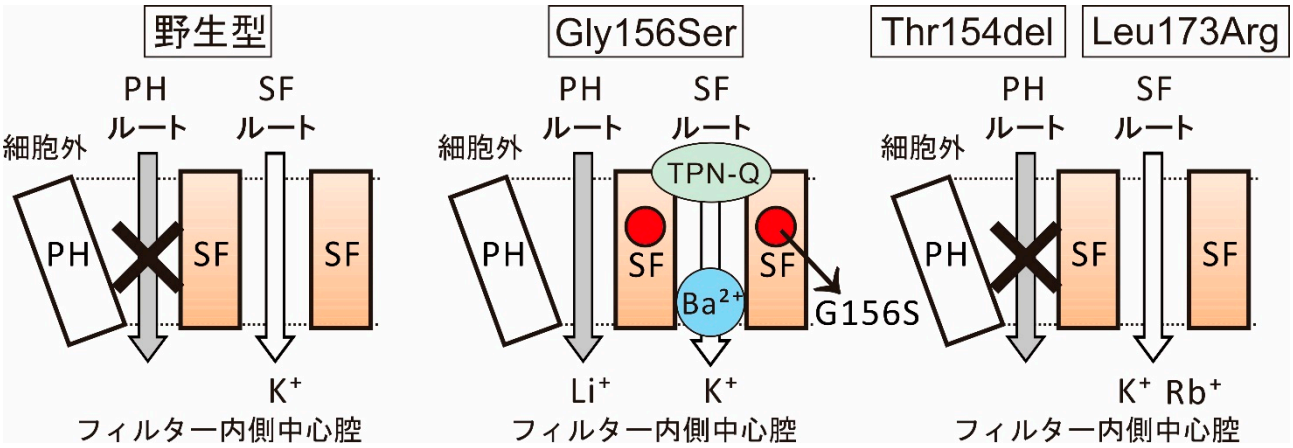
150　K⁺チャネル変異による遺伝性疾患の新規治療薬の探索	陳　以珊

【目的】GIRK チャネルはカリウムイオンを通す膜蛋白質の一種であり、脳の神経細胞の興奮や、心拍とホルモンの調節において重要な役割を果たしている。GIRK チャネルのサブユニット 2（GIRK2）は、中枢神経系の細胞に広く分布し、この分子をコードする *KCNJ6* 遺伝子の異変は、遺伝性疾患 Keppen-Lubinsky 症候群の原因であることが報告されている。Keppen-Lubinsky 症候群の患者は、重度の発育遅滞、知的障害、反射亢進・緊張亢進を伴い、小頭症と脂肪組織の減少による顔面異常の徴候を示す。患者から、GIRK2 チャネルのイオン選択性フィルター（SF）領域に Thr152del や Gly154Ser、第二膜貫通領域に Leu171Arg の異変が見つかり、チャネルのイオン選択性が異常であることがわかった。これまでの国内外の研究によって、Keppen-Lubinsky 症候群の原因が明らかになったが、GIRK2 の異変による異常なイオン選択性に繋がる SF の構造変化は未だに不明である。本研究の目的は、GIRK2 の種々異変による SF の構造変化を検証し、その異常のイオン選択性を正常化する新規制御機構による治療薬の探索である。我々は、GIRK2 変異体の異常なイオン選択性を是正することによって、過剰なイオン流入による細胞死をとめ、発育と代謝等の異常症状の進行を緩めることができると想定している。

【方法】本研究では、ヒト GIRK2 変異体に対応するマウス GIRK2 Thr154del、Gly156Ser と Leu173Arg 等異常なイオン選択性を示す変異体を部位特異的変異導入法により作製し、アフリカツメガエル卵母細胞を発現系として用い、種々の 1 価陽イオンのカリウムイオンに対する選択性を二電極膜電位固定法により電気生理学的解析を行った。

