

- | | | |
|----------------|---|-------------------------|
| 1. 課程・論文博士の別 | 課程博士 | |
| 2. 申請者氏名（ふりがな） | 小澤 新一郎（おざわ しんいちろう） | |
| 3. 学位の種類 | 博士（薬学） | |
| 4. 学位記番号 | 博薬 第1487号 | |
| 5. 学位授与年月日 | 平成 25年 3月 25日 | |
| 6. 論文題目 | Gating modifier toxinによる
電位依存性カリウムイオンチャネル阻害
の構造基盤に関する研究 | |
| 7. リンク先URL | 希望しない | |
| 8. 提出ファイルの仕様等 | | |
| 提出ファイル名 | 使用アプリケーション | OS |
| 使用文書ファイル | 小澤新一郎論文要旨.pdf | Adobe Acrobat WindowsXP |

論文の内容の要旨

論文題目

Gating modifier toxin による 電位依存性カリウムイオンチャネル阻害の構造基盤

氏名 小澤 新一郎

【背景】

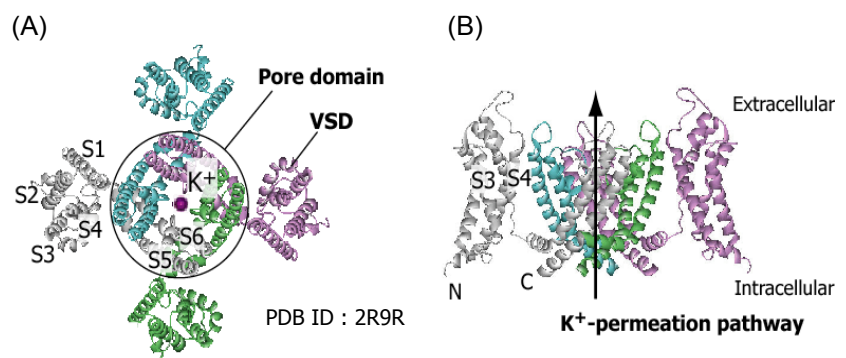
電位依存性カリウムイオンチャネル (K_v) は膜電位に応じて開閉し、電気化学的ポテンシャルに従ってカリウムイオンを選択的に透過する膜タンパク質である。 K_v は 4 本の膜貫通ヘリックス (S1-S4) からなる電位センサードメイン (VSD) と 2 本の膜貫通ヘリックス (S5-S6) からなるポアドメインを含むサブユニットが対称な四量体を形成して機能する (Fig. 1)。

また、VSD の S4 には 3-4 残基ごとに側鎖に正電荷を含む Arg や Lys が保存されている。この正電荷が膜電位に応じて脂質二重膜中を上下に移動するような VSD の構造変化により、イオン透過路の開閉がアロステリックに制御されると考えられている。

Fig. 1 K_v の立体構造

(A) 細胞外側から見た構造。

(B) 膜に平行な方向から見た構造。VSD は向かい合う 2 サブユニット分のみを表示した。



K_v を介したカリウムイオンの透過を阻害する生物毒として、gating modifier toxin が知られている。Gating modifier toxin は脂質二重膜中で VSD と結合し、その膜電位依存的な構造変化を阻害することで K_v の機能をアロステリックに阻害すると考えられている。Gating modifier toxin は 30-40 残基程度のポリペプチドであり、分子内に 3 本のジスルフィド結合を含む高度に保存された立体構造を有している。また、分子表面には疎水性残基が多く露出しており、hydrophobic patch と呼ばれる保存された領域が脂質二重膜中への分配と VSD との結合の両者において重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、gating modifier toxin 上に共通して存在する hydrophobic patch を用いて、どのようにして標的となる K_v を特異的に認識しているのかは明らかとなっていない。

また、近年、VSD に変異導入した K_v 全長を用いた電気生理解析により、gating modifier toxin が VSD の S3-S4 周辺に結合することや、gating modifier toxin が K_v を阻害するためには膜が一度再分極する必要があることなどが報告された (Alabi AA *et al.* 2007, Schmidt D *et al.* 2009)。しかしながら、gating modifier toxin 結合状態の VSD の立体構造は明らかとなっていないため、gating modifier toxin がどのようにして標的となる VSD の膜電位依存的な構造変化を阻害しているのかは明らかとなっていない。

そこで本研究では、gating modifier toxin-VSD 間の特異的な分子認識様式、および gating modifier toxin による VSD の膜電位依存的な構造変化の阻害様式を解明することを目的として、gating modifier toxin-VSD 複合体の立体構造を明らかとすることとした。

