

博士学位論文 2020 年度

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

慶應義塾大学大学院薬学研究科

氏名 松村 一輝

略語

AMBER	Assisted Model Building with Energy Refinement
BMRB	Biological Magnetic Resonance Bank
CHCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid
CNBH	cyclic nucleotide binding homology
COS	CV-1 cells origin, SV40
COSY	correlation spectroscopy
cRNA	complementary ribonucleic acid
cryo-EM	cryo-electron microscopy
CYANA	combined assignment and dynamics algorithm for NMR applications
DEPC	diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid
DSS	4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate
DTT	dithiothreitol
rEAG1	rat <i>ether-à-go-go</i> 1
EGTA	ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
FID	free induction decay
hERG	human <i>ether-à-go-go</i> -related gene 1
HADDOCK	High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing
HEK293	human embryonic kidney cells 293
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
IUPAC-IUB	International Union of Pure and Applied Chemistry-International Union of Biochemistry
K _v	Voltage-gated potassium channel
LB	Luria-Bertani
LQTS	long QT syndrome
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization
MS	mass spectroscopy
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
NOESY	NOE spectroscopy
NP-40	nonidet P-40
NUS	non-uniform sampling

OD	optical density
S-S bond	disulfide bond
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAS	Per-Arnt-Sim
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PD	pore domain
PDB	Protein Data Bank
rEAG1	rat <i>ether-à-go-go</i> 1
RMSD	root mean square deviation
rpm	revolutions per minute
SEM	standard error of the mean
SDS	sodium dodecyl sulfate
SOB	super optimal broth
SOC	super optimal broth with catabolite repression
TEV	tobacco etch virus
TEVC	two-electrode voltage clamp
TFA	trifluoroacetic acid
TOCSY	total correlation spectroscopy
TOF	time of flight
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
VSD	voltage-sensing domain
$V_{1/2}$	half-maximal activation voltage
YT	yeast extract tryptone

目次

第 1 章 序論	5
1.1 電位依存性カリウムイオンチャネル	5
1.2 Human <i>ether-à-go-go</i> -related gene (hERG) の生体内での機能と、hERG 結合リガンドによる創薬の可能性	6
1.3 hERG の構造的特徴	8
1.4 hERG の膜電位依存的な活性化	12
1.5 K _v チャネルを阻害するペプチド毒素	13
1.6 hERG を阻害する gating-modifier toxin APETx1	18
1.7 研究の目的	22
1.8 研究の概要	22
第 2 章 材料と方法	24
2.1 試薬	24
2.2 培地の組成	24
2.3 バッファーの組成	26
2.4 APETx1 の発現コンストラクトの構築	27
2.5 リコンビナント APETx1 およびその変異体の調製	28
2.6 核磁気共鳴 (NMR) 法によるリコンビナント APETx1 の解析	31
2.7 ホールセルパッチクランプ法による解析	36
2.8 二本刺し膜電位固定法 (TEVC) による解析	37
2.9 APETx1-VSD 複合体の構造モデルの構築	43
第 3 章 結果	45
3.1 リコンビナント APETx1 の調製	45
3.2 リコンビナント APETx1 の hERG 阻害活性の評価	47
3.3 NMR 法によるリコンビナント APETx1 の立体構造の評価	52
3.4 APETx1 の hERG 阻害に関わるアミノ酸残基の同定	62
3.5 APETx1 による阻害に関わる hERG のアミノ酸残基の同定	71
3.6 APETx1-VSD 複合体の構造モデルの構築	81
第 4 章 考察	88
4.1 APETx1 による hERG の VSD の S4 の down conformation の認識	88
4.2 APETx1-VSD 複合体の構造モデル	90
4.3 APETx1 とクモ由来の gating-modifier toxin の比較	92
4.4 APETx1 の hERG 阻害活性と結合親和性の定量的な評価	93

第 5 章 総括	95
5.1 結論	95
5.2 今後の展望	96
第 6 章 補遺	97
6.1 APETx1 の化学シフトテーブル (BMRB code: 36345)	97
参考文献	102
謝辞	110

第1章 序論

1.1 電位依存性カリウムイオンチャネル

生体内におけるカリウムイオン (K^+) の濃度は細胞内で約 140 mM、細胞外で約 5 mM であり、細胞内外の K^+ 濃度の差は膜電位の形成に必須である。カリウムイオンチャネル (K^+ チャネル) は電気化学的勾配に従って K^+ を選択的に膜透過させる膜貫通型タンパク質である [1]。 K^+ チャネルには膜電位やリガンドといった種々の刺激に応答して、イオン透過路の開閉が調節されているものがあり、膜電位を感知して構造変化する K^+ チャネルを電位依存性 K^+ チャネル (K_v チャネル、voltage-gated K^+ channel) と呼ぶ [1]。ヒトの K_v チャネルは 12 個のファミリー (K_v1 - K_v12) に分類され、これまでに 40 種の分子種が同定されている [2-5]。 K_v チャネルは細胞の静止膜電位の維持や、神経細胞や心筋細胞といった電氣的興奮性細胞の活動電位の持続時間や発火頻度の調節に関わっている [6,7]。そのため、膜電位依存的な K_v チャネルの動作機構を解明することは、これらの生命現象を理解する上で重要であるとともに、 K_v チャネルの電位依存性を調節する新規リガンドの創製にも繋がることが期待され、創薬の観点からも重要な課題である。

1.2 Human *ether-à-go-go*-related gene (hERG) の生体内での機能と、hERG 結合リガンドによる創薬の可能性

Human *ether-à-go-go*-related gene (hERG, $K_v11.1$) は K_v チャンネルの一種であり [8]、心臓や脳、がん細胞に発現し、静止膜電位の維持や活動電位の制御などに関与する [8-10]。

心臓の拍動は、心筋細胞の正常な活動電位によって制御されている。心筋の中でも、心室筋細胞の収縮および弛緩は血液を全身へと拍出することに寄与する。心室筋細胞の活動電位は、第0相（脱分極）、第1相（一過性再分極、スパイク）、第2相（プラトー）、第3相（再分極）、第4相（静止膜電位）で構成されており、それぞれの相では電位依存性イオンチャンネルの機能が必須である（図1-1） [11]。このうち第3相では、 K_v チャンネルである hERG および KCNQ1 ($K_v7.1$) が K^+ を細胞外へと流出させることで、膜電位が低下し、活動電位が終結する。そのため、これらの K_v チャンネルは活動電位持続時間の調節に関わっており（図1-1） [9-11]、その機能不全は活動電位持続時間の延長に伴う致死的な不整脈（QT 延長症候群、long QT syndrome: LQTS）を誘発する。特に、hERG は遺伝的要因や薬剤による致死的な不整脈と関連することが報告されている [9,12-14]。

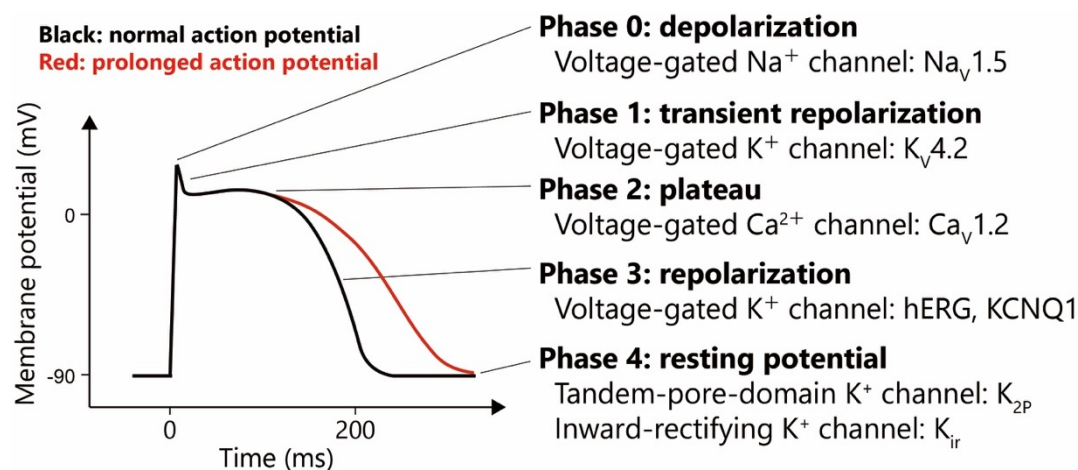


図 1-1 心室筋活動電位の形成に関わるイオンチャンネル
正常時の活動電位を黒、再分極が遅延したときの活動電位を赤で示した。

近年、脳などの中枢神経系の興奮性細胞や、がん細胞のような非興奮性細胞においても、hERG の発現や機能の重要性が知られてきた。脳の海馬に発現する hERG アイソフォームである KCNH2-3.1 の発現量や機能は、統合失調症の発症と関連していることが報告されている [15-17]。また、ラットの視床下核の神経細胞では、ERG が発火の頻度や自動性の調節に関与しており、hERG の阻害剤 (E-4031) がパーキンソン病様症状を改善し、逆に hERG の活性化剤 (PD118057) が運動機能を低下させることが報告されている [18]。さらに、多くのがん細胞において hERG の発現の亢進がみられており、hERG が発がんプロセスに関与していることが示唆されている [19-21]。グリア細胞由来の脳腫瘍である膠芽腫 (glioblastoma) では、hERG を高発現したがん細胞を有する患者に対して、不整脈を誘発させない hERG 阻害剤を投与したところ、生存期間が有意に延長したことが報告された [22]。これらのことは、hERG の機能を調節するリガンドが新たな薬剤候補分子となる可能性を示している。そのため、hERG の膜電位依存的な機能発現メカニズムを明らかにし、hERG の生理学的な役割や疾患の発症機序を分子レベルで理解するとともに、hERG に結合するリガンドの作用メカニズムを原子レベルで解明することが重要である [21,23]。

1.3 hERG の構造的特徴

hERG は全長 1159 残基からなる 6 回膜貫通型タンパク質であり、4 量体を形成して K_v チャネルとして機能する (図 1-2a) [8,24]。hERG の立体構造はクライオ電子顕微鏡 (cryo-electron microscopy: cryo-EM) を利用した単粒子解析法により解明されている (図 1-2b) [24]。hERG の膜貫通ドメインは他の K_v チャネルと共通したドメイン構造を有しており、膜電位を感知して構造変化する電位センサードメイン (voltage-sensing domain: VSD) と K^+ 透過路を有するポアドメイン (pore domain: PD) に分かれる。膜貫通ドメインの両側には細胞内ドメインが存在する。N 末端側の細胞内ドメインには N-tail (N-cap と呼ばれる) ドメインとそれに続く Per-Arnt-Sim (PAS) ドメインを有する [25]。一方で、C 末端側の細胞内ドメインには環状ヌクレオチド結合相同 (cyclic nucleotide binding homology: CNBH) ドメインと特定の立体構造を形成していない C-tail を有し、膜貫通ドメインと CNBH ドメインとの間は C-linker ドメインによって繋がれている [26,27]。これらの細胞内ドメインは、膜貫通ドメインにおける膜電位依存的な K^+ の透過を調節している [10]。

膜貫通ドメインの VSD は 4 本の膜貫通ヘリックス (S1-S4) で構成される (図 1-2c)。S4 ヘリックスには 3 残基ごとに塩基性アミノ酸残基が存在し、膜電位依存的な構造変化に関わっている。その一方で、PD は 2 本の膜貫通ヘリックス (S5-S6) の 4 量体で構成される (図 1-2c 左)。4 量体の中心には K^+ 透過孔 (K^+ permeation pore) が存在し、4 本の S6 ヘリックスが細胞内側で束となることでイオン透過路の細胞内側ゲート (intracellular gate) を形成する (図 1-2c 右)。S5 と S6 を繋ぐループ領域には K^+ 選択性に関わる配列 (signature motif) が存在し、選択性フィルター (selectivity filter) と呼ばれる構造を形成する (図 1-2c 右)。

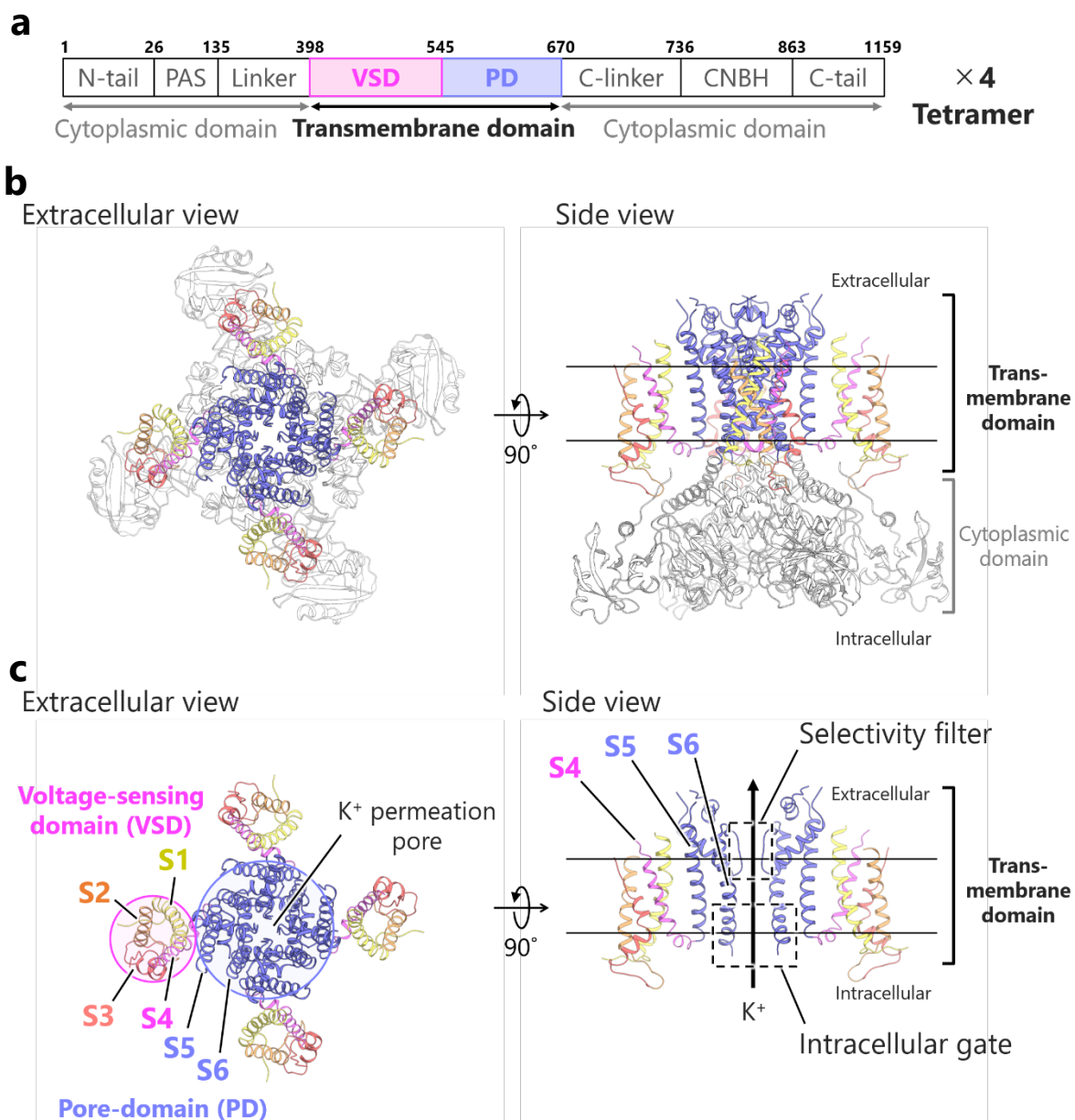


図 1-2 hERG の立体構造

(a) hERG のドメイン構造。(b) hERG の cryo-EM 構造 (PDB code: 5VA2)。全長 1159 残基のうち、特定の立体構造を形成しないと考えられている残基番号 141-350 および 871-1005 を欠失したコンストラクトで構造解析された [24]。細胞外側から見下ろした図 (左、extracellular view) と膜平面方向から見た図 (右、side view) を示した。VSD の S1 を黄色、S2 を橙色、S3 を赤色、S4 をピンク色で示し、PD は青色で示した。(c) hERG の膜貫通ドメイン (残基番号 398-668) だけを表示した。Side view には向かい合う 2 つのサブユニットだけを表示し、K⁺透過路を矢印で示した。

これまでに全長に相当する立体構造が明らかとなっている K_v チャンネルには、古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来 K_vAP [28]、ラット由来 K_v1.2 [29,30]、ラット由来 K_v1.2 の S3 上部から S4 までの領域 (S3b-S4 領域、paddle motif と呼ばれる。) を K_v2.1 のもので置換したキメラチャンネル (K_v1.2-2.1 キメラ) [31-34]、アフリカツメガエルおよびヒト由来 KCNQ1 (K_v7.1) [35,36]、ヒト由来 KCNQ2 (K_v7.2) [37]、ヒト由来 KCNQ4 (K_v7.4) [38]、ラット由来 *ether-à-go-go* 1 (rEAG1: K_v10.1) [39,40]、および hERG [24] がある。K_v チャンネルのうち、K_v1-K_v9 では VSD と PD が隣接するサブユニット間で交差したドメインスワップト型 (domain-swapped) の 4 量体構造を形成する (図 1-3a)。ドメインスワップト型 K_v チャンネルでは、VSD と PD を繋ぐ約 15 残基の S4-S5 リンカーが α ヘリックスを形成しており、VSD の構造変化を PD に伝える役割を担うと考えられている [41]。その一方で、hERG を含む *ether-à-go-go* (EAG) ファミリー (K_v10-12) の K_v チャンネルでは VSD と PD が同一サブユニット内で近接した非ドメインスワップト型 (non-domain-swapped) の 4 量体構造を形成する (図 1-3b)。非ドメインスワップト型の K_v チャンネルでは、S4-S5 リンカーが非常に短く、VSD と PD の相対的な配置がドメインスワップト型の K_v チャンネルとは異なり、VSD と PD の間の共役機構も異なることが想定される [24,39]。

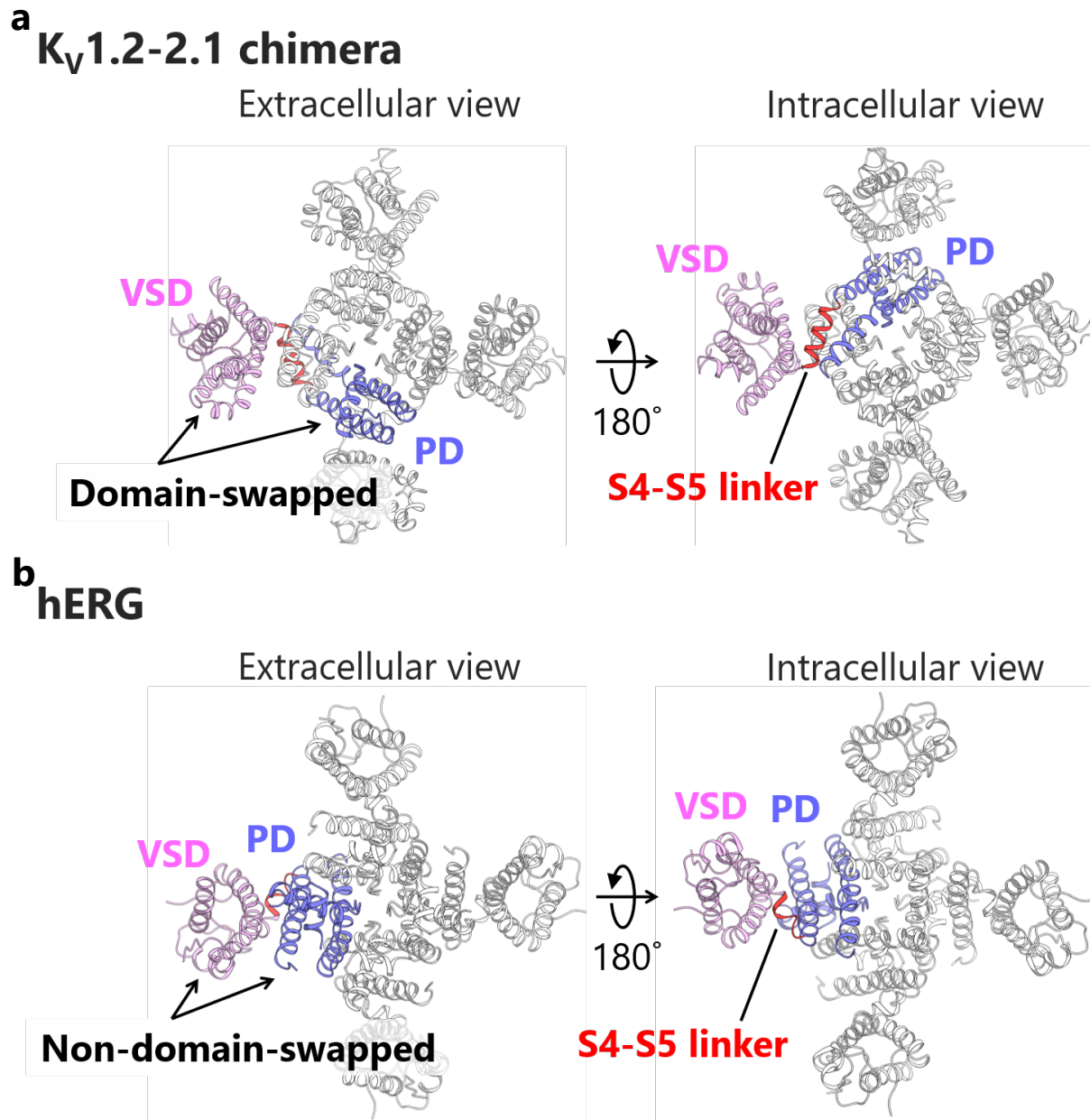


図 1-3 K_v1.2-2.1 キメラと hERG の膜貫通ドメインの 4 量体構造の比較
 細胞外側から見た図 (左、extracellular view) と細胞内側から見た図 (右、intracellular view)
 を示した。一つのプロトマー中の VSD をピンク、PD を青、S4-S5 リンカーを赤で示した。
 (a) K_v1.2-2.1 キメラの結晶構造中の膜貫通ドメイン (PDB code: 2R9R) [31]。 (b) hERG の
 cryo-EM 構造中の膜貫通ドメイン (PDB code: 5VA2) [24]。

1.4 hERG の膜電位依存的な活性化

hERG の VSD の S4 ヘリックスは複数の塩基性残基を有しており、正電荷を帯びているため、静止膜電位の下では細胞内側に引き付けられた down conformation をとる。このとき、ゲートは閉じており、この状態を静止状態 (resting state) と呼ぶ (図 1-4)。膜電位が脱分極すると、S4 ヘリックスが細胞外側へと移動した up conformation をとり、これに伴ってゲートが開くことで、活性化状態 (activated state) をとる (図 1-4)。これまでにクライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) を利用した単粒子解析によって、hERG の異なる 3 種類のコンストラクトでの構造が決定されている [24]。これらの構造はいずれも膜電位のない条件で解析されており、S4 が up conformation をとり、ゲートが開いている。そのため、これらの構造は膜電位が脱分極したときの機能状態である activated state の立体構造であると考えられている。その一方で、従来の構造解析手法では膜電位を形成させた条件での解析が技術的に困難であるために、負の膜電位での機能状態である resting state の立体構造は明らかになっていない。

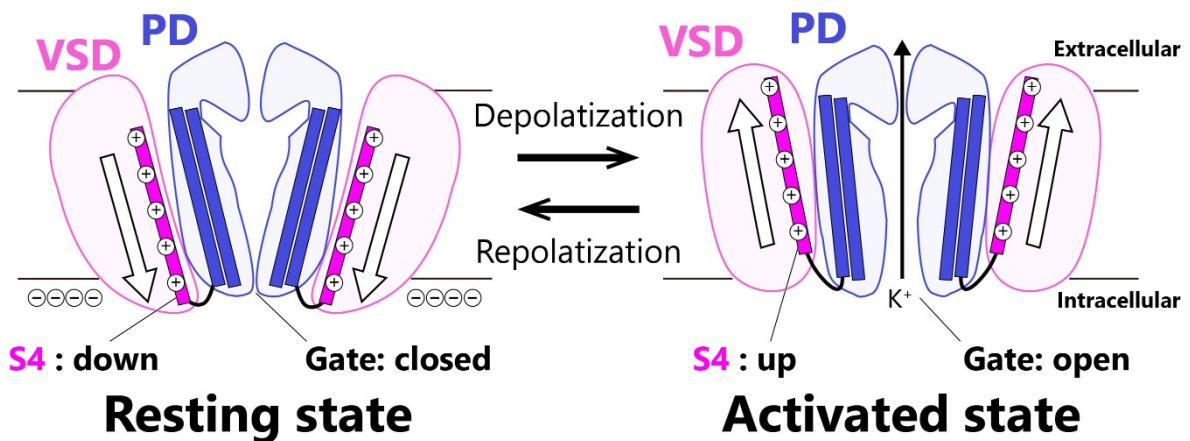


図 1-4 hERG の膜電位依存的な活性化における機能状態の変化
VSD をピンク、PD を青で示した。VSD の S4、および PD の S5 と S6 を棒で模式的に示した。

1.5 K_v チャンネルを阻害するペプチド毒素

サソリ、イソギンチャク、クモ、イモガイ、ヘビ、ハチ、ムカデなどの有毒生物が天敵からの自己防衛や獲物の捕食のために利用するペプチド毒素には、イオンチャンネルを作用標的とするものがある [42-45]。これらのペプチド毒素には多様な分子種が存在し、その分子構造や標的選択性、作用メカニズムがそれぞれ異なる。K_v チャンネルを阻害するペプチド毒素の結合部位は、PD の細胞外領域と VSD の細胞外領域に分類することができる (図 1-5)。PD の細胞外領域に結合するペプチド毒素の中で最もよく解析されているが、pore-blocking toxin である。Pore-blocking toxin は K_v チャンネルの選択性フィルターの周辺に細胞外側から結合し、イオン透過路を物理的に塞ぐことでイオン透過を阻害する [34]。その一方で、VSD の細胞外領域に結合するペプチド毒素は gating-modifier toxin と呼ばれる。Gating-modifier toxin は K_v チャンネルの VSD の細胞外領域に結合し、特定の機能状態を安定化することで、PD でのイオン透過をアロステリックに制御する [46]。これらの生物由来のペプチド毒素の K_v チャンネルに対する結合様式、および阻害様式を明らかにすることは、K_v チャンネルを標的とした創薬への応用に繋がることが期待される。

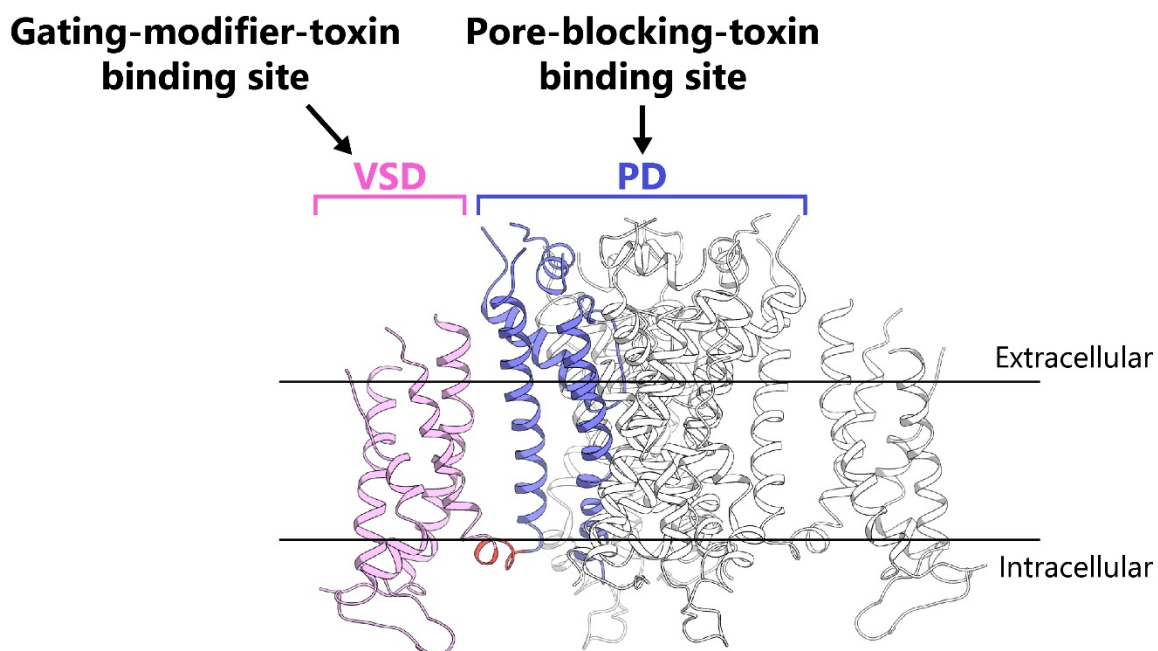


図 1-5 K_v チャンネルのペプチド毒素結合部位
hERG の cryo-EM 構造中の膜貫通ドメイン (PDB code: 5VA2) [31]。一つのプロトマー中の VSD をピンク、PD を青、S4-S5 リンカーを赤で示した。

Pore-blocking toxin にはサソリ、イソギンチャク、イモガイ、ムカデ由来のものが知られており、その配列と立体構造は非常に多様である [43-45]。特に、サソリの一種である *Leiurus quinquestriatus hebraeus* が産生する charybdotoxin (CTX: α -KTx 1.1) では、 K^+ チャンネルの阻害機構がよく解析されており、 $K_v1.2-2.1$ キメラとの複合体の結晶構造が明らかとなっている (図 1-6) [34]。この構造では、CTX が Lys 残基の側鎖 NH_3^+ を選択性フィルターの最も外側の K^+ 結合サイト付近に結合させており、これにより K^+ の透過を物理的に阻んでいることが示された (図 1-6)。この pore-plugging 機構による K^+ チャンネル阻害機構は他の pore-blocking toxin でも共通していると考えられている [47-53]。

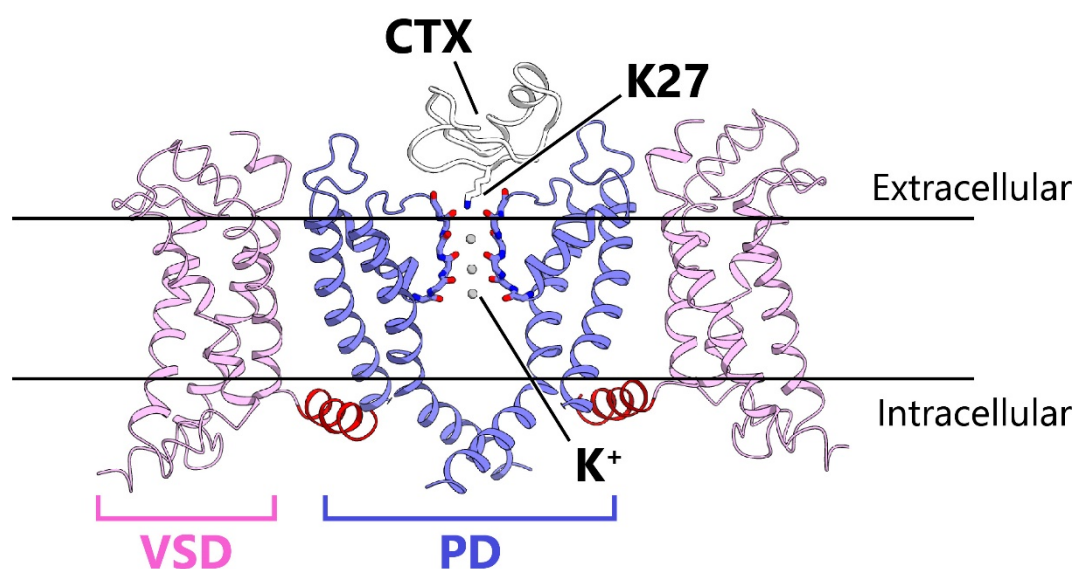


図 1-6 Pore-blocking toxin による K_v チャンネル阻害様式

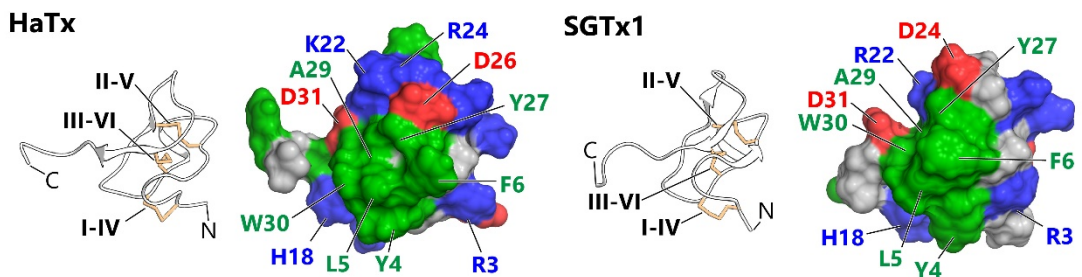
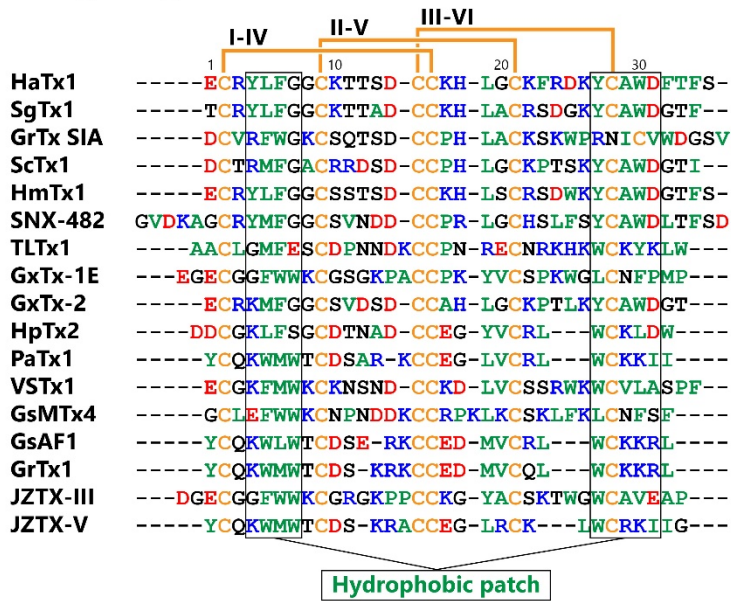
CTX と $K_v1.2-2.1$ キメラの複合体の結晶構造 (PDB code: 4JTA) [34]。 $K_v1.2-2.1$ キメラについては膜貫通ドメインの向かい合うサブユニットだけを表示し、選択性フィルターを構成するアミノ酸残基をスティックで表示した。選択性フィルターに結合している K^+ (灰色) も示した。VSD をピンク、PD を青、S4-S5 リンカーを赤で示した。CTX は選択性フィルターに結合している K27 だけをスティックで表示した。