【結果】正常な GIRK2 はカリウムイオンに対する選択性が高いため、ほかのイオンは通り抜けない。それに対して、Gly156Ser 変異体はカリウムイオンに比してリチウムイオンとナトリウムイオンに対する選択性が高く、Thr154del と Leu173Arg 変異体はルビジウムイオンに対する選択性が高いことが明らかとなった。また、SF の構築するイオン透過路のブロッカーの投与により、Gly156Ser 変異体のイオン選択性が変わり、Thr154del と Leu173Arg 変異体のイオン選択性は変化しないことが観察された。これらの結果から、Gly156Ser の変異により、Thr154del や Leu173Arg 変異体とは異なる構造変化が起こり、通常の SF の構築するイオン透過路（SF ルート）とは異なるイオン選択性を持つ、第二のイオン透過路（ポアヘリックス PH ルート）が新たに形成された可能性が示唆された。本研究により、従来と全く異なる解釈である「新規イオン透過路の形成による異常のイオン選択性の発生」の新規制御機構の可能性が示唆された。この研究結果を基に、第二のイオン透過路の選択性阻害薬の同定によって、異常なイオン選択性を是正する Keppen-Lubinsky 症候群の新規治療薬の開発に繋がることが期待される。

GIRK2 チャネルの異変による異常なイオン選択性の構造基盤の想定モデル



150. K^+チャネル変異による遺伝性疾患の新規治療薬の探索

陳　以珊

*自然科学研究機構 生理学研究所 神経機能素子研究部門

Key words：イオンチャネル病，カリウムチャネル，イオン選択性，新規制御機構，新規治療薬の探索

緒　言

細胞膜上には、特定のイオンを通す働きをしているイオンチャネルがある。我々はカリウムイオン（K^+）を通すチャネルの一種であるGタンパク質活性型内向整流性カリウム（GIRK）チャネルを研究している。GIRKチャネルは、脳の神経細胞の興奮や、心拍とホルモンの調節において重要な役割を果たしている。

GIRKチャネルのサブユニット2（GIRK2）は、中枢神経系の細胞に広く分布している分子である。この分子をコードする *KCNJ6* 遺伝子の異変は、イオンチャネル病の一種であるKeppen-Lubinsky 症候群の原因であることが報告された［1］。Keppen-Lubinsky 症候群の患者は、重度の発育遅滞、知的障害、反射亢進・緊張亢進を伴い、小頭症と脂肪組織の減少による顔面異常の徴候を示す。患者から、GIRK2チャネルのイオン選択性フィルター領域にThr152delやGly154Ser、第二膜貫通領域にLeu171Arg の異変が見つかり、チャネルのイオン選択性が異常であることが明らかとなった（図1）［1，2］。

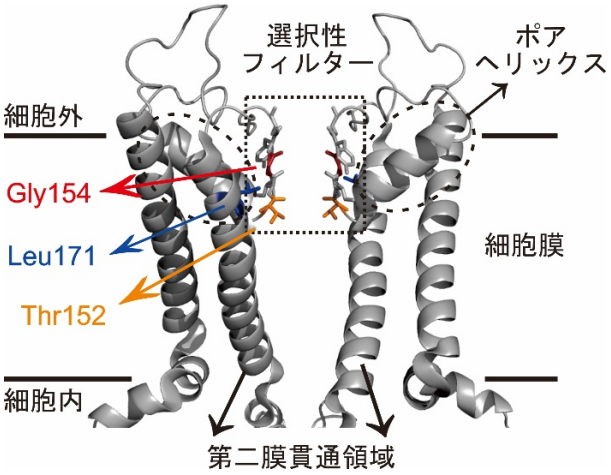


図1. GIRK2チャネルのイオン選択性フィルターおよび膜貫通領域の構造
イオンはチャネルの中心に位置する選択性フィルターを通過する。彩色矢印はKeppen-Lubinsky 症候群に関連する変異のアミノ酸残基の位置を示す。

正常なGIRK2 チャネルは K^+に対する選択性が高いため、細胞外のナトリウムイオン（Na^+）はイオン選択性フィルターに通り抜けない。しかし、Thr152del や Gly154Ser や Leu171Arg の異変により、イオン選択性フィルター近辺の構造が変わり、Na^+やカルシウムイオン（Ca^{2+}）は通過できるようになる。そのため、過剰な Na^+や Ca^{2+} 流入による細胞死が引き起こされる。これまでの国内外の研究によって、Keppen-Lubinsky 症候群の原因が明らかになったが、GIRK2 チャネル遺伝子の異変によって、イオン選択性フィルターの構造がどう変化するのかは未だに謎のままである。また、確立したKeppen-Lubinsky 症候群の治療薬はない。

*現在の所属：和歌山県立医科大学 医学部 薬理学講座

本研究の目的はGIRK2チャネル遺伝子の異変によるイオン選択性フィルターの構造変化を検証し、その異変による異常のイオン選択性を正常化する新規制御機構による治療薬の探索である。我々は、GIRK2 変異体の異常なイオン選択性を是正することによって、過剰なイオン流入による細胞死をとめ、発育と代謝等の異常症状の進行を緩めることができると想定している。

