

# 審査結果の要旨

氏名 竹内 恒

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、蛋白質を生理的条件下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。しかしながら、NMRをイオンチャネルなどの膜蛋白質に適応することは基本的に困難をとらなう。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。

ブロッカーによるイオンチャネルの阻害機構およびチャネルの開閉機構について、NMRを用いて解析している本研究は、イオンチャネルの構造生物学的解析に寄与するとともに、このような研究対象に対するNMRによる研究手法の発展にも貢献するものと評価できる。以下に本研究によって得られた主要な知見をまとめる。

## 1. 電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル開閉阻害ペプチド: $\omega$ -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の立体構造が決定され、その阻害活性発現機構について考察が行われた。研究対象とされたのは、P/Q, N型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルにたいするgating-modifier、 $\omega$ -grammotoxin SIA (GrTx)である。立体構造決定は定法に基づいて慎重に行われており、得られた立体構造の検証も正確である。得られた構造から、GrTxが2本の $\beta$ -strand (Leu19-Cys21, Cys30-Trp32)と1組の $\beta$ -bulge (Trp6, Gly7 - Cys30)から構成され、+2x, -1のトポロジーを保持することが明らかにされた。これは "inhibitor cystine 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と言える。

GrTxは電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 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  $\text{K}^+$ 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。論文中においては、得られたGrTxの立体構造が、すでに報告のあったHaTxの立体構造と比較され、gating-modifierのチャネル阻害活性発現機構について考察が行われている。その結果、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見出され、これによりGrTxとHaTxの交差阻害活性が説明され

ている。また両者のチャンネルに対する結合親和性の違いが、分子表面における芳香族残基の配向、荷電性残基によって決定される可能性を指摘しており、gating-modifier のチャンネル特異性の解明に向けた指針を示した点で評価できる。

## 2. K<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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。

本章では、電位依存性 K<sup>+</sup>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<sup>+</sup>チャンネル: KcsA と、pore-blocker: Agitoxin2 (AgTx) の相互作用について立体構造に基づく解析が行われている。申請者は、蛋白質複合体の分子量に依存せずに結合部位を決定できる TCS 法の利点を生かすことで、膜蛋白質の解析における分子量的問題を克服し、AgTx 上の KcsA 結合界面の同定に成功している。TCS 実験により影響を受けた残基が AgTx 上において一つの連続した面を形成していること、それらの残基に対する変異導入が KcsA に対する結合活性を低下させていることから、実験結果の妥当性が認められる。また TCS 実験により同定された結合界面が結合親和性に寄与していることも明らかである。論文中においてはさらに、TCS 実験結果に基づいて KcsA-AgTx 複合体モデルが構築され、複合体モデル中における相互作用残基対の特定に用いられている。その結果、pore-blocker の分子表面に保存された構造モチーフが見出されるとともに、それらに対応するチャンネル上の相互作用残基が特定されている。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ており、ここで明らかとなった相互作用が、電位依存性 K<sup>+</sup>チャンネルの pore-blocker 感受性を左右する要因であると評価できる。

## 3. K<sup>+</sup>チャンネル KcsA の開閉機構の構造解析

イオンチャン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、イオンチャンネルは、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<sub>o</sub> 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まない、イオンチャン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<sup>+</sup>チャンネルであり、酸性 pH において P<sub>o</sub> が上昇する。ただし、酸性 pH においてもその P<sub>o</sub> はそれほど高くない (P<sub>o</sub> < 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。

本章では、チャン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が行なわれている。その結果、pH 6.0 における KcsA の細胞質側の立体構造が X 線結晶構造と同一であること、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にされた。P<sub>o</sub> が低いにもかかわらず KcsA の大部分が酸性 pH で中性 pH と異なる立体構造を取ることから、申請者は酸性 pH では KcsA の多くが僅かに緩んだ前駆的構造に移行し、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という二段階仮説を提唱している。ここで提唱されたモデルは、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り、より一般的なモデルとして評価できる。また、観測された分子内運動と、チャンネル電流変化の時間領域がほぼ一致したことは、KcsA 分子が本来持つ柔軟性がチャンネルの開閉と密接に関係することを示す興味深いデータと認められる。

以上のように、本研究は、NMR を用いて gating modifier の立体構造決定および KcsA-AgTx 間の相互作用解析を行い、ブロッカーによるイオンチャンネルの阻害機構を明らかにするとともに、KcsA を直接 NMR で観測することでチャンネルの開閉機構に関し新たなモデルを提唱した。また同時に、このような研究対象に対する NMR による研究手法の発展にも寄与している。

ゆえに本研究はイオンチャンネルの構造生物学的解析に対する十分な貢献が認められ、博士(薬学)の学位に値するものと判定した。