

論文内容の要旨

研究題目

イオンチャネルの阻害および開閉機構に関する構造生物学的研究

氏名

竹内 恒

1. 序論

イオンチャネルは、それぞれに固有のイオンを細胞内外の濃度勾配に従って透過させることで、膜電位、浸透圧等を調節する膜蛋白質である。イオンチャネルが機能を発揮するためには、その開閉が膜電位などにより高度に制御されている必要がある。逆に、イオンチャネルが機能不全に陥ると様々な疾患を引き起こすことから、イオンチャネルは創薬のターゲットとしても注目される。一方、天然にはイオンチャネルの機能を阻害あるいは制御するペプチドが存在し、それらは特定のイオンチャネルに対する高い親和性と選択性を有することから、その一部について臨床応用を視野に入れた研究が進んでいる。

X線結晶構造解析や核磁気共鳴法(NMR)を用いた原子レベルでの解析は、対象蛋白質の分子機能や相互作用分子の認識機構を明らかにする上で最も詳細な情報を与える。X線結晶構造解析は対象蛋白質の分子量によらずその立体構造を明らかにすることができる反面、分子の運動性の情報を得ることが困難である。また、対象蛋白質の結晶化が常に成功するとは限らない。一方、NMRは直接観測する対象分子の分子量に制約はあるものの、蛋白質を生理的条件に最も近い溶液中で解析できること、蛋白質の運動性を直接観測可能であることから他の手法では得られない独自の情報を与える。

近年、複数のカリウムおよびクロライドチャネルについてそのX線結晶構造が解明された。その結果、イオンチャネルの選択的イオン透過機構が明らかにされるとともに、イオンチャネルの開閉制御機構の解明に向けて目覚ましい進展が得られた。このことからイオンチャネルの研究において原子レベルの解析が極めて有効であることは明白であり、またX線結晶構造解析の貢献は多大である。しかしながら一方で、X線結晶構造から提唱された電位依存性カリウムチャネルの開閉制御機構に対し、重大な疑義

が投げかけられていることから明らかなように、結晶構造に基づいて分子運動や機能発現メカニズムを予想することは極めて慎重を要する作業である。一方、NMR をイオンチャネルなどの膜蛋白質に適用することは基本的に困難をとまなう。それは、膜蛋白質がその機能の立体構造や機能の維持に脂質分子を必要とすることで、観測対象の分子量が増大し、NMR 情報の劣化を生じるためである。よってイオンチャネルの構造生物学的研究をさらに推し進めるためには、新たな研究手法の確立が必要となる。

以上のことをふまえ、本研究では、「イオンチャネルの阻害および開閉機構に関する構造生物学的研究」と題して以下の研究を行った。

2. 電位依存性 Ca^{2+} チャネル開閉阻害ペプチド: ω -Grammotoxin SIA の立体構造決定

本章では、チャネルの制御部位に結合してその正常な開閉を阻害する gating-modifier に注目し、その立体構造を決定することで、gating-modifier の阻害活性発現機構について考察を行った。立体構造決定を行ったのは、36 アミノ酸残基からなる P/Q, N 型電位依存性 Ca^{2+} チャネルの gating-modifier、 ω -grammotoxin SIA (GrTx)である。得られた GrTx の立体構造は2本の β -strand (Leu19-Cys21, Cys30-Trp32)と1組の β -bulge (Trp6, Gly7 - Cys30) から構成され、+2x, -1 のトポロジーを保持していた。これは "inhibitor cyctine knot" モチーフを持つペプチドの典型的な主鎖折りたたみ構造である。GrTx はそもそも電位依存性 Ca^{2+} チャネルに対する阻害活性により同定されたが、結合活性はより低いものの Kv2.1 電位依存性 K^+ チャネルに対しても阻害活性を示す。同様の交差阻害活性は、Hanatoxin1 (HaTx) においてもみられるが、両者の結合親和性は異なっている。GrTxの立体構造を HaTx と比較すると、両者の分子表面には、大きな疎水性のパッチがいくつかの塩基性残基に取り囲まれた共通の構造モチーフが存在した。GrTx と HaTx の交差阻害活性は、この共通した構造モチーフにより説明される。また、分子表面における芳香族残基の配向、荷電性残基が異なることで、両者の構造モチーフが僅かに異なった性質を示すことにより、チャネルに対する親和性の違いが生じると考えた。