本研究では、ヒトGIRK2変異体に対応するマウスGIRK2 Thr154del、Gly156Serと Leu173Arg等異常なイオン選択性を示す変異体の、種々の 1 価陽イオンの K^+に対する選択性を、アフリカツメガエル卵母細胞を発現系として用い、二電極膜電位固定法により電気生理学的解析を行った。その結果、Gly156Ser 変異体は K^+に比してリチウムイオン（Li^+）と Na^+に対する選択性が高く、Thr154delと Leu173Arg変異体はルビジウムイオン（Rb^+）に対する選択性が高いことが明らかとなった。また、イオン選択性フィルターの構築するイオン透過路のブロッカーの投与により、Gly156Ser変異体のイオン選択性が変わり、Thr154delと Leu173Arg変異体のイオン選択性は変化しないことが観察された。これらの結果から、Gly156Ser の変異により、Thr154del や Leu173Arg 変異体とは異なる構造変化が起こり、通常のイオン選択性フィルターの構築するイオン透過路とは異なるイオン選択性を持つ、第二のイオン透過路が新たに形成された可能性が示唆された。本研究により、従来と全く異なる解釈である「新規イオン透過路の形成による異常のイオン選択性の発生」の新規制御機構の可能性が示唆された。

方法および結果

1. GIRK2チャネル変異体のイオン選択性の同定

GIRK2 チャネル変異体の特徴を同定するため、異常なイオン選択性を持つ GIRK2 の変異体を部位特異的変異導入法により作製し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、二電極膜電位固定法により以下の電気生理学的解析を行った（図 2a）。細胞外溶液に大きさの異なる 1 価陽イオンを一種類ずつに置換し（表 1）、GIRK2 変異体の細胞外から細胞内に流れるイオンの量を電流量として測定した。

表 1. 細胞外液に使用した 1 価陽イオンの大きさ

イオン	Li^+	Na^+	K^+	Rb^+	Cs^+	MA^+	TMA^+	TEA^+	$NMDG^+$
半径（Å）	0.60	0.95	1.33	1.48	1.69	2.17	2.75	3.29	3.65

MA は Methylammonium（メチルアンモニウム）、TMA は Tetramethylammonium（テトラメチルアンモニウム）、TEA は Tetraethylammonium（テトラエチルアンモニウム）、NMDG は N-Methyl-D-glucamine（N-メチル-D-グルカミン）。

その結果、野生型では大きな内向き K^+電流が観察されたが、ほかのイオンは K^+に比して電流は殆どない（図 2b）。Thr154del変異体と Leu173Arg変異体では、TMA^+、TEA^+と $NMDG^+$等大きなイオンは通り抜けないが、しかし、ほかのイオンが流れるようになった（図 2c、2e）。野生型と比較して、この二つの変異体は特に Rb^+に対する透過性が高くなったことが明らかとなった。Gly156Ser変異体の場合は MA^+、Li^+と Na^+に対する透過性が高くなったことが観察された（図 2d）。以上の結果から、Thr154del変異体のイオン選択性は Leu173Arg変異体のイオン選択性に類似しているが、Gly156Serでは異なるイオン選択性を示していることが明らかとなった。

2. GIRK2チャネルのブロッカーの投与によるイオン選択性の変化

バリウムイオン（Ba^{2+}）は GIRK チャネルのブロッカーであり、イオン選択性フィルターの内側中心腔に近い領域に位置するアミノ酸残基と強く結合し、フィルター内の K^+の通過を阻害することが知られている（図 3a）[3]。我々は、高濃度の Ba^{2+}（3 mM）を細胞外から投与し、投与前と投与後のイオン選択性を比較した。その結果、Thr154delと Leu173Arg変異体は、Ba^{2+}の投与により K^+に比してのほかのイオンの電流相対量が変化しないことが明らかとなった（図 3b、d）。しかし、Gly156Ser変異体では、Ba^{2+}の投与により K^+に比して Li^+、Na^+及び MA^+の電流相対量が増加したことが観察された（図 3c）。以上の結果から、Gly156Ser の変異により、Ba^{2+}の阻害するイオン選択性フィ