Pore-blocking toxin とは異なり、gating-modifier toxin では K_v チャンネルとの複合体の立体構造は明らかとなっておらず、その阻害機構は分かっていない。 K_v チャンネルを標的とする gating-modifier toxin には、クモ（主にタランチュラ）由来のペプチド毒素とイソギンチャク由来のペプチド毒素が複数存在し（図 1-7a-b） [54,55]、近年ではサソリ由来のペプチド毒素でも発見されている [56]。これらの gating-modifier toxin の多くは、VSD の S3 ヘリックスから S4 ヘリックスを繋ぐループ（S3-S4 ループ）周辺の細胞外側領域に結合し、resting state を安定化することによって膜電位依存的な活性化を阻害する [54,55]。

クモ由来の gating-modifier toxin には *Grammostola spatulata* の hanatoxin 1 (HaTx1) [57]、*Scodra griseipes* の SGTx1 [58]、*Plesiophrictus guangxiensis* の guangxitoxin-1E (GxTx-1E) [59,60]、*Chilobrachys jingzhao* の jingzhaotoxin (JZTX) ファミリーの JZTX-III や JZTX-V [61,62] などがあり、いずれも 30-41 残基のペプチド毒素で、3 組の分子内ジスルフィド (S-S) 結合で架橋された inhibitor cystine knot (ICK) フォールドを形成する（図 1-7a） [55,63-65]。これらの gating-modifier toxin の分子表面には疎水性残基が局在した疎水性パッチが存在し、この疎水性パッチが脂質二重膜中への分配と VSD との結合の両方に関与すると考えられている [66,67]。

その一方で、イソギンチャク由来の gating-modifier toxin には、*Anemonia sulcata* の blood-depressing substance-1 (BDS-1) [68] や *Anthopleura elegantissima* の APETx1 [69] などが知られる（図 1-7b）。これらは 42-43 残基のペプチド毒素であり、3 組の分子内 S-S 結合で架橋された β -defensin フォールドを形成する [70-73]。イソギンチャクとクモの gating-modifier toxin の間には相同性がみられず、立体構造や S-S 結合の架橋の位置も異なるにも関わらず、クモの gating-modifier toxin と同様にイソギンチャクの gating-modifier toxin の分子表面にも疎水性パッチが存在する（図 1-7b）。しかしながら、イソギンチャクの gating-modifier toxin の疎水性パッチが K_v チャンネルとの相互作用に関与しているのかは分かっておらず、これらの gating-modifier toxin がどのように K_v チャンネルの VSD と相互作用し、 K_v チャンネルの膜電位依存的な構造変化を阻害するのかは明らかとなっていない。

a Spider gating-modifier toxin



b Sea anemone gating-modifier toxin

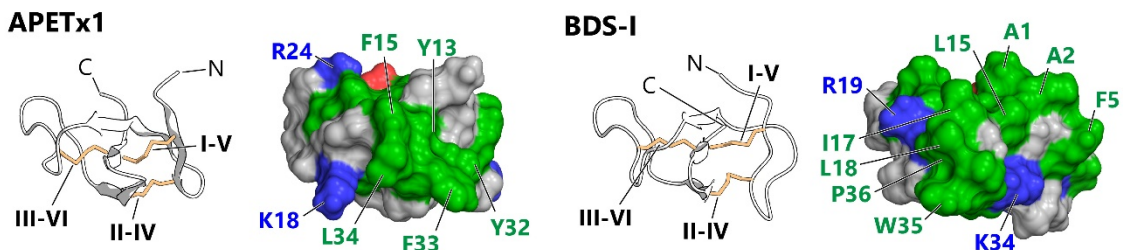
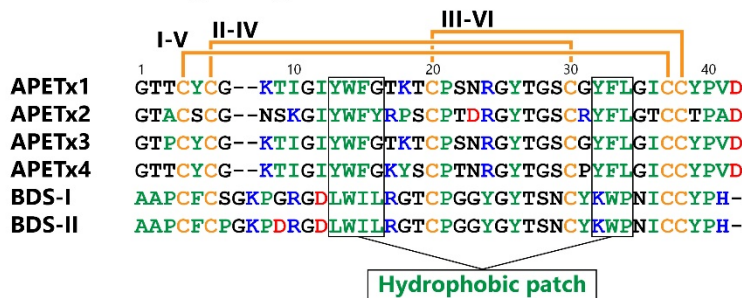


図 1-7 Gating-modifier toxin のアミノ酸配列と構造

アミノ酸配列のアラインメントは Clustal Omega [74] を利用して作成したのに対して、マニュアルで修正を加えて作成した。システイン残基 (Cys) を橙、酸性アミノ酸残基 (Asp, Glu) を赤、塩基性アミノ酸残基 (Arg, His, Lys) を青、疎水性アミノ酸残基 (Ala, Ile, Leu,

Met, Phe, Pro, Trp, Tyr, Val) を緑、その他のアミノ酸残基 (Asn, Gln, Gly, Ser, Thr) を黒で示した。6 個の Cys 残基は N 末端から順に I-VI で表し、配列中には橙色の線で S-S 結合の形成ペアを示した。また、Hydrophobic patch を形成しているアミノ酸残基を枠で囲った。

(a) クモの ICK フォールドのペプチド毒素の配列 (上) と構造 (リボン表示と表面表示)。各ペプチド毒素の UniProtKB code は以下に示した (HaTx1, P56852; SGTx1, P56855; GrTx SIA, P60590; ScTx1, P60991; HmTx1, P60992; SNX-482, P56854; TLTx1, P83745; GxTx-1E, P84835; GxTx-2, P84837; HpTx2, P58426; PaTx1, P61230; VSTx1, P60980; GsMTx4, Q7YT39; GsAF1, P61408; GrTx1, P85117; JZTX-III, P62520; JZTX-V, Q2PAY4)。PDB code は以下に示した (HaTx1, 1D1H; SGTx1, 1LA4)。

(b) イソギンチャクの β -defensin フォールドのペプチド毒素の配列 (上) と構造 (リボン表示と表面表示)。各ペプチド毒素の UniProtKB code は以下に示した (APETx1, P61541; APETx2, P61542; APETx3, B3EWF9; APETx4, C0HL40; BDS-I, P11494; BDS-II, P59084)。PDB code は以下に示した (APETx1, 1WQK; BDS-I, 1BDS)。

1.6 hERG を阻害する gating-modifier toxin APETx1

イソギンチャク的一种である *Anthopleura elegantissima* が産生する APETx1 は全長42残基のペプチド毒素である (図1-8a) [69]。イソギンチャクから抽出して精製した天然物の APETx1 を核磁気共鳴 (NMR) 法で解析することにより、APETx1 が3組のジスルフィド (S-S) 結合で架橋された4本の逆平行βストランドからなる立体構造を有することが分かっている (図1-8b) [72]。

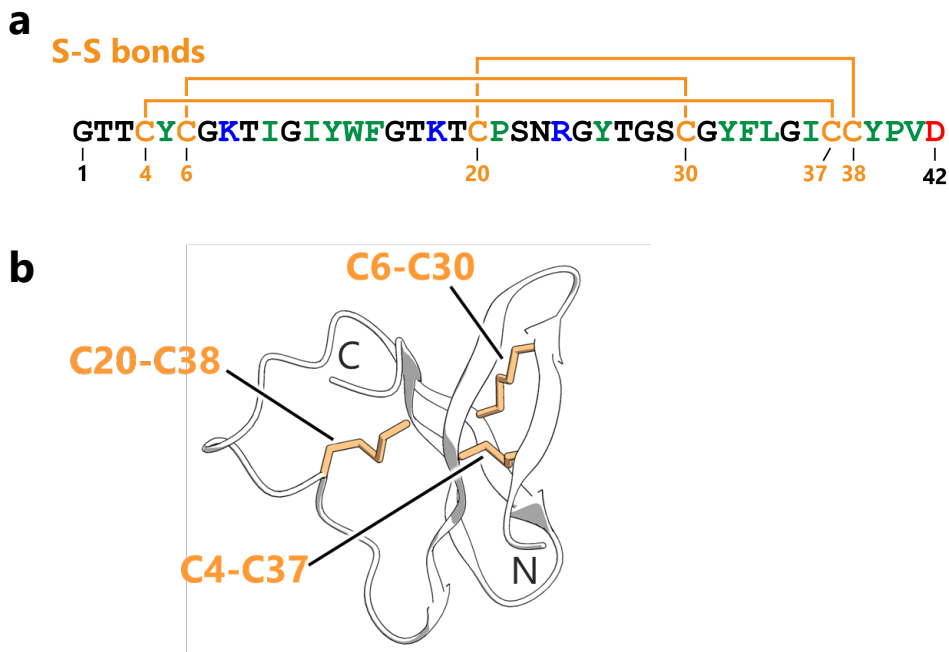


図 1-8 APETx1 のアミノ酸配列

(a) システイン残基 (Cys) を橙、酸性アミノ酸残基 (Asp) を赤、塩基性アミノ酸残基 (Arg, Lys) を青、疎水性アミノ酸残基 (Ile, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr, Val) を緑、その他のアミノ酸残基 (Asn, Gly, Ser, Thr) を黒で示した。S-S 結合を形成する Cys 残基のペアを橙色の線で示した。(b) イソギンチャクから精製された APETx1 の NMR 構造 (PDB: 1WQK)。pH 3.0 かつ 280 K 条件での構造決定された [72]。

K_v チャネルを過剰発現させたアフリカミドリザル腎細胞由来細胞株 (COS-7) を利用したホールセルパッチクランプ法によって、APETx1はhERGを阻害することが明らかとなった ($IC_{50}=34$ nM) [69]。APETx1は低い脱分極電位の際にhERG電流をより強く阻害し、hERGの conductance-voltage 曲線 (G - V 曲線、活性化曲線) を高電位側にシフト (ポジティブシフト) させることが報告されている (図1-9a) [69,75]。このことはAPETx1添加時にhERGを活性化させるにはより高い電位を与える必要があることを示しており、APETx1がhERGの活性化前の機能状態である resting state に結合し、安定化していることを反映している。

hERGのPDに結合することが知られているサソリ由来のペプチド毒素 (BeKm-1) [76,77] との競合実験により、APETx1の結合部位がhERGのPDではないことが示唆された [75]。さらに、hERGのVSDの細胞外側領域であるS3-S4ループのアミノ酸残基 (G514-E519) の変異体解析では、G514C変異体においては10 μ M APETx1によるhERGの50%活性化電位 ($V_{1/2}$) のポジティブシフトがWTと比較して有意に増大し、逆にE518C変異体においてはポジティブシフトが有意に低下することが報告されている (WT, $\Delta V_{1/2}=+24.6 \pm 2.7$ mV; G514C, $\Delta V_{1/2}=+55.6 \pm 1.3$ mV; E518C, $\Delta V_{1/2}= -0.5 \pm 1.0$ mV) (図1-9b) [75]。これらの結果は、APETx1の結合部位がhERGのVSDであることを示唆している。そのため、APETx1はhERGのVSDへの結合を介して resting state を安定化し、活性化を阻害する gating-modifier toxin であると考えられている。

これまでにAPETx1についてペプチド合成法や異種タンパク質発現系を利用した調製法は確立されておらず、APETx1の変異体解析は困難であった。そのため、APETx1がどのアミノ酸残基を利用して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。リコンビナントAPETx1の大量調製法を確立し、変異体ごとのhERG阻害活性を評価することが可能となれば、APETx1のhERG阻害機構をアミノ酸残基レベルで解明することができる。このようにして明らかとなったhERG阻害に重要なAPETx1のアミノ酸残基は、hERGに結合するアミノ酸残基を含むことが想定される。一方で、hERGの変異体に対するAPETx1の阻害活性を評価することにより、APETx1による阻害に関与するhERGのアミノ酸残基を解明することができる。これにより、現状では立体構造が明らかとなっていないhERGの resting state の分子表面上に形成される、APETx1の立体構造と相補的な未知のリガンド結合部位を同定するこ

とが可能となる。したがって、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。

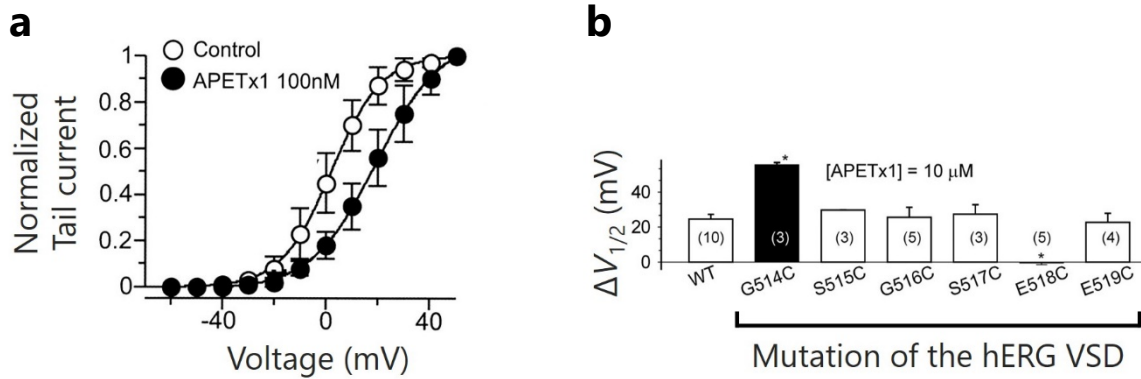


図 1-9 APETx1 による hERG の G-V 曲線のポジティブシフト

(a) hERG の G-V 曲線。APETx1 非添加条件 (白、control) と 10 μM APETx1 添加条件 (黒) で解析したもの [69]。(b) 濃度 10 μM の APETx1 での 50%活性化電位 $V_{1/2}$ の変化量 ($\Delta V_{1/2}$)。hERG の野生型 (WT) と VSD の S3-S4 ループ領域のアミノ酸残基の変異体を比較したもの [75]。測定回数を括弧の中に示している。p 値が 0.05 より小さいとき、統計学的有意 (*) であると判断している。

1.7 研究の目的

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。

1.8 研究の概要

まず、ヒスチジン (His) タグを融合した APETx1 を大腸菌に不溶性の凝集体である封入体として発現させた。尿素で変性させることで可溶化し、ニッケル (Ni^{2+}) アフィニティークロマトグラフィーにより精製した後、透析によって尿素を除去するとともに酸化還元バッファ中で S-S 結合を形成させ、リフォールディングさせた。この組換え型 APETx1 (リコンビナント APETx1) を NMR 法により解析することで、pH 6.0, 298 K 条件下で立体構造を決定し、リコンビナント APETx1 が天然物の APETx1 (ネイティブ APETx1) と同等の立体構造を有することを確認した。また、電気生理学的解析により、リコンビナント APETx1 は hERG の $V_{1/2}$ の値を上昇させたことから、ネイティブ APETx1 と同様にリコンビナント APETx1 が hERG の resting state を安定化することを確認した。

次に、APETx1 の hERG 阻害活性に寄与するアミノ酸残基を同定するために、APETx1 の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 $\Delta V_{1/2}$ の値が有意に低下した。これらの疎水性アミノ酸残基は分子表面上で局在し、疎水性パッチを形成していたことから、この疎水性パッチが hERG との相互作用に関与していることが示唆された。

続いて、この APETx1 が結合する hERG のアミノ酸残基を同定するために、hERG の変異体解析を行った。アフリカツメガエルの卵母細胞に強制発現させた hERG 変異体の電流を測定したところ、APETx1 添加時の $\Delta V_{1/2}$ の値が hERG の L433, D460, F508, E518, I521 の変異で有意に低下し、I512, G514, G522 の変異で有意に上昇した。これらのアミノ酸残基のうち L433 と D460 を除くアミノ酸残基は VSD の S3-S4 領域に位置することから、APETx1 が hERG の VSD の S3-S4 領域に結合することが示唆された。

そこで、APETx1 と hERG のドッキングシミュレーションを行うことにより、変異体解析の結果を満たす複合体の構造モデルを構築することができるかを検証することとした。hERG の VSD の S4 が細胞内側に引き付けられた down conformation のモデルを構築し、APETx1 をドッキングさせたところ、APETx1 の疎水性パッチが hERG の S3-S4 領域の分子表面の窪みにはまるように結合した構造モデルが得られた。この構造モデルでは、変異体解析により同定された両者のアミノ酸残基が直接的に相互作用しており、変異体解析の結果を満たしていることが分かった。以上の結果に基づいて、APETx1 による hERG 阻害のメカニズムを考察した。

第2章 材料と方法

2.1 試薬

安定同位体標識化合物は ISOTEC™ より購入した。PCR 反応用の DNA プライマーはユーロフィンジェノミクス株式会社に合成を委託した。その他の試薬は、特に断りのない限り全てナカライテスク株式会社または和光純薬工業株式会社より購入した。これら2社以外から購入した試薬に関しては、文中で適宜製造元を試薬名と共に表記した。

2.2 培地の組成

本研究では、以下の組成の培地を用いた。

- ・ LB (Luria-Bertani) 培地 (40 mg/L kanamycin を含む)

Tryptone 10 g、yeast extract dried 5 g、NaCl 10 g に Milli Q 水を加えて 1 L とし、オートクレーブにより滅菌した後、50-60°C になるまで放冷した。終濃度 40 mg/L の kanamycin を無菌的に加えた。

- ・ LB 培地プレート (40 mg/L kanamycin を含む)

Tryptone 1 g、yeast extract dried 0.5 g、NaCl 1 g、agar 1.5 g に Milli Q 水を加えて 100 mL とし、オートクレーブにより滅菌した後、50-60°C になるまで放冷した。終濃度 40 mg/L の kanamycin を加えてプレート上に分注し、agar が完全に固まるまで室温でさらに放冷した。

- ・ SOC (super optimal broth with catabolite repression) 培地

Tryptone 4 g、yeast extract dried 1 g、NaCl 0.1 g、KCl 0.03 g に Milli Q 水を加えて 200 mL とし、オートクレーブにより滅菌した後、50-60°C になるまで放冷した。2 mM MgCl₂ 1 mL、40% (w/v) glucose 2 mL を無菌的に加えた。

・¹⁵N 標識用 M9 最小培地 (40 mg/L kanamycin を含む)

Na₂HPO₄·12H₂O 15.1 g、KH₂PO₄ 3.0 g、¹⁵N-NH₄Cl 1.0 g、NaCl 0.5 g に Milli Q 水を加えて 1 L とした。オートクレーブにより滅菌した後、室温まで放冷した。培養を開始する直前に、2 M MgSO₄ 1.0 ml、0.1 M CaCl₂ 1.0 ml、10 mM FeCl₃ 0.1 mL、0.2 M ZnSO₄ 0.1 mL、vitamine mixture 1 mL (1 mg/mL biotin、5 mg/mL thiamine、1 mg/mL choline chloride、1 mg/mL folic acid、1 mg/mL nicotinamide、1 mg/mL pyridoxal、1 mg/mL D-pantothenic acid calcium salt、0.1 mg/mL riboflavin を含む)、40 % (w/v) glucose 10 ml および 40 mg の kanamycin を無菌的に加えた。

・¹³C, ¹⁵N 標識用 M9 最小培地 (40 mg/L kanamycin を含む)

Na₂HPO₄·12H₂O 15.1 g、KH₂PO₄ 3.0 g、¹⁵N-NH₄Cl 1.0 g、NaCl 0.5 g に Milli Q 水を加えて 1 L とした。オートクレーブにより滅菌した後、室温まで放冷した。培養を開始する直前に、2 M MgSO₄ 1.0 ml、0.1 M CaCl₂ 1.0 ml、10 mM FeCl₃ 0.1 mL、0.2 M ZnSO₄ 0.1 mL、vitamine mixture 1 mL (1 mg/mL biotin、5 mg/mL thiamine、1 mg/mL choline chloride、1 mg/mL folic acid、1 mg/mL nicotinamide、1 mg/mL pyridoxal、1 mg/mL D-pantothenic acid calcium salt、0.1 mg/mL riboflavin を含む)、40 % (w/v) ¹³C-D-glucose 10 ml および 40 mg の kanamycin を無菌的に加えた。

・2×YT (yeast extract tryptone) 培地 (100 mg/L ampicillin を含む)

Tryptone 16 g、yeast extract dried 10 g、NaCl 5 g に Milli Q 水を加えて 1 L とし、オートクレーブにより滅菌した後、50-60°C になるまで放冷した。終濃度 100 mg/L の ampicillin を無菌的に加えた。

・2×YT 培地プレート (100 mg/L ampicillin を含む)

Tryptone 1.6 g、yeast extract dried 1 g、NaCl 0.5 g、agar 1.5 g に Milli Q 水を加えて 100 mL とし、オートクレーブにより滅菌した後、50-60°C になるまで放冷した。終濃度 100 mg/L の ampicillin を加えてプレート上に分注し、agar が完全に固まるまで室温でさらに放冷した。

- SOB (super optimal broth) 培地

Tryptone 4 g、yeast extract dried 1 g、NaCl 0.1 g、KCl 0.03 g に Milli Q 水を加えて 200 mL とし、オートクレーブにより滅菌した後、50-60°C になるまで放冷した。2 M MgCl₂ 1 mL、2 M MgSO₄ 1 mL を無菌的に加えた。

2.3 バッファーの組成

本研究では以下の組成のバッファーを用いた。特に記載のない限り、水は Milli Q 水を用いた。

- 1×phosphate buffered saline (PBS)

137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄ (pH7.4)

- Lysis バッファー

20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl

- 尿素バッファー

8 M 尿素, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl

- 酸化還元バッファー

3 mM reduced glutathione, 0.3 mM oxidized glutathione, 10% (v/v) glycerol, 20 mM Tris-HCl (pH 9.0), 200 mM NaCl

- リフォールディングバッファー

20 mM Tris-HCl (pH 9.0), 200 mM NaCl

- NMR 測定用バッファー

20 mM KH₂PO₄ (pH 6.0), 100 mM NaCl, 10% D₂O

・パッチクランプ測定用内液

110 mM KF, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.2)

・パッチクランプ測定用外液

140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM D-glucose, 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)

・カエルリンゲル液

88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, and 0.3 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 0.82 mM MgSO₄, and 15 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 0.1% penicillin-streptomycin

・ND96

96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)

2.4 APETx1 の発現コンストラクトの構築

APETx1 (残基番号 1-42) を大腸菌発現用プラスミド pET-30 Xa/LIC (Novagen) に組み込んだコンストラクト (APETx1/pET-30 Xa/LIC) は、東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室の今井駿輔博士が作製したものをご恵与いただいた。本研究では、慶應義塾大学薬学部生命機能物理学講座の秋元まどか助教がこのコンストラクトに対して tobacco etch virus (TEV) プロテアーゼ認識配列を付加することで改変したもの (APETx1-TEV/pET-30 Xa/LIC) を使用した。このコンストラクトでは、目的タンパク質の N 末端にはヒスチジンタグ (His タグ) を融合している。His タグと目的タンパク質の間に TEV プロテアーゼ認識配列が付加さ

れており、TEV プロテアーゼでの切断反応後に目的タンパク質の N 末端側に付加配列が残らない設計となっている。

合計 15 種の APETx1 変異体 (T3P, Y5A, K8A, F15A, K18A, T19A, S22A, N23A, R24A, T27A, S29A, Y32A, F33A, L34A, D42A) については、以下に記載したポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による部位特異的変異導入により作製した。目的の変異を含む 17 残基の相同配列を有するフォワードプライマーおよびリバースプライマーを用意した。これらのプライマーを用いて、APETx1/pET-30 Xa/LIC のプラスミドを鋳型とした PCR を行った。PCR には KOD One (東洋紡) を利用した。反応後の溶液に残存する鋳型プラスミドは、*DpnI* (東洋紡) によって分解することで除去した。この反応後の溶液を用いて、クローニング用大腸菌 DH5 α または TOP10 をヒートショック法により形質転換した。形質転換後の大腸菌に SOC 培地 300-500 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 1-2 時間振盪することで回復培養した。終濃度 40 mg/mL の kanamycin を含む LB 培地プレートを用いて 37 $^{\circ}$ C で終夜培養し、大腸菌を選別した。シングルコロニーを 2-3 mL の LB 培地に植菌し、37 $^{\circ}$ C で 6-12 時間培養した後、培養した菌体からプラスミドを抽出、精製した。得られたプラスミドの塩基配列を解析し、目的の配列を得たことを確認した。

2.5 リコンビナント APETx1 およびその変異体の調製

2.5.1 発現

APETx1-TEV/pET-30 Xa/LIC およびその変異体コンストラクトを用いたヒートショック法により、タンパク質発現用大腸菌株 C41(DE3) を形質転換した。形質転換後、終濃度 40 mg/L の kanamycin を含む LB 培地プレートにて大腸菌を選別し、シングルコロニーを 10 mL の LB 培地 (40 mg/L kanamycin を含む) に植菌し、37 $^{\circ}$ C にて終夜振盪培養した。培養液に滅菌した 80%グリセロールを 2.5 mL 加えて攪拌し、0.1 mL ずつ分注した。液体窒素によって凍結させた後、使用するまで-80 $^{\circ}$ C にて保存した。

非標識体については、以下の手順で大腸菌に発現させた。10 mL の LB 培地 (40 mg/L kanamycin を含む) にグリセロールストック 0.1 mL を加え、37 $^{\circ}$ C にて終夜振盪培養した。培養液を 1 L の LB 培地 (40 mg/L kanamycin を含む) に加え、37 $^{\circ}$ C にて振盪培養し、波長 600

nmでの光学濃度 (OD₆₀₀) が0.6-0.8のときに終濃度 1 mM の isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を加えてタンパク質の発現を誘導した。6 時間後、5,000 rpm にて 10 分間遠心して菌体を回収し、20 ml の lysis バッファーに懸濁した。回収した菌体は液体窒素によって凍結させた後、菌体を破碎するまでの間、-80 °C にて保存した。

均一 ¹⁵N 標識体および均一 ¹³C, ¹⁵N 標識体については、以下の手順で大腸菌に発現させた。40 mL の LB 培地 (40 mg/L kanamycin を含む) にグリセロールストック 0.1 ml を加え、37°C にて終夜振盪培養した。培養液を 5,000 rpm にて 3 分間遠心し、上清をデカンテーションにより除いた後、再び 5,000 rpm にて 3 分間遠心し、上清をピペットで静かに吸い取った。40 mL の 1×PBS を加え、菌体を穏やかに再懸濁したのち、上記と同様の分離操作によって上清を除いた。この操作をもう一回繰り返した。少量 (~10 mL) の M9 培地で菌体を穏やかに懸濁した後、1 L の ¹⁵N 標識用または ¹³C, ¹⁵N 標識用の M9 培地 (40 mg/L kanamycin を含む) に加え、37°C にて振盪培養し、波長 600 nm での光学濃度 (OD₆₀₀) が 0.6-0.8 のときに終濃度 1 mM の isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を加えてタンパク質の発現を誘導した。6 時間後、5,000 rpm にて 10 分間遠心して菌体を回収し、20 ml の lysis バッファーに懸濁した。回収した菌体は液体窒素によって凍結させた後、菌体を破碎するまでの間、-80 °C にて保存した。

2.5.2 精製およびリフォールディング

凍結菌体を含むチューブを流水で穏やかに解凍した後、プロテアーゼ阻害剤カクテル (EDTA free) を添加した。氷上にて Sonifer Analog 250A (Branson) による 0.5 秒、Power 5 の間欠超音波パルス を 2 分間ずつ計 5 回与え、菌体を破碎した。この破碎液を 10,000×g にて 30 分間遠心して上清を取り除き、沈殿を得た。沈殿に対して 0.1% NP-40 を含む lysis バッファー 20 mL を加え、スパーテルでチューブ壁面から沈殿を引き剥がしたのち、氷上にて Sonifer Analog 250A (Branson) による 0.5 秒、Power 5 の間欠超音波パルス を 1 分間ずつ計 3-5 回与え、沈殿物が細くなるまで懸濁した。この懸濁液を 10,000×g にて 30 分間遠心して上清を取り除き、沈殿を得た。沈殿画分中に含まれる核酸を除去するために、上記の懸濁と遠心分

離による沈殿の回収の操作を計3回繰り返した。得られた沈殿に対して尿素バッファー20 mLを加え、スパーテルでチューブ壁面から沈殿を引き剥がしたのち、氷上にて Sonifer Analog 250A (Branson) による0.5秒、Power 5の間欠超音波パルスをもつ計3-5回与え、沈殿物が細くなるまで懸濁した。懸濁液を室温 (25-27°C) で1時間振盪した後、17,000×gにて30分間遠心して上清を得た。尿素バッファーにて平衡化したベッドボリューム3 mlの HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich) に上清をアプライした。尿素バッファーをレジンにアプライし、溶出液における波長260 nmでの吸光度 (A_{260}) および280 nmでの吸光度 (A_{280}) がアプライしたバッファーと同程度になるまで、この洗浄操作を続けた。300 mM imidazole を含む尿素バッファーをアプライして目的タンパク質を溶出させた。非特異に形成された分子内および分子間のジスルフィド結合を還元することを目的として、この目的タンパク質を含む溶出液に対して終濃度2 mMの dithiothreitol (DTT) を添加し、室温 (25-27°C) で1時間静置した。この後の透析中の凝集体形成をできるだけ抑えるために、目的タンパク質の濃度が3 μ M以下になるように尿素バッファーで希釈した。この希釈液を透析膜 Spectra/Por® 3 Dialysis Membrane Standard RC Tubing MWCO 3500 D (Spectrum) に入れ、酸化還元バッファー (透析内液に対する体積比で10倍量) に対して24時間透析を2回行った。続いて、透析内液をリフォールディングバッファー (透析内液に対する体積比で10倍量) に移し替えて、24時間透析を2回行った。透析内液を回収し、Sep-Pak® C18 cartridges (Waters) にアプライした後、0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む60%アセトニトリルにより溶出した。この溶液を凍結乾燥し、lysis バッファーで懸濁し、2,000×gで3分間遠心することで上清を得た。 A_{280} を測定し、配列から計算されたモル吸光係数 ($\epsilon = 13325$) を用いてタンパク質の濃度を算出した。His タグを切断するために、TEV プロテアーゼ (His タグ融合型) を加え、25°Cで12時間以上静置した。反応後の溶液に含まれる His タグと TEV プロテアーゼ (His タグ融合型) を除去するために、lysis バッファーにて平衡化したベッドボリューム3 mlの HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich) に反応後の溶液をアプライし、素通りした溶出液を得た。さらにlysis バッファーをアプライし、得られた溶出液を得た。これらの溶出液を混ぜ合わせ、0.22 μ mのフィルター (Millipore) にてろ過したのち、終濃度0.1%のトリフルオロ酢酸 (TFA) を