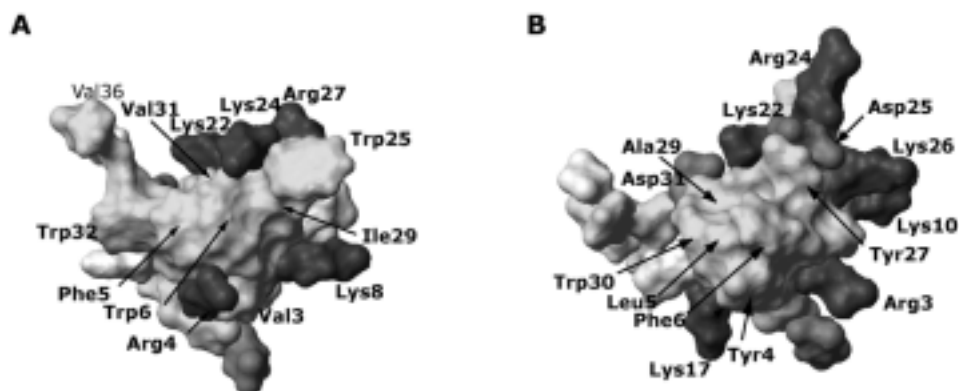


Figure 1. GrTx および HaTx の表面構造比較. GrTx(A)および(B)HaTx の表面構造を示す。疎水性、塩基性、酸性残基に残基番号を付記した。疎水性パッチおよびそれを囲む塩基性残基については太字で示した。

3. K⁺チャンネル阻害ペプチド: agitoxin2 によるチャンネル阻害機構の構造解析

ポアードメインは、すべての K⁺チャンネルが共有する、イオンの選択透過を担う構造ドメインである。一方、pore-blocker と呼ばれる一群のペプチドは、ポアードメインに細胞外から結合することで K⁺チャンネルのイオン透過活性を物理的に阻害する。電位依存性 K⁺チャンネルはそのサブクラスによって pore-blocker に対する感受性が大きく異なることが知られており、この性質を利用することで pore-blocker は電位依存性 K⁺チャンネルの薬理学的研究に広く用いられている。また pore-blocker の選択性をより向上させる試みは、新たな作用機序を持った薬剤の創生という観点からも興味を持たれている。電位依存性 K⁺チャンネルにおける pore-blocker 結合領域は、その感受性の有無に関わらず、高い相同性を示すことから、いくつかの特定残基が感受性の有無を決定していると考えられる。よって、電位依存性 K⁺チャンネルと pore-blocker 間の相互作用を立体構造に基づいて解析し、両者の結合において鍵となる残基を特定できれば、電位依存性 K⁺チャンネルの pore-blocker 感受性の違いを明らかにする重要な情報を与えると期待される。

そこで本研究では、電位依存性 K⁺チャンネルと高い相同性を示し、かつ pore-blocker に対する感受性を保持した *Streptomyces lividans* 由来の K⁺チャンネル: KcsA と pore-blocker: Agitoxin2 (AgTx) を研究対象とし、これらの相互作用について立体構造に基づく解析を行った。AgTx 上の KcsA 結合界面の同定は、TCS 法を用いることにより可能となった。TCS 法は、従来の NMR 法と異なり、蛋白質複合体の分子量に依存せず結合部位を決定できることから、膜蛋白質の解析における分子量的問題を克服することが可能である。TCS 実験により影響を受けた残基は AgTx 上において一つの連続した面を形成し、それらの残基に対する変異導入は、KcsA に対する結合活性を低下させた。よって、同定された結合界面が結合親和性に寄与していることが示された。次に、TCS 実験結果に基づいて KcsA-AgTx 複合体モデルを構築した。得られた複合体モデルは分子論的解析から明らかになった結合様式に鑑みて妥当であった。最後に、複合体モデル中における相互作用残基対の特定を行った結果、pore-blocker の分子表面に保存された構造モチーフを見出し、それに対応するチャンネル上の相互作用残基を特定した。チャンネル上で特定された相互作用残基は、pore-blocker に対する感受性の有無により異なる保存性を示した。よって、ここで明らかとなった相互作用は、電位依存性 K⁺チャンネルの pore-blocker 感受性を決定する要因と考えられた。