ルターの構築するイオン透過路と異なる、Li^+、Na^+とMA^+に対する選択性の高い第二のイオン透過路が新たに形成された可能性が示唆された（図 3a）。

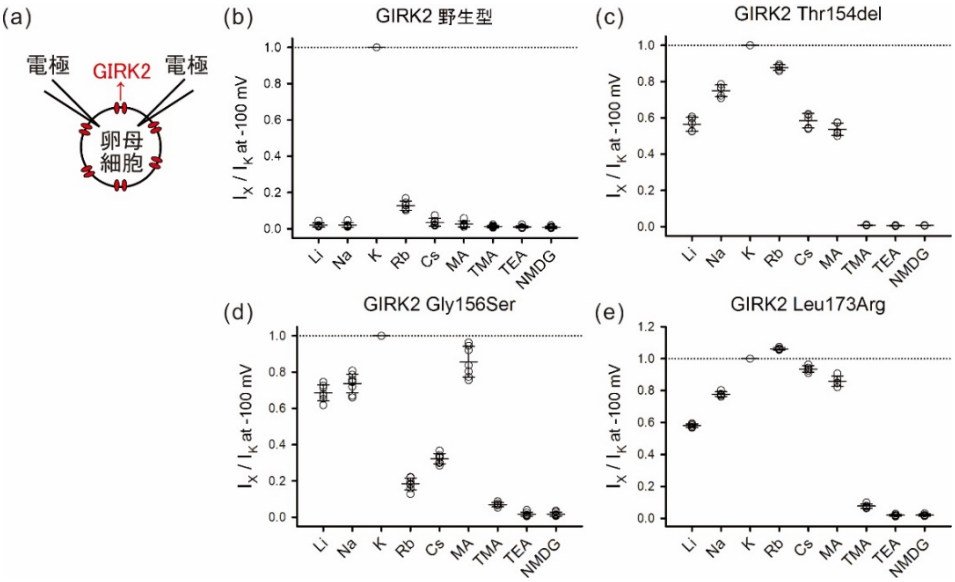


図 2. GIRK2 チャネルの野生型と変異体のイオン選択性

a） GIRK2 チャネルの野生型や変異体をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、二電極膜電位固定法により電流量を記録する。

b～e） 膜電位を－100 mV 固定時のGIRK2チャネルの野生型と変異体に流れる各1価陽イオン対 K^+の電流量比率。

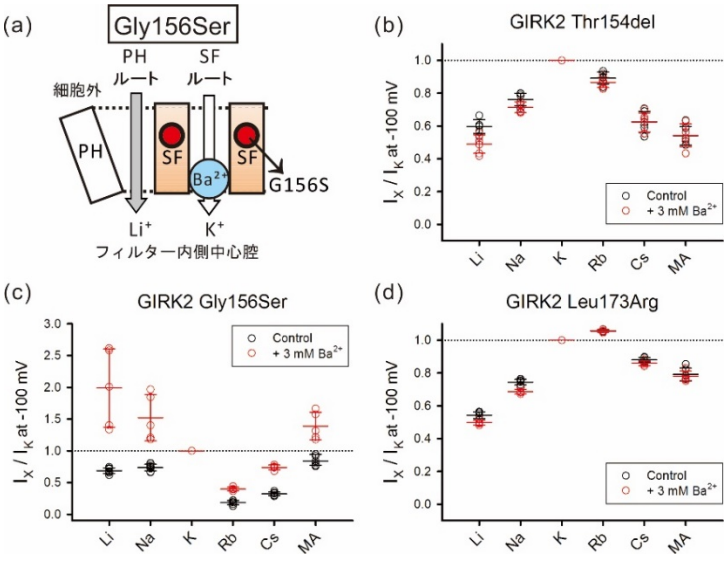


図 3. GIRK2 チャネルのブロッカーの投与によるイオン選択性の影響

a） Ba^{2+}はイオン選択性フィルター（SF）の構築するイオン透過路のブロッカーである。Gly156Ser 変異体は SF ルートと第二のイオン透過路「ポアヘリックス（PH）ルート」を持っている可能性が示唆された。