加えた。最後に、逆相カラム YMC-Pack ODS-AM (YMC) を接続した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) システム (島津製作所株式会社) を使用して、逆相 HPLC 精製を行った。流速を 5.0 mL/min とし、20%から 50%までのアセトニトリル濃度のリニアグラジエントを 30 分間で行い、溶出液中のタンパク質の検出は A_{280} を利用して行った。MALDI-8020 mass spectrometer (島津製作所株式会社) を用いたマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI TOF-MS) によって分子質量を測定し、APETx1 が含まれているフラクションを確認した。MALDI TOF-MS のマトリックスには α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) を使用し、分子質量のキャリブレーションのための外部標準試料には ProteoMass Peptide and Protein MALDI-MS Calibration Kit (Sigma-Aldrich) を使用した。APETx1 を含む逆相 HPLC のフラクションを凍結乾燥した後、 -80°C にて保存した。

2.6 核磁気共鳴 (NMR) 法によるリコンビナント APETx1 の解析

2.6.1 試料調製

NMR 測定のパuffer組成は 20 mM KH_2PO_4 (pH 6.0), 100 mM NaCl とした。溶媒の重水率は 10% D_2O とした。「2.5.2 精製およびリフォールディング」にて凍結乾燥された粉末試料に対して、別に記載のない限り、NMR 測定用パufferを 250 μL 加えることで測定試料とした。測定試料は脱気した後、5 mm の Shigemi チューブに充填した。

2.6.2 配列特異的連鎖帰属のための 2 次元および 3 次元 NMR 測定

NMR 測定には Avance 600 spectrometers (Bruker) を用いて、プローブは xyz 軸のグラジエントユニットをもつ TXI 三重共鳴プローブを用いた。測定温度は 298 K とし、測定試料には濃度 258 μM の APETx1 の均一 ^{13}C , ^{15}N 標識体を用いた。帰属の際に基準となる 2 次元 NMR スペクトルとして、 ^1H - ^{15}N HSQC、脂肪族領域の ^1H - ^{13}C HSQC、および芳香族領域の ^1H - ^{13}C HSQC の測定を行った。連鎖帰属に利用する 3 次元 NMR スペクトルとして、HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCOC, HCCH-COSY, HCCH-TOCSY, ^{15}N -edited TOCSY HSQC, ^{15}N -edited NOESY HSQC, および ^{13}C -edited NOESY HSQC の測定を行った。これらの 3 次元 NMR の測

定には、不均一サンプリング (NUS) を利用した。NOE 測定での mixing time については、¹⁵N-edited NOESY HSQC で 100 ms、¹³C-edited NOESY HSQC で 120 ms とした。

2.6.3 主鎖および側鎖の化学シフト値の配列特異的連鎖帰属

「2.6.2 配列特異的連鎖帰属のための 2 次元および 3 次元 NMR 測定」で得た 2 次元 NMR スペクトルの自由誘導減衰 (FID) の取り込み、フーリエ変換、ベースライン補正、およびフェーズ合わせには Topspin ver 3.6.1 (Bruker) を使用した。NUS を利用して測定した 3 次元 NMR スペクトルのデータプロセッシングには NMRPipe [78] を使用した。解析には Topspin ver 3.6.1 (Bruker) と Sparky (T. D. Goddard and D. G. Kneller, Sparky 3, University of California, San Francisco, CA) を使用した。主鎖および側鎖の NMR シグナルを配列特異的かつ連鎖的に帰属した。主鎖の帰属には HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCO を使用し、側鎖の帰属には HCCH-COSY, HCCH-TOCSY, ¹⁵N-edited TOCSY HSQC, ¹⁵N-edited NOESY HSQC, ¹³C-edited NOESY HSQC を使用した。¹H 化学シフト値は 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate (DSS) の ¹H 化学シフト値を利用して補正し、¹³C および ¹⁵N 化学シフト値は下記の換算式に基づいて間接的に補正した。

$$\begin{aligned} \text{SR}_{13\text{C}} &= \left(\frac{\gamma_{13\text{C}}}{\gamma_{1\text{H}}} \times \text{BF1} - \text{BF2} \right) \times 10^6 + \text{SR}_{1\text{H}} \times \frac{\gamma_{13\text{C}}}{\gamma_{1\text{H}}} \\ \text{SR}_{15\text{N}} &= \left(\frac{\gamma_{15\text{N}}}{\gamma_{1\text{H}}} \times \text{BF1} - \text{BF3} \right) \times 10^6 + \text{SR}_{1\text{H}} \times \frac{\gamma_{15\text{N}}}{\gamma_{1\text{H}}} \end{aligned}$$

ここでは、 $\text{SR}_{1\text{H}}$ は ¹H 化学シフト値の真の値との差、 $\text{SR}_{13\text{C}}$ は ¹³C 化学シフト値の真の値との差、 $\text{SR}_{15\text{N}}$ は ¹⁵N 化学シフト値の真の値との差、BF1 は ¹H の基準周波数 (600.275 MHz)、BF2 は ¹³C の基準周波数 (150.939269 MHz)、BF3 は ¹⁵N の基準周波数 (60.825338 MHz) を示す。 $\gamma_{13\text{C}}/\gamma_{1\text{H}}$ は ¹³C と ¹H のラーモア周波数の比 (0.251449530)、 $\gamma_{15\text{N}}/\gamma_{1\text{H}}$ は ¹⁵N と ¹H のラーモア周波数の比 (0.101329118) を示しており、これらの値はいずれも Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB) の Indirect Chemical Shift Referencing の IUPAC-IUB Recommended Chemical Shift Referencing Ratios (http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/cshift.html) より得た。これ

らの式に基づいて算出された核種ごとの化学シフト補正值は、 ^1H で -0.070 ppm、 ^{13}C で -2.736 ppm、 ^{15}N で -0.098 ppm であった。

pH 6.0, 298 K 条件下でのリコンビナント APETx1 の ^1H 、 ^{13}C および ^{15}N の化学シフト値は、BMRB に登録した (BMRB ID: 36345)。

2.6.4 pH 滴定測定および温度可変測定と解析

NMR 測定には Avance 500 spectrometers (Bruker) を用いて、プローブは xyz 軸のグラジエントユニットをもつ TXI 三重共鳴プローブを用いた。測定試料には濃度 $140\ \mu\text{M}$ の APETx1 の均一 ^{15}N 標識体を用いた。

「2.6.1 試料調製」で調製した pH 6.0 の試料を用いて、298 K, 290 K, 280 K の3種の温度条件で ^1H - ^{15}N HSQC 測定を行った。続いて、試料溶液を Shigemi チューブから回収し、HCl 溶液を滴定し pH 4.5 もしくは pH 3.0 に合わせた試料を再び Shigemi チューブに充填し、3種の温度条件で ^1H - ^{15}N HSQC 測定を行った。最後に、pH および温度の変化に伴って目的タンパク質の性状が変化していないことを確認するため、pH 3.0 の試料を回収して、NaOH 溶液を滴定し pH 6.0 に合わせた試料で ^1H - ^{15}N HSQC 測定を行った。

自由誘導減衰 (FID) の取り込み、フーリエ変換、ベースライン補正、およびフェーズ合わせには Topspin ver 3.6.1 (Bruker) を使用した。解析には Topspin ver 3.6.1 (Bruker) と Sparky (T. D. Goddard and D. G. Kneller, Sparky 3, University of California, San Francisco, CA) を使用した。

pH 変化に伴う化学シフト値の変化量 ($\Delta\delta$) については、以下の式 [79] より算出した。

$$\Delta\delta = \sqrt{\Delta\delta_{1\text{H}}^2 + (\Delta\delta_{15\text{N}}/6.5)^2}$$

ここでは、 ^1H と ^{15}N の pH 変化に伴う化学シフト値の変化量をそれぞれ $\Delta\delta_{1\text{H}}$ と $\Delta\delta_{15\text{N}}$ で表した。

2.6.5 核オーバーハウザー効果 (NOE) を利用した 3 次元 NMR 測定

NMR 測定には Avance III 700 spectrometers (Bruker) を用いて、プローブは xyz 軸のグラフィエントユニットをもつ CPTCI 極低温三重共鳴プローブを用いた。測定試料には濃度 691 μM の APETx1 の均一 ^{13}C , ^{15}N 標識体を用い、 ^{15}N -edited NOESY HSQC と ^{13}C -edited NOESY HSQC の測定を行った。 ^{15}N -edited NOESY HSQC と ^{13}C -edited NOESY HSQC の mixing time については、いずれも 200 ms とした。

2.6.6 拘束条件の作成と立体構造計算

「2.6.3 主鎖および側鎖の化学シフト値の配列特異的連鎖帰属」での $^{13}\text{C}\alpha$, $^{13}\text{C}\beta$, ^{13}CO , $^{15}\text{N}\alpha$, および ^1HN 化学シフト値に基づいて、TALOS+ [80] を使用して主鎖二面角拘束条件を作成した。さらに、Pro 残基の $\text{C}\beta$ と $\text{C}\gamma$ との間での化学シフト値の差に基づいて Pro 残基の *cis-trans* 異性体の評価を行った上で [81]、40 番目の Pro 残基 (P40) の *cis* 配座の拘束条件を作成した。ジスルフィド結合 (S-S 結合) の拘束条件については、3 組の Cys 残基のペア (C4-C37, C6-C30, C20-C38) に対して、それぞれ 4 組の原子のペア ($\text{C}\beta$ - $\text{C}\beta$, $\text{C}\beta$ - $\text{S}\gamma$, $\text{S}\gamma$ - $\text{C}\beta$, $\text{S}\gamma$ - $\text{S}\gamma$) で距離拘束条件を作成した。

「2.6.5 核オーバーハウザー効果 (NOE) を利用した 3 次元 NMR 測定」で得た 3 次元 NMR スペクトルのデータプロセッシングには、NMRPipe [78] を使用した。NOE のオートピークピッキングは MagRO-NMRView [82-84] を使用して行った。CYANA 3.98 [85] を使用して、NOE ピークの強度を距離拘束条件へと変換するとともに、構造計算を行った。このときに上記の主鎖二面角拘束条件と、P40 の *cis* 配座の拘束条件を構造計算に利用した。CYANA での構造計算においては、まず予備的な構造を得るために S-S 結合の拘束条件を含めずに計算を行い、6 個の Cys 残基が天然物の APETx1 と同じ組み合わせ (C4-C37, C6-C30, C20-C38) [72] で S-S 結合を形成しうる位置に存在することを確認した。続いて、S-S 結合の拘束条件を含めて計算を行い、100 個の構造を生成させた。このうち最小のエネルギーを有する 20 個の構造を利用して、Amber 12 [86] による拘束条件下での 30 ps の分子動力学計算を行い、構造の精密化を行った。FitRobot ver. 1.00.07 [87] を使用して、Amber 12 で得た 20 個の最小エネルギー

一構造について、収束領域を自動で計算し、重ね合わせを行った。20 個の構造間での平均二乗偏差 (RMSD) の計算と構造アンサンブルの描画には、MOLMOL [88] を使用した。Ramachandran plot を利用した stereochemical quality の評価には、MolProbity [89] を使用した。

構造計算に使用した拘束条件のファイルおよびリコンビナント APETx1 の 20 個の NMR 構造の原子座標は、Protein Data Bank (PDB) に登録した (PDB code: 7BWI)。

2.6.7 APETx1 変異体の ^1H - ^{15}N HSQC 測定

NMR 測定には Avance 600 spectrometers (Bruker) を用いて、プローブは xyz 軸のグラジエントユニットをもつ TXI 三重共鳴プローブを用いた。測定温度は 298 K とし、測定試料には各 APETx1 変異体の均一 ^{15}N 標識体を用いた。T3P, K8A, F15A, K18A, R24A, Y32A, および F33A については、「2.5.2 精製およびリフォールディング」にて凍結乾燥された粉末試料を NMR 測定用バッファーで溶解し、測定を行った。Y5A, T19A, S22A, N23A, T27A, S29A, L34A, および D42A については、10% D_2O (pH 6.0) で溶解し、測定を行った。変異による影響のみを比較するため、野生型については両溶液条件での測定を行った。野生型および 15 種の変異体の濃度は、以下の通りである (WT, 149 μM (in the phosphate buffer) or 102 μM (in 10% D_2O , pH 6.0); T3P, 50 μM ; Y5A, 229 μM ; K8A, 30 μM ; F15A, 184 μM ; K18A, 31 μM ; T19A, 290 μM ; S22A, 102 μM ; N23A, 76 μM ; R24A, 19 μM ; T27A, 129 μM ; S29A, 86 μM ; Y32A, 408 μM ; F33A, 634 μM ; L34A, 258 μM ; and D42A, 174 μM)。

2.7 ホールセルパッチクランプ法による解析

APETx1 の変異体解析は、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行うこととした。

2.7.1 細胞の調製

ヒト胎児腎細胞 293 (HEK293) の hERG 安定発現株 (SB Drug Discovery Limited) を使用した。終濃度 10% のウシ胎児血清 (FBS; Thermo, Gibco) と終濃度 1% のペニシリン-ストレプトマイシン (Thermo, Gibco) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Thermo, Gibco) 中で、5% CO₂ 存在下、37°C 条件下で細胞培養を行った。ポリスチレン製シャーレ (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) を使用して接着培養し、TrypLE Express (Thermo, Gibco) を用いて 37°C で細胞を剥離することで、パッチクランプ測定に使用する細胞を調製した。

2.7.2 hERG 電流のホールセルパッチクランプ測定

ホールセルパッチクランプ測定にはオートパッチクランプ装置 SyncroPatch 384PE (Nanion Technologies GmbH, Germany) と中抵抗値 (4-5.5 MΩ) のホウケイ酸ガラス製パッチクランプチップ (Nanion Technologies GmbH, Germany) を用いた。細胞のキャッチ、ホールセルの形成までの圧力制御、および膜電位のコントロールには PatchControl 384 V1.6.6 (Nanion Technologies GmbH, Germany) を用い、データ収集には DataControl384 V1.8.0 (Nanion Technologies GmbH, Germany) を用いた。電流測定のサンプリング周波数は 1 kHz とした。電位プロトコル開始前に弱い電位パルスを与えることによってリーク電流の大きさを評価し、この値を予め差し引くことでリーク電流を除去した。細胞ごとに測定されたシール抵抗の値を確認し、シール抵抗が 0.3 GΩ 以上であった細胞だけを解析に用いた。

パッチクランプ測定用内液 (以下、内液と記載する。) とパッチクランプ測定用外液 (以下、外液と記載する。) を用いて、測定を行った。これらの溶液を用いたときの液間電位は ~9 mV であり、この値を予めコマンド電位から差し引くことで液間電位を補正した。全ての測定は室温 (20-25°C) で行った。静止電位は -80 mV とした。conductance-voltage (*G-I*) 測定

では、-80 mV から+60 mV までの 10 mV ごとの値の脱分極電位を 2 秒間与えた後、-40 mV に 2 秒間再分極させ、電流を記録した。

用量反応関係を評価するために、0.1 μM から 10 μM までの任意の終濃度の APETx1 を外液に添加して G - V 測定を行った。APETx1 の変異体解析では、終濃度 10 μM の各変異体を外液に添加して G - V 測定を行った。全ての G - V 測定において、APETx1 およびその変異体の添加後にその阻害効果が定常状態に達したことを確認した後、電位プロトコルを開始した。

2.7.3 データ解析

カーブフィッティングには、MATLAB R2019b (MathWorks Inc., Natick, MA) を使用した。 G - V 曲線のフィッティングについては、hERG の resting state と activated state の 2 つの機能状態間の遷移が膜電位依存的に起こり、その分布が Boltzmann 分布に従っていると判断して、以下の Boltzmann 式により行った。

$$G/G_{\max} = 1 / (1 + e^{(V_{1/2}-V)/k}) + C$$

ここでは、 G/G_{\max} はコンダクタンスの相対値、 $V_{1/2}$ は G - V 関係が最大値の 50% に達したときの膜電位、 k は slope factor ($k = RT/z_g F$ で表される。 z_g は gating charge、 F はファラデー定数、 R は気体定数、 T は絶対温度を示す。)、 C は定数を示す。

統計解析には IBM SPSS Statistics, Version 25 (IBM Corp. Armonk, NY.) を使用した。一元配置分散分析 (one-way ANOVA) の後、Tukey 検定による多重比較を行った。 p 値が 0.05 未満であるとき、統計学的に有異であると判定した (*, $0.01 \leq p < 0.05$; **, $0.001 \leq p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)。

2.8 二本刺し膜電位固定法 (TEVC) による解析

hERG の変異体解析については、アフリカツメガエルの卵母細胞への cRNA のインジェクションにより、hERG 変異体の発現と機能の評価を迅速に行うことができる二本刺し膜電位固定法 (TEVC) によって行うこととした。

2.8.1 生命倫理の承認

全ての動物実験は、生理学研究所を傘下に置く自然科学研究機構の動物実験委員会から承認を得ており、そのガイドラインに準拠して行った。

2.8.2 アフリカツメガエルの卵母細胞の準備

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) (Hamamatsu Animal Supply Co.) からの卵母細胞の取り出しと、卵母細胞のコラゲナーゼによる前処理は、先行研究と同様の方法により [90]、自然科学研究機構生理学研究所神経機能素子研究部門の内藤知津江技術補佐員に行っていただいた。本研究で使用したアフリカツメガエルの総数は~20 匹である。開腹手術中のアフリカツメガエルは 0.15% tricaine により麻酔しており、卵母細胞が枯渇したアフリカツメガエルは麻酔下での脊髄破壊法により安楽死させた。

2.8.3 hERG 変異体の卵母細胞発現コンストラクトの作製

hERG を pSP64 プラスミドベクターに組み込んだコンストラクト (hERG/pSP64) は、自然科学研究機構生理学研究所神経機能素子研究部門の久保義弘教授、下村拓史博士よりご恵与いただいた。

合計 20 種の hERG 変異体 (L433A, K434A, E435A, E437A, E438A, D456A, D460A, F508A, D509A, L510A, L511A, I512A, F513A, G514C, E518C, L520A, I521A, G522A, L523A, L524A) のコンストラクトについては、先行研究の方法を参考にし [90]、以下の手順で作製した。hERG/pSP64 には、hERG の VSD の DNA 配列の上流に *BstE* II 認識配列、下流に *Bgl* II 認識配列が存在する。そこでまず、二種類の制限酵素 *BstE* II (東洋紡) と *Bgl* II (東洋紡) によって切断することで、変異を導入する位置を含む DNA 配列を除去するとともに、プラスミドを線状化した。続いて、目的の変異を含むフォワードプライマーとリバースプライマーを用意した。これらのプライマーのうち、リバースプライマーでは hERG/pSP64 の *BstE* II 認識配列を含む領域に設計したフォワードプライマーとの組み合わせで PCR を行い、フォワードプライマーでは hERG/pSP64 の *Bgl* II 認識配列を含む領域に設計したリバースプライマーとの組み合わせで PCR を行った。PCR には PrimeSTAR Max DNA Polymerase (タカラバイオ) を利

用した。反応後の溶液に残存する hERG/pSP64 鋳型プラスミドは、*Dpn I* (東洋紡) によって分解することで除去した。In-Fusion HD Cloning Kit (Takara) を用いた相同末端の結合反応により、PCR により増幅した 2 種の DNA 断片と、線状化した hERG/pSP64 を融合した。この反応後の溶液を用いて、クローニング用大腸菌 TG1 をヒートショック法により形質転換した。SOB 培地を用いて回復培養を行った後、終濃度 100 mg/mL の ampicillin を含む 2×YT 培地プレートを用いて 37°C で終夜培養し、大腸菌を選別した。シングルコロニーを 2 mL の 2×YT 培地 (100 mg/mL ampicillin を含む) に植菌し、37°C で 6 時間培養した後、培養した菌体からプラスミドを抽出、精製した。得られたプラスミドの塩基配列を解析し、目的の配列を得たことを確認した。

2.8.4 相補鎖リボ核酸 (cRNA) の調製

「2.8.3 hERG 変異体の卵母細胞発現コンストラクトの作製」で作製したプラスミドを *EcoR I* (東洋紡) で切断して線状化した後、Proteinase K を添加して 37°C で 1.5 時間静置した。終濃度 1 M の酢酸ナトリウムと diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水を添加した。フェノールクロロホルム抽出を行った後、エタノール沈殿により DNA を精製した。続いて、mMessage mMachine SP6 Transcription Kit (Ambion, Austin, TX, USA) を使用して転写反応を行った。合成した cRNA を塩化リチウム沈殿により精製した。RNA を変性させる性質を有するホルムアルデヒドを用いたアガロースゲル電気泳動により、目的の鎖長の cRNA が得られたことを確認した。

2.8.5 cRNA の卵母細胞へのマイクロインジェクション

「2.8.2 アフリカツメガエルの卵母細胞の準備」で得た卵母細胞のうち、形状や色等の外観に基づいて状態の良いものを選別した。卵母細胞に対して濃度 0.5 mg/mL の cRNA を 50 nL インジェクションした。インジェクト後の卵母細胞はディッシュ中でカエルリング液に浸した状態で、17°C で 1-3 日間静置した。cRNA のインジェクションの後、発現量は経時的に

増大するため、実際に電流を測定し、最大脱分極電位での電流量が 0.5-5 μA であることを指標にして適切な発現量であるかを判断した。

卵母細胞の細胞膜の外側には vitelline 膜と follicle 膜が存在し、このうち follicle 膜は APETx1 が細胞膜に到達するのを阻む可能性がある。そのため、予め精密ピンセットで follicle 膜を除去した。Cys 変異体 (G514C, E518C) については、非特異的なジスルフィド結合の形成を抑制するために、先行研究に従い [75,91]、以下の還元処理を行った。卵母細胞を終濃度 10 mM の DTT を含むカエルリング液に移し替え、室温 (20-25°C) で 15 分間静置した。還元処理後には、DTT を含まないカエルリング液で満たしたディッシュに移し替え、3 時間以内に測定を行った。

2.8.6 hERG およびその変異体の巨視的電流の TEVC 測定

卵母細胞を利用した巨視的電流の記録は、先行研究を参考にした TEVC 測定により行った [90,92]。アンプリファイアには OC-725C (Warner Instruments, Hamden, CT, USA) を用い AD-DA コンバータには Digidata version 1440A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を用いた。膜電位固定の制御と記録には pCLAMP version 10.7 (Molecular Devices) を使用した。電極に使用するガラスチューブにはホウケイ酸ガラスキャピラリー (Harvard Apparatus, Cambridge, MA, USA) を使用し、3 M 酢酸カリウムおよび 10 mM KCl を含み、HCl で pH 7.4 に調整された溶液を充填した。測定前には電極抵抗が 0.2-0.8 M Ω であることを確認した。全ての測定は室温 (20-25°C) で行った。バス溶液には ND96 を使用し、卵母細胞をカエルリング液から ND96 に移した後、灌流を行い、電流が安定していることを確認した。静止電位は -90 mV とした。G-V 測定では、-80 mV から +60 mV までの 10 mV ごとの値の脱分極電位を 1 秒間与えた後、-60 mV に 1 秒間再分極させ、電流を記録した。このとき、L520A 変異体および L523A 変異体では活性化電位が負の膜電位の方向に大きくシフトしていたため、測定する脱分極電位の大きさをそれぞれの変異体の活性化がみられる電位に合わせて調節した。

APETx1 による hERG 阻害の用量反応関係を評価するために、まず終濃度 0.1 μM の APETx1 をバス溶液に添加し、段階的に濃度を 10 μM まで上昇させていき、各段階で G-V 測

定を行った。各 hERG 変異体での APETx1 による阻害を評価するときには、終濃度 10 μM の APETx1 をバス溶液に添加し、 G - V 測定を行った。なお、APETx1 の濃度が 10 μM を超えると 0.5 μA を超える大きなリーク電流が観測されたため、10 μM 以上の濃度では hERG 電流を測定することができなかった。全ての G - V 測定において、APETx1 およびその変異体の添加後にその阻害効果が定常状態に達したことを確認した後、電位プロトコルを開始した。また、全ての測定は異なる二個体以上のアフリカツメガエル由来の卵母細胞を用いて行い、バッチ間に大きな差がみられないことを確認した。

2.8.7 データ解析

カーブフィッティングには、MATLAB R2019b (MathWorks Inc., Natick, MA) を使用した。 G - V 曲線のフィッティングについては、hERG の resting state と activated state の 2 つの機能状態間の遷移が膜電位依存的に起こり、その分布が Boltzmann 分布に従っていると判断して、以下の Boltzmann 式により行った。

$$G/G_{\max} = 1 / (1 + e^{(V_{1/2}-V)/k}) + C$$

ここでは、 G/G_{\max} はコンダクタンスの相対値、 $V_{1/2}$ は G - V 関係が最大値の 50% に達したときの膜電位、 k は slope factor ($k = RT/z_g F$ で表される。 z_g は gating charge、 F はファラデー定数、 R は気体定数、 T は絶対温度を示す。)、 C は定数を示す。

先行研究を参考にして [75]、下記の三種のフィッティングモデル (A)-(C) により、APETx1 の hERG に対する結合の K_d 値を評価した。モデル (A) では、1 個のイオンチャンネルあたりに 4 個の独立した等価な結合部位が存在し、トキシンによる阻害が部分的であり、濃度を上昇させていっても阻害率が 100% に達しないことを仮定しており、以下の式で表される。

$$I_{\text{Toxin}}/I_{\text{Control}} = A_{\max} \times [K_d/(K_d + [\text{APETx1}])]^4 + (1 - A_{\max})$$

モデル (B) では、1 個のイオンチャンネルあたりに 4 個の独立した等価な結合部位が存在し、トキシンの濃度を上昇させていくと阻害率が 100% に達することを仮定しており、以下の式で表される。

$$I_{\text{Toxin}}/I_{\text{Control}} = [K_d/(K_d + [\text{APETx1}])]^4$$

モデル (C) では、1 個のイオンチャネルあたりに 1 個の結合部位が存在し、トキシンによる阻害が部分的であり、濃度を上昇させていっても阻害率が 100% に達しないことを仮定しており、以下の式で表される。

$$I_{\text{Toxin}}/I_{\text{Control}} = A_{\text{max}} \times [K_d/(K_d + [\text{APETx1}])] + (1 - A_{\text{max}})$$

以上の 3 種のモデル式では、 I_{Toxin} は APETx1 添加後の電流量、 I_{Control} は APETx1 添加前の電流量、 A_{max} は APETx1 による最大の電流阻害率を示す。

統計解析には IBM SPSS Statistics, Version 25 (IBM Corp. Armonk, NY.) を使用した。一元配置分散分析 (one-way ANOVA) の後、Tukey 検定による多重比較を行った。 p 値が 0.05 未満であるとき、統計学的に有異であると判定した (*, $0.01 \leq p < 0.05$; **, $0.001 \leq p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)。

2.9 APETx1-VSD 複合体の構造モデルの構築

2.9.1 ホモロジーモデリングによる hERG の VSD の構造モデルの構築

ホモロジーモデリングには MODELLER 9.23 [93] を使用した。鋳型には hERG と配列相同性がある rat *ether-à-go-go* 1 (rEAG1) の cryo-EM 構造 (PDB code: 5K7L) を用いた [39]。hERG と rEAG のアミノ酸配列のアラインメントは、Clustal Omega [74] を利用して得られたものに対して、保存度が低いループ領域についてはマニュアルで修正を加えることで作成した。このうち、hERG の VSD に相当する 398 番目から 545 番目までの配列 (rEAG1 では 208 番目から 347 番目までの配列) を抜き出したアラインメントを利用したホモロジーモデリングにより、VSD の up conformation の構造モデルを作製した。さらに、hERG と rEAG1 と間のアラインメントを用いて、hERG の S4 ヘリックスの配列をヘリックス一巻き分に相当する 3 残基分、および二巻き分に相当する 6 残基分だけ下流方向にずらしたアラインメントを作成した。これらのアラインメントを利用したホモロジーモデリングにより、VSD の down conformation の構造モデルを作製した。

2.9.2 APETx1 の hERG VSD に対するドッキングの検討

ドッキングシミュレーションには High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing (HADDOCK) 2.4 web server [94] を使用した。「2.7 ホールセルパッチクランプ法による解析」で同定された APETx1 のアミノ酸残基 (F15, Y32, F33, L34) と「2.8 二本刺し膜電位固定法による解析」で同定された hERG のアミノ酸残基 (F508, E518, I521) が互いに近接した複合体の構造モデルを得ることができるのかを検証するため、APETx1 の F15, F33, L34 と hERG の F508, E518, I521 との間での距離拘束条件、および APETx1 の Y32 の側鎖ヒドロキシル基と hERG の E518 の側鎖カルボキシル基との間での水素結合拘束条件を設定し、ドッキングシミュレーションを実行した。剛体でのエネルギー最小化計算では、1000 個の構造を生成させて行い、そのうちの最小エネルギーを有する 200 個の構造に対して semi-flexible simulated annealing と water refinement を行った。分子構造の描画には CueMol (<http://www.cuemol.org/>) を使用した。

第3章 結果

3.1 リコンビナント APETx1 の調製

本研究で使用したリコンビナント APETx1 のコンストラクトを図 3-1 に示す。このコンストラクトでは、TEV プロテアーゼで His タグを切断した後、目的タンパク質の N 末端側に余分な付加配列が残らない設計となっており、リコンビナント APETx1 のアミノ酸配列は天然物の APETx1 (ネイティブ APETx1) と完全に一致する。リコンビナント APETx1 の調製は、「2.5.1 発現」と「2.5.2 精製およびリフォールディング」に記載した方法で行った。調製したリコンビナント APETx1 の逆相 HPLC でのクロマトグラムから、リコンビナント APETx1 を単一ピークで精製したことを確認した (図 3-2a)。MALDI-TOF MS 解析により、リコンビナント APETx1 の分子質量は 4551.267 Da であることが分かった (図 3-2b)。APETx1 の理論分子質量は 4552.23 Da である。また、先行研究ではイソギンチャクから抽出、精製されたネイティブ APETx1 の分子質量が 4551.99 Da であることが報告されている [69]。これらのことから、調製したリコンビナント APETx1 とネイティブ APETx1 との間で分子質量がほとんど一致しており、両者が化学的に同一であることを確認した。

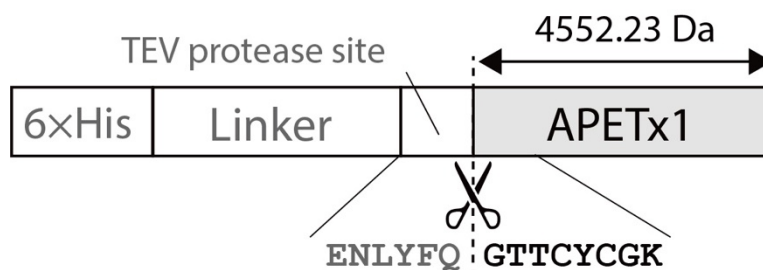


図 3-1 APETx1 の発現コンストラクト

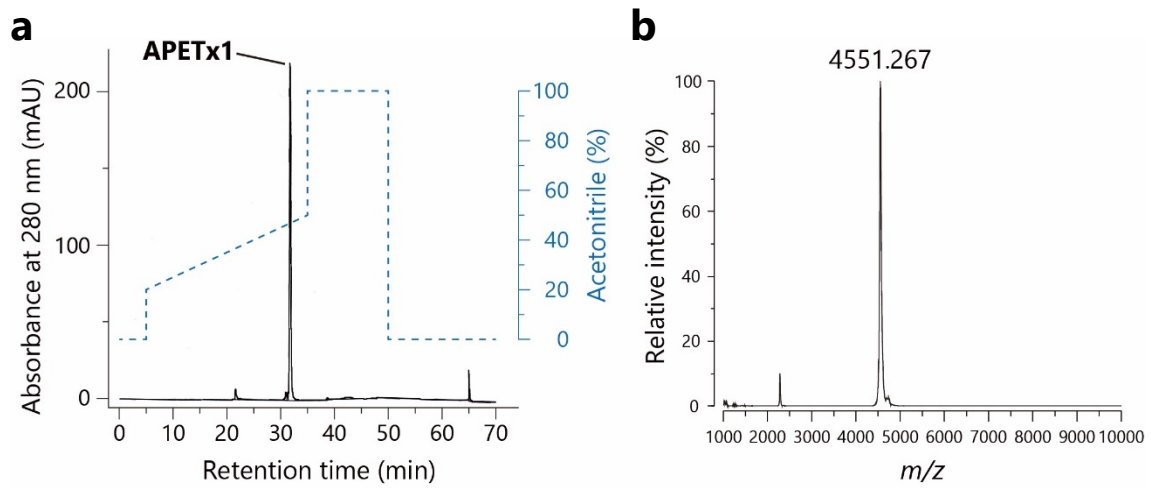


図 3-2 リコンビナント APETx1 の性状評価

(a) 逆相 HPLC のクロマトグラム。アセトニトリルのグラジエントプロトコル（点線）を重ね合わせて示した。(b) MALDI-TOF MS スペクトル。

3.2 リコンビナント APETx1 の hERG 阻害活性の評価

3.2.1 リコンビナント APETx1 による hERG 活性化電位のポジティブシフト

リコンビナント APETx1 の hERG 阻害活性を評価するために、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り hERG 電流を測定した。hERG の巨視的電流では、脱分極させたときに流れる電流量が小さく、それに続いて再分極させたときには電流量が増大することが知られている [9,10]。この再分極させたときの電流をテール電流と呼ぶ。脱分極電位に対してテール電流の電流量をプロットした conductance-voltage 曲線 (G - V 曲線、活性化曲線) は hERG の活性化の電位依存性を反映する。本研究では、この G - V 曲線に基づき APETx1 添加前後での 50%活性化電位の変化量 ($\Delta V_{1/2}$) を算出し、APETx1 による hERG 阻害活性を評価した。