【方法・結果】

1. VSD および VSTx1 の調製

解析対象としては、真核生物由来 K_v と同等の立体構造および電気生理学的性質を有する古細菌 *A. pernix* 由来 K_v である K_vAP の VSD (1-149, C11S) と、 K_vAP を阻害する gating modifier toxin である VSTx1 を選択した。両者は大腸菌を用いて発現・精製した。また、VSD は decylmaltoside (DM) を用いて可溶化した。

2. VSD の性状解析

調製した VSD の立体構造を、膜電位依存的に大きく構造変化する S4 周辺残基の DM ミセルからの露出度を指標として評価した。今回は、VSD の S4 に変異導入した Cys と水溶性の高いマレイミド化ポリエチレングリコール (Mal-PEG) との反応によって各残基の露出度を解析した。その結果、DM ミセルから大きく露出した残基として、VSD の S3-S4 ループ周辺残基を同定した。得られた結果を先行研究 (Ruta V *et al.* 2005) と比較することにより、DM ミセル中の VSD が膜電位のない脂質二重膜における脱分極状態の VSD と同等の立体構造を形成することが示唆された。

次に、蛍光修飾した VSD をリポソームに再構成し、膜電位を形成した際の蛍光スペクトルの変化を指標として VSD の膜電位依存的な構造変化を解析した。その結果、VSD 再構成リポソームでは膜電位形成に伴う蛍光消光が観測されたため、調製した VSD が膜電位依存的に構造変化することが示された。一方、VSTx1 存在下では蛍光スペクトル変化が顕著に抑制されたため、VSTx1 が膜電位のない脂質二重膜中で脱分極状態の VSD と結合し、その構造を安定化することが示唆された。

そこで、以降は、VSD が脱分極状態の構造を形成することが明らかとなった DM ミセル中で、VSTx1 と VSD の相互作用解析を行うこととした。

3. VSTx1-VSD 間相互作用解析

DM ミセル中の VSD と VSTx1 の相互作用を、等温滴定型カロリメトリー (ITC) によって解析した。その結果、両者はモル比 1 : 1、解離定数 $1.5 \mu\text{M}$ 程度で結合することが明らかとなった。

次に、均一 ^{15}N 標識した VSD に対して VSTx1 を添加する NMR 滴定実験を行った。その結果、VSTx1 結合に伴って観測された化学シフト変化は小さく、大部分のシグナルはほとんど変化しなかった。これにより、VSTx1 結合時に VSD の全体構造はほとんど変化しないことが示唆された。

4. VSTx1-VSD 間相互作用残基の同定および複合体モデルの構築

当研究室で開発した NMR 手法である交差飽和 (CS) 法およびアミノ酸選択的 CS (ASCS) 法により、VSTx1-VSD 間で近接する残基対を同定した。はじめに、CS 法によって VSTx1 上の DM 結合残基として F5, M6, W7, K8, C9, D18, W27 および V29 を、VSTx1 上の VSD 結合残基として V20, S22, W25, S32 および F34 をそれぞれ同定した (Fig. 2 (A))。これにより、VSTx1 は hydrophobic patch 周辺残基を用いて DM と相互作用する一方で、hydrophobic patch 裏側の C 末端 (F34) の周辺残基を用いて VSD と相互作用することが明らかとなった。

また、ASCS 法により、VSTx1-VSD 間で 5 \AA 以内に近接する残基対として V20-I127, S22-F124, W25-L121, S32-L128 および F34-L128 の 5 組の残基対を同定した (Fig. 2 (C))。次に、同定した近接残基対を距離制限情報、VSTx1 の溶液構造および脱分極状態の VSD の溶液構造を初期構造として HADDOCK (de Vries SJ *et al.* 2010) によるドッキング計算を行い、VSTx1-VSD 複合体モデルを構築した (Fig. 3)。複合体モデル上では、VSTx1 の C 末端周辺残基が VSD の S4 と相互作用する一方で、hydrophobic patch は DM のアシル鎖が存在すると想定される領域に露出していた。

