するアミノ酸残基の変異体ごとに APETx1 による阻害活性を評価することで、先行研究で知られていた hERG の S3-S4 領域に存在する E518 に加えて F508 と I521 が APETx1 による阻害に寄与していることを明らかにした。最後に、hERG の resting state の VSD の構造モデルを構築し、APETx1 のドッキングシミュレーションを行うことで、変異体解析によって見出されたアミノ酸残基同士の直接的な相互作用が起こりうるかを検証した。これにより、resting state での hERG の VSD の分子表面上に APETx1 の結合部位が形成されることが、APETx1 による hERG の resting state の安定化のメカニズムに重要であることを提唱した。以上は、リガンドによる hERG の機能調節について重要な知見を与えるものであり、今後、hERG を標的とした新たな阻害メカニズムを有する薬剤を創生する上で有用な研究であると評価できる。

審査会においては、副査の三澤教授から、「リフォールディングによるペプチド毒素の調製では一種類のジスルフィド結合の組み合わせで調製することが可能なのか。」と

という質問があり、「APETx1 では単一成分として調製できたことを逆相 HPLC と NMR により確認しているが、ペプチド毒素の種類やリフォールディングの条件によるため、全てのペプチド毒素でリフォールディングによる調製が可能であるとは言えない。」と回答した。さらに、その回答に対して「APETx1 に変異を導入したことで、リフォールディングの起こり方が変化していないのか」という質問があり、「変異体と WT との間で NMR シグナルの化学シフト値に大きな差はないことから、リフォールディング後の立体構造に大きな差はないことを確認している」と回答した。また、副査の鈴木教授からは、「hERG の 4 量体構造には APETx1 結合部位が 4 個存在すると考えられるが、結合数に応じて K^+ の透過性が減少するのか」という質問があり、「現時点では APETx1 の結合数が K^+ 電流の阻害率に与える影響を調べることができておらず、不明であるが、4 個の結合部位のうち 1 個に APETx1 が結合しただけで K^+ 電流が流れなくなる可能性も考えている。」と回答した。

申請者の博士学位論文における変異体を利用した詳細な機能解析に基づく議論は高く評価され、事前の試問、審査会における質問に対する回答は概ね妥当で、周辺知識も十分であることが伺えた。以上より、申請者は博士(薬学)の学位を授与されるに相応しいと判断した。

論文目録

1.主論文に関する原著論文

Kazuki Matsumura, Takushi Shimomura, Yoshihiro Kubo, Takayuki Oka, Naohiro Kobayashi, Shunsuke Imai, Naomi Yanase, Madoka Akimoto, Masahiro Fukuda, Mariko Yokogawa, Kazuyoshi Ikeda, Jun-ichi Kurita, Yoshifumi Nishimura, Ichio Shimada, and Masanori Osawa
Mechanism of hERG inhibition by gating-modifier toxin, APETx1, deduced by functional characterization

BMC Molecular and Cell Biology **22**, 3, doi: <https://doi.org/10.1186/s12860-020-00337-3>
(2021).

2.参考論文

特になし。