

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機構の解明

氏 名 野崎 智裕

【背景・目的】

電位依存性カリウムイオンチャネル (Kv) は、膜電位依存的にカリウムイオン (K^+) を選択的に透過することで活動電位を制御する膜タンパク質であり、神経伝達や筋収縮において重要な役割を担う。Kv は、膜貫通領域に電位センサードメイン (VSD) とポアドメイン (PD) を有し、 K^+ 透過路は PD 同士が組んだ 4 量体の中央に存在する (Fig. 1)。VSD は S1-S4 の 4 本の helix からなり、正電荷を持つアミノ酸残基を多数有する S4 が、静止膜電位存在下では細胞内側に、脱分極時には細胞外側に移行して、PD の K^+ 透過路の開閉をアロステリックに制御すると考えられている。しかしながら、膜電位存在下の立体構造解析は困難であり、膜電位依存的な構造変化様式は不明である。

また、Kv を介した K^+ の透過を阻害する毒素として、30~40 残基程度のポリペプチドである gating modifier toxin が知られており、脂質二重膜に分配し VSD と結合することで電位依存性イオンチャネルの機能を阻害する。これまでに当研究室により、VSD-toxin 複合体の解析が行われてきた (Ref. 1) もの、toxin 結合状態の VSD の立体構造は明らかになっておらず、Kv 阻害機構の詳細は不明である。

そこで本研究では、チャネル開閉に必要な VSD の膜電位依存的な構造変化メカニズムを明らかにし、さらに gating modifier toxin がどのようにして VSD に結合して Kv の機能を阻害しているのか明らかにすることを目的とした。

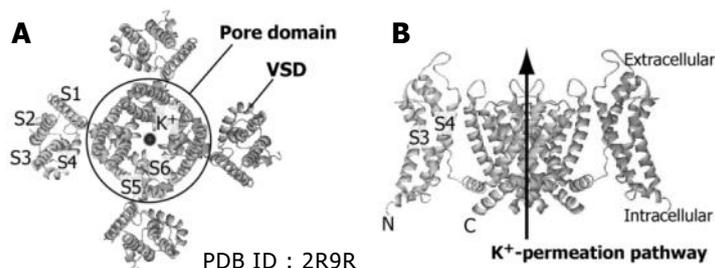


Fig. 1 Kv1.2-Kv2.1 キメラチャネルの結晶構造

(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 サブユニットのみ表示した。

【方法】

1. VSD および gating modifier toxin の調製

真核生物由来 Kv と同様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 Kv (KvAP) の VSD および KvAP を阻害する gating modifier toxin である VSTx1 を解析に用いた。両者は大腸菌を用いて発現・精製した。

2. 膜電位依存的 disulfide locking 解析

Disulfide locking 解析では、近接する Cys 同士が SS 結合を形成することを利用する。

VSD の S1 については S4 側を向いた S32, L36, V39 および V42 の 4 残基の内 1 ヶ所に、S4 については L121~I131 の内 Arg を除いた 9 残基の内 1 ヶ所に Cys を導入し、計 36 種類の VSD double Cys 変異体を調製した。これらをリポソームに再構成し、リポソーム内外の K⁺濃度差を利用して膜電位を形成し、酸化剤の添加により分子内 SS 結合の形成を誘起した。その後、分子内 SS 結合の形成の有無を検出するために、変性させた VSD に maleimide polyethylene glycol (Mal-PEG) を添加することで、分子内 SS 結合を形成していない Cys の SH 基を修飾した。

3. VSTx1 添加条件での disulfide locking 解析

DM ミセル中の VSD double Cys 変異体について、VSTx1 を添加してインキュベートした。その後、上記と同様に分子内 SS 結合の形成を誘起し、検出を行った。

4. VSD の NMR 解析

野生型の VSD を均一 ²H 標識し、Ile の側鎖メチル基を選択的に ¹³C¹H₃ 標識した。DM ミセル中の VSD について VSTx1 非添加時/添加時、ガドレル酸メグルミン非添加時/添加時について ¹H-¹³C HMQC スペクトルを取得し、溶媒中に存在する Gd³⁺からの常磁性緩和促進効果を観測することにより、VSTx1 結合による VSD の構造変化を解析した。

【結果】

1. 膜電位依存的 disulfide locking 解析 (Ref. 2)

膜電位非形成時/形成時において近接する残基対を、disulfide locking 解析にて同定した (Fig. 2)。膜電位非形成時には、L36C/L129C、V42C/L121C、V42C/L122C、V42C/I127C、V42C/L129C、V42C/I130C および V42C/I131C が分子内 SS 結合を形成した。膜電位形成時には、L36C/L129C、V42C/L121C、V42C/L122C、V42C/I127C、V42C/L129C および V42C/I131C が分子内 SS 結合を形成した。