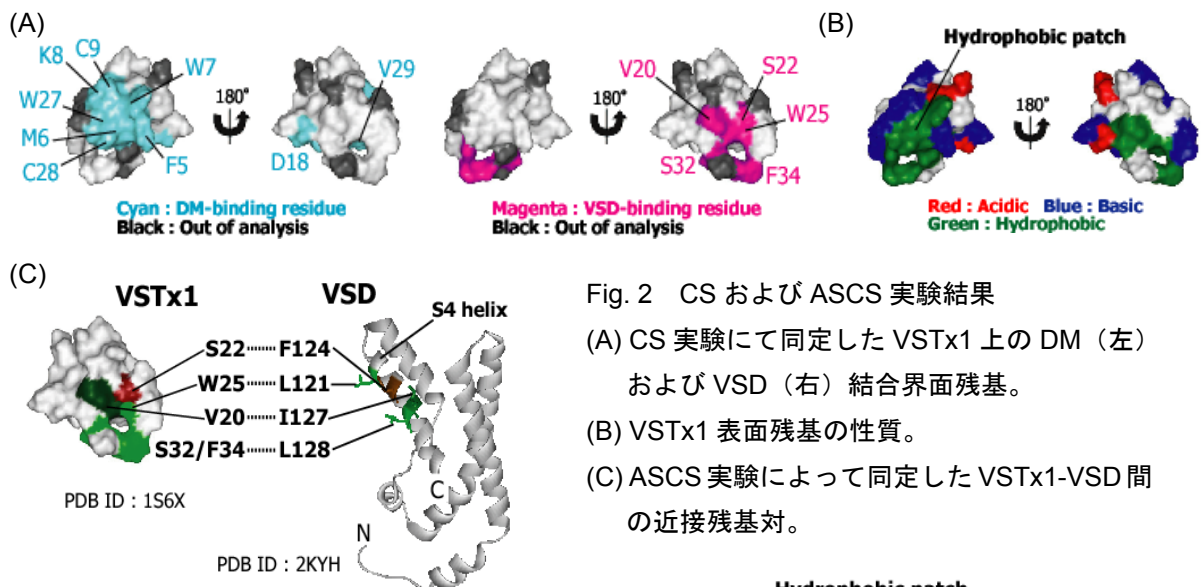


Fig. 2 CS および ASCS 実験結果

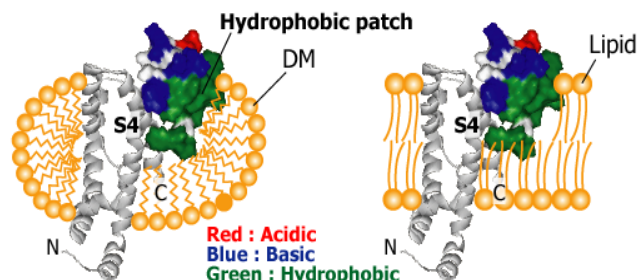
(A) CS 実験にて同定した VSTx1 上の DM (左) および VSD (右) 結合界面残基。

(B) VSTx1 表面残基の性質。

(C) ASCS 実験によって同定した VSTx1-VSD 間の近接残基対。

Fig. 3 VSTx1-VSD 複合体モデル

DM 中 (左) または脂質二重膜中 (右) に分子を配置した。ドッキング計算の過程で、側鎖や運動性の高い VSTx1 の C 末端 (L30-F34) の配向は変化させている。



【考察】

本研究により、VSTx1 は従来の知見とは異なり、hydrophobic patch 裏側の C 末端周辺残基を用いて VSD の S4 と相互作用することが明らかとなった。Gating modifier toxin は hydrophobic patch 周辺残基の性質がよく保存されている一方で C 末端周辺残基の保存性は低いため、gating modifier toxin が保存性の低い C 末端周辺残基を用いて標的となる VSD を特異的に認識していることが示唆された。

また、複合体モデルからは、細胞膜中では hydrophobic patch がリン脂質のアシル鎖と相互作用する一方で、荷電性残基は細胞外側に露出することが示唆された (Fig. 3)。これにより、VSD と結合した VSTx1 は細胞膜外側に留まることで S4 の膜電位依存的な構造変化を阻害し、脱分極状態の VSD の構造を安定化することが示唆された。Gating modifier toxin の hydrophobic patch やその周辺の荷電性残基はアミノ酸配列や表面分布の保存性が高いため、VSTx1 が脱分極状態の VSD を安定化する相互作用様式は、他の gating modifier toxin と VSD でも広く保存されている可能性が高い。K_v は脱分極刺激による活性化のあと経時的に不活性化し、脱分極電位下でもイオンを透過しにくい不活性化状態に移行することや、不活性化した K_v が再活性化するためには再分極に伴って一度静止膜電位下の構造に戻る必要があることが知られている。これに対して、gating modifier toxin は脱分極した膜中で VSD の構造を安定化するため、再分極に伴う VSD の膜電位依存的な構造変化を阻害し、K_v の再活性化を阻害することが示唆された。

このように、VSTx1-VSD 複合体モデルからは、これまで gating modifier toxin を用いた電気生理実験等によって解析されてきた K_v の機能を立体構造の観点から説明する上で重要な知見が得られた。また、内因性リガンドがほとんど報告されていない K_v 上の pharmacophore を同定し、立体構造情報をもとにした薬物の設計を可能とした点でも意義が大きい。