リコンビナント APETx1 は脱分極電位を 0 mV としたときのテール電流を強く阻害していた (図 3-3a)。これと比較して、脱分極電位を +60 mV としたときのテール電流の阻害は弱かった (図 3-3b)。それぞれの脱分極電位での hERG 電流を調べたところ、先行研究のネイティブ APETx1 での結果 [69] と同様に、リコンビナント APETx1 の添加に伴って hERG の G - V 曲線が高電位側へとシフト (ポジティブシフト) したことが分かった (図 3-3c)。濃度 10 μ M の APETx1 添加時の $\Delta V_{1/2}$ の値は $+23.9 \pm 2.5$ mV であった (図 3-3d)。

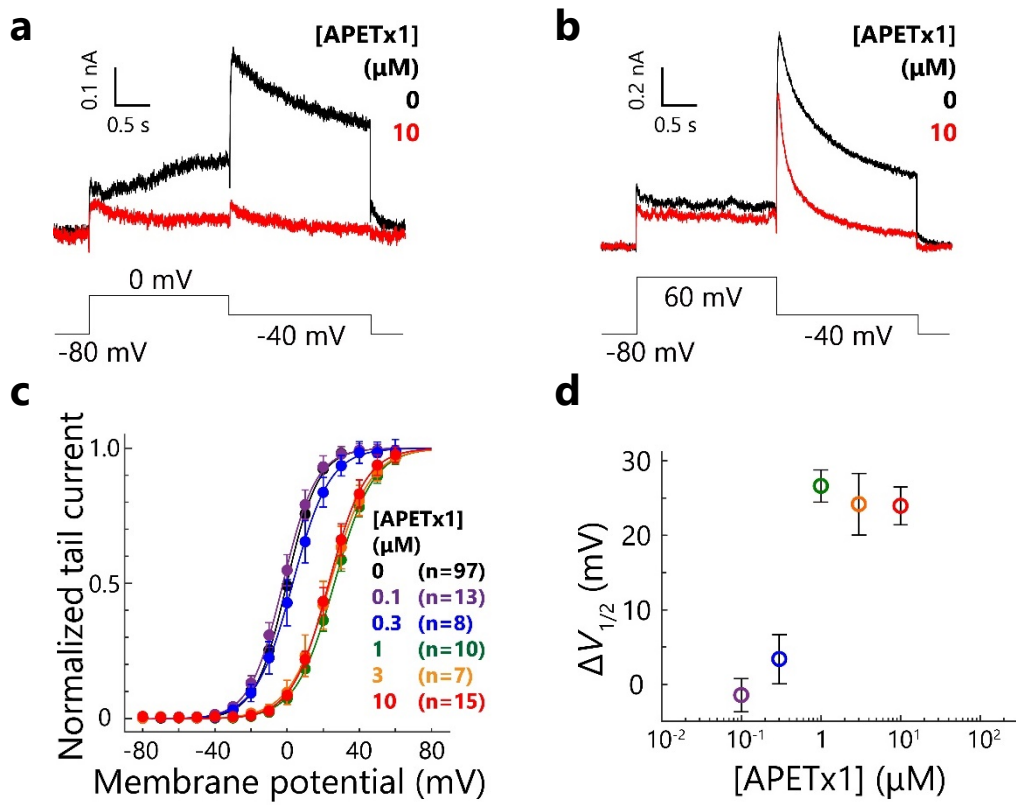


図 3-3 パッチクランプ測定によるリコンビナント APETx1 の hERG 阻害活性の評価
 (a) 脱分極電位 0 mV での hERG 電流。(b) 脱分極電位 +60 mV での hERG 電流。(c) 最大電流
 量が 1.0 となるように規格化した G-V 曲線。(d) $\Delta V_{1/2}$ の用量依存的変化。

同様に hERG を強制発現させたアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞を用いた TEVC 測定においても、APETx1 による hERG 阻害には電位依存性がみられ (図 3-4a-b)、hERG の活性化電位はポジティブシフトした (図 3-4c)。用量反応測定での濃度 10 μM の APETx1 添加時の $\Delta V_{1/2}$ の値は $+28.7 \pm 1.3 \text{ mV}$ であり (図 3-4d)、この値は先行研究の TEVC 測定での $\Delta V_{1/2}$ の値 ($+24.6 \pm 2.7 \text{ mV}$) と同程度であった [75]。

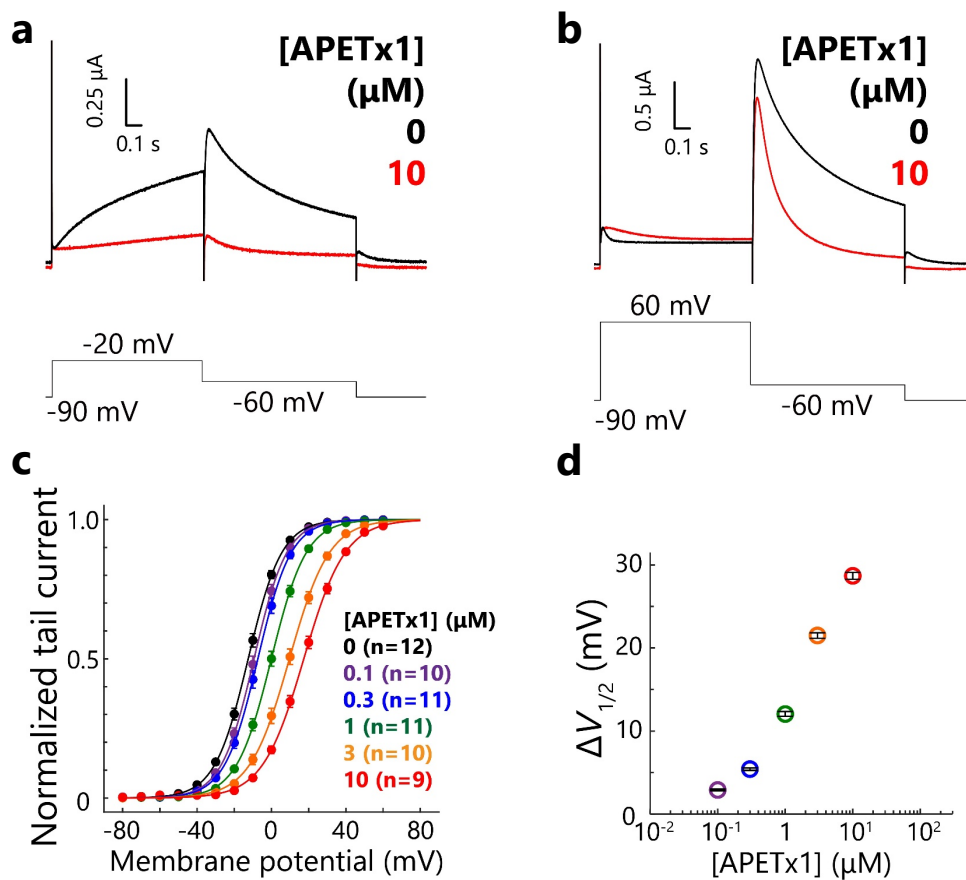


図 3-4 TEVC 測定によるリコンビナント APETx1 の hERG 阻害活性の評価

(a) 脱分極電位 -20 mV での hERG 電流。(b) 脱分極電位 $+60 \text{ mV}$ での hERG 電流。(c) 最大電流量が 1.0 となるように規格化した G-V 曲線。APETx1 の添加量を段階的に増やしていき、それぞれの濃度での hERG 電流を測定した。(d) $\Delta V_{1/2}$ の用量依存的变化。

3.2.2 リコンビナント APETx1 とネイティブ APETx1 の hERG に対する解離定数の比較

先行研究では TEVC の実験系において、ネイティブ APETx1 の hERG に対する解離定数 K_d が求められている [75]。そこで、リコンビナント APETx1 についても K_d 値を算出し、ネイティブ APETx1 との間で解離定数 (K_d) の値を比較することとした。

図 3-5a の $G-I$ 曲線では、縦軸に APETx1 非添加時の最大電流量に対する相対値で、各濃度の APETx1 添加時の電流量を示した。「3.2.1 リコンビナント APETx1 による hERG 活性化電位のポジティブシフト」で述べたように、APETx1 による hERG 阻害には電位依存性がみられる (図 3-3a-b、図 3-4a-b)。高い脱分極電位においては、APETx1 が結合した状態でも hERG が活性化できるため、APETx1 添加時の巨視的電流量の減少が両者の結合を反映しなくなる。その一方で、低い脱分極電位においては、APETx1 が結合した状態の hERG は活性化できないと考えられ、APETx1 添加時の巨視的電流量の減少が両者の結合を反映するとみなすことができる。そのため、先行研究では APETx1 による hERG 阻害の用量反応関係の評価するときに、hERG を活性化させる閾値電位に近い脱分極電位 (-20 mV \sim -40 mV) での電流量を利用している [75]。本研究でも脱分極電位が -30 mV のときの hERG の電流量を用いて、APETx1 非添加時の電流量 (I_{Control}) で APETx1 を添加時の電流量 (I_{Toxin}) を除した値を算出し、用量反応曲線を得た (図 3-5b)。先行研究と同様に、3 種のフィッティングモデル [75] で解析し、 K_d 値を求めた (モデル (A) で 1.2 μM 、モデル (B) で 1.7 μM 、モデル (C) で 0.23 μM)。これらの値は先行研究で報告されている K_d 値 (モデル (A) で 87 nM、モデル (B) で 141 nM、モデル (C) で 16.3 nM) [75] と比較して、12-14 倍高かった。リコンビナント APETx1 とネイティブ APETx1 との間で、 K_d 値に差がみられた原因は分かっていない。また、本研究ではネイティブ APETx1 を入手することが困難であったため、同一条件で直接的な比較を行うことはできなかった。そこで、リコンビナント APETx1 の立体構造をネイティブ APETx1 のものと比較するために、NMR 法による解析を行うこととした。

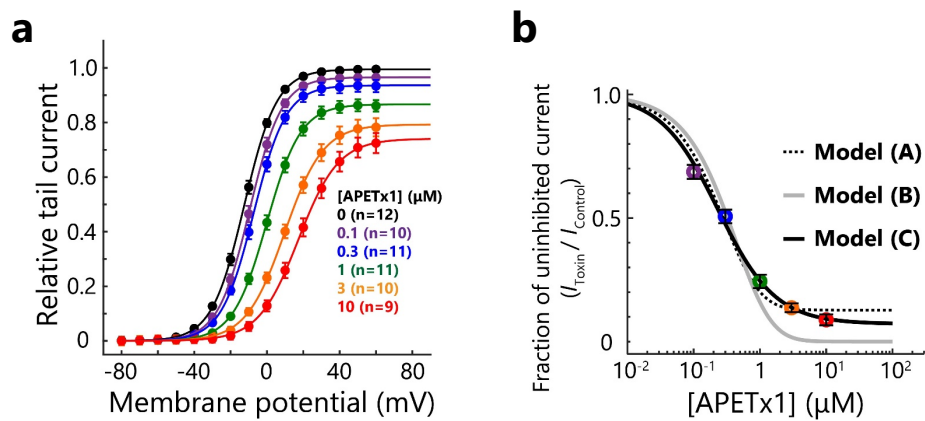


図 3-5 APETx1 による hERG 阻害の用量反応関係

(a) 異なる APETx1 濃度での G-V 曲線。縦軸は APETx1 非添加時の最大電流量を 1 としたときの相対値で表した。(b) 脱分極電位 -30 mV のときのテール電流の電流量を指標とした用量反応関係。APETx1 非添加時の電流量 (I_{Control}) で APETx1 を添加した時の電流量 (I_{Toxin}) を除した値を縦軸にとった。

3.3 NMR 法によるリコンビナント APETx1 の立体構造の評価

3.3.1 リコンビナント APETx1 の NMR シグナルの帰属

リフォールディングによって調製したリコンビナント APETx1 がネイティブ APETx1 と同等の立体構造を有することを確認するために、NMR 法による解析を行うこととした。まず、アミド水素原子核と窒素原子核の間の相関シグナルを与える ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルと水素原子核と炭素原子核の間の相関シグナルを与える ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルを pH 6.0, 298 K 条件下で測定した (図 3-6a-c)。 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル上のシグナルは全体によく分散しており、特に 8.6 ppm よりも化学シフトが大きい領域 (低磁場側) にもシグナルが観測された (図 3-6a)。このことはリコンビナント APETx1 が二次構造を有し、特定の立体構造を形成していることを示している。

続いて、「2.6.2 配列特異的連鎖帰属のための 2 次元および 3 次元 NMR 測定」に示した各種の三重共鳴 NMR スペクトルを利用し、リコンビナント APETx1 の NMR シグナルを帰属した (図 3-6a-c)。APETx1 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルおよび ^1H - ^{13}C HSQC スペクトル上で観測しうる水素原子核 265 個のうち 263 個 (全水素原子の個数は 295 個)、窒素原子核 42 個のうち 40 個 (全窒素原子の個数は 49 個)、炭素原子核 182 個のうち 180 個 (全炭素原子の個数は 203 個) で帰属することができ、帰属率は 98.8% (全原子中では 88.3%) であった。なお、磁場強度 600 MHz の装置を使用した pH 6.0, 298 K の条件下の測定では、T2 と L34 の主鎖アミドシグナルが観測されなかった。

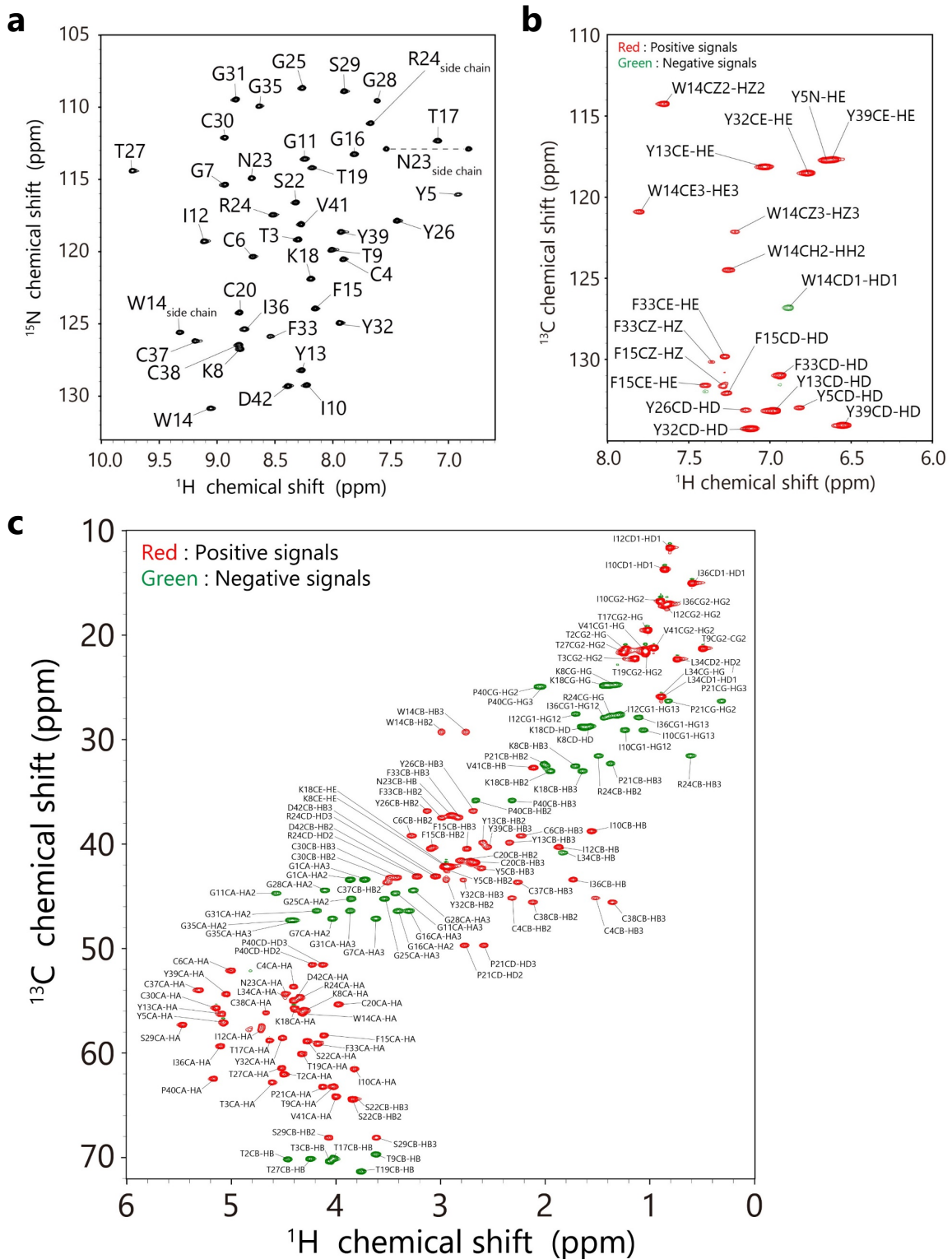


図 3-6 リコンビナント APETx1 の NMR スペクトル

均一 ^{13}C , ^{15}N 標識を施したリコンビナント APETx1 を利用して、磁場強度 600 MHz の装置を使用し、pH 6.0, 298 K の条件下で測定した。(a) ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。(b) 脂肪酸領域の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトル。(c) 芳香属領域の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトル。

3.3.2 ネイティブ APETx1 との化学シフト値の比較

先行研究では pH 3.0, 280 K 条件下でのネイティブ APETx1 のプロトン化学シフト値が報告されている (BMRB code: 6370) [69]。そこで、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを利用して pH 滴定測定および温度可変測定を行うことで、「3.3.1 リコンビナント APETx1 の NMR シグナルの帰属」で確立した pH 6.0, 298 K 条件下の主鎖アミドシグナルの帰属を pH 3.0, 280 K 条件下のスペクトルに移すことで、リコンビナント APETx1 とネイティブ APETx1 の主鎖アミドプロトンの化学シフト値を比較することとした。まず、pH 6.0 条件下で温度を低下させていき、pH 6.0, 280 K 条件下でのスペクトルに帰属を移した (図 3-7a)。続いて、温度 280 K 条件下で pH を低下させていき、pH 3.0, 280 K 条件下でのスペクトルに帰属を移した (図 3-7b)。なお、磁場強度 500 MHz の装置を使用した pH 3.0, 280 K 条件下の測定では、Y5, F33, L34 の主鎖アミドシグナルが観測されなかったため、帰属を移すことができなかった。

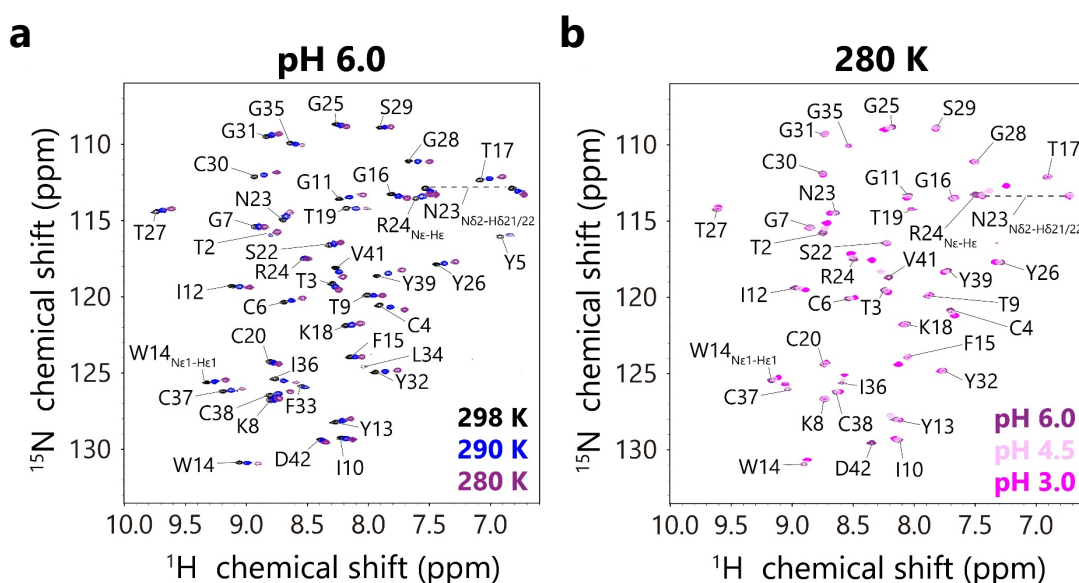


図 3-7 リコンビナント APETx1 の pH および温度の変化に伴う ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの変化

均一 ^{15}N 標識を施したリコンビナント APETx1 を利用して、磁場強度 500 MHz の装置で測定した。(a) pH 6.0 条件下での温度可変測定。(b) 温度 280 K 条件下での pH 滴定測定。

pH 3.0, 280 K 条件下でのリコンビナント APETx1 とネイティブ APETx1 の主鎖アミドプロトン化学シフト値、および両者の化学シフト値の差を表 3-1 に示した。いずれのアミノ酸残基の主鎖アミドプロトン化学シフト値においても、リコンビナント APETx1 のほうがネイティブ APETx1 よりも化学シフト値が大きく、その差は平均して 0.12 ppm と小さかった (表 3-1、図 3-8)。この差は化学シフト値の補正などの系統誤差に起因すると想定されることから、リコンビナント APETx1 とネイティブ APETx1 の立体構造はほとんど同じであると考えた。

表 3-1 リコンビナント APETx1 とネイティブ APETx1 の 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の比較

	Recombinant APETx1 (BMRB code: 36345) (ppm)	Native APETx1 (BMRB code: 6370 [69]) (ppm)	¹ H chemical shift difference (ppm)
G1	-	-	-
T2	8.7847	8.663	0.1217
T3	8.2857	8.149	0.1367
C4	7.7367	7.637	0.0997
Y5	Not observed	6.738	-
C6	8.5587	8.452	0.1067
G7	8.9297	8.799	0.1307
K8	8.8007	8.666	0.1347
T9	7.9427	7.82	0.1227
I10	8.2207	8.091	0.1297
G11	8.1317	8.011	0.1207
I12	8.9617	8.858	0.1037
Y13	8.1897	8.065	0.1247
W14	8.9437	8.834	0.1097
F15	8.1177	7.993	0.1247
G16	8.0907	7.967	0.1237
T17	6.9717	6.859	0.1127
K18	8.1607	8.044	0.1167
T19	7.7417	7.61	0.1317
C20	8.7947	8.665	0.1297
P21	-	-	-
S22	8.2947	8.158	0.1367
N23	8.7627	8.624	0.1387
R24	8.5877	8.458	0.1297
G25	8.3107	8.172	0.1387
Y26	7.4047	7.284	0.1207
T27	9.6767	9.558	0.1187
G28	7.5807	7.456	0.1247
S29	7.8927	7.762	0.1307
C30	8.8177	8.695	0.1227
G31	8.8007	8.673	0.1277
Y32	7.8457	7.732	0.1137
F33	Not observed	8.414	-
L34	Not observed	7.828	-
G35	8.6067	8.48	0.1267
I36	8.6427	8.535	0.1077
C37	9.1167	9.007	0.1097
C38	8.6827	8.571	0.1117
Y39	7.8227	7.716	0.1067
P40	-	-	-
V41	8.4177	8.266	0.1517
D42	8.1997	8.034	0.1657

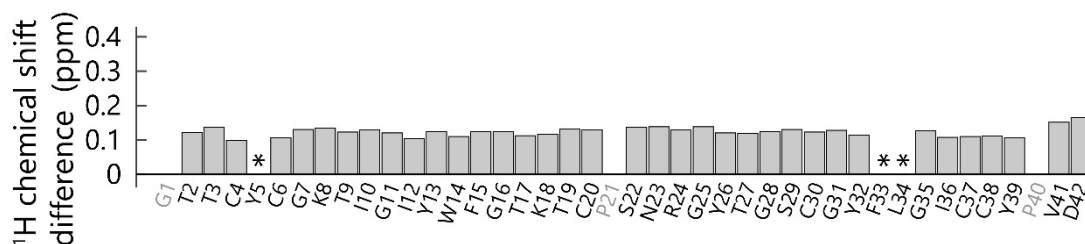


図 3-8 リコンビナント APETx1 とネイティブ APETx1 の ¹H 化学シフト値の差

リコンビナント APETx1 のものからネイティブ APETx1 のものを差し引いた。pH 3.0, 280 K 条件下で観測されなかったシグナルをアスタリスク (*) で示した。

3.3.3 リコンビナント APETx1 の NMR シグナルの pH による変化

温度 298 K での pH 6.0 から pH 3.0 への変化に伴う ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル上での各シグナルの化学シフト値の変化量 ($\Delta\delta$) を算出したところ、C 末端のアミノ酸残基 (V41, D42) の主鎖アミドシグナルと、R24 の側鎖由来のシグナルで変化が大きかった (図 3-9a-b)。そのため、先行研究でネイティブ APETx1 の立体構造が決定されている pH 3.0 条件下と生理的な pH 条件下では、APETx1 の立体構造が局所的に異なる可能性があることが分かった。

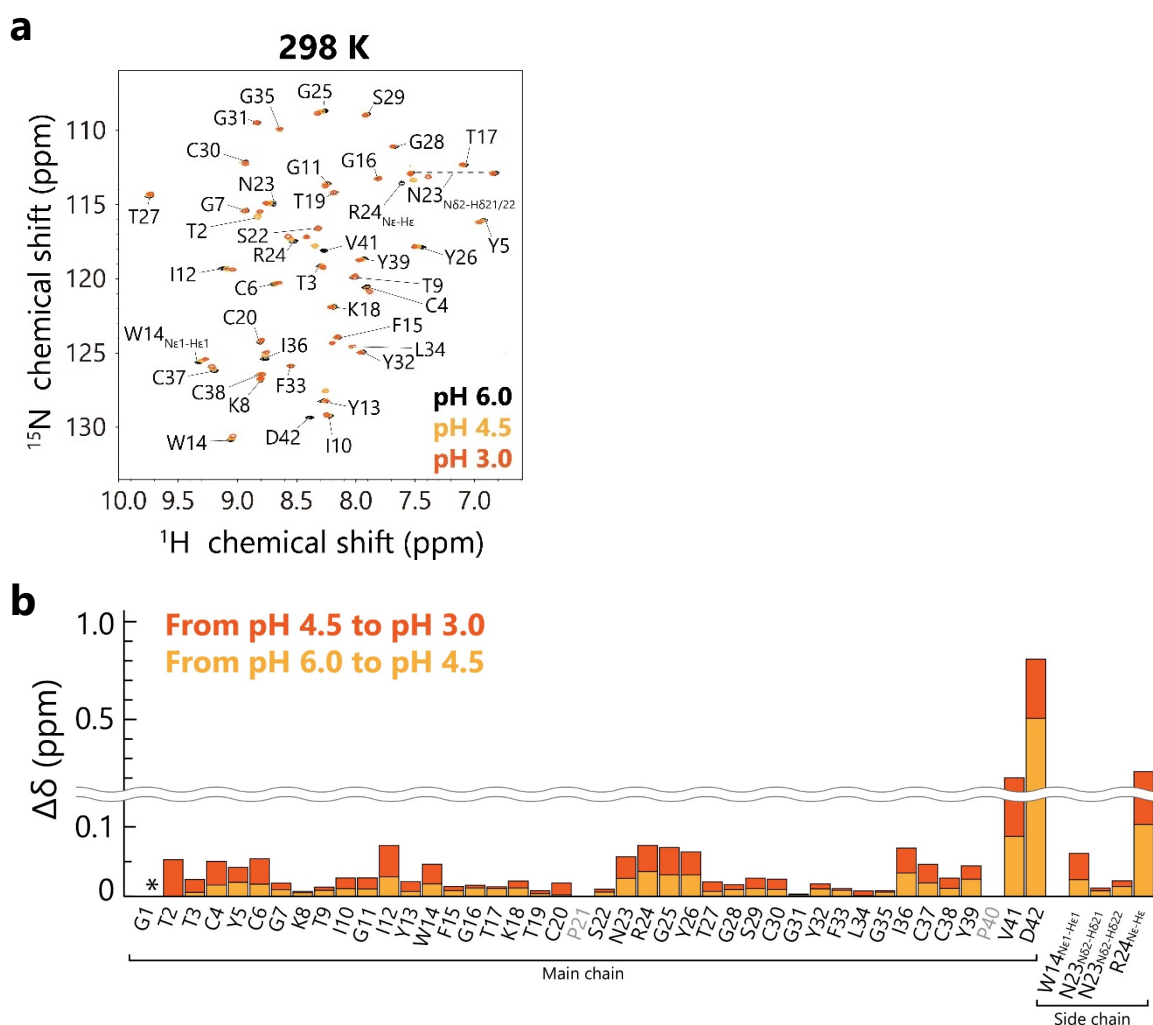


図 3-9 リコンビナント APETx1 の pH 変化に伴う化学シフト変化量

(a) 温度 298 K 条件下での pH 滴定測定。均一 ^{15}N 標識を施したリコンビナント APETx1 を利用して、磁場強度 500 MHz の装置で測定した。(b) 温度 298 K での化学シフト値の変化量を示した。化学シフト値の変化量 ($\Delta\delta$) については、 ^1H 化学シフト値の変化量 ($\Delta\delta_{1\text{H}}$) と ^{15}N 化学シフト値の変化量 ($\Delta\delta_{15\text{N}}$) を利用して算出した [79]。

3.3.4 pH 6.0 条件下での APETx1 の立体構造決定

先行研究では pH 3.0, 280 K 条件下での APETx1 の立体構造が決定されている [72]。

「3.3.3 リコンビナント APETx1 の NMR シグナルの pH による変化」で述べたように、pH 3.0 条件下での APETx1 の立体構造は生理的な pH 条件下での立体構造と局所的に異なる可能性がある。そこで、生理的 pH に近い pH 6.0 条件下で APETx1 の NMR 構造を決定することとした。

構造計算には、766 個の NOE シグナルから作成した距離拘束条件、 $^{13}\text{C}\alpha$, $^{13}\text{C}\beta$, $^{13}\text{C}\text{O}$, $^{15}\text{N}\alpha$, および ^1HN の化学シフト値から作成した 41 個の主鎖二面角拘束条件、および S-S 結合の拘束条件を利用した (表 3-2)。また、他のアミノ酸残基とは異なり、Pro 残基では 1 残基前のアミノ酸残基との間のペプチド結合において、*trans* 配座だけでなく *cis* 配座もとることが可能である。Pro 残基がいずれの立体配座をとっているのかを判定する方法として、Pro 残基の $\text{C}\beta$ と $\text{C}\gamma$ の化学シフト値の差 ($\delta_{\text{C}\beta} - \delta_{\text{C}\gamma}$) を指標とする方法が報告されている [81]。この方法では、 $\delta_{\text{C}\beta} - \delta_{\text{C}\gamma}$ が 4.8 ppm よりも小さい値のときには *trans* 配座であり、9.15 ppm よりも大きい値を示している場合には *cis* 配座であると判定する。APETx1 には 2 つの Pro 残基 P21 と P40 が存在するが、P21 では $\delta_{\text{C}\beta} - \delta_{\text{C}\gamma}$ が 5.992 ppm ($\delta_{\text{C}\beta} = 32.299$ ppm, $\delta_{\text{C}\gamma} = 26.307$ ppm) であり、P40 では $\delta_{\text{C}\beta} - \delta_{\text{C}\gamma}$ が 10.927 ppm ($\delta_{\text{C}\beta} = 35.842$ ppm, $\delta_{\text{C}\gamma} = 24.915$ ppm) であった。このことから、P40 のペプチド結合は *cis* 配座であると判断し、このことも構造計算時の拘束条件に利用した。

CYANA 3.98 [85] を使用して torsion angle dynamics での構造計算を行った後、Amber 12 [86] を使用した分子動力学計算によって構造の精密化を行い、20 個の最小エネルギー構造を最終構造として得た (図 3-10a)。20 個の構造を重ね合わせたときの主鎖の重原子 (水素原子を除く) での RMSD 値は残基番号 1-42 で 0.66 ± 0.21 Å、残基番号 2-41 で 0.48 ± 0.12 Å であった (表 3-2)。また、側鎖も含めた全重原子 (水素原子を除く) での RMSD 値は残基番号 1-42 で 1.01 ± 0.15 Å、残基番号 2-41 で 0.95 ± 0.14 Å であった (表 3-2)。