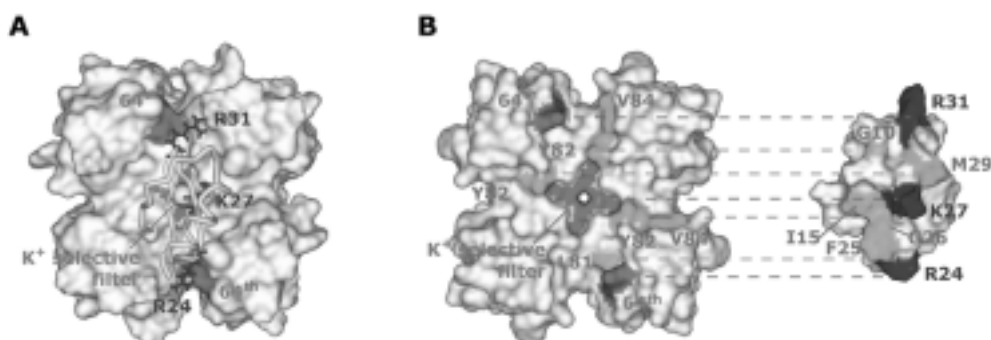


Figure 2. TCS 実験結果に基づいて構築された複合体モデル。(A) KcsA の分子表面に結合した AgTx をチューブモデルで示す。AgTx の KcsA 結合面に存在する塩基性残基を残基番号とともにスティックモデルで示し、これに対応する KcsA 上のサイトに影をつけた。(B) KcsA(左)および AgTx(右)の分子間相互作用面を開いて示す。複合体において相互作用する残基を点線で結んだ。

4. K⁺チャネル KcsA の開閉機構の構造解析

イオンチャネルはそれぞれ固有の環境に対応して、イオン透過を制御する gating 活性を保持する。すなわち、イオンチャネルは、閉環境においてイオン透過活性を示さないが、開環境においては矩形パルス状のイオン透過活性を示し、一定時間中におけるイオン透過活性を示す割合、 P_o を変化させることによってイオン透過量を制御する。イオン透過活性の変化にともない、イオンチャネルの立体構造はイオン不透過な閉状態から、透過可能な開状態へと一過的に変化すると考えられるが、その詳細は明らかとなっていない。KcsA は pH 依存的 gating 活性を持つ K⁺チャネルであり、酸性 pH において P_o が上昇する。ただし、酸性 pH においてもその P_o はそれほど高くない ($P_o < 0.4$)。また閉状態の立体構造は X 線結晶構造解析によりすでに明らかとなっている。今回我々は、チャネル開閉に伴う立体構造変化を明らかにすることを目的として、各種 pH 条件下で KcsA の立体構造および内部運動の解析を行った。その結果、pH 6.0 における KcsA の細胞質側の立体構造は X 線結晶構造と同一であったが、pH 4.0 では、その 90% 以上が異なる立体構造に移行することが明らかとなった。 P_o が低いにもかかわらず酸性 pH でそのほとんどが中性 pH と異なる立体構造を取ることから、KcsA は大部分が僅かに緩んだ前駆の構造に移行し、そのうちの一部がより大きな構造変化に伴い開状態に移行する二段階の構造変化を起こすものと考えた。このモデルにより、現在までに報告されている 2 種の KcsA 開閉モデルを矛盾なく説明することが可能であった。さらに、ここで観測された分子内運動と、チャネル電流変化の時間領域がほぼ一致したことから、KcsA 分子が本来持つ柔軟性がチャネルの開閉と密接に関係すると考えた。

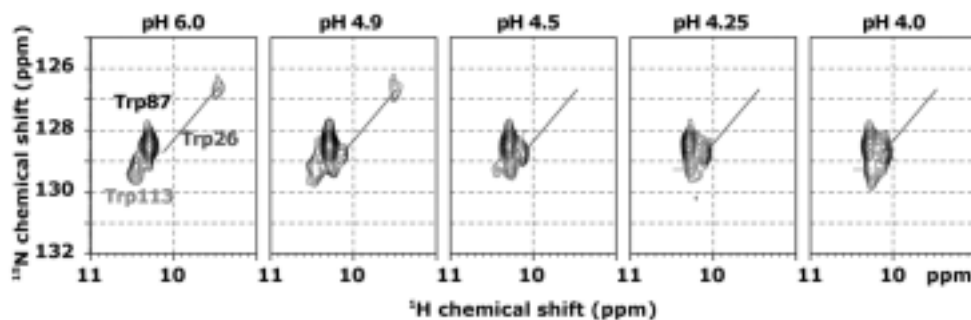


Figure 3. pH 変化にもなう KcsA の indol 由来シグナルの化学シフト変化. Trp26, 113 に関しては化学シフト前後におけるシグナルの位置を線で結んだ。pH 変化前後における両者のシグナルの帰属は W26F, W113A 変異体を用いることで確認した。