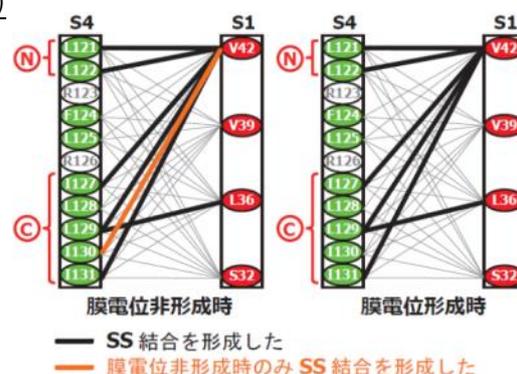


Fig. 2 膜電位依存的 disulfide locking 解析結果
黒にて SS 結合を形成した残基対を、橙にて膜電位非形成時のみ SS 結合を形成した残基対を示した。

2. VSTx1 添加時における DM ミセル中の VSD の disulfide locking 解析

V42C/I130C 変異体は、VSTx1 非添加時および添加時のいずれにおいても SS 結合を形成した (Fig. 3 左)。一方で、V42C/L121C 変異体は、VSTx1 非添加時では SS 結合を形成し、VSTx1 添加時では SS 結合を形成しなかった (Fig. 3 右)。

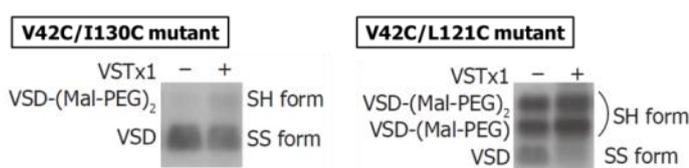


Fig. 3 VSTx1 非添加時および添加時における disulfide locking 解析結果

(左) V42C/I130C 変異体 : Up state で SS 結合を形成する。
(右) V42C/L121C 変異体 : Down state で SS 結合を形成する。

3. Ile メチル基標識 VSD の NMR 解析

VSD 分子中において 10 残基存在する Ile (Fig. 4A) を対象として、DM ミセル中の VSD

について VSTx1 非添加時/添加時の ^1H - ^{13}C HMQC スペクトルを取得した (Fig. 4B)。また、Ile への変異導入により全てのシグナルの帰属を行った。その結果、VSTx1 非添加時には I40, I127 および I131 が 2つのシグナルを、他の残基は 1つのシグナルを与えており、VSTx1 添加時にはすべての残基が 1つのシグナルを与えていた。また、I40, I127 および I131 のいずれも minor signal の強度比は 30%程度であったことから、これら 3 残基の major signal と minor signal はそれぞれ同一の “major state” および “minor state” に対応していることが示唆された。

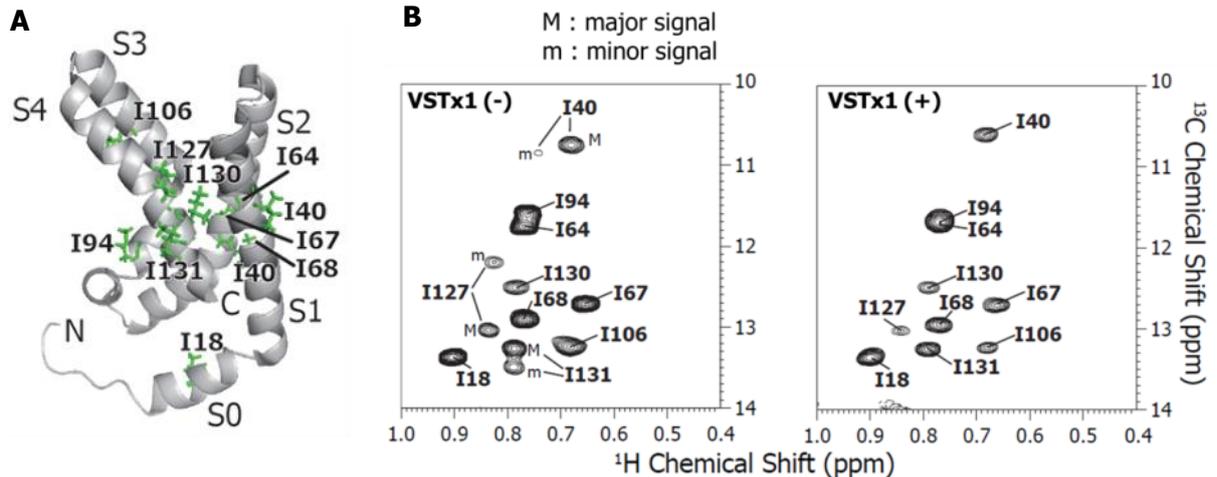


Fig. 4 VSD の Ile メチル基の NMR 観測結果

(A) VSD 中の Ile の分布

VSD の溶液構造 (PDB ID:2KYH) 上に Ile を stick にて表示した。

(B) Ile メチル基の ^1H - ^{13}C HMQC スペクトル

左に VSTx1 非添加時のスペクトルを、右に VSTx1 添加時のスペクトルを示した。

4. Solvent PRE 解析

VSTx1 非添加時の major state の VSD および minor state の VSD、VSTx1 添加時の VSD のそれぞれがどのような構造を反映しているのかを、溶媒露出度を調べるのが可能な solvent PRE により解析した。NMR サンプルにガドテル酸メグルミンを添加し、添加前後のシグナル強度比を解析した (Fig. 5)。シグナル強度減少率が大きいことは、溶媒中の Gd^{3+} からの PRE 効果を受けやすいこと、すなわち溶媒露出度が高いことを示す。