先行研究での pH3.0, 280 K 条件下での 25 個の構造と本研究での pH6.0, 298 K 条件下での 20 個の構造を重ね合わせたところ、pH および温度の条件が異なるにも関わらず、全体的

に非常によく重なっていた（残基番号 2-41 の主鎖 RMSD 値で 0.7 Å -1.5 Å。図 3-10b）。このことは、「3.3.2 ネイティブ APETx1 との化学シフト値の比較」での化学シフト値の比較の結果と同様に、リフォールディングによって調製したリコンビナント APETx1 がネイティブ APETx1 と同等の立体構造を形成していることを示している。

表 3-2 リコンビナント APETx1 の構造決定における統計値

	Native APETx1 [72]	Recombinant APETx1
PDB code	1WQK	7BWI
Number of conformers	25	20
Experimental conditions	pH 3.0 and 280 K	pH 6.0 and 298 K
Distance restraints		
Total NOE-derived restraints	751	766
Intraresidue restraints ($ i-j = 0$)	366	131
Sequential restraints ($ i-j = 1$)	140	216
Short-range restraints ($2 \leq i-j \leq 4$)	61	94
Long-range restraints ($ i-j \geq 5$)	184	325
Disulfide bond restraints	9	12
Dihedral angle restraints	20	41
Hydrogen-bond restraints	36	-
RMSD from mean coordinate structure (Å)^a		
Backbone heavy atoms		
Residues 1-42	0.82 ± 0.17	0.66 ± 0.21
Residues 2-41	0.63 ± 0.13	0.48 ± 0.12
All heavy atoms		
Residues 1-42	1.28 ± 0.17	1.01 ± 0.15
Residues 2-41	1.13 ± 0.15	0.95 ± 0.14
Analysis of the Ramachandran plot (%)^b		
Residues in favored regions	84.3	93.7
Residues in allowed regions	14.0	5.6
Ramachandran outliers	1.7	0.6

^aRMSD は MOLMOL [88] を用いて計算した。 ^bStereochemical quality は MolProbity [89] を用いて評価した。

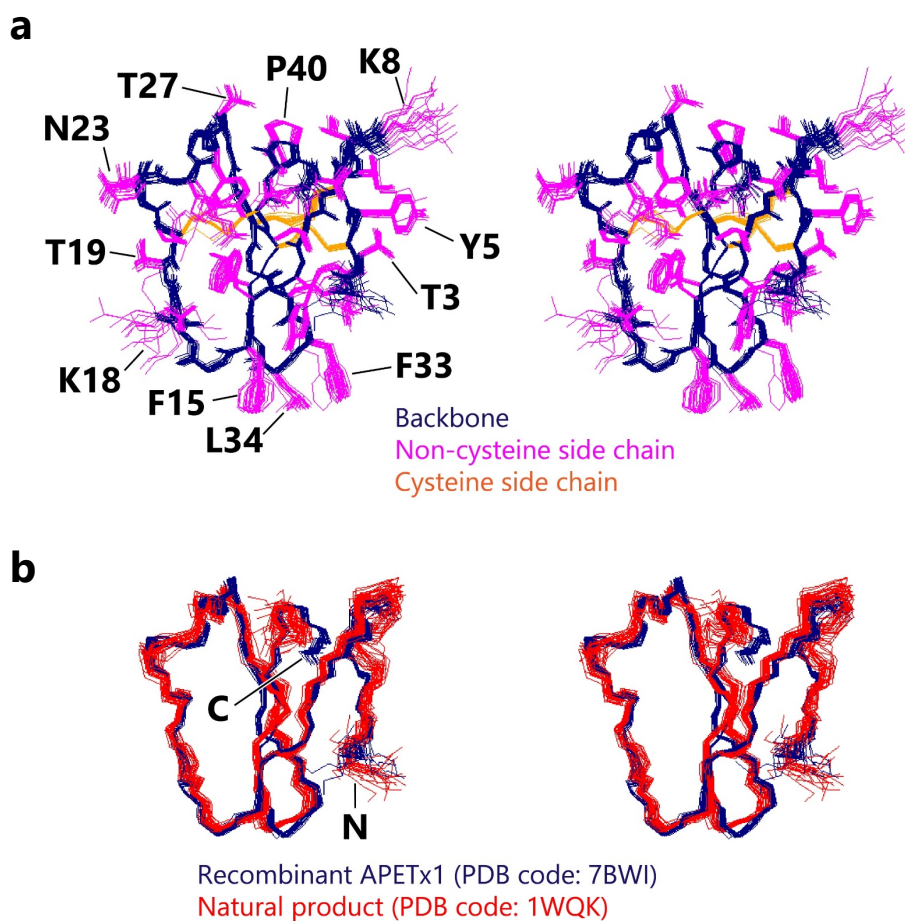


図 3-10 リコンビナント APETx1 の NMR 構造

(a) リコンビナント APETx1 の 20 個の最小エネルギー構造の重ね合わせ。主鎖を紺、Cys 残基以外の側鎖をピンク、Cys 残基の側鎖を橙で示した。(b) リコンビナント APETx1 (紺) とネイティブ APETx1 (赤) の重ね合わせ。両者とも主鎖のみを表示した。ネイティブ APETx1 は 25 個の構造の重ね合わせである (PDB code: 1WQK) [72]。

ネイティブ APETx1 とリコンビナント APETx1 の構造は全体的によく重なっていたが、C 末端の位置は僅かにずれていた (図 3-11a)。pH 6.0, 298 K 条件下で決定したリコンビナント APETx1 の構造では、C 末端の D42 の側鎖のカルボキシル基が R24 の側鎖のグアニジニウム基に近づいていた (図 3-11b)。この構造変化は、「3.3.3 リコンビナント APETx1 の NMR シグナルの pH による変化」で pH 依存的な化学シフト変化が C 末端のアミノ酸残基 (V41, D42) の主鎖アミドシグナルと、R24 の側鎖由来のシグナルで大きかったことと矛盾しない。これらの結果は、D42 の側鎖のカルボキシル基のプロトン化状態が pH 6.0 と pH 3.0 で異なり、pH 6.0 では脱プロトン化したことによって、R24 のグアニジニウム基に近づくように構造変化が起こったことを示唆している。本研究における pH 滴定実験では、pH 3.0 と pH 6.0 の間での NMR スペクトルの変化が可逆的であることを確認しており、これらの pH 依存的な局所構造の変化は可逆的であることが分かっている。以上の結果から、リコンビナント APETx1 とネイティブ APETx1 の立体構造に大きな差はなく、pH 6.0, 298 K 条件下で APETx1 の立体構造を決定することに成功したと考えた。

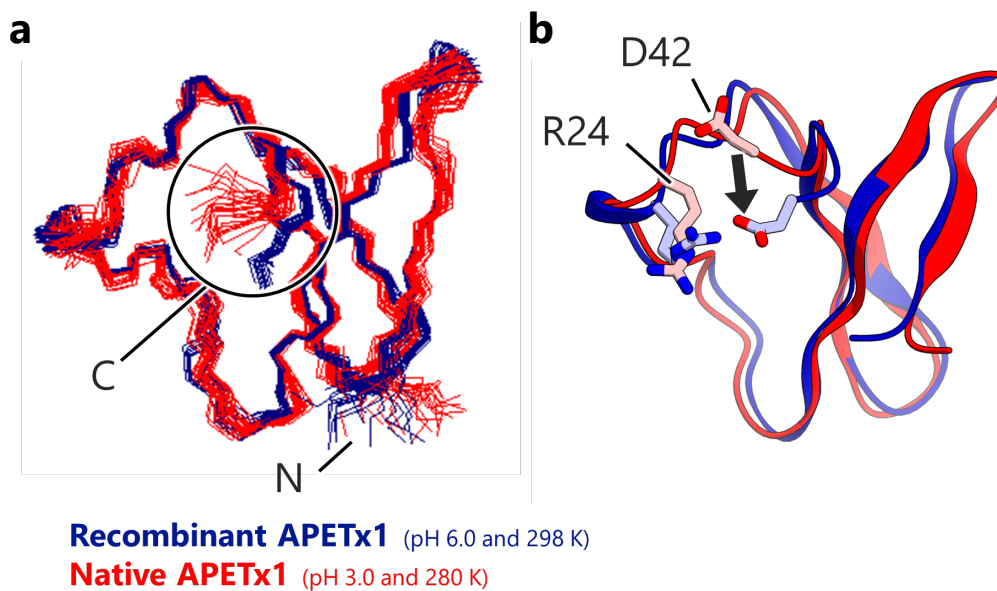


図 3-11 APETx1 の pH 依存的な局所構造の変化

(a) リコンビナント APETx1 (紺) とネイティブ APETx1 (赤) の構造の重ね合わせ。図 3-10 (b) を異なる向きから表示した。(b) リコンビナント APETx1 (紺) とネイティブ APETx1 (赤) からそれぞれ一個の構造だけを示した。R24 と D42 は側鎖をスティック表示で示した。

3.4 APETx1 の hERG 阻害に関わるアミノ酸残基の同定

3.4.1 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルによる APETx1 変異体の構造の評価

これまで APETx1 の変異体解析は行われておらず、APETx1 がどのアミノ酸残基を利用して、hERG の resting state に結合し阻害するのかが明らかとなっていない。そこでまず、APETx1 の hERG 阻害に関わるアミノ酸残基を同定するために、APETx1 の変異体の hERG 阻害活性を電気生理学的手法により評価することにした。

APETx1 の変異体を作製するアミノ酸残基には、側鎖が分子表面に露出している 15 個のアミノ酸残基 (T3, Y5, K8, F15, K18, T19, S22, N23, R24, T27, S29, Y32, F33, L34, D42) を選定した (図 3-12)。T3 を除き、変異後のアミノ酸残基は側鎖の構造が最も単純なアラニンとした。T3 については、APETx1 の T3P 変異体 (APETx3) をイソギンチャクが保有しており、この APETx3 を濃度 50 μM で添加しても脱分極電位が +40 mV のときの hERG 電流を阻害しないことが報告されているため [95]、この変異体を作製することにした。

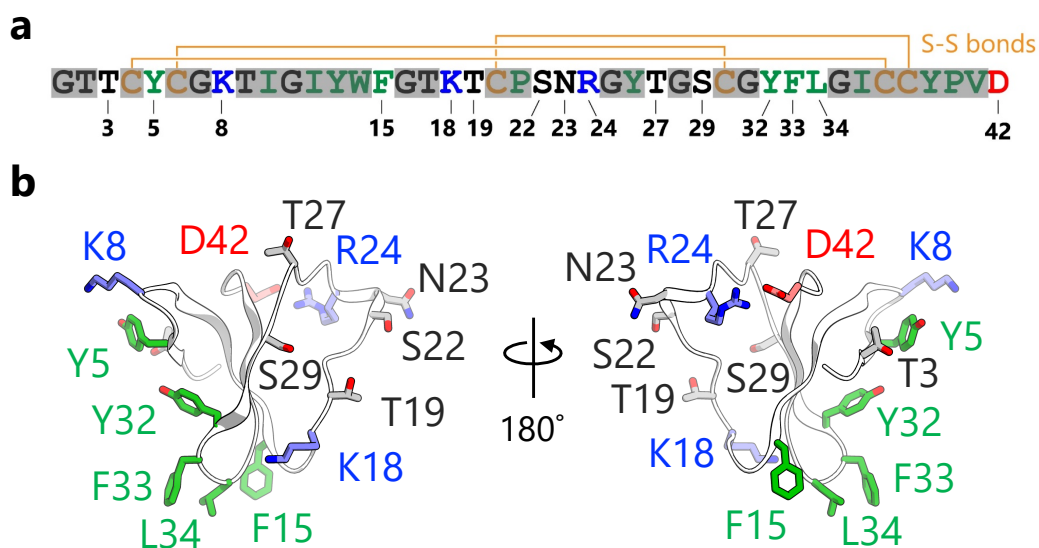


図 3-12 APETx1 の変異部位

(a) APETx1 のアミノ酸配列。変異体を作製したアミノ酸残基には残基番号をラベルした。(b) APETx1 の構造 (PDB: 7BWI)。変異体を作製したアミノ酸残基の側鎖をスティックで表示した。

まず、APETx1 の変異体を野生型 (WT) と同じく、「2.5.1 発現」と「2.5.2 精製およびリフォールディング」に記載した方法で調製した。これらの変異体が WT と同等の立体構造を形成していることを確認するため、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した。全 15 種の変異体で 8.6 ppm よりも低磁場側にシグナルが観測されており、スペクトル全体にシグナルがよく分散していた (図 3-13)。さらに、変異体の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを WT のスペクトルと重ね合わせて主鎖アミドシグナルの化学シフト値の比較を行ったところ、多くのシグナルが WT のものとよく重なることが分かった (図 3-13)。

R24A 変異体と Y32A 変異体では複数のシグナルで化学シフト値に差がみられた (図 3-13)。そこで、APETx1 の立体構造上に主鎖アミドプロトンをマッピングして、変異による立体構造への影響を評価した (図 3-14)。その結果、WT との間で化学シフト値に差がみられた主鎖アミドプロトンは変異させたアミノ酸残基と構造上で近接しており、化学シフトに大きな差がみられない主鎖アミドプロトンは離れた位置にあることが分かった。そのため、これらの化学シフト値の差は変異に伴う側鎖構造の変化によって局所的な化学環境が変化したことに起因することが示唆された。これらのことから、全ての APETx1 の変異体が WT と同等の立体構造を形成していると判断した。

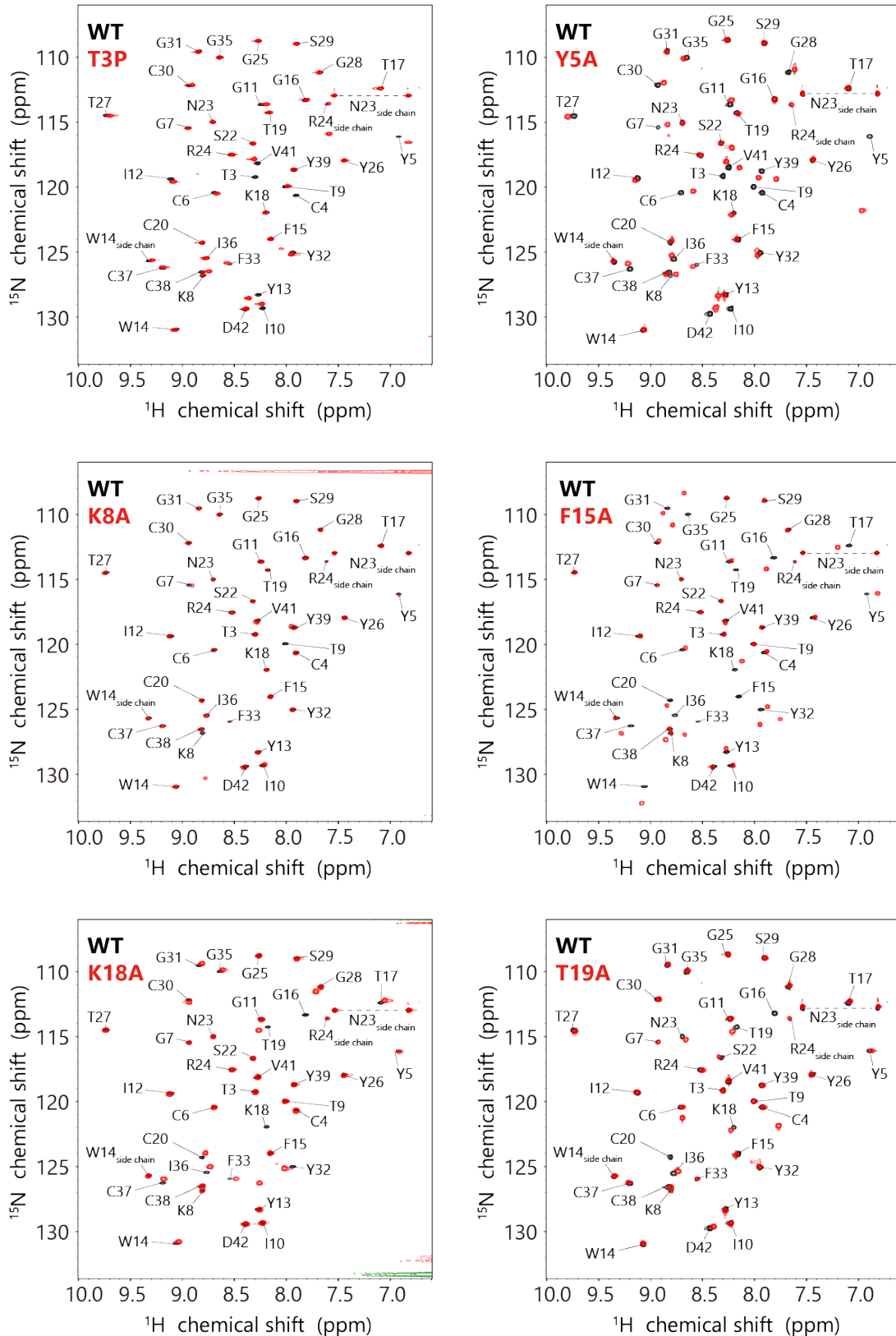


図 3-13 APETx1 変異体の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル

均一 ^{15}N 標識を施した APETx1 変異体を利用して、磁場強度 600 MHz の装置で測定した。APETx1 の WT のスペクトル (黒) に対して、変異体のスペクトル (赤) を重ね合わせた。

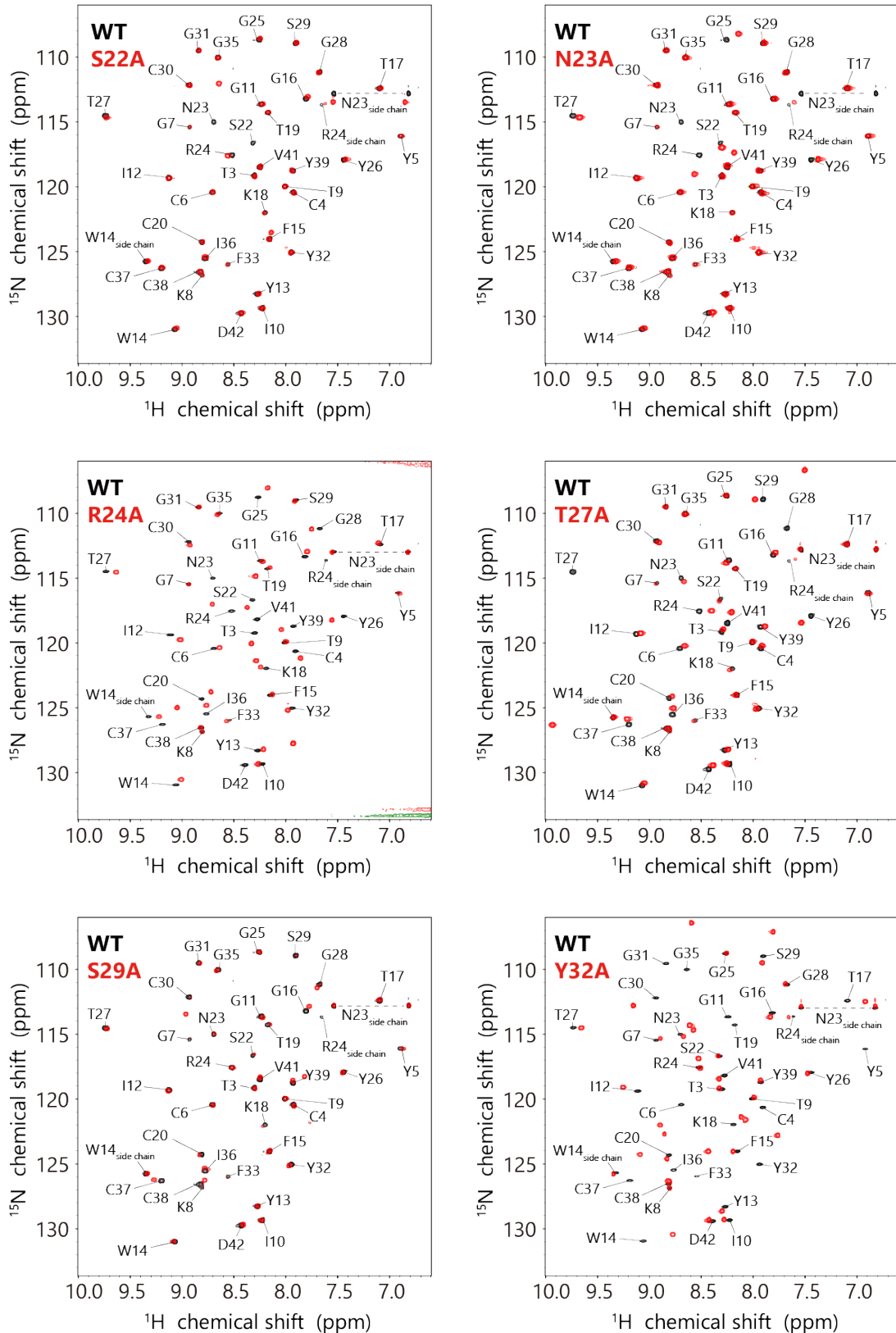


図 3-13 APETx1 変異体の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル (前頁からの続き)
 均一 ^{15}N 標識を施した APETx1 変異体を利用して、磁場強度 600 MHz の装置で測定した。
 APETx1 の WT のスペクトル (黒) に対して、変異体のスペクトル (赤) を重ね合わせた。

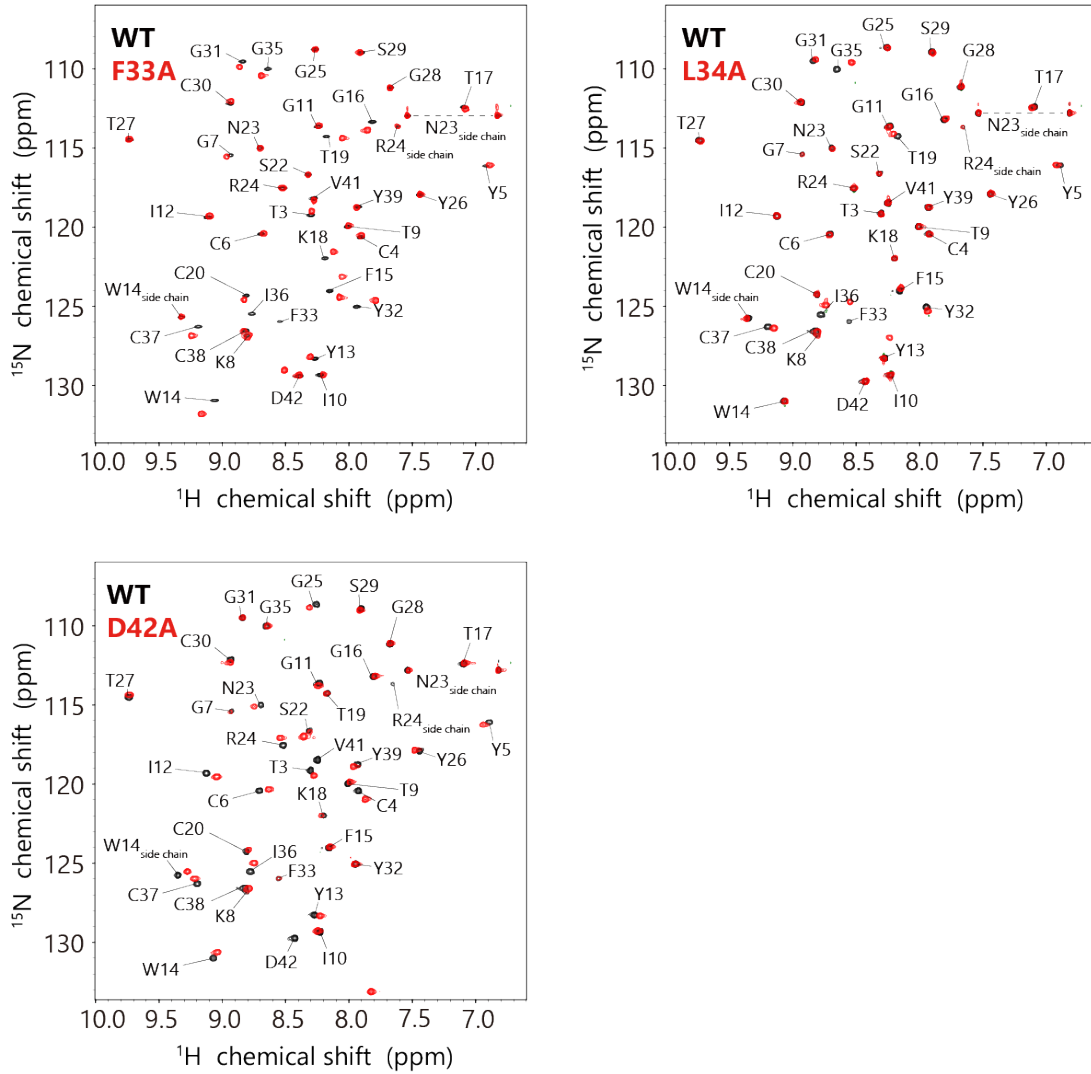


図 3-13 APETx1 変異体の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル (前頁からの続き)

均一 ^{15}N 標識を施した APETx1 変異体を利用して、磁場強度 600 MHz の装置で測定した。APETx1 の WT のスペクトル (黒) に対して、変異体のスペクトル (赤) を重ね合わせた。

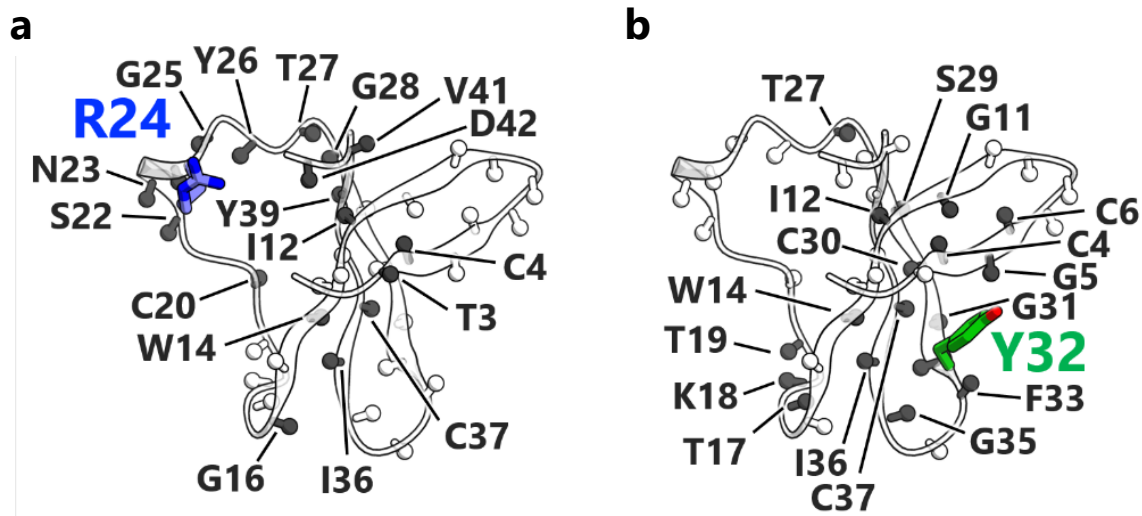


図 3-14 APETx1 の変異によって化学シフト変化が生じた主鎖アミドプロトンのマッピング
 APETx1 の NMR 構造 (PDB: 7BWI) にマッピングした。主鎖アミドプロトンを球で表した。主
 鎖アミドプロトンのうち、WT と変異体の中でシグナルが重なり合わないほど化学シフト値
 の差が大きいものを黒、ほとんど差がみられなかったものを白で示した。(a) R24A 変異体。
 (b) Y32A 変異体。

3.4.2 APETx1 変異体の hERG 阻害活性の評価

APETx1 の変異体解析は、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り行った。「3.2.1 リコンビナント APETx1 による hERG 活性化電位のポジティブシフト」で述べたように、APETx1 は hERG の G - V 曲線をポジティブシフトさせ、濃度 $10\ \mu\text{M}$ での $\Delta V_{1/2}$ の値は $+23.9 \pm 2.5\ \text{mV}$ であった。濃度 $10\ \mu\text{M}$ の APETx1 変異体を添加したときの G - V 曲線を、図 3-15a-c に示した。このときの $\Delta V_{1/2}$ の値を WT との間で比較した (図 3-15d)。その結果、F15A, Y32A, F33A, L34A では WT と比較して $\Delta V_{1/2}$ の値が有意に減少した (F15A, $0.001 < p < 0.01$; Y32A, F33A, L34A, $p < 0.001$) (図 3-15c-d)。その他の変異体 (T3P, Y5A, K8A, F15A, K18A, T19A, S22A, N23A, R24A, T27A, S29A, Y32A, F33A, L34A, D42A) では WT と比較して $\Delta V_{1/2}$ の値に有意な差がみられなかったが (図 3-15a-b,d)、K18A と T19A では僅かに減少傾向がみられた (K18A, $p = 0.563$; T19A, $p = 0.219$)。

APETx3 (APETx1 の T3P 変異体) については、先行研究では脱分極電位 $+40\ \text{mV}$ のときの hERG の電流を阻害しないことが報告されている [95]。しかしながら、これまで APETx3 が hERG の活性化電位をポジティブシフトさせるかは評価されていなかった。本研究ではリコンビナント APETx3 が hERG の活性化電位をポジティブシフトさせており、その $\Delta V_{1/2}$ の値は APETx1 と比較して有意な差がないことが示された (図 3-15d)。「3.4. APETx1 変異体の hERG 阻害に関わる分子表面の同定」で示した ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルから、リコンビナント APETx3 とリコンビナント APETx1 の間で立体構造が同等であることが分かっている (図 3-13)。これらのことから、APETx1 の T3 は hERG の活性化電位のポジティブシフトに対してほとんど寄与していないことが示唆された。

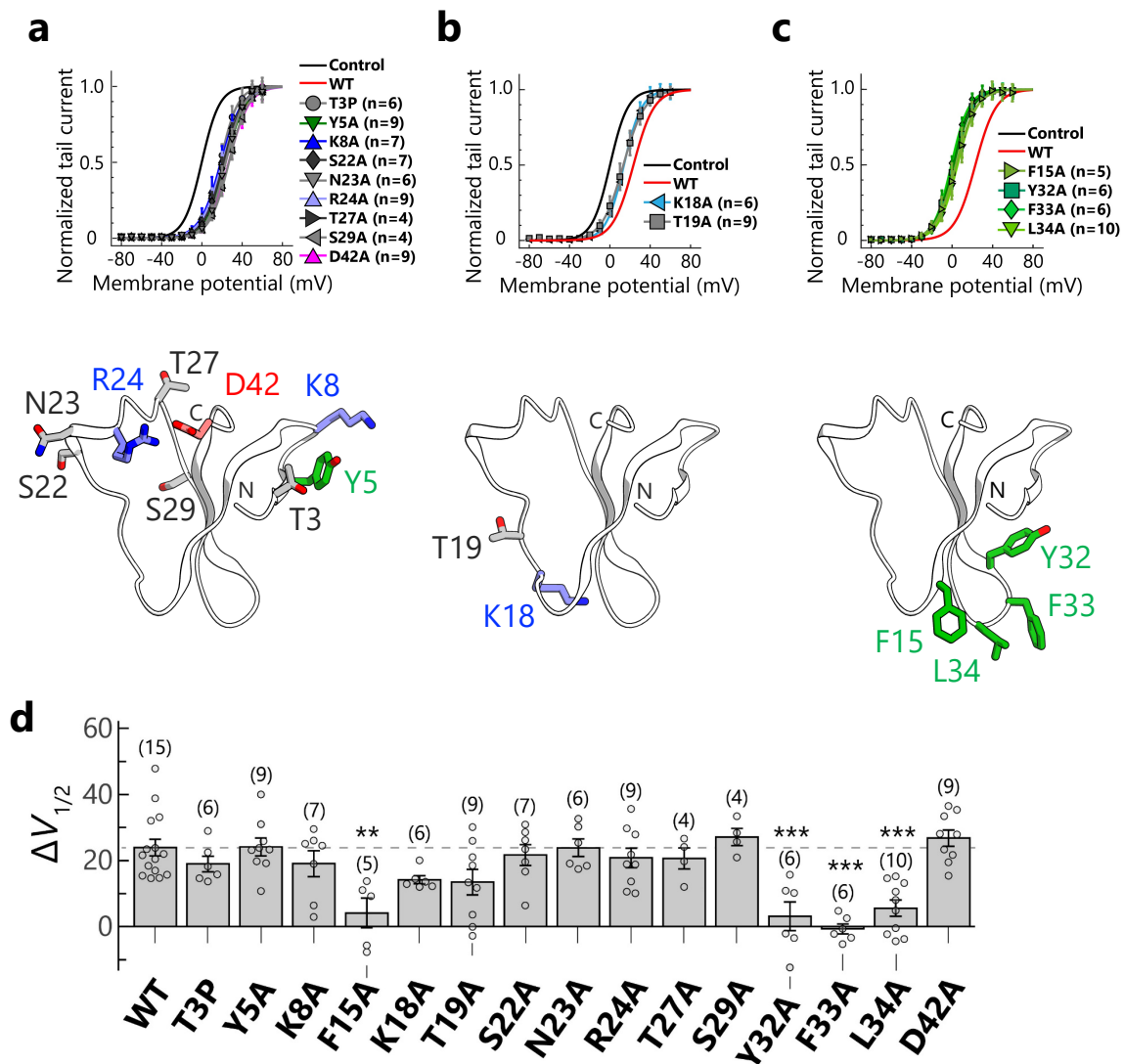


図 3-15 APETx1 変異体による hERG の活性化電位のシフト

(a) 濃度 10 μM の APETx1 変異体を添加したときの hERG の G-V 曲線。全てのデータは平均値と標準誤差 (mean \pm SEM) で表した。(b) 濃度 10 μM の APETx1 変異体を添加したときの $\Delta V_{1/2}$ 。全てのデータは平均値と標準誤差 (mean \pm SEM) で表し、測定回数を括弧内に記載した。一元配置分散分析 (one-way ANOVA) の後、Tukey 検定による多重比較を行い、 p 値が 0.05 未満であるとき、統計学的に有異であると判定した (*, $0.01 \leq p < 0.05$; **, $0.001 \leq p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)。