b～d）Ba^{2+}投与前（黒○）と投与後（赤○）の各 1 価陽イオン対 K^+の電流量比率。

3. ペプチド毒素の投与による Gly156Ser 変異体のイオン選択性の変化

ペプチド毒素テルチアピン-Q（TPN-Q）はミツバチ毒素のテルチアピンの誘導体であり、内向き整流カリウムチャネルの細胞外領域の中心部と結合し、チャネル活性を阻害することが知られている（図 4a）[4]。TPN-Q（1 μM）を細胞外から投与し、Gly156Ser 変異体のイオン選択性の変化を測定した。その結果、TPN-Q の投与により K^+に比して Li^+、Na^+及び MA^+の電流相対量が大いに増加したことが観察された（図 4b）。また、K^+と Rb^+と Cs^+電流に対する抑制効果が強く、Li^+と Na^+と MA^+電流に対する抑制効果が弱いことが明らかとなった（図 4c）。以上の結果から、K^+と Rb^+と Cs^+は主にイオン選択性フィルターの構築するイオン透過路を通り抜け、Li^+と Na^+と MA^+では TPN-Q の阻害のない第二のイオン透過路を通過することが示唆された（図 4a）。

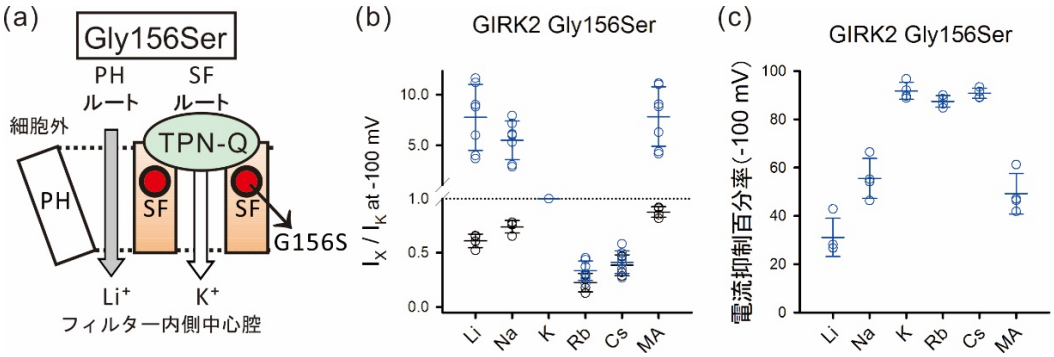


図 4. TPN-Q の投与による Gly156Ser 変異体のイオン選択性の影響

a）TPN-Q は細胞外側から SF ルートのイオン通過を阻害する。

b）TPN-Q 投与前（黒○）と投与後（青○）の各 1 価陽イオン対 K^+の電流量比率。

c）TPN-Q の投与による各 1 価陽イオンの電流に対する抑制百分率。

考　察

イオンチャネルの遺伝子の変異による疾患の原因は様々である。例えば、変異によるチャネルの発現量の増減や、膜電位依存性の変化、リガンドに対する感受性の増減、イオン透過性や選択性の変化等分子機能の異常により、重篤な生理機能の異常に繋がる［5］。

本研究では、Keppen-Lubinsky 症候群の原因である GIRK2 チャネルの変異による異常なイオン選択性の制御機構について調べた。イオンチャネルのイオン選択性はイオン選択性フィルターの構造にて決められている［6］。これまでの研究では、GIRK チャネルの変異体のホモロジーモデルを用いてイオン選択性フィルターの構造変化を予測し、変異により K^+とフィルターの結合の安定性が乱れ、異常なイオン選択性に繋がることが推察されている［1, 2］。しかし、この仮説を実証するデータは提示されていない。本研究では、電気生理学的解析を行った結果、Gly156Ser の変異により、Thr154del や Leu173Arg 変異体とは異なる構造変化が起こり、通常のイオン選択性フィルターの構築するイオン透過路とは異なるイオン選択性を持つ第二のイオン透過路が新たに形成された可能性が示唆された（図 5）。イオン選択性フィルターとその背後に位置するポアヘリックスとの間に親水性アミノ酸残基で囲む空間があり、イオンや水分子はこのポケットにアクセスできる可能性があると想定される。GIRK2 野生型の場合、イオンや水分子はこのポケットに溜まれるが、フィルター内側の中心腔へ通り抜けない。Gly156Ser の変異により、ポアヘリックスとイオン選択性フィルターの構造が変化し、イオンや水分子はこのポケットを通り抜け、フィルター内側の中心腔に流れるようになる。また、Thr154del や Leu173Arg の変異により、イオン選択性フィルターの構築するイオン透過路の構造が変化し、K^+に比して半径が少し大きめの Rb^+との結合が安定できるようになる。しかし、ブロッカーの投与によるイオン選択性の変化が観察されないことから、Thr154del や Leu173Arg 変異体の第二のイオン透過路の形成は認めない。