Major state においては I40 の溶媒露出度が低く、I127 および I131 の溶媒露出度が高いことが明らかとなった。Minor state においては、I40, I127 および I131 のいずれの溶媒露出度も低いことが明らかとなった。VSTx1 添加時においては、I40 の溶媒露出度が低く、I127 および I131 の溶媒露出度が高いことが明らかとなった。

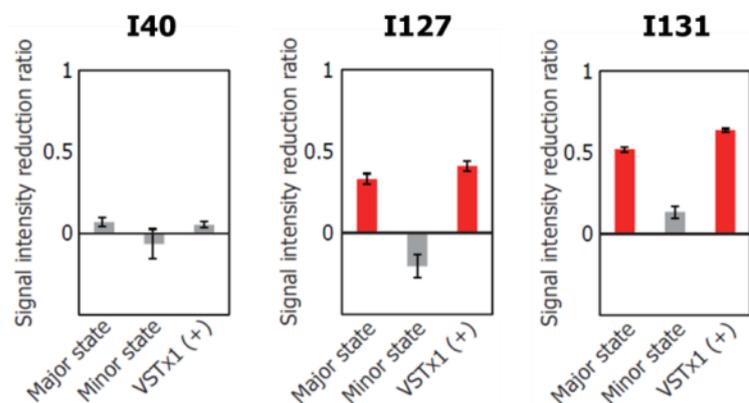


Fig. 5 I40, I127 および I131 シグナルの solvent PRE 解析結果

各シグナルのガドテル酸メグルミン添加にともなうシグナル強度減少率を示し、大きなシグナル強度減少が観測されたシグナルを赤にて示した。

【考察】

1. 膜電位依存的な VSD の構造変化様式の解明 (Ref. 2)

膜電位の有無に関わらず、S1 の V42 に対して S4 の N 末端側と C 末端側が SS 結合を形成すること、S4 中央部は SS 結合を形成しなかった (Fig. 2)。この結果は単一の構造からは説明できないことから、VSD は、V42 と S4 の C 末端側が近接した状態 (up state) と N 末端側が近接した状態 (down state) の間の平衡にあり中間的な状態はとらないことが示唆された (Fig. 6)。また、膜電位非形成時にのみ V42-I130 が近接したことから、脱分極時には up state に平衡がシフトすることが示唆された。

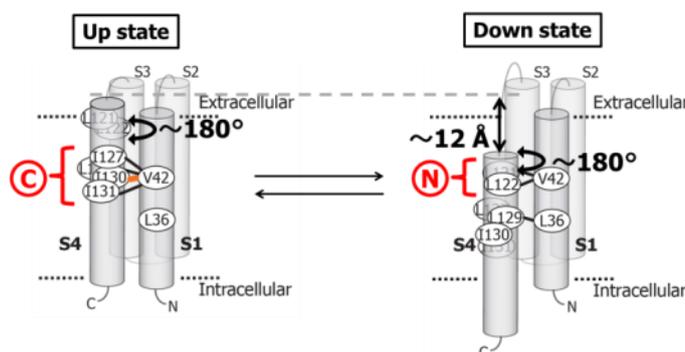


Fig. 6 膜電位依存的な VSD の構造変化様式

SS 結合を形成した残基対を線で結んで示した。S1 の V55 に対して S4 の C 末端側が近接する状態 (up state) と N 末端側が近接する状態 (down state) の平衡にあり、膜電位依存的に平衡がシフトすることが示唆された。

2. VSTx1 によるチャネル阻害機構の解明

Disulfide locking 解析より、DM ミセル中の VSD は VSTx1 非存在下では up state および down state をとりうることを、VSTx1 存在下では up state はとりうるが、down state はとらなくなることが示唆された。

また、up state に対応する VSD の溶液構造において、I40 の溶媒露出度は低く、I127, I131 の溶媒露出度は高いことが想定される。これらが major state および VSTx1 添加時の solvent PRE 解析結果と対応しているため、major state および VSTx1 添加時は up state であることが示唆された。一方で、minor state においては、I127, I131 の溶媒露出度が低くなっていた。このことは、S4 が細胞内側に移行して I127, I131 がミセル中に埋もれることを示している可能性が高く、minor state が down state であることが示唆された。

以上より、DM ミセル中において VSD は up state と down state の平衡にあり、VSTx1 の結合によって VSD が up state に固定されることが示唆された。

したがって、VSTx1 の結合によって VSD が up state に固定されることで、KvAP の closed state への構造変化を阻害されるとともに、ポアドメインの不活性化によって KvAP が open state から inactivated state へと移行することで、K⁺の透過が阻害されるというメカニズムが明らかとなった。

【参考文献】

- [1] Ozawa S, Kimura T, Nozaki T, Harada H, Shimada I & Osawa M (2015) *Scientific Reports*, **5**: 14226.
- [2] Nozaki T, Ozawa S, Harada H, Kimura T, Osawa M & Shimada I (2016) *Scientific Reports*, **6**: 37303