変異により $\Delta F_{1/2}$ の値が有意に減少した F15, Y32, F33, L34 を APETx1 の立体構造にマッピングしたところ、分子表面で局在していることが分かった (図 3-16a)。これらのアミノ酸残基はいずれも疎水性アミノ酸残基であり、F15 と Y32 の C β の間で 9.4 Å、F15 と F33 の C β の間で 10 Å 以内に局在していた (図 3-16b)。APETx1 の分子表面に側鎖が露出しているアミノ酸残基の変異体のうち、これらの 4 個の疎水性アミノ酸残基の変異体だけで hERG 阻害活性が有意に低下し、阻害がほとんど完全に消失したことから、APETx1 の F15, Y32, F33, L34 で形成される疎水性表面が hERG 阻害に重要であり、直接的な相互作用に関わっていることが示唆された。

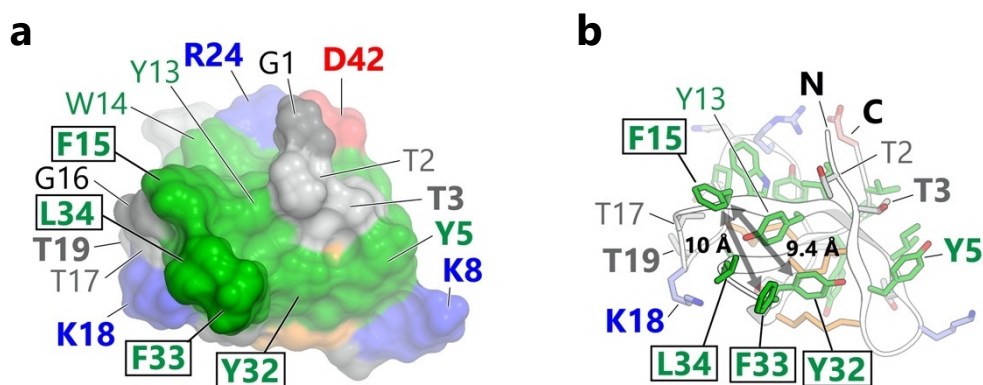


図 3-16 変異体解析により同定された APETx1 の疎水性残基の局在
変異体を作製したアミノ酸残基を太字で示した。

3.5 APETx1 による阻害に関わる hERG のアミノ酸残基の同定

3.5.1 hERG 変異体の作製

先行研究の TEVC 測定では hERG の S3-S4 ループの G514 から E519 までの 6 個のアミノ酸残基の Cys 変異体が解析され、G514C 変異体において APETx1 での $\Delta V_{1/2}$ の値が有意に増大し、E518C 変異体で $\Delta V_{1/2}$ の値が有意に減少することが報告されている [75]。多くの gating-modifier toxin は電位依存性イオンチャネルの VSD の S3-S4 領域に結合すると考えられている [54,55,96]。しかしながら、APETx1 が hERG の S3-S4 領域に対してどのように結合し、hERG の resting state を安定化するのかは分かっていない。そこで、hERG の S3-S4 領域の各アミノ酸残基が APETx1 による hERG 阻害に関与しているのかを調べるために、hERG の変異体解析を行うこととした。

hERG の S3-S4 領域の F508 から L524 までの 17 残基のうち、先行研究で変異体解析が行われた 6 残基 (G514-E519) を除く、11 個のアミノ酸残基 (F508, D509, L510, L511, I512, F513, L520, I521, G522, L523, L524) の Ala 変異体を作製した (図 3-17a-c)。先行研究で APETx1 による hERG 阻害活性に有意な変化がみられた G514C 変異体と E518C 変異体も作製した。また、S4 に近接する S1 のすぐ上の位置の L433 とその周辺の荷電性アミノ酸残基 (K434, E435, E437, E438) と、S2 ヘリックスの酸性アミノ酸残基 (D456, D460) についても Ala 変異体を作製した (図 3-17a-c)。

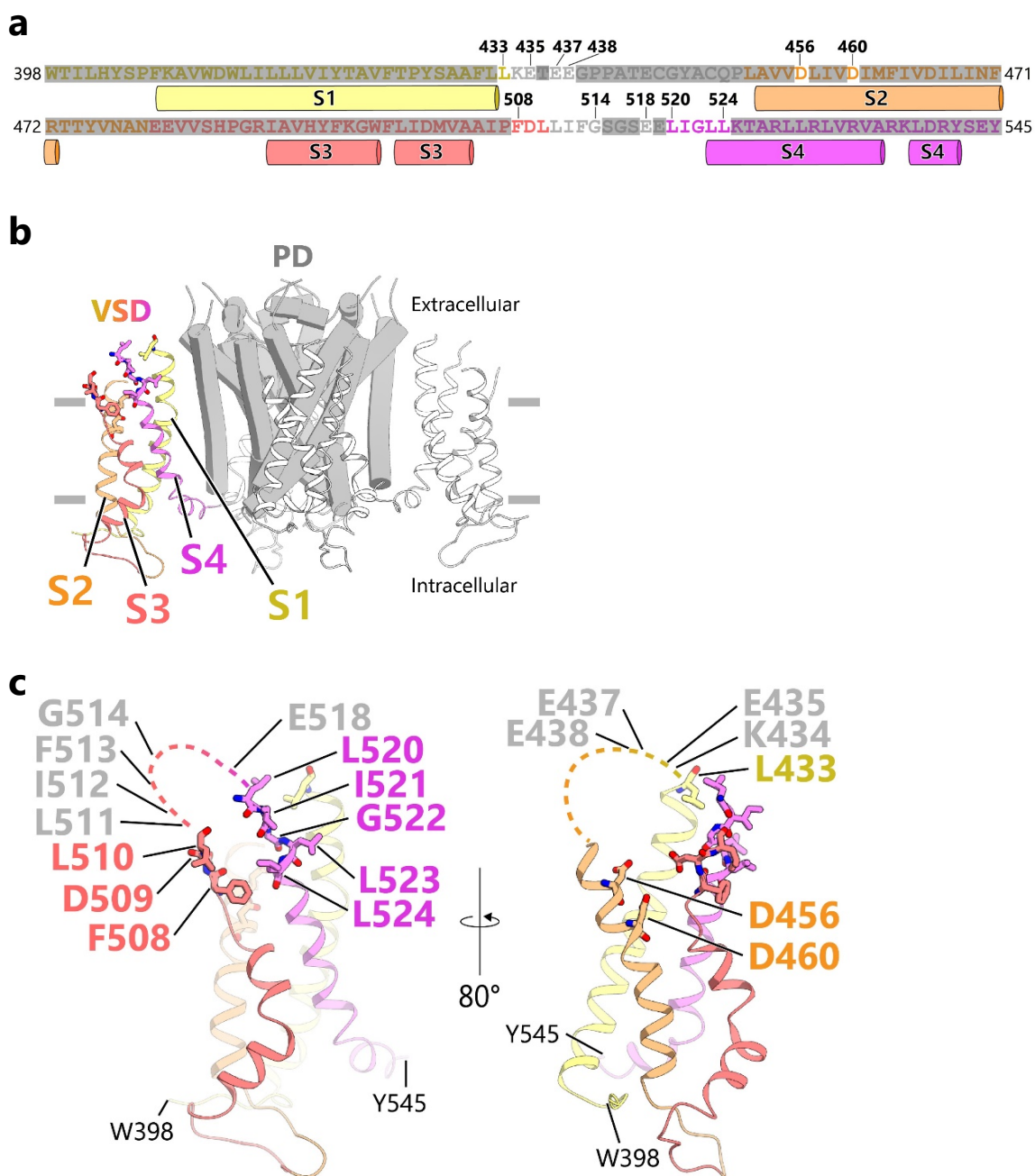


図 3-17 hERG の変異導入部位

(a) hERG の VSD (残基番号 398-545) のアミノ酸配列。(b) hERG の膜貫通ドメインの構造。VSD はリボン表示とし、4 量体中の一つのサブユニットだけを (a) と同じように色分けして示した。PD は灰色のシリンダー表示で示した。(c) hERG の VSD の拡大図。変異体を作製したアミノ酸残基をマッピングした。

3.5.2 hERG 変異体の電流の評価

hERG の変異体解析はアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた TEVC 測定により行った。全ての変異体で hERG に特徴的なテール電流が観測されたことから (図 3-18)、変異体が卵母細胞の細胞膜上に発現し、hERG の電気生理学的性質を保持していることが分かった。

hERG の G - V 曲線から得られる $V_{1/2}$ の値は、resting state から activated state への遷移 (活性化) の膜電位依存性を反映する [10]。TEVC 測定における hERG WT の $V_{1/2}$ の値は -13.0 ± 0.4 mV であり (図 3-19)、D456A, D460A, D509A, E518C および L524A 変異体では変異導入によって $V_{1/2}$ の値が高電位側にシフトし、L520A および L523A 変異体では変異導入によって $V_{1/2}$ の値が低電位側にシフトしていた (図 3-19)。残りの 13 種の変異体では WT と比較して $V_{1/2}$ の値にほとんど差がなかった (図 3-19)。

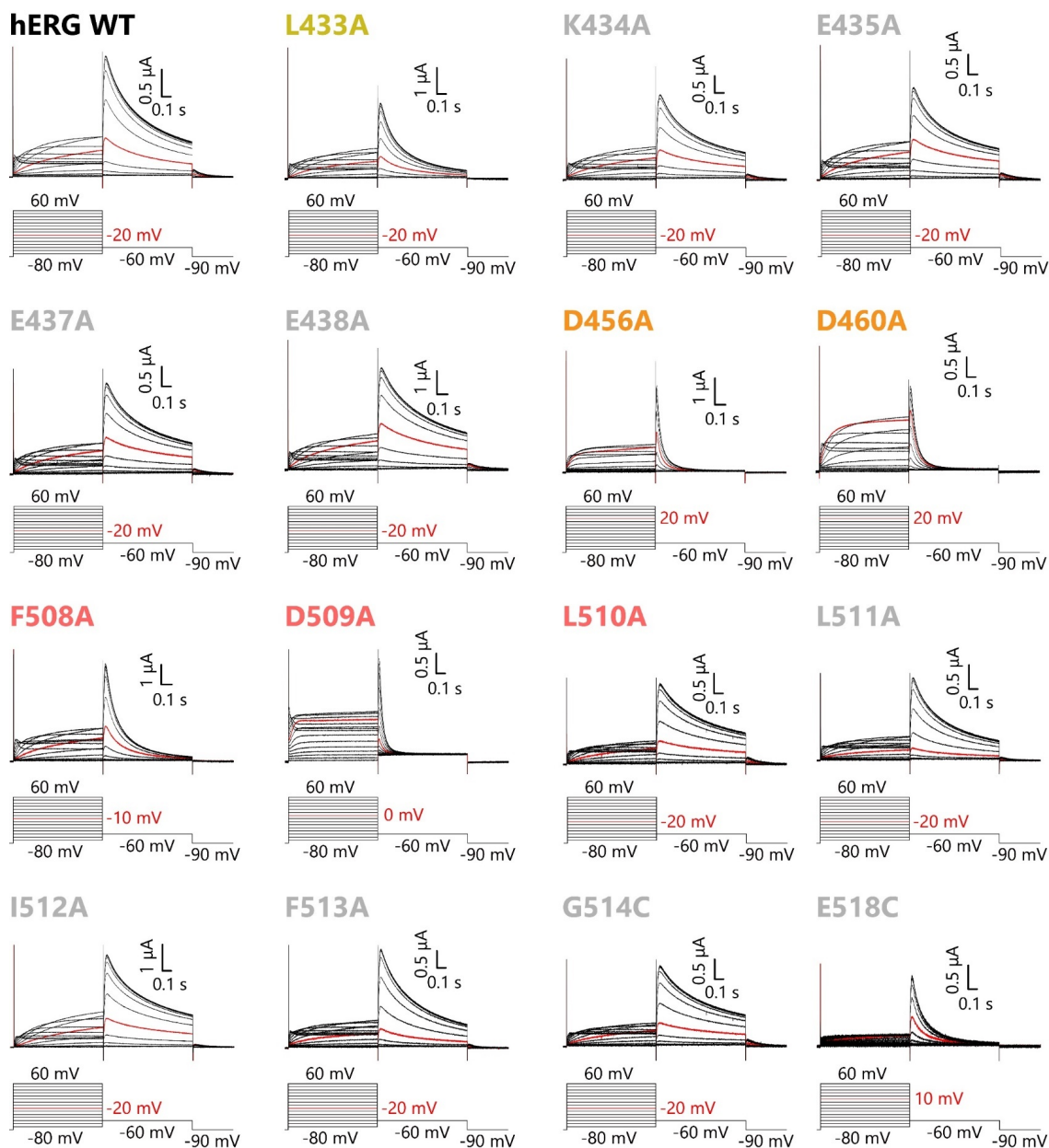


図 3-18 hERG 変異体の電流

変異体ごとに電流トレース（上）と電位プロトコル（下）を示した。変異体のラベルの色はその残基が存在する α ヘリックスで色分けしており、図 3-17 に準拠している（S1 を黄、S2 を橙、S3 を赤、S4 をピンクとした）。

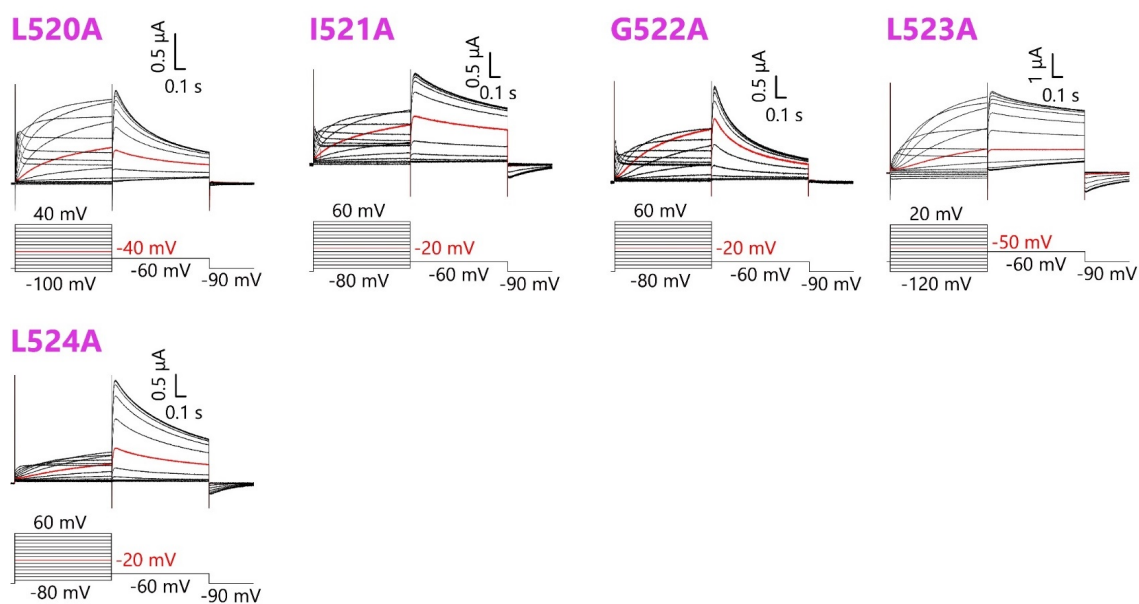


図 3-18 hERG 変異体の電流（前頁からの続き）

変異体ごとに電流トレース（上）と電位プロトコル（下）を示した。変異体のラベルの色はその残基が存在する α ヘリックスで色分けしており、図 3-17 に準拠している（S1 を黄、S2 を橙、S3 を赤、S4 をピンクとした）。

3.5.3 APETx1 による hERG 変異体の阻害活性の評価

APETx1 は hERG の WT の $G-V$ 曲線をポジティブシフトさせ、濃度 $10\ \mu\text{M}$ での $\Delta V_{1/2}$ の値は $+21.9 \pm 1.1\ \text{mV}$ であった (図 3-19)。同様に hERG 変異体についても、濃度 $10\ \mu\text{M}$ の APETx1 を添加したときの $G-V$ 曲線を図 3-19 に示した。このときの変異体ごとの $\Delta V_{1/2}$ の値を WT との間で比較した (図 3-20)。先行研究 [75] と同様に、G514C 変異体では $\Delta V_{1/2}$ の値は有意に増大し、E518C 変異体では $\Delta V_{1/2}$ の値は有意に減少することを確認した (図 3-20)。さらに、S3-S4 領域のアミノ酸残基の変異体のうち、F508A と I521A では $\Delta V_{1/2}$ の値が WT と比較して有意に減少し、APETx1 による阻害がほとんど完全に消失した (図 3-20)。これに対して、I512A と G522A では $\Delta V_{1/2}$ の値が WT と比較して有意に増大し、APETx1 による阻害が増強された (図 3-20)。S1-S2 領域のアミノ酸残基の変異体のうち、L433A と D460A では $\Delta V_{1/2}$ の値が WT と比較して有意に減少した (図 3-20)。

APETx1 によるポジティブシフトが減少した S3-S4 領域のアミノ酸残基の変異体のうち、E518C 変異体では変異導入によって $V_{1/2}$ の値が WT と比較して高電位側にシフトした (WT, $V_{1/2} = -13.0 \pm 0.4\ \text{mV}$; E518C, $V_{1/2} = 5.0 \pm 2.7\ \text{mV}$, 図 3-19)。E518C と同様に、変異導入により $V_{1/2}$ の値が WT と比較して高電位側にシフトした変異体である L524A 変異体 ($V_{1/2} = 8.3 \pm 1.5\ \text{mV}$, 図 3-19) では、APETx1 は WT のときと同程度のポジティブシフトを引き起こした (図 3-20)。逆に、L520A 変異体 ($V_{1/2} = -34.4 \pm 0.6\ \text{mV}$) と L523A 変異体 ($V_{1/2} = -40.8 \pm 1.2\ \text{mV}$) では変異導入によって $V_{1/2}$ の値が WT と比較して低電位側にシフトしていたが (図 3-19)、APETx1 はこれらの変異体に対しても WT のときと同程度のポジティブシフトを引き起こした (図 3-20)。これらの結果は、 $V_{1/2}$ の値が変異導入によって変化し、hERG の resting state と activated state の存在比率が変異によって変化したとしても、APETx1 による阻害には影響を及ぼさないことを示唆している。そのため、E518C 変異体で APETx1 によるポジティブシフトが顕著に減少したことは、hERG の resting state の存在比率が低下したことによるものではなく、変異導入による側鎖構造の局所的な変化が APETx1 との結合を低下させたことを反映していると考えた。以上の結果から、hERG の E518 は F508 や I521 とともに APETx1 による hERG 阻害に寄与するアミノ酸残基であると判断した。

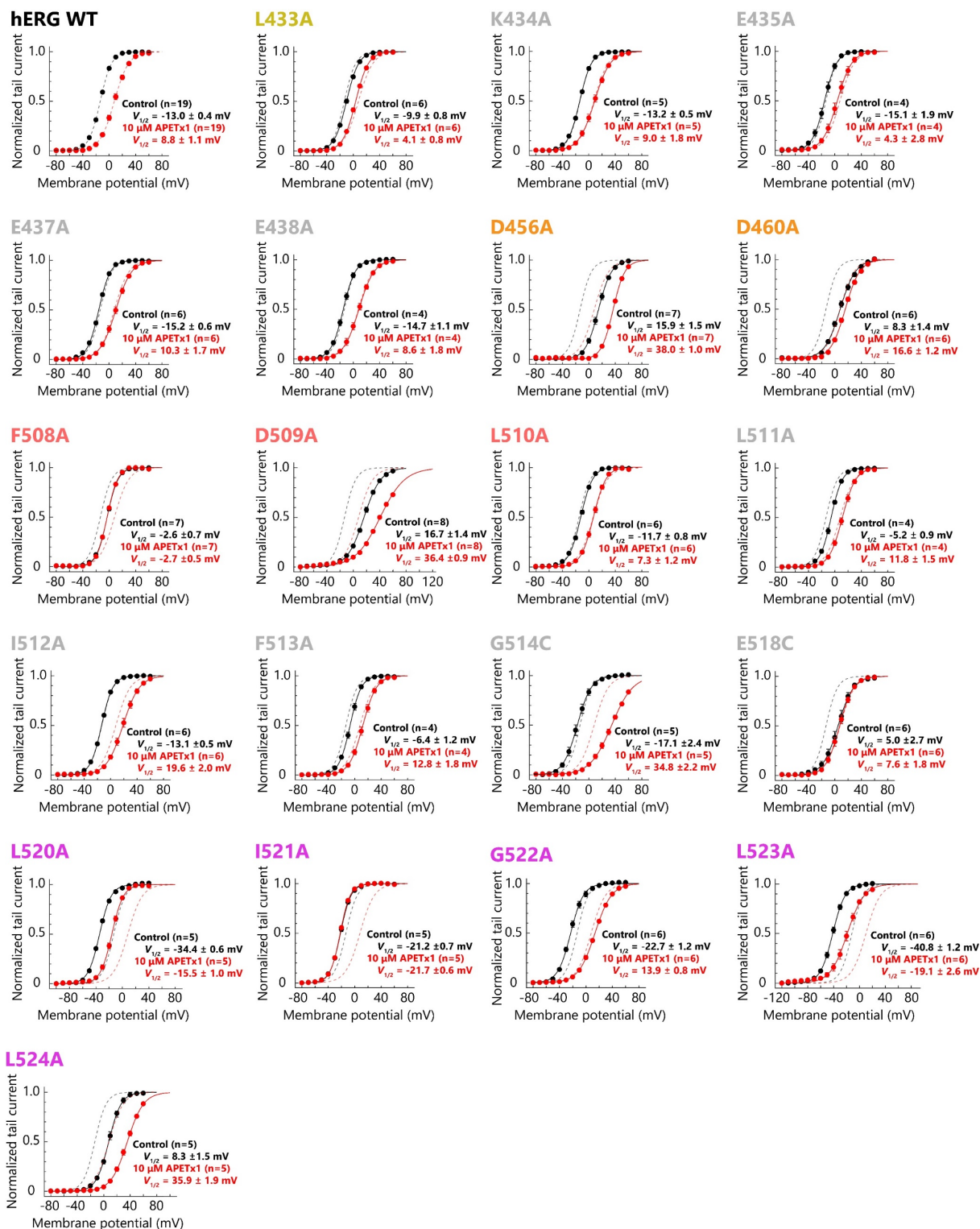


図 3-19 APETx1 による hERG 変異体の G-V 曲線のシフト

濃度 10 μ M の APETx1 の添加前後での hERG 変異体の G-V 曲線を示した。全てのデータは平均値と標準誤差 (mean \pm SEM) で表した。変異体のラベルの色はその残基が存在する α ヘリックスで色分けしており、図 3-17 に準拠している (S1 を黄、S2 を橙、S3 を赤、S4 をピンクとした)。

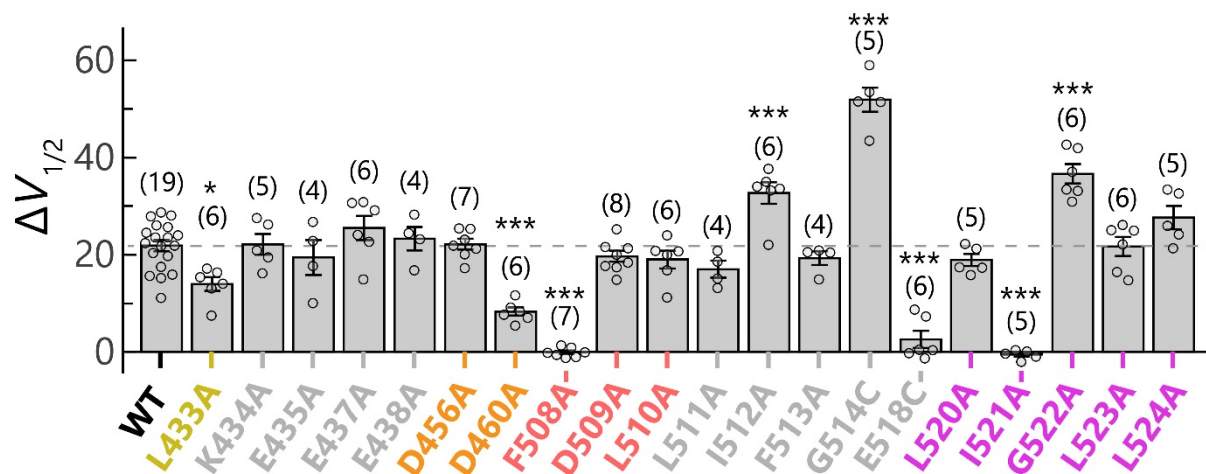


図 3-20 10 μ M APETx1 による hERG 変異体の 50%活性化電位の変化量

濃度 10 μ M の APETx1 を添加したときの各 hERG 変異体の $\Delta V_{1/2}$ を示した。全てのデータは平均値と標準誤差 (mean \pm SEM) で表し、測定回数を括弧内に記載した。一元配置分散分析 (one-way ANOVA) の後、Tukey 検定による多重比較を行い、 p 値が 0.05 未満であるとき、統計学的に有異であると判定した (*, $0.01 \leq p < 0.05$; **, $0.001 \leq p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)。変異体のラベルの色はその残基が存在する α ヘリックスで色分けしており、図 3-17 に準拠している (S1 を黄、S2 を橙、S3 を赤、S4 をピンクとした)。

APETx1 による hERG 阻害活性が変異によってほとんど完全に消失したアミノ酸残基 F508, E518, I521 は、いずれも S3-S4 領域に位置する。hERG の構造上で F508 と I521 の C β 間の距離は 11.7 Å であった (図 3-21)。また、hERG の S3-S4 ループの L511 から E519 までの領域は先行研究の cryo-EM 構造では原子座標情報がないことから、構造上での E518 の正確な位置は明らかではないが、F508 と E518 との間は約 15 Å 以上離れていることが想定された (図 3-21)。

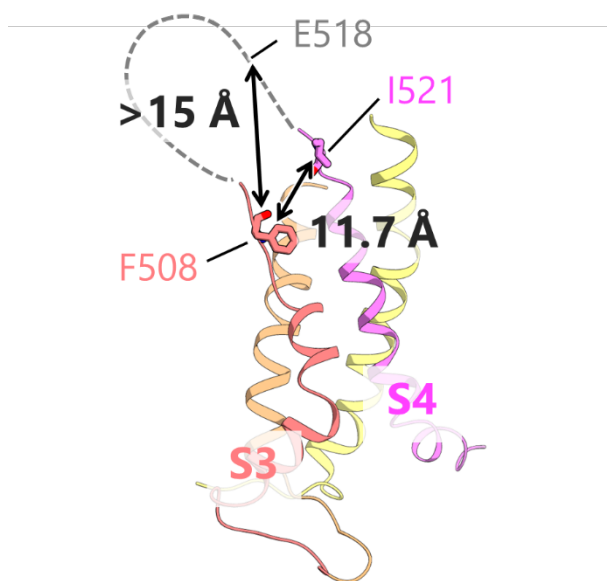


図 3-21 変異体解析で阻害活性が低下した hERG の S3-S4 領域のアミノ酸残基の位置
hERG の cryo-EM 構造 (PDB: 5VA2) の VSD の up conformation の構造上に、APETx1 の F508, E518, I521 の位置をマッピングした。L511 から E519 までのアミノ酸残基は原子座標が存在しないため、灰色の点線で表した。

3.6 APETx1-VSD 複合体の構造モデルの構築

本研究ではここまで、「3.4.2 APETx1 変異体の hERG 阻害活性の評価」で APETx1 の F15, Y32, F33, L34 が hERG 阻害活性に関与することを示し、「3.5.3 APETx1 による hERG 変異体の阻害活性の評価」で APETx1 による hERG 阻害には先行研究で報告されていた E518 [75] に加えて F508 と I521 が重要であることを示した。そこで、APETx1 と hERG のドッキングシミュレーションを行うことで、両者の変異体解析によって同定されたアミノ酸残基同士が直接的に相互作用した APETx1-hERG 複合体の構造モデルを得ることができるかどうかを検証することとした。

3.6.1 hERG の S3-S4 ループの構造モデルの構築

hERG の VSD の S4 は膜電位依存的に構造変化し、静止膜電位下では S4 が細胞内側に引き付けられた down conformation をとり、脱分極時には S4 が細胞外側に引き付けられた up conformation をとる。hERG の cryo-EM 構造 (PDB code: 5VA2) は膜電位のない条件で解析されたものであり、S4 が up-conformation をとっている [24]。その一方で、先行研究および本研究の電気生理学的解析の結果から、APETx1 は hERG の resting state での VSD を安定化することから、S4 の down conformation を認識することが分かっている [69,75]。そこでまず、hERG の S4 の down conformation の構造モデルを構築することを目指した。

hERG の cryo-EM 構造では S3-S4 ループの一部である L511 から E519 までの領域の原子座標の情報がないため、初めに MODELLER [93] を使用したホモロジーモデリングによって、hERG の S3-S4 領域の全原子座標を含む構造モデルを作製することにした。ホモロジーモデリングの鋳型には、rat *ether-à-go-go* 1 (rEAG1) の cryo-EM 構造 (PDB code: 5K7L) を利用した [39]。hERG の VSD (残基番号 398-545) と rEAG1 の VSD (残基番号 208-347) では配列同一度が 47.8% と高く (図 3-22a)、構造もよく類似している (図 3-22b)。さらに、rEAG1 の構造モデルには S3-S4 領域の全原子座標が含まれている (図 3-22b)。これらのことから、hERG の S3-S4 ループの構造の鋳型に利用できると考えた。ホモロジーモデリングにより得られた hERG の S3-S4 領域の構造モデルは、hERG の cryo-EM 構造 (PDB code: 5VA2)

のものと非常によく類似しており（図 3-22c）、hERG の S3-S4 領域の全原子座標を含む構造モデルを作製することができたと判断した（以下、この構造モデルを up model と記載する）。

続いて、hERG と rEAG1 の VSD の配列アラインメントにおいて、hERG の S4 ヘリックスの配列をヘリックス一巻分または二巻分に相当する 3 残基もしくは 6 残基だけ下流方向にシフトさせてホモロジーモデリングを行うことで、S4 の down conformation のモデルを作製した（図 3-22c。以下、それぞれの構造モデルを one-helical-turn down model と two-helical-turn down model と記載する。）。

電位依存性イオンチャネルの S4 ヘリックスには、複数の塩基性アミノ酸残基が存在し、VSD の S1-S3 ヘリックスに存在する酸性残基との間で近接し、VSD の内部で塩橋を形成することで、脂質膜中で安定化していると考えられている [97-101]。ホモロジーモデリングにより作製した hERG の up model、one-helical-turn down model、two-helical-turn down model は、VSD 内部での酸性アミノ酸残基と塩基性アミノ酸残基との間での位置関係が保持されていたことから（図 3-22c）、適切なモデルを構築することに成功したと判断した。