本研究により、従来と全く異なる解釈である「新規イオン透過路の形成による異常のイオン選択性の発生」の新規制御機構の可能性が示唆された。この研究結果を基に、今後はさらに第二のイオン透過路の選択性阻害薬の同定を行い、Gly156Ser 変異体のモデル動物 *Weaver* マウスを用いて阻害薬の治療効果を検証する。

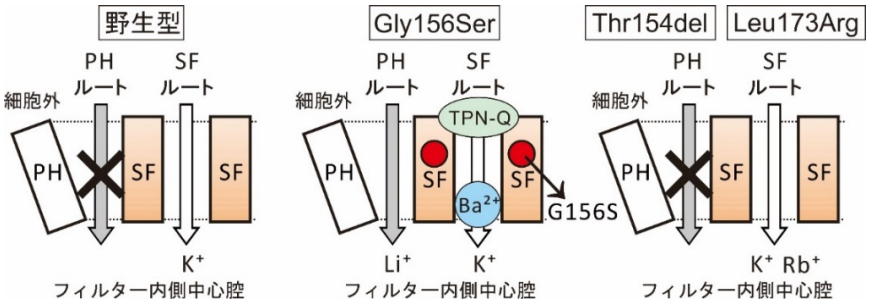


図 5. GIRK2 チャネルの異変による異常なイオン選択性の構造基盤の想定モデル
野生型はイオン選択性フィルター（SF）の構築するイオン透過路のみ存在し、第二のルート（ポアヘリックス（PH）ルート）には存在しない。Gly156Ser 変異体はSFルートとPHルートを持ち、両ルートは異なるイオン選択性を示す。Thr154del変異体とLeu173Arg変異体はSFルートのみ存在しているが、野生型とは異なる構造があり、ルビジウムイオンに対する透過性が特に高い。

共同研究者

本研究の共同研究者は、自然科学研究機構生理学研究所神経機能素子研究部門大学大学院の久保義弘先生である。

文　献

1) Masotti A, Uva P, Davis-Keppen L, Basel-Vanagaite L, Cohen L, Pisaneschi E, Celluzzi A, Bencivenga P, Fang M, Tian M, Xu X, Cappa M, Dallapiccola B. Keppen-Lubinsky Syndrome is caused by mutations in the inwardly rectifying K+ channel encoded by KCNJ6. Am J Hum Genet. 2015 Feb 5; 96(2): 295–300. PMID: 25620207 DOI: 10.1016/j.ajhg.2014.12.011

2) Horvath GA, Zhao Y, Tarailo-Graovac M, Boelman C, Gill H, Shyr C, Lee J, Blydt-Hansen I, Drögemöller BI, Moreland J, Ross CJ, Wasserman WW, Masotti A, Slesinger PA, Karnebeek C. Gain-of-function KCNJ6 mutation in a severe hyperkinetic movement disorder phenotype. Neuroscience. 2018 Aug 1; 384: 152–164. Epub 2018 May 29. PMID: 29852244 DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.05.031

3) Jiang Y, MacKinnon R. The barium site in a potassium channel by x-ray crystallography. J Gen Physiol. 2000 Mar; 115(3): 269-72. PMID: 10694255 DOI: 10.1085/jgp.115.3.269

4) Doupnik CA, Parra KC, Guida WC. A computational design approach for virtual screening of peptide interactions across K(+) channel families. Comput Struct Biotechnol J. 2014 Nov 7; 13: 85-94. PMID: 25709757 DOI: 10.1016/j.csbj.2014.11.004

5) Imbrici P, Liantonio A, Camerino GM, De Bellis M, Camerino C, Mele A, Giustino A, Pierno S, De Luca A, Tricarico D, Desaphy JF, Conte D. Therapeutic approaches to genetic ion channelopathies and perspectives in drug discovery. Front Pharmacol. 2016 May 10; 7: 121. PMID: 27242528 DOI: 10.3389/fphar.2016.00121

6) Alam A, Jiang Y. Structural analysis of ion selectivity in the NaK channel. Nat Struct Mol Biol. 2009 Jan; 16(1): 35-41. Epub 2008 Dec 21. PMID: 19098915 DOI: 10.1038/nsmb.1537