

不整脈に関わる心臓電位依存性イオンチャンネル阻害の構造基盤と創薬戦略の構築

大澤匡範

慶應義塾大学薬学部 生命機能物理学講座

【研究の背景】

電位依存性 K⁺チャンネル(Kv)である hERG は、ヒト心臓に多く発現する電位依存性カリウムイオンチャンネルであり、心室筋活動電位の再分極に重要な役割を果たしている¹⁾。hERG は多くの薬物により阻害され、重篤な不整脈を惹起することから、副作用としての hERG 阻害は創薬の大きな障害となっている。近年、hERG の開口状態の立体構造が低温電子顕微鏡により解明された²⁾。しかしながら、膜電位存在下での閉口状態の hERG の構造は未解明であり、膜電位依存的なチャンネル開閉機構は不明である。

これまでに、イソギンチャク由来ペプチド性毒素である Gating Modifier Toxin (GMT) が、閉口状態の hERG の電位センサードメイン (VSD) を特異的に認識して hERG を阻害することが報告されている^{3, 4)}。閉構造を安定化するこの GMT は、hERG が閉口状態にある膜電位存在下における hERG-VSD の構造を安定化することが示唆される。そこで、GMT と hERG-VSD との複合体の立体構造解析ができれば、これまで未解明だった膜電位存在下の hERG-VSD の立体構造を解明することができ、hERG の動作機構および分子認識機構の解明が可能となる。しかし、この GMT はこれまでにイソギンチャクから抽出・精製することでしか得られなかったことから、hERG との相互作用を構造生物学的に解析することが出来なかった。

【目 的】

これまでにリコンビナントが得られていない GMT の大量発現・調製法を確立し、GMT との複合体として閉口状態の hERG-VSD の立体構造を明らかにすることにより、hERG の膜電位依存的な機能発現メカニズムを解明することを目的とする。

【方 法】

GMT については、大腸菌を宿主とする発現系を構築し、大量発現法、変性巻き戻し・酸化によるジスルフィド結合形成を伴う精製法を確立した。NMR により立体構造形成を確認するとともに、hERG 阻害活性をホールセルパッチクランプ法により解析した。また、GMT に ¹³C, ¹⁵N 安定同位体標識を施し、各種三重共鳴実験により主鎖 NMR シグナルの帰属を試みた。

hERG-VSD については、大腸菌を宿主とする大量発現・界面活性剤による可溶化を伴う精製法を確立した。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) および NMR による性状解析を行った。

さらに、VSD 添加に伴う GMT の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトル変化により両者の相互作用の検出を試みた。

【結 果】

GMT の大腸菌 1 L 培養液からの収量は、約 5 mg であった。¹⁵N 安定同位体標識を施し、¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを観測したところ、シグナルがよく分散していたことから、立体構造の形成が示唆された。また、ホールセルパッチクランプ法による電気生理解析により、HEK 細胞に発現した hERG の K⁺電流を 10 nM の GMT が顕著に抑制したことから、適切な立体構造を形成した活性体の GMT の調製法の確立に成功したと結論した。そこで、GMT の ¹³C, ¹⁵N 標識体を用いて、各種三重共鳴実験により主鎖 NMR シグナルの帰属を確立した。

hERG-VSD は大腸菌で発現し、界面活性剤で可溶化した後に SDS-PAGE で単独バンドになるまで精製した。大腸菌 1 L

培養液からの収量は、約 0.1 mg であった。精製した VSD は、界面活性剤入りの buffer 中で SEC 解析を行ったところ、モノマー＋界面活性剤ミセルの分子量に該当する位置に溶出した。¹⁵N 安定同位体標識を施し、¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを観測したところ、シグナルがよく分散していたことから、立体構造の形成が示唆された。

GMT と hERG-VSD の両方の調製に成功したため、GMT に ¹⁵N 安定同位体標識を施し、hERG-VSD 添加に伴う ¹H-¹⁵N HSQC スペクトル変化を観測した。その結果、GMT のすべての NMR シグナルが顕著に広幅化した。このことから、APETx1 と VSD が直接相互作用することが分かった。

【考 察】

本研究で、hERG-VSD と、VSD に結合して hERG を阻害する VSD の大量発現・調製法を確立することに成功した。これにより、両者の複合体の構造生物学的解析が可能となり、分子認識様式や hERG の機能発現メカニズム解明につながる端緒となる成果が得られた。今後、両者の結合親和性、結合部位、結合様式を原子レベルで解明する。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により、不整脈に関わる心臓電位依存性イオンチャネルの機能・阻害機構を構造生物学的に解明するための試料調製法が確立できた。これにより、機能構造毎にチャネル間を横断的に構造比較・特徴抽出することが可能となった。また、本試料を用いた解析により、hERG の同じ機能構造・同じ部位に結合する一群の阻害剤を同定できるため、阻害剤情報のみ（タンパク質の構造情報無し）で精度の高いファーマコフォアモデルを構築でき、各阻害機構を明らかにすることが出来る。これらの成果を基に、特定のイオンチャネルを特異的に阻害する全く新規なリガンドの創製、および、心臓電位依存性イオンチャネルの阻害を回避する革新的創薬戦略の構築が可能となる。

【参考・引用文献】

- [1] J. I. Vandenberg, et al., **Physiol. Rev.**, 92(3):1393-1478, 2012.
- [2] W. Wang and R. MacKinnon, **Cell**, 169(3):422-430.e10, 2017.
- [3] S. Diochot et al., **Mol. Pharmacol.**, 64:59-69, 2003.
- [4] M. Zhang et al., **Mol. Pharmacol.**, 72: 259-268, 2007.