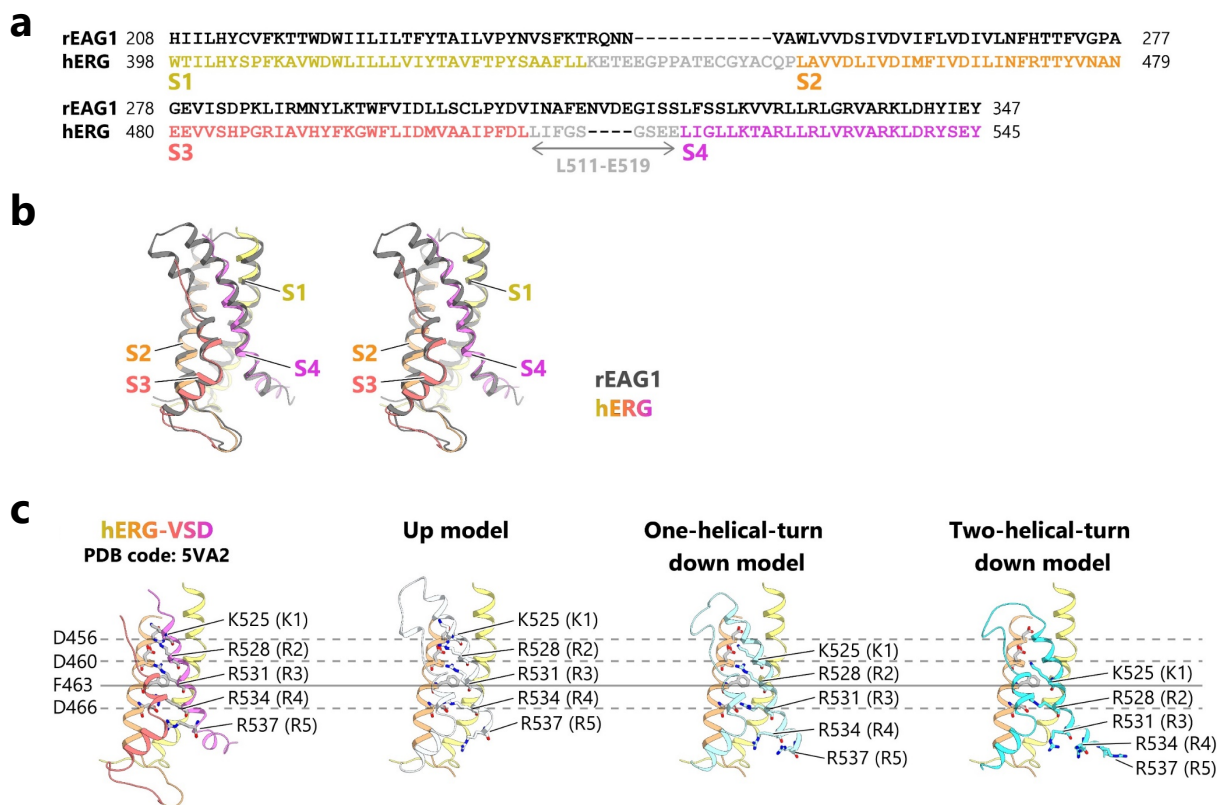


図 3-22 hERG の VSD の down conformation の構造モデルの構築

(a) rEAG1 の VSD と hERG の VSD の配列比較。hERG については S1 を黄色、S2 を橙色、S3 を紅色、S4 をピンク色で示した。Cryo-EM 構造 (PDB: 5VA2) に原子座標が存在しないアミノ酸残基を薄い灰色で示した。(b) rEAG1 の VSD (PDB code: 5K7L、灰色) と hERG の VSD (PDB code: 5VA2、色分けは (a) に従う。) の構造の重ね合わせ。(c) 左から順に、hERG の VSD の cryo-EM 構造 (PDB code: 5VA2)、up model、one-helical-turn down model、two-helical-turn down model を示した。S2 の酸性残基 D456, D460, D466 の位置を灰色の点線で示し、F463 (VSD 内部で細胞内側と細胞外側を隔てており、charge transfer center と呼ばれるアミノ酸残基) の位置を灰色の実線で示した。S4 の塩基性残基 K525, R528, R531, R534, R537 (VSD の S4 に保存され、膜電位感受に関わる塩基性残基で、N 末端側のものから順に K1-R5 と呼ばれる。) の位置を図示した。

Up model においては、変異導入によって APETx1 による阻害活性が低下した hERG の F508, E518, I521 が分子表面にほとんど露出していなかった (図 3-23)。これに対して、one-helical-turn model と two-helical-turn model においては、これらの 3 個のアミノ酸残基の側鎖が分子表面に広く露出しており、これらの側鎖は分子表面に窪み (crevice) を形成していた (図 3-23)。

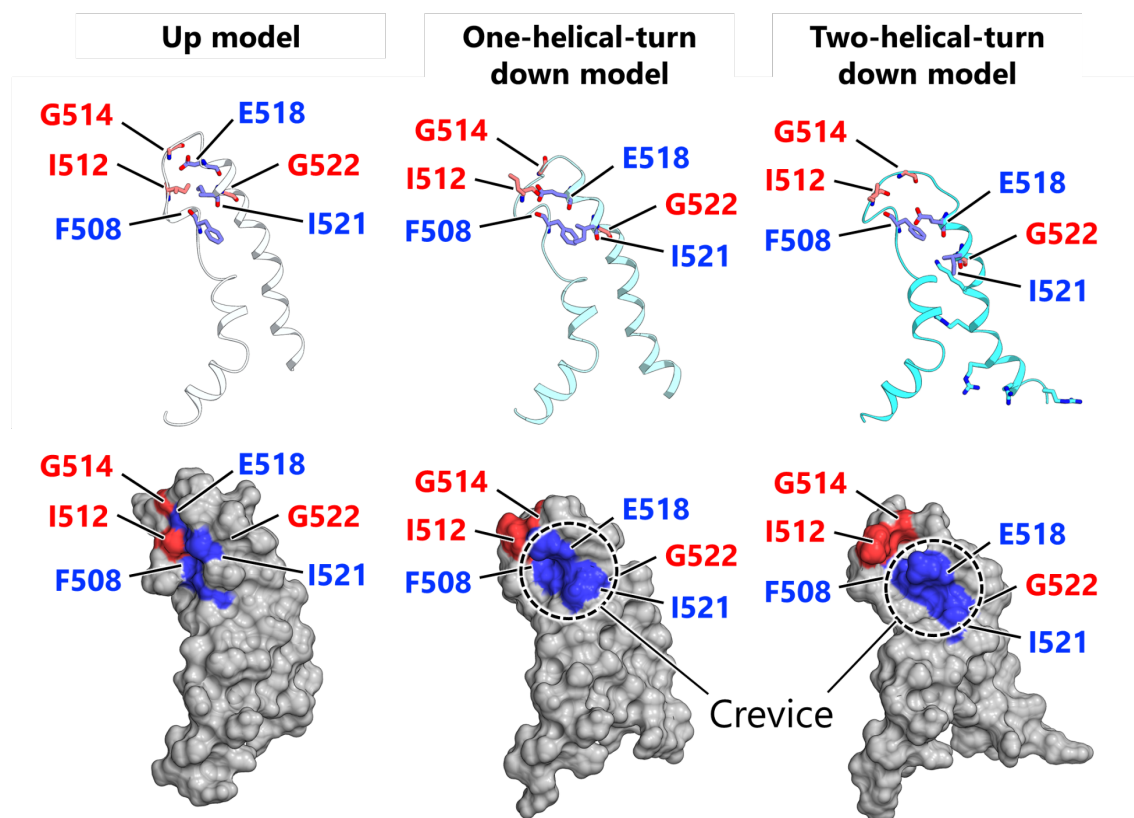


図 3-23 変異体解析により同定されたアミノ酸残基の hERG S3-S4 領域の構造モデル上での位置

hERG の S3-S4 領域の構造モデルをリボン表示 (上) と表面表示 (下) で示した。変異により APETx1 による hERG 阻害活性が上昇したアミノ酸残基を赤色、低下したアミノ酸残基を青色で示した。One-helical-turn-down model と two-helical-turn-down model で分子表面に見られた窪み (crevice) の位置は、点線で囲むことで示した。

3.6.2 変異体解析結果を満たす APETx1 の VSD に対する結合様式

APETx1 と hERG の両者の変異体解析で同定されたアミノ酸残基同士が直接的に相互作用する複合体モデルが得られるのかを検証するために、拘束条件付きのドッキングシミュレーションを HADDOCK 2.4 web server [94] を使用して行った。Up model に対するドッキングシミュレーションでは、変異体解析で同定された APETx1 の疎水性残基 F15, Y32, F33, L34 が hERG の F508, E518, I521 と直接的に相互作用した複合体モデルを得ることができなかった。このとき、複数の異なるドッキングポーズを有するモデルが得られたが、現状ではどのモデルが妥当であるかを評価することはできなかった。その一方で、one-helical-turn down model と two-helical-turn down model に対するドッキングシミュレーションにおいては、APETx1 の疎水性残基 F15, F33, L34 の側鎖が hERG の F508, E518, I521 で形成された分子表面の窪みに収まるように結合したモデルが得られた (図 3-24)。このとき、APETx1 の Y32 は hERG の E518 と水素結合しうる位置に存在した (図 3-24, inset)。

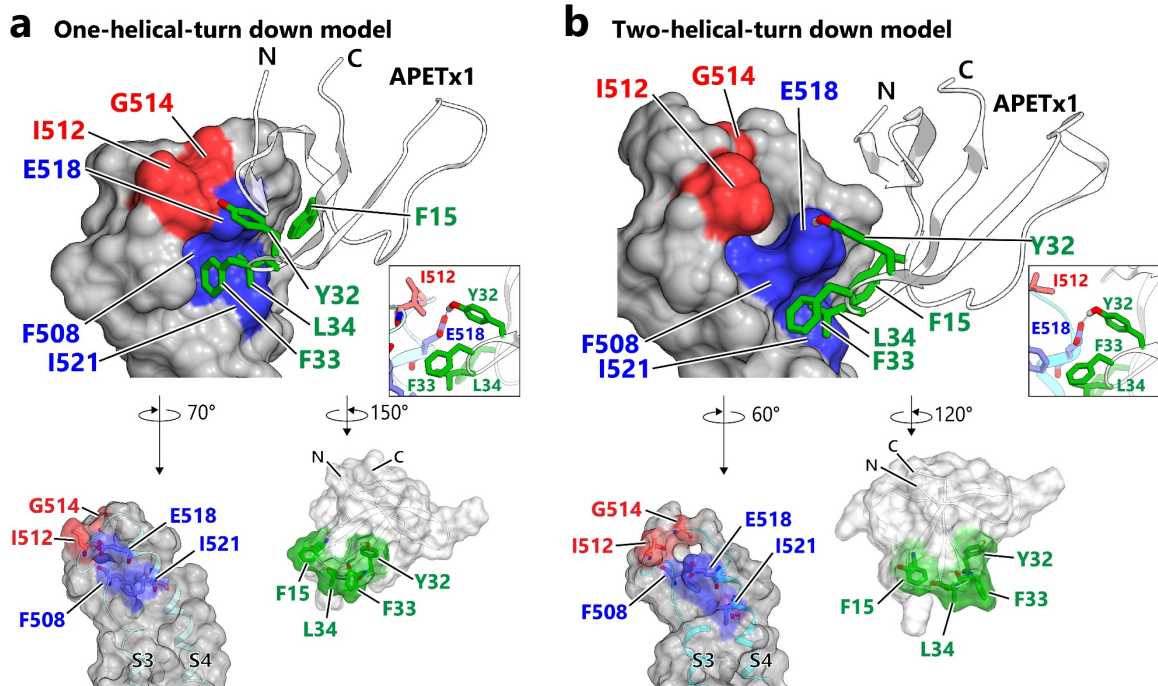


図 3-24 変異体解析の結果を満たす APETx1-VSD 複合体の構造モデル

変異体により hERG 阻害活性が低下した APETx1 の疎水性アミノ酸残基を緑色で示した。hERG については、変異により APETx1 による hERG 阻害活性が上昇したアミノ酸残基を赤色、低下したアミノ酸残基を青色で示した。(a) one-helical-turn down model。(b) two-helical-turn down model。

One-helical-turn down model と two-helical-turn down model のいずれにおいても、APETx1 が hERG の VSD の S3-S4 領域の脂質膜界面側に結合しており、この結合部位は hERG の膜貫通ドメインの外縁部に位置していた (図 3-25)。これらのモデルにおいて、APETx1 が PD や 4 量体中の他のサブユニットの VSD と接触していなかったことから (図 3-25)、APETx1 が hERG に対してこの位置で結合することは hERG の全長構造とも矛盾しないことが確認された。

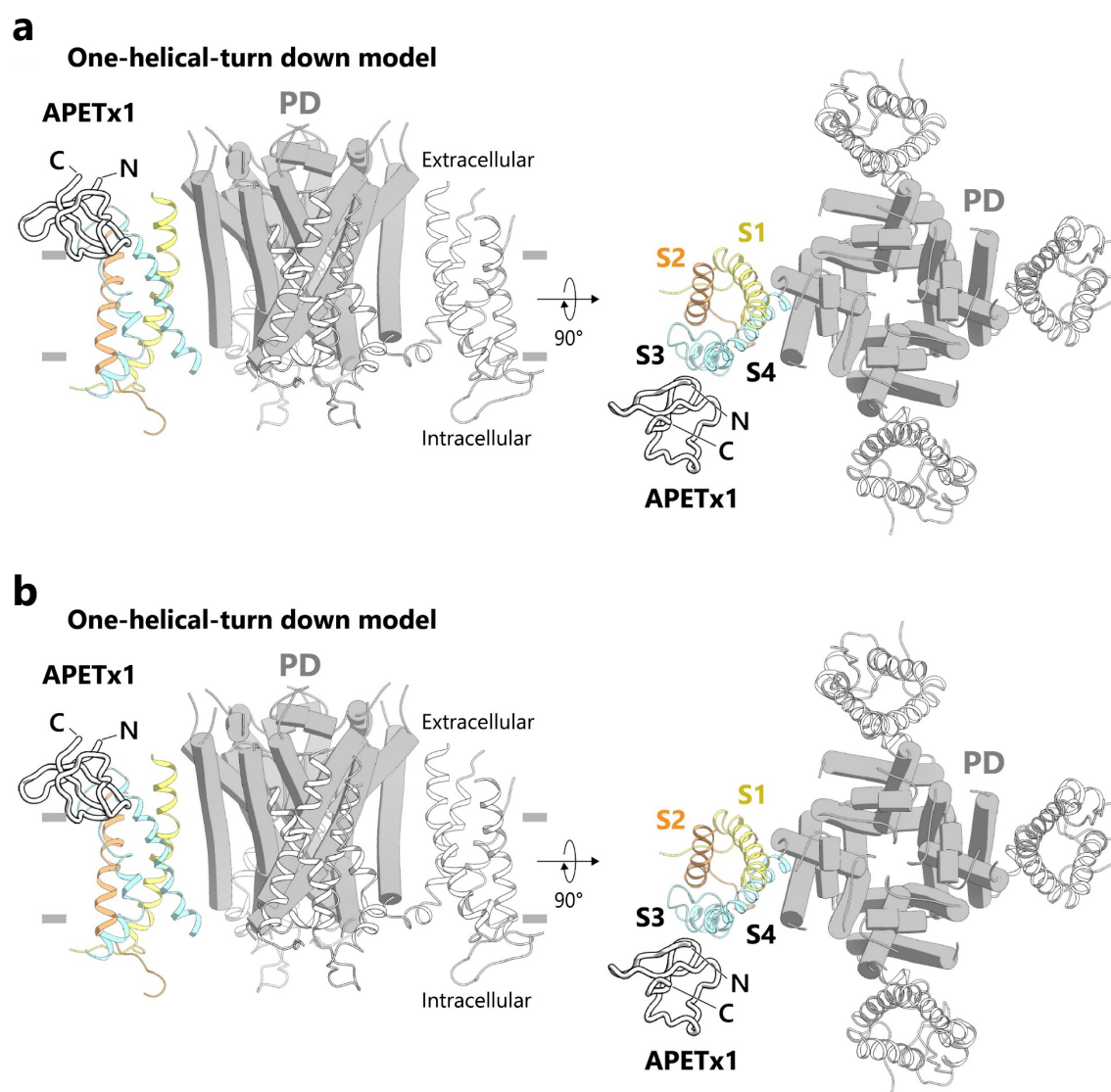


図 3-25 hERG 全長における APETx1 の結合位置
 APETx1 はチューブ表示で示した。hERG の VSD をリボン表示、PD をシリンダー表示で示した。APETx1 が結合している VSD の色分けは図 3-22 に従った。(a) one-helical-turn down model。
 (b) two-helical-turn down model。

第4章 考察

4.1 APETx1 による hERG の VSD の S4 の down conformation の認識

APETx1 と hERG の変異体解析の結果から、APETx1 では分子表面上で局在した4個の疎水性残基 F15, Y32, F33, L34 が hERG 阻害活性に寄与しており (図 3-15)、hERG では F508, E518, I521 が APETx1 による hERG 阻害活性に寄与していることが明らかとなった (図 3-19、図 3-20)。APETx1 の4個の疎水性残基は互いに約 10 Å 以内に局在し、疎水性パッチを形成している (図 3-16)。その一方で、S4 が up conformation を形成している hERG の cryo-EM 構造中では、F508, E518, I521 が互いに 10~15 Å 以上離れた位置に存在する (図 3-21)。そのため、APETx1 の疎水性残基が up conformation における F508, E518, I521 と直接的に相互作用するのは難しいと考えた。

APETx1 による hERG 阻害の電気生理学的解析から、APETx1 は hERG の resting state における S4 の down conformation に結合し、この機能状態を安定化することが示唆される (図 3-3、図 3-4) [69,75]。そのため、APETx1 の疎水性パッチは、cryo-EM により膜電位のない条件で解析された hERG の S4 の up conformation ではなく、詳細な立体構造は未解明であるが生理的な静止膜電位下で S4 が細胞内側に引き付けられた down conformation との相互作用に適した形状となっていると考えた。K_v チャンネルの VSD では、脱分極電位から静止膜電位へと再分極する過程で、S4 ヘリックスが細胞内側に向かって垂直に移動すると考えられている [97-99]。そのため、down conformation では S4 が細胞内側に向かって一巻き分から二巻き分の距離を移動することによって、S4 の E518 と I521 が S3 の F508 と近づき、APETx1 の結合部位が形成されると考えた (図 4-1)。

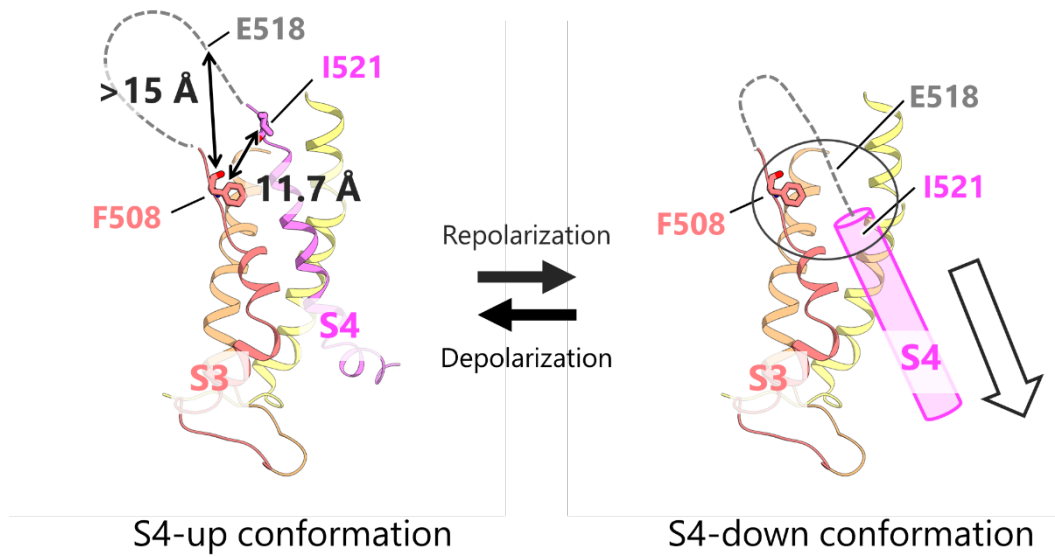


図 4-1 hERG の VSD の S4 のコンフォメーションの比較

Cryo-EM により明らかとなっている hERG の VSD の up conformation (左, PDB code: 5VA2) と、想定される down conformation (右)。Down conformation で形成されることが推定される APETx1 結合位置を丸枠で囲った。

4.2 APETx1-VSD 複合体の構造モデル

本研究では、APETx1 が hERG の resting state に結合することに着目して、ホモロジーモデリングにより S4 の down conformation での構造モデルである one-helical-turn down model と two-helical-turn down model を構築し、これらの構造モデルに対して APETx1 をドッキングさせることによって、APETx1 の疎水性パッチが hERG の F508, E518, I521 と直接的に相互作用した複合体構造モデルを得た (図 3-24、図 3-25)。これらの複合体構造モデルにおいては、APETx1 の疎水性残基のうち F15, F33, L34 の側鎖が hERG の F508, E518, I521 によって分子表面上に形成された窪みに収まるように結合していた (図 3-24)。また、この窪みの外では、APETx1 の Y32 が hERG の E518 の側鎖との間で水素結合を形成しうる位置に近接していた (図 3-24, inset)。これらのことから、本研究で得た複合体の構造モデルは変異体を用いた電気生理学的解析の結果を説明しうるものだと考えた。

APETx1 のドッキングシミュレーションに用いた 2 種類の down conformation の構造モデルでは S4 の位置がヘリックス一巻き分だけずれているが、どちらのモデルでも変異体解析の結果に矛盾しない複合体構造モデルを得ることができた (図 3-24)。したがって、one-helical-turn down model と two-helical-turn down model を比較して、どちらがより妥当なモデルであるかということを結論付けることはできないと考えた。

hERG の I512A, G514C, G522A の 3 個の変異体では、WT と比較して APETx1 での $\Delta V_{1/2}$ が有意に増大し、APETx1 による hERG 阻害が増強した (図 3-19、図 3-20)。One-helical-turn-down model において、立体的に嵩高い側鎖を有する I512 が E518 の近くに位置している (図 3-24, inset)。そのため、I512 の側鎖は APETx1 の hERG への結合を妨げている可能性があり、I512A 変異によってこの立体障害が緩和されたことで阻害活性が上昇した可能性がある。また、G514C と G522A の 2 個の Gly 残基の変異体については、二次構造を形成させづらい傾向を有する Gly 残基が Cys 残基もしくは Ala 残基に置換されたことで、I512 や E518 を含む hERG の S3-S4 ループの二次構造を変化させ、APETx1 の結合能に影響を及ぼした可能性がある。

hERG の S1-S2 領域のアミノ酸残基については、L433A と D460A の 2 個の変異体で WT と比較して阻害活性が有意に低下した (図 3-19、図 3-20)。これらの変異体における APETx1 による阻害活性の低下は、S3-S4 領域の F508, E518, I521 の変異体で APETx1 による阻害がほとんど完全に消失したことと比較して、変化が小さかった。そのため本研究では、S1-S2 領域よりも、S3-S4 領域との相互作用が APETx1 による hERG 阻害に重要であると考え、APETx1 が S3-S4 領域の脂質膜界面側に結合し、S1-S2 領域とは接触していない複合体構造モデルを構築した (図 3-25)。hERG の L433 と D460 や S1-S2 領域のその他のアミノ酸残基が APETx1 との直接的な相互作用に関与しているのかについては、複合体の立体構造解析を通じた実験的な検証が必要である。

4.3 APETx1 とクモ由来の gating-modifier toxin の比較

本研究では、側鎖が分子表面に露出する APETx1 のアミノ酸残基の変異体解析を行うことで、4 個の疎水性残基 F15, Y32, F33, L34 の変異が hERG 阻害活性を有意に低下させることが明らかとなった (図 3-16)。この結果は、これらの疎水性残基が局在することで形成される疎水性パッチが hERG への結合に寄与することを示している。

APETx1 を含むイソギンチャク由来の gating-modifier toxin は、いずれも β -defensin フォールドを形成しており、クモ由来の gating-modifier toxin の ICK フォールドとは立体構造が異なる。しかしながら、両者の分子表面には共通して疎水性パッチがみられる (図 1-7)。これまでにクモ由来の gating-modifier toxin では、SGTx1, JZTX-III, JZTX-V の変異体解析が行われており、疎水性パッチを中心とした分子表面が K_v チャネルの阻害に関与することが報告されている [66,102,103]。また、クモ由来の gating-modifier toxin は脂質膜に分配しながら K_v チャネルを阻害することが報告されており [104-108]、実際に SGTx1 の疎水性パッチが標的 K_v チャネルとの直接的な相互作用と脂質膜との相互作用の両方に関与していることが示されている [67]。これらのことは、クモとイソギンチャクの gating-modifier toxin では異なるフォールドの立体構造を有するにも関わらず、共通して K_v チャネルに対する結合に疎水性パッチを利用していることを示唆している。

さらに本研究では、APETx1 の結合部位として、hERG の S3-S4 領域のアミノ酸残基が重要であることが示唆された。クモ由来の gating-modifier toxin においても、標的となる K_v チャネルの S3-S4 領域のアミノ酸残基の変異により阻害活性が低下することから、S3-S4 領域が gating-modifier toxin の結合部位であると考えられている [102,103,106,109-113]。そのため、本研究の複合体モデルでみられた APETx1 の疎水性パッチと hERG の S3-S4 領域との間での結合は、イソギンチャク由来の gating-modifier toxin だけでなく、クモ由来の gating-modifier toxin にも共通した K_v チャネルとの相互作用様式となっている可能性がある。

4.4 APETx1 の hERG 阻害活性と結合親和性の定量的な評価

先行研究および本研究の電気生理学的解析では、濃度 10 μM の APETx1 が hERG の $V_{1/2}$ の値を 20 -25 mV だけ上昇させた (図 3-3c、図 3-4c、[75])。このことは、膜電位 -30 mV における resting state から activated state への構造変化 (活性化) に要する自由エネルギーが、10 μM APETx1 の添加前後で 5 kJ/mol から 10-11 kJ/mol に変化したことを反映している (「2.8.7 データ解析」と同様に Boltzmann 式 $\Delta G = RT(V_{1/2} - V) / k$ に基づいて、絶対温度を 298.15 K、slope factor k を 10 mV として算出した。)。APETx1 非存在下では膜電位 0 mV において activated state をとっている hERG の割合が 80%以上であったが、一方で、10 μM APETx1 存在下ではこの割合が 20%以下となっている (図 3-5a)。このことは APETx1 が膜電位の存在しない 0 mV においても hERG の resting state を安定化していることを意味している。

TEVC での解析では、hERG の活性化の閾値付近の膜電位 (-30 mV) における電流量を利用して APETx1 の hERG に対する K_d 値を求めており、この K_d 値は 10^{-7} から 10^{-6} M のオーダーであった (図 3-5b)。この K_d 値は約 -34 kJ/mol から -40 kJ/mol の自由エネルギー変化量 (ΔG_{obs}) に相当する (自由エネルギー ΔG と平衡定数 K の間の関係式 $\Delta G = -RT \ln K$ に基づいて、 ΔG_{obs} を算出した)。膜電位が -30 mV のときの hERG の電流量から、APETx1 非存在下では全ての hERG のうち 10-15% が activated state をとっており、残りの 85-90% が resting state をとっていることが分かる (図 3-5a)。このとき、resting state に対する APETx1 の結合は電流量の減少には反映されないため、APETx1 の添加に伴う電流量の減少は 10-15% の activated state に対する APETx1 の作用を反映する。すなわち、この電流量の減少を指標として求めた ΔG_{obs} は、APETx1 が結合した activated state が resting state へと構造変化するのに要する自由エネルギー (ΔG_{change}) と、これにより生じた resting state との結合自由エネルギー ($\Delta G_{\text{binding}}$) の総和で表される ($\Delta G_{\text{obs}} = \Delta G_{\text{change}} + \Delta G_{\text{binding}}$)。上述のように濃度 10 μM の APETx1 添加時の hERG の活性化に要するエネルギーは約 10-11 kJ/mol であり、 ΔG_{change} はこの値と同程度であると考えられる。そのため、 ΔG_{obs} からこの値を差し引くことで、 $\Delta G_{\text{binding}}$

を概算することが可能であり、その値はおよそ -23 kJ/mol から -30 kJ/mol となる。この $\Delta G_{\text{binding}}$ を K_d 値に換算するとおよそ $6 \times 10^{-6} \text{ M}$ から $9 \times 10^{-5} \text{ M}$ であり、この値は APETx1 の hERG の resting state に対する結合親和性を反映していると考えた。

第5章 総括

5.1 結論

本研究では、大腸菌発現系を利用することでリコンビナント APETx1 の調製法を確立した。調製したリコンビナント APETx1 の立体構造はイソギンチャク由来のネイティブ APETx1 と同等であった。また、リコンビナント APETx1 がネイティブ APETx1 と同様に hERG の resting state を安定化することを確認した。APETx1 と hERG の変異体解析により、APETx1 の分子表面上で局在している 4 個の疎水性アミノ酸残基 F15, Y32, F33, L34 と hERG の S3-S4 領域の F508, E518, I521 が hERG 阻害活性に大きく寄与していることが明らかとなった。そこで、APETx1 が結合する hERG の S4 の down conformation のモデルを構築し、ドッキングシミュレーションを行ったところ、両者の変異体解析により同定されたアミノ酸残基は互いに近接した APETx1-VSD 複合体の構造モデルが得られることが分かった。本研究で得られた複合体の構造モデルは変異体解析の結果を満たしており、APETx1 が hERG の VSD の静止膜電位下での機能状態である down conformation に結合するメカニズムを示唆するものであった。

5.2 今後の展望

hERG の VSD の S4 ヘリックスは膜電位の脱分極に応じて細胞内側から細胞外側へと膜平面に対して垂直に近い方向に移動することで構造変化する。しかしながら、静止膜電位下で S4 ヘリックスが細胞内側に引き付けられた down conformation の構造は、hERG のみならず K_v チャンネルにおいて解明されていない。これは、従来の構造解析手法では膜電位を形成させた条件で解析を行うことが技術的に困難であったためである。APETx1 は hERG の VSD に結合し、down conformation を安定化するリガンドであることから、APETx1 との複合体として hERG の立体構造解析を行うことは、S4 が down conformation をとり、細胞内側ゲートが閉じた機能状態である resting state の立体構造を明らかにする有効な手段であろう。さらに、立体構造解析の条件下では生理的な脂質膜環境下とは異なり、界面活性剤ミセルやリポソーム、ナノディスクなどに再構成したイオンチャンネルを解析することとなる。現状では脂質膜が APETx1 による hERG 阻害活性に及ぼす影響は不明である。今後は APETx1 の hERG 阻害活性を様々な膜電位条件下や脂質膜環境下で評価するとともに、その阻害活性を増強した変異体を探索するために、本研究で確立した大腸菌を用いたリコンビナント APETx1 の調製法が活用されることが期待される。

また、APETx1 による hERG 阻害活性には APETx1 の分子表面上の疎水性パッチが重要であり、本研究で構築した複合体モデルは APETx1 の疎水性パッチの形状が hERG の S3-S4 領域の分子表面の形状との間で相補的であることを示唆していた。本研究から示唆された APETx1 による hERG の S4 の down conformation の認識機構は、hERG の VSD に結合して機能を調節する、新しい作用メカニズムを有したりガンドを創製するための構造基盤となることが期待される。

第 6 章 補遺

6.1 APETx1 の化学シフトテーブル (BMRB code: 36345)

表 6-1 ¹H 化学シフト値 (ppm)

