

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	松村 一輝
主 論 文 題 名： Gating-modifier toxin APETx1 による電位依存性カリウムイオンチャネル hERG 阻害機構の解析				
(内容の要旨) 【背景・目的】 Human <i>ether-à-go-go-related gene 1</i> (hERG) は心臓や脳、がん細胞に発現する電位依存性カリウムイオンチャネル (K _v チャネル) 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と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 阻害機構を解明することは医学・薬学的に重要な課題である。 hERG は 4 量体を形成して K _v チャ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は 6 本の膜貫通ヘリックス S1-S6 を有する。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。VSD の S4 は正電荷を帯びており、膜電位の変化に応答して構造変化する。静止膜電位下では S4 は細胞内側に引き付けられた down conformation をとり、このとき 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 up conformation をとり、ゲートが開くことで activated state をとる。従来の立体構造解析では、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 <i>Anthopleura elegantissima</i> 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 がいかにして hERG の resting state に結合し、活性化を阻害するのかが解明されていない。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 阻害機構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、大腸菌に封入体として発現させた。尿素を用いて可溶化し、アフィニティー精製を行なった後、透析法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で精製した。

リコンビナント APETx1 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、同条件下で天然物の APETx1 と化学シフト値を比較した。核オーバーハウザー効果 (NOE) 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 の構造を決定した。

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 hERG 電流をホールセルパッチクランプ法によって測定し、APETx1 の野生型および変異体の 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 の野生型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

Rat *ether-à-go-go* gene 1 (rEAG1) の立体構造を鋳型にして、hERG の S4 の up conformation および 2 種の down conformation のモデルを作製し、HADDOCK 2.4 web server を用いたドッキングシミュレーションによって APETx1-VSD 複合体の構造モデルを構築した。

【結果】

リコンビナント APETx1 を大腸菌に封入体として発現させた後、リフォールディングさせることで調製した。リコンビナント APETx1 の立体構造が天然物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、天然物の構造と全体構造がほとんど一致していることを確認した (残基番号 2-41 の主鎖 RMSD 値で 0.7 Å-1.5 Å)。

続いて、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 μM のリコンビナント APETx1 は hERG 電流を減少させ、hERG の 50%活性化電位 ($V_{1/2}$) を高電位側にシフトさせた ($\Delta V_{1/2} = 23.9 \pm 2.5$ mV)。二本刺し膜電位固定法でも同等の結果が得られることを確認した ($\Delta V_{1/2} = 21.9 \pm 1.1$ mV)。

そこで、APETx1 の hERG 阻害活性に関わるアミノ酸残基を同定するため、側鎖が分子表面に露出する 15 残基について変異体解析を行なった。濃度 10 μM 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 F15, Y32, F33, L34 の変異体で野生型と比較して $\Delta V_{1/2}$ 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、疎水性パッチを形成していた。そのため、この疎水性パッチが hERG の VSD との結合に関与していることが示唆された。

次に、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。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り野生型と同等の電流が観測されることを確認した。それぞれの変異体における濃度 10 μM の APETx1 での $\Delta V_{1/2}$ の値を評価したところ、hERG の F508A、E518C、I521A の 3 個の変異体で APETx1 による阻害がほとんど完全に消失することが分かった。これらの 3 個のアミノ酸残基は hERG の VSD の S3-S4 ループに存在することから、APETx1 が hERG の S3-S4 ループに結合していることが示唆された。

最後に、変異体解析で同定された APETx1 と hERG の残基同士が直接的に相互作用することが可能であるかを検証することとした。APETx1 が結合することが示唆される hERG の S3-S4 ループは、先行研究の立体構造において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 ループ領域の構造モデル (up モデル) を作製した。さらに、S4 を一巻きもしくは二巻き分だけ細胞内側に移動させた 2 種の down モデルを作製した。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 モデルでは変異体解析で同定されたアミノ酸残基同士が相互作用したモデルを得ることができなかった。その一方で、down モデルでは、APETx1 の疎水性残基の側鎖が hERG の F508, E518, I521 の 3 個の残基で形成された窪みにはまるように結合した複合体モデルを得ることができた。

【考察】

リコンビナント APETx1 は天然物の APETx1 と同等の立体構造を形成し、resting state を安定化することが分かった。APETx1 の変異体解析から、APETx1 の分子表面の疎水性パッチが hERG との直接的な相互作用に関与すると考えた。さらにドッキングシミュレーションによる検証では、S4 が down conformation となったときに hERG の変異体解析で同定された F508, E518, I521 が APETx1 の結合部位を形成することが示唆された。この APETx1 による S4 の down conformation の認識機構は、VSD への結合を介して hERG の機能を調節するリガンドを創製する上での構造基盤となることが期待される。