Residue	H	HA	HA2	HA3	HB	HB2	HB3	HG	HG2	HG3	HG11	HG12	HG13	HG21	HG22	HG23
G1	-	-	3.873	3.734	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	-	4.497	-	-	4.463	-	-	-	-	-	-	-	-	1.232	1.232	1.232
T3	8.298	4.608	-	-	4.061	-	-	-	-	-	-	-	-	1.142	1.142	1.142
C4	7.907	4.409	-	-	-	2.323	1.532	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y5	6.918	5.066	-	-	-	2.619	2.619	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	8.69	4.996	-	-	-	3.279	2.235	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G7	8.931	-	4.042	3.62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K8	8.8	4.335	-	-	-	1.975	1.712	-	1.421	1.421	-	-	-	-	-	-
T9	8.009	4.032	-	-	3.616	-	-	-	-	-	-	-	-	0.499	0.499	0.499
I10	8.224	3.824	-	-	1.563	-	-	-	-	-	-	1.237	1.054	0.899	0.899	0.899
G11	8.24	-	4.58	3.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I12	9.11	4.715	-	-	1.866	-	-	-	-	-	-	1.702	1.303	0.827	0.827	0.827
Y13	8.275	5.095	-	-	-	2.596	2.345	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W14	9.053	4.306	-	-	-	2.997	2.758	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F15	8.15	4.119	-	-	-	3.103	2.749	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G16	8.177	-	3.406	3.309	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T17	7.089	4.641	-	-	4.043	-	-	-	-	-	-	-	-	1.019	1.019	1.019
K18	8.188	4.397	-	-	-	1.949	1.645	-	1.425	1.425	-	-	-	-	-	-
T19	7.813	4.329	-	-	3.761	-	-	-	-	-	-	-	-	1.041	1.041	1.041
C20	8.804	3.979	-	-	-	2.809	2.693	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P21	-	4.129	-	-	-	1.998	1.382	-	0.831	0.318	-	-	-	-	-	-
S22	8.317	4.279	-	-	-	3.861	3.841	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N23	8.7	4.486	-	-	-	2.894	2.891	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R24	8.518	4.347	-	-	-	1.493	0.624	-	1.386	1.386	-	-	-	-	-	-
G25	8.263	-	3.86	3.537	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y26	7.444	4.726	-	-	-	3.134	2.691	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T27	9.73	4.524	-	-	4.25	-	-	-	-	-	-	-	-	1.252	1.252	1.252
G28	7.671	-	4.109	3.27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S29	7.902	5.459	-	-	-	4.073	3.613	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C30	8.931	5.138	-	-	-	3.477	3.421	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G31	8.835	-	4.19	3.868	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y32	7.94	4.517	-	-	-	2.946	2.784	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F33	8.539	4.18	-	-	-	2.99	2.846	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L34	-	4.492	-	-	-	1.83	1.83	0.89	-	-	-	-	-	-	-	-
G35	8.636	-	4.438	4.425	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I36	8.763	5.098	-	-	1.735	-	-	-	-	-	-	1.435	1.106	0.843	0.843	0.843
C37	9.166	5.306	-	-	-	3.513	2.265	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C38	8.81	4.674	-	-	-	2.118	1.364	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y39	7.927	5.043	-	-	-	3.08	2.55	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P40	-	5.165	-	-	-	2.663	2.321	-	2.059	2.044	-	-	-	-	-	-
V41	8.271	4.005	-	-	2.116	-	-	-	-	-	1.043	1.043	1.043	0.961	0.961	0.961
D42	8.386	4.407	-	-	-	3.228	3.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 6-1 ¹H 化学シフト値 (ppm) (続き)

Residue	HD1	HD2	HD3	HD11	HD12	HD13	HD21	HD22	HD23	HE	HE1	HE2	HE3	HZ	HZ2	HZ3	HH2
G1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y5	6.822	6.822	-	-	-	-	-	-	-	-	6.656	6.656	-	-	-	-	-
C6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K8	-	1.635	1.635	-	-	-	-	-	-	-	-	2.952	2.952	-	-	-	-
T9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I10	-	-	-	0.862	0.862	0.862	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I12	-	-	-	0.814	0.814	0.814	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y13	6.982	6.982	-	-	-	-	-	-	-	-	7.032	7.032	-	-	-	-	-
W14	6.887	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.321	-	7.795	-	7.651	7.218	7.259
F15	7.283	7.283	-	-	-	-	-	-	-	-	7.403	7.403	-	7.39	-	-	-
G16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K18	-	1.63	1.63	-	-	-	-	-	-	-	-	2.945	2.945	-	-	-	-
T19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P21	-	2.771	2.587	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N23	-	-	-	-	-	-	7.536	6.826	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R24	-	3.243	3.061	-	-	-	-	-	-	7.615	-	-	-	-	-	-	-
G25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y26	7.149	7.149	-	-	-	-	-	-	-	-	6.718	6.718	-	-	-	-	-
T27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y32	7.119	7.119	-	-	-	-	-	-	-	-	6.765	6.765	-	-	-	-	-
F33	6.938	6.938	-	-	-	-	-	-	-	-	7.285	7.285	-	7.362	-	-	-
L34	-	-	-	0.894	0.894	0.894	0.746	0.746	0.746	-	-	-	-	-	-	-	-
G35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I36	-	-	-	0.603	0.603	0.603	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y39	6.554	6.554	-	-	-	-	-	-	-	-	6.621	6.621	-	-	-	-	-
P40	-	4.228	4.127	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 6-2 ¹⁵N 化学シフト値 (ppm)

Residue	N	ND2	NE	NE1
G1	-	-	-	-
T2	-	-	-	-
T3	119.179	-	-	-
C4	120.549	-	-	-
Y5	116.063	-	-	-
C6	120.369	-	-	-
G7	115.388	-	-	-
K8	126.77	-	-	-
T9	119.896	-	-	-
I10	129.268	-	-	-
G11	113.602	-	-	-
I12	119.303	-	-	-
Y13	128.23	-	-	-
W14	130.881	-	-	125.616
F15	123.962	-	-	-
G16	114.215	-	-	-
T17	112.339	-	-	-
K18	121.904	-	-	-
T19	113.269	-	-	-
C20	124.247	-	-	-
P21	-	-	-	-
S22	116.615	-	-	-
N23	114.933	112.908	-	-
R24	117.467	-	85.62	-
G25	108.687	-	-	-
Y26	117.879	-	-	-
T27	114.42	-	-	-
G28	111.121	-	-	-
S29	108.908	-	-	-
C30	112.129	-	-	-
G31	109.482	-	-	-
Y32	124.96	-	-	-
F33	125.892	-	-	-
L34	-	-	-	-
G35	109.939	-	-	-
I36	125.393	-	-	-
C37	126.201	-	-	-
C38	126.483	-	-	-
Y39	118.661	-	-	-
P40	-	-	-	-
V41	118.129	-	-	-
D42	129.338	-	-	-

表 6-3 ¹³C 化学シフト値 (ppm)

Residue	C	CA	CB	CG	CG1	CG2	CD	CD1	CD2	CE	CE1	CE2	CE3	CZ	CZ2	CZ3	CH2
G1	-	43.422	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	179.631	62.054	70.164	-	-	21.294	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3	178.849	62.83	70.334	-	-	22.235	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	175.6	53.712	45.178	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y5	181.668	57.096	42.331	-	-	-	-	132.876	132.876	-	117.774	117.774	-	-	-	-	-
C6	181.789	52.141	39.229	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G7	180.736	47.158	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K8	172.931	56.277	32.528	24.783	-	-	28.798	-	-	42.116	-	-	-	-	-	-	-
T9	178.361	63.242	69.708	-	-	21.281	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I10	179.357	61.56	38.769	-	29.101	16.768	-	13.695	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G11	178.821	44.735	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I12	180.968	57.578	40.335	-	27.627	17.06	-	11.652	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y13	180.644	56.337	39.873	-	-	-	-	133.353	133.353	-	118.112	118.112	-	-	-	-	-
W14	180.016	55.935	29.269	-	-	-	-	126.847	-	-	-	-	120.994	-	114.329	122.096	124.411
F15	171.864	58.34	40.492	-	-	-	-	132.111	132.111	-	132.069	132.069	-	130.726	-	-	-
G16	178.778	46.432	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T17	177.632	58.811	70.206	-	-	19.515	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K18	181.934	55.74	33.019	24.787	-	-	28.798	-	-	42.088	-	-	-	-	-	-	-
T19	179.364	60.103	71.343	-	-	21.516	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20	-	55.361	41.639	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P21	182.017	63.251	32.299	26.307	-	-	49.716	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S22	179.916	58.894	64.451	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N23	181.033	54.335	37.253	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R24	170.035	54.704	31.546	27.724	-	-	43.122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G25	180.308	45.269	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y26	171.993	57.805	36.802	-	-	-	-	133.219	133.219	-	120.301	120.301	-	-	-	-	-
T27	180.505	61.478	70.142	-	-	21.644	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G28	175.827	44.468	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S29	179.962	57.329	68.122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C30	179.208	55.739	43.246	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G31	179.208	46.408	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y32	179.711	58.555	43.441	-	-	-	-	134.268	134.268	-	118.44	118.44	-	-	-	-	-
F33	-	59.142	37.448	-	-	-	-	131.365	131.365	-	129.759	129.759	-	130.169	-	-	-
L34	170.991	54.765	40.821	25.679	-	-	-	25.849	22.294	-	-	-	-	-	-	-	-
G35	177.962	47.333	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I36	176.804	59.369	43.414	-	27.898	17.054	-	15.016	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C37	179.638	54.012	43.683	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C38	177.409	56.164	45.573	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y39	-	54.401	40.301	-	-	-	-	134.05	134.05	-	117.724	117.724	-	-	-	-	-
P40	169.683	62.471	35.842	24.915	-	-	51.565	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V41	180.458	64.178	32.691	-	20.644	21.185	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D42	-	55.054	43.108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

参考文献

1. Hille B. Ion channels of excitable membranes. Sunderland, MA: Sinauer; 2001.
2. Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, et al. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Potassium Channels. *Pharmacol Rev.* 2003;55(4):583.
3. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57(4):473.
4. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA, Veale EL, Striessnig J, Kelly E, et al. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: Ion channels. *Br J Pharmacol.* 2019;176(S1):S142-S228.
5. González C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzún I, Rojas P, Naranjo D, et al. K⁺ channels: function-structural overview. *Compr Physiol.* 2012;2(3):2087-149.
6. Johnston J, Forsythe ID, Kopp-Scheinflug C. Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability. *J Physiol.* 2010;588(Pt 17):3187-200.
7. Grandi E, Sanguinetti MC, Bartos DC, Bers DM, Chen-Izu Y, Chiamvimonvat N, et al. Potassium channels in the heart: structure, function and regulation. *J Physiol.* 2017;595(7):2209-28.
8. Warmke JW, Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(8):3438-42.
9. Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature.* 2006;440(7083):463-9.
10. Vandenberg JI, Perry MD, Perrin MJ, Mann SA, Ke Y, Hill AP. hERG K⁺ channels: structure, function, and clinical significance. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1393-478.
11. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol Rev.* 2005;85(4):1205-53.
12. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: *HERG* mutations cause long QT syndrome. *Cell.* 1995;80(5):795-803.
13. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: *HERG* encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell.* 1995;81(2):299-307.
14. Roden DM. Drug-induced prolongation of the QT interval. *New Engl J Med.* 2004;350(10):1013-22.
15. Huffaker SJ, Chen J, Nicodemus KK, Sambataro F, Yang F, Mattay V, et al. A primate-specific, brain isoform of *KCNH2* affects cortical physiology, cognition, neuronal repolarization and risk of schizophrenia. *Nat Med.* 2009;15(5):509.

16. Atalar F, Acuner TT, Cine N, Oncu F, Yesilbursa D, Ozbek U, et al. Two four-marker haplotypes on 7q36.1 region indicate that the potassium channel gene HERG1 (KCNH2, Kv11.1) is related to schizophrenia: a case control study. *Behav Brain Funct.* 2010;6:27.
17. Apud JA, Zhang F, Decot H, Bigos KL, Weinberger DR. Genetic variation in KCNH2 associated with expression in the brain of a unique hERG isoform modulates treatment response in patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 2012;169(7):725-34.
18. Huang C-S, Wang G-H, Tai C-H, Hu C-C, Yang Y-C. Antiarrhythmics cure brain arrhythmia: The imperativeness of subthalamic ERG K⁺ channels in parkinsonian discharges. *Science Advances.* 2017;3(5):e1602272.
19. Jehle J, Schweizer PA, Katus HA, Thomas D. Novel roles for hERG K⁺ channels in cell proliferation and apoptosis. *Cell Death Dis.* 2011;2:e193.
20. Rao VR, Perez-Neut M, Kaja S, Gentile S. Voltage-gated ion channels in cancer cell proliferation. *Cancers (Basel).* 2015;7(2):849-75.
21. He S, Moutaoufik MT, Islam S, Persad A, Wu A, Aly KA, et al. HERG channel and cancer: A mechanistic review of carcinogenic processes and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta.* 2020;1873(2):188355.
22. Pointer KB, Clark PA, Eliceiri KW, Salamat MS, Robertson GA, Kuo JS. Administration of Non-Torsadogenic human Ether-à-go-go-Related Gene Inhibitors Is Associated with Better Survival for High hERG-Expressing Glioblastoma Patients. *Clin Cancer Res.* 2017;23(1):73-80.
23. Arcangeli A, Becchetti A. hERG Channels: From Antitargets to Novel Targets for Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 2017;23(1):3-5.
24. Wang W, MacKinnon R. Cryo-EM Structure of the Open Human *Ether-à-go-go*-Related K⁺ Channel hERG. *Cell.* 2017;169(3):422-30.e10.
25. Morais Cabral JH, Lee A, Cohen SL, Chait BT, Li M, Mackinnon R. Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell.* 1998;95(5):649-55.
26. Ben-Bassat A, Giladi M, Haitin Y. Structure of KCNH2 cyclic nucleotide-binding homology domain reveals a functionally vital salt-bridge. *J Gen Physiol.* 2020;152(4):e201912505.
27. Li Y, Ng HQ, Li Q, Kang C. Structure of the Cyclic Nucleotide-Binding Homology Domain of the hERG Channel and Its Insight into Type 2 Long QT Syndrome. *Sci Rep.* 2016;6:23712.
28. Tao X, MacKinnon R. Cryo-EM structure of the KvAP channel reveals a non-domain-swapped voltage sensor topology. *eLife.* 2019;8:e52164.
29. Long SB. Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel. *Science.* 2005;309(5736):897-903.
30. Chen X, Wang Q, Ni F, Ma J. Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-

mode-based X-ray crystallographic refinement. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(25):11352-7.

31. Long SB, Tao X, Campbell EB, MacKinnon R. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*. 2007;450(7168):376-82.
32. Pau V, Zhou Y, Ramu Y, Xu Y, Lu Z. Crystal structure of an inactivated mutant mammalian voltage-gated K(+) channel. *Nat Struct Mol Biol*. 2017;24(10):857-65.
33. Matthies D, Bae C, Toombes GE, Fox T, Bartesaghi A, Subramaniam S, et al. Single-particle cryo-EM structure of a voltage-activated potassium channel in lipid nanodiscs. *eLife*. 2018;7.
34. Banerjee A, Lee A, Campbell E, Mackinnon R. Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K⁺ channel. *eLife*. 2013;2:e00594.
35. Sun J, MacKinnon R. Cryo-EM Structure of a KCNQ1/CaM Complex Reveals Insights into Congenital Long QT Syndrome. *Cell*. 2017;169(6):1042-50.e9.
36. Sun J, MacKinnon R. Structural Basis of Human KCNQ1 Modulation and Gating. *Cell*. 2020;180(2):340-7.e9.
37. Li X, Zhang Q, Guo P, Fu J, Mei L, Lv D, et al. Molecular basis for ligand activation of the human KCNQ2 channel. *Cell Res*. 2020.
38. Li T, Wu K, Yue Z, Wang Y, Zhang F, Shen H. Structural Basis for the Modulation of Human KCNQ4 by Small-Molecule Drugs. *Mol Cell*. 2020.
39. Whicher JR, MacKinnon R. Structure of the voltage-gated K⁺ channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. *Science*. 2016;353(6300):664-9.
40. Whicher JR, MacKinnon R. Regulation of Eag1 gating by its intracellular domains. *eLife*. 2019;8:e49188.
41. Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science*. 2005;309(5736):903-8.
42. Harvey AL, Robertson B. Dendrotoxins: structure-activity relationships and effects on potassium ion channels. *Curr Med Chem*. 2004;11(23):3065-72.
43. Jiménez-Vargas JM, Possani LD, Luna-Ramírez K. Arthropod toxins acting on neuronal potassium channels. *Neuropharmacology*. 2017;127:139-60.
44. Chu Y, Qiu P, Yu R. Centipede Venom Peptides Acting on Ion Channels. *Toxins (Basel)*. 2020;12(4).
45. Finol-Urdaneta RK, Belovanovic A, Micic-Vicovac M, Kinsella GK, McArthur JR, Al-Sabi A. Marine Toxins Targeting Kv1 Channels: Pharmacological Tools and Therapeutic Scaffolds. *Mar Drugs*. 2020;18(3).
46. Cestèle S, Qu Y, Rogers JC, Rochat H, Scheuer T, Catterall WA. Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by β -scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron*. 1998;21(4):919-31.

47. Takeuchi K, Yokogawa M, Matsuda T, Sugai M, Kawano S, Kohno T, et al. Structural basis of the KcsA K⁺ channel and agitoxin2 pore-blocking toxin interaction by using the transferred cross-saturation method. *Structure*. 2003;11(11):1381-92.
48. Gilquin B, Braud S, Eriksson MA, Roux B, Bailey TD, Priest BT, et al. A variable residue in the pore of Kv1 channels is critical for the high affinity of blockers from sea anemones and scorpions. *J Biol Chem*. 2005;280(29):27093-102.
49. Huang X, Dong F, Zhou HX. Electrostatic recognition and induced fit in the κ -PVIIA toxin binding to Shaker potassium channel. *J Am Chem Soc*. 2005;127(18):6836-49.
50. Lange A, Giller K, Hornig S, Martin-Eauclaire MF, Pongs O, Becker S, et al. Toxin-induced conformational changes in a potassium channel revealed by solid-state NMR. *Nature*. 2006;440(7086):959-62.
51. Cordeiro S, Finol-Urdaneta RK, Köpfer D, Markushina A, Song J, French RJ, et al. Conotoxin κ M-RIIIJ, a tool targeting asymmetric heteromeric Kv1 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(3):1059-64.
52. Yang S, Wang Y, Wang L, Kamau P, Zhang H, Luo A, et al. Target switch of centipede toxins for antagonistic switch. *Sci Adv*. 2020;6(32):eabb5734.
53. Zhao R, Dai H, Mendelman N, Chill JH, Goldstein SAN. Tethered peptide neurotoxins display two blocking mechanisms in the K⁺ channel pore as do their untethered analogs. *Sci Adv*. 2020;6(10):eaaz3439.
54. Catterall WA, Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*. 2007;49(2):124-41.
55. Swartz KJ. Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels. *Toxicon*. 2007;49(2):213-30.
56. Xie C, Li T, Xu L, Yu C, Cao Z, Li W, et al. Kv1.3 potassium channel-blocking toxin Ctri9577, novel gating modifier of Kv4.3 potassium channel from the scorpion toxin family. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;444(3):406-10.
57. Swartz KJ, MacKinnon R. An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron*. 1995;15(4):941-9.
58. Marvin L, De E, Cosette P, Gagnon J, Molle G, Lange C. Isolation, amino acid sequence and functional assays of SGTx1. The first toxin purified from the venom of the spider *scodra griseipes*. *Eur J Biochem*. 1999;265(2):572-9.
59. Herrington J, Zhou YP, Bugianesi RM, Dulski PM, Feng Y, Warren VA, et al. Blockers of the delayed-rectifier potassium current in pancreatic β -cells enhance glucose-dependent insulin secretion. *Diabetes*. 2006;55(4):1034-42.
60. Herrington J. Gating modifier peptides as probes of pancreatic β -cell physiology. *Toxicon*. 2007;49(2):231-8.
61. Zeng X, Deng M, Lin Y, Yuan C, Pi J, Liang S. Isolation and characterization of Jingzhaotoxin-V, a

- novel neurotoxin from the venom of the spider *Chilobrachys jingzhao*. *Toxicon*. 2007;49(3):388-99.
62. Yuan C, Yang S, Liao Z, Liang S. Effects and mechanism of Chinese tarantula toxins on the Kv2.1 potassium channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;352(3):799-804.
63. Takahashi H, Kim JI, Min HJ, Sato K, Swartz KJ, Shimada I. Solution structure of hanatoxin1, a gating modifier of voltage-dependent K⁺ channels: common surface features of gating modifier toxins. *J Mol Biol*. 2000;297(3):771-80.
64. Lee CW, Kim S, Roh SH, Endoh H, Kodera Y, Maeda T, et al. Solution Structure and Functional Characterization of SGTx1, a Modifier of Kv2.1 Channel Gating. *Biochemistry*. 2004;43(4):890-7.
65. Lee S, Milesco M, Jung HH, Lee JY, Bae CH, Lee CW, et al. Solution structure of GxTX-1E, a high-affinity tarantula toxin interacting with voltage sensors in Kv2.1 potassium channels. *Biochemistry*. 2010;49(25):5134-42.
66. Wang JM, Roh SH, Kim S, Lee CW, Kim JI, Swartz KJ. Molecular surface of tarantula toxins interacting with voltage sensors in Kv channels. *J Gen Physiol*. 2004;123(4):455-67.
67. Milesco M, Vobecky J, Roh SH, Kim SH, Jung HJ, Kim JI, et al. Tarantula toxins interact with voltage sensors within lipid membranes. *J Gen Physiol*. 2007;130(5):497-511.
68. Diochot S, Schweitz H, Béress L, Lazdunski M. Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4. *J Biol Chem*. 1998;273(12):6744-9.
69. Diochot S, Loret E, Bruhn T, Beress L, Lazdunski M. APETx1, a New Toxin from the Sea Anemone *Anthopleura elegantissima*, Blocks Voltage-Gated Human *Ether-a-go-go*-Related Gene Potassium Channels. *Mol Pharmacol*. 2003;64(1):59-69.
70. Driscoll PC, Clore GM, Beress L, Gronenborn AM. A proton nuclear magnetic resonance study of the antihypertensive and antiviral protein BDS-I from the sea anemone *Anemonia sulcata*: sequential and stereospecific resonance assignment and secondary structure. *Biochemistry*. 1989;28(5):2178-87.
71. Driscoll PC, Gronenborn AM, Clore GM. The influence of stereospecific assignments on the determination of three-dimensional structures of proteins by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Application to the sea anemone protein BDS-I. *FEBS Lett*. 1989;243(2):223-33.
72. Chagot B, Diochot S, Pimentel C, Lazdunski M, Darbon H. Solution structure of APETx1 from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*: a new fold for an HERG toxin. *Proteins*. 2005;59(2):380-6.
73. Chagot B, Escoubas P, Diochot S, Bernard C, Lazdunski M, Darbon H. Solution structure of APETx2, a specific peptide inhibitor of ASIC3 proton-gated channels. *Protein Sci*. 2005;14(8):2003-10.
74. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. 2011;7:539.
75. Zhang M, Liu XS, Diochot S, Lazdunski M, Tseng GN. APETx1 from Sea Anemone *Anthopleura elegantissima* Is a Gating Modifier Peptide Toxin of the Human *Ether-a-go-go*-Related Potassium Channel. *Mol*

Pharmacol. 2007;72(2):259-68.

76. Zhang M, Korolkova YV, Liu J, Jiang M, Grishin EV, Tseng GN. BeKm-1 is a HERG-specific toxin that shares the structure with ChTx but the mechanism of action with ErgTx1. *Biophys J.* 2003;84(5):3022-36.
77. Tseng GN, Sonawane KD, Korolkova YV, Zhang M, Liu J, Grishin EV, et al. Probing the outer mouth structure of the HERG channel with peptide toxin footprinting and molecular modeling. *Biophys J.* 2007;92(10):3524-40.
78. Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A. NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR.* 1995;6(3):277-93.
79. Mulder FAA, Schipper D, Bott R, Boelens R. Altered flexibility in the substrate-binding site of related native and engineered high-alkaline *Bacillus subtilis*ins. *J Mol Biol.* 1999;292(1):111-23.
80. Shen Y, Delaglio F, Cornilescu G, Bax A. TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J Biomol NMR.* 2009;44(4):213-23.
81. Schubert M, Labudde D, Oschkinat H, Schmieder P. A software tool for the prediction of Xaa-Pro peptide bond conformations in proteins based on ¹³C chemical shift statistics. *J Biomol NMR.* 2002;24(2):149-54.
82. Kobayashi N, Iwahara J, Koshihara S, Tomizawa T, Tochio N, Güntert P, et al. KUJIRA, a package of integrated modules for systematic and interactive analysis of NMR data directed to high-throughput NMR structure studies. *J Biomol NMR.* 2007;39(1):31-52.
83. Kobayashi N, Harano Y, Tochio N, Nakatani E, Kigawa T, Yokoyama S, et al. An automated system designed for large scale NMR data deposition and annotation: Application to over 600 assigned chemical shift data entries to the BioMagResBank from the Riken Structural Genomics/Proteomics Initiative internal database. *J Biomol NMR.* 2012;53(4):311-20.
84. Kobayashi N, Hattori Y, Nagata T, Shinya S, Güntert P, Kojima C, et al. Noise peak filtering in multi-dimensional NMR spectra using convolutional neural networks. *Bioinformatics.* 2018;34(24):4300-1.
85. Güntert P. Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol Biol.* 2004;278:353-78.
86. Case DA, Darden T, Cheatham T, Simmerling C, Wang J, Duke RE, et al. AMBER 12: University of California, San Francisco; 2012.
87. Kobayashi N. A robust method for quantitative identification of ordered cores in an ensemble of biomolecular structures by non-linear multi-dimensional scaling using inter-atomic distance variance matrix. *J Biomol NMR.* 2014;58(1):61-7.
88. Koradi R, Billeter M, Wüthrich K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graphics Model.* 1996;14(1):51-5, 29-32.
89. Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, Prisant MG, Videau LL, Deis LN, et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci.* 2018;27(1):293-315.
90. Kume S, Shimomura T, Tateyama M, Kubo Y. Two mutations at different positions in the CNBH domain

of the hERG channel accelerate deactivation and impair the interaction with the EAG domain. *Journal of Physiology*. 2018;596(19):4629-50.

91. Liu J, Zhang M, Jiang M, Tseng GN. Structural and functional role of the extracellular S5-P linker in the HERG potassium channel. *J Gen Physiol*. 2002;120(5):723-37.

92. Nakajo K, Kubo Y. Steric hindrance between S4 and S5 of the KCNQ1/KCNE1 channel hampers pore opening. *Nat Commun*. 2014;5(May):1-11.

93. Webb B, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc in Bioinformatics*. 2016;54:5.6.1-5.6.37.

94. van Zundert GCP, Rodrigues J, Trellet M, Schmitz C, Kastriitis PL, Karaca E, et al. The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J Mol Biol*. 2016;428(4):720-5.

95. Peigneur S, Beress L, Moller C, Mari F, Forssmann WG, Tytgat J. A natural point mutation changes both target selectivity and mechanism of action of sea anemone toxins. *FASEB J*. 2012;26(12):5141-51.

96. McDonough SI. Gating modifier toxins of voltage-gated calcium channels. *Toxicon*. 2007;49(2):202-12.

97. Bezanilla F. How membrane proteins sense voltage. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(4):323-32.

98. Börjesson SI, Elinder F. Structure, Function, and Modification of the Voltage Sensor in Voltage-Gated Ion Channels. *Cell Biochem Biophys*. 2008;52(3):149-74.

99. Swartz KJ. Sensing voltage across lipid membranes. *Nature*. 2008;456(7224):891-7.

100. Vargas E, Bezanilla F, Roux B. In search of a consensus model of the resting state of a voltage-sensing domain. *Neuron*. 2011;72(5):713-20.

101. Groome JR, Bayless-Edwards L. Roles for Countercharge in the Voltage Sensor Domain of Ion Channels. *Front Pharmacol*. 2020;11:160.

102. Tao H, Chen JJ, Xiao YC, Wu YY, Su HB, Li D, et al. Analysis of the interaction of tarantula toxin Jingzhaotoxin-III (β -TRTX-Cj1 α) with the voltage sensor of Kv2.1 uncovers the molecular basis for cross-activities on Kv2.1 and Nav1.5 channels. *Biochemistry*. 2013;52(42):7439-48.

103. Zhang Y, Luo J, He J, Rong M, Zeng X. JZTX-V Targets the Voltage Sensor in Kv4.2 to Inhibit I_{to} Potassium Channels in Cardiomyocytes. *Front Pharmacol*. 2019;10:357.

104. Lee SY, MacKinnon R. A membrane-access mechanism of ion channel inhibition by voltage sensor toxins from spider venom. *Nature*. 2004;430(6996):232-5.

105. Phillips LR, Milesu M, Li-Smerin Y, Mindell JA, Kim JI, Swartz KJ. Voltage-sensor activation with a tarantula toxin as cargo. *Nature*. 2005;436(7052):857-60.

106. Milesu M, Bosmans F, Lee S, Alabi AA, Kim JI, Swartz KJ. Interactions between lipids and voltage sensor paddles detected with tarantula toxins. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(10):1080-5.

107. Agwa AJ, Henriques ST, Schroeder CI. Gating modifier toxin interactions with ion channels and lipid bilayers: Is the trimolecular complex real? *Neuropharmacology*. 2017;127:32-45.
108. Mihailescu M, Krepiy D, Milescu M, Gawrisch K, Swartz KJ, White S. Structural interactions of a voltage sensor toxin with lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(50):E5463-70.
109. Li-Smerin Y, Swartz KJ. Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltage-gated Ca^{2+} and K^{+} channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(15):8585-9.
110. Alabi AA, Bahamonde MI, Jung HJ, Kim JI, Swartz KJ. Portability of paddle motif function and pharmacology in voltage sensors. *Nature*. 2007;450(7168):370-5.
111. DeSimone CV, Lu Y, Bondarenko VE, Morales MJ. S3b amino acid substitutions and ancillary subunits alter the affinity of *Heteropoda venatoria* toxin 2 for Kv4.3. *Mol Pharmacol*. 2009;76(1):125-33.
112. Tao H, Wu Y, Deng M, He J, Wang M, Xiao Y, et al. Molecular determinants for the tarantula toxin jingzhaotoxin-I interacting with potassium channel Kv2.1. *Toxicon*. 2013;63:129-36.
113. Tao H, Chen X, Deng M, Xiao Y, Wu Y, Liu Z, et al. Interaction site for the inhibition of tarantula Jingzhaotoxin-XI on voltage-gated potassium channel Kv2.1. *Toxicon*. 2016;124:8-14.

謝辞

本研究は多くの方々の厚いご援助をなくしては、進めることができませんでした。

本研究を遂行する機会と環境を与えてくださり、豊富な知識とご経験の下で研究に関して広くご助言を頂いたとともに、日々温かくご指導とご鞭撻を賜りました、慶應義塾大学薬学研究科生命機能物理学講座の大澤匡範教授に心より深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、NMR 測定やその解析を中心に多大なるご助力を頂き、また、常に研究環境を整備していただきました、慶應義塾大学薬学研究科生命機能物理学講座の横川真梨子専任講師に感謝申し上げます。

APETx1 の調製の初期検討を行ってくださり、また、博士課程進学前の未熟であった私と議論してくださり、当時の私の進路に関するご相談にも親身にご対応いただきました、慶應義塾大学薬学研究科生命機能物理学講座の秋元まどか助教に心より御礼申し上げます。また、秋元まどか助教とともに APETx1 の調製の初期検討に携わった生命機能物理学講座の築瀬尚美学士に感謝します。

博士課程 2 年次の 1 年間に本博士研究に付随したテーマとして、私とともに hERG の発現系の構築に取り組んでくださり、活発に議論していただきました、慶應義塾大学薬学研究科生命機能物理学講座の福田昌弘助教に心より御礼申し上げます。

度重なる研究室へのご訪問の際に温かく受け入れていただき、TEVC 測定の実験指導や電気生理学に関するデータの解析と考察、さらには投稿論文のご査読と多岐に渡ってご尽力いただきました、自然科学研究機構生理学研究所神経機能素子部門の久保義弘教授、下村拓史助教に心より御礼申し上げます。また、アフリカツメガエルの卵母細胞の調製にご尽力いただいた内藤知津江技術補佐員を始めとして、神経機能素子部門の研究室員の皆様に深く感謝いたします。

オートパッチクランプ測定とその解析、ならびに培養細胞の維持にご尽力いただき、細かな実験条件の調整にも手厚くご対応いただいた、ナニオンテクノロジーズジャパン株式会社の岡貴之様、および同社東京ラボの室員の皆様に心より御礼申し上げます。また、パッチ

クランプ測定に使用した培養細胞を提供して下さった SB Drug Discovery 株式会社の皆様に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、NMR ならびに MALDI-TOF MS の装置を使用させていただきました、東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室の嶋田一夫教授に心より御礼申し上げます。本研究で使用した APETx1 の大腸菌発現系を構築し、本研究の基礎を築いていただきました、生命物理化学教室の今井駿輔博士に心より感謝します。

本研究を遂行するにあたり、NMR 測定にご助力いただきました、横浜市立大学生命医科学研究科プロジェクト研究室の西村善文特任教授と栗田順一特任助教に心より御礼申し上げます。

NMR 法による APETx1 の構造決定を行うにあたり、ソフトウェアをご提供いただき、解析方法に関する幾度のご相談に対しても親身になってご助言を頂きました、理化学研究所放射光科学研究センターNMR 研究開発部門の小林直宏博士に心より御礼申し上げます。

本研究のホモロジーモデリングとドッキングシミュレーションを行うにあたり、貴重なご意見を頂いたばかりでなく、セミナーでの質疑や投稿論文のご査読を通じて本研究に対して異分野のご専門ならではのご意見を頂きました、慶應義塾大学薬学研究科生命機能物理学講座の池田和由特任准教授に心より感謝いたします。

いつも私の研究生生活を温かく見守り、激励してくださいました、慶應義塾大学薬学研究科生命機能物理学講座の原田彩佳助教に深く感謝します。また、ともに切磋琢磨しながら研究生生活を共にし、研究を進めるに当って様々なご協力を頂いた、生命機能物理学講座の皆様感謝申し上げます。

最後に、私の大学院での研究生生活を常に温かく見守り、支援してくれた家族や友人に感謝します。