

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16491

研究課題名（和文）hERGチャネル独自の細胞内ドメイン間相互作用に基づく構造機能連関の解析

研究課題名（英文）Analyses of the structure-function relationship based on the characteristic interaction among the intracellular domains in the hERG channel

研究代表者

糸 慎一郎（Kume, Shinichiro）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：90794579

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：電位作動性カリウムチャネルであるhERGチャネルは、電位センサードメイン（VSD）とポアドメイン（PD）が同じサブユニット間で相互作用する独自の構造「Non-domain swapped構造」をとる。本研究では、この構造的特徴に伴う細胞内ドメイン間の独自の相互作用の有無を解析し、VSD-PD間のS4-S5リンカードメインとC末端に存在するCリンカードメインの間に物理的な相互作用が存在する可能性を見出し、hERGチャネルの特徴的な遅い脱活性化の制御機構との関係性を明らかにした。

その他、本研究の実験手法等を応用し、hERGチャネルに対する薬剤投与の影響を解析し、成果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

hERGチャネルはヒト心室筋の活動電位における再分極の調節に関与しており、心臓の正常な生理機能において極めて重要な役割を担う。そのため、遺伝子の異常や薬剤の投与により機能不全が生じると、心室性不整脈や突然死のリスクを伴うQT延長症候群のような疾患の原因となり得ることが知られている。本研究により得られたhERGチャネルの構造機能連関に関する成果や薬剤投与の影響に関する成果は、イオンチャネル研究の発展に役立つだけでなく、このようなヒト心臓の疾患に対する予防や治療への貢献も期待できる。

研究成果の概要（英文）：The hERG channel is a member of voltage-gated potassium channel and has a unique assembly "Non-domain swapped structure" which supposedly interacts between the voltage sensor domain (VSD) and a pore domain (PD) in the same domain. In this study, I demonstrated the features of the intracellular domains associated with this characteristic structure; the direct interaction of S4-S5 linker domain located between VSD and PD with C-linker domain in C-terminal region, which suggests that this intracellular interaction plays an important role in slow deactivation. In addition, I applied the experiment technique of this study and analyzed the effects of drugs on this channel.

研究分野：イオンチャネルの分子生理学

キーワード：イオンチャネル hERGチャネル 構造機能連関 分子生物学 電気生理学

## 1. 研究開始当初の背景

電位作動性 K<sup>+</sup>チャンネル(Kv)ファミリーに属する human Ether-a-go-go Related Gene(hERG)チャンネルは、他の Kv と比較して開状態から閉状態への遷移(脱活性化)が極めて遅く、同ファミリーの Shaker チャンネルが数ミリ秒であるのに対して数 100 ミリ秒～数秒を要する。この遅い脱活性化の制御機構には、他の Kv とは異なる hERG チャンネル独自の構造機能連関の存在が考えられる。

hERG チャンネルは、他の Kv と同様に、電位センサードメイン(VSD、S1-S4)とポアドメイン(PD、S5-S6)から成る 6 回膜貫通ヘリックスを基本単位としたサブユニットが、PD を中心に 4 量体を形成する。一般的に、Kv の VSD と PD は S4-S5 リンカードメイン(S4-S5LD)を介して細胞内側で繋がっており、VSD は別のサブユニットの PD と相互作用する「Domain swapped 構造」をとる(図 1)。この構造では、膜電位に応じて VSD の電位センサー(S4)が構造変化することで、S4-S5LD は S4 に引っ張られるように S5 と S6 の構造変化を引き起こし、活性化ゲートを制御するというモデルが考えられている。

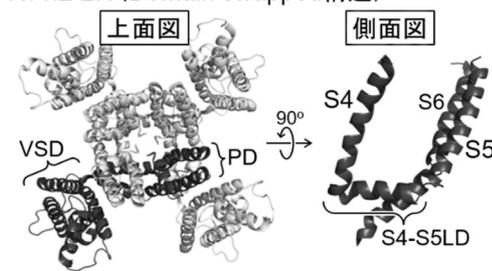
しかし近年の構造解析の結果から、hERG チャンネルは他の Kv とは異なり、VSD と PD が同じサブユニット間で相互作用する「Non-domain swapped 構造」をとることが明らかになった(図 1)。この独自の構造に伴い、S4-S5LD は他の Kv より短く、また明確なヘリックス構造をとらない。さらに、hERG チャンネルは S4-S5LD の部位で分子生物学的に切断しても、VSD を含む前半部分と PD を含む後半部分を共発現させることで依然として膜電位依存性を示す。そのため hERG チャンネルは、他の Kv で見られる従来のモデルが当てはまらない。一方で、S4-S5LD の変異が膜電位依存性に影響し、また遅い脱活性化を著しく加速させることから、S4-S5LD がゲーティング機構において重要な役割を持つことは確かである。

それでは、Non-domain swapped 構造をとる hERG チャンネルには、S4-S5LD を介した独自のゲーティング機構が存在するのだろうか。研究代表者はこれまでに、細胞内ドメインである S4-S5LD が、同じく hERG チャンネルに特徴的な細胞内ドメインの 1 つである C リンカードメイン(CLD)と直接的に相互作用し、その相互作用が遅い脱活性化の制御に重要である可能性を見出した。この CLD は活性化ゲートの直下に位置することから、hERG チャンネルには、電位センサー(S4)の動きが S4-S5LD から CLD の構造変化を介して伝播され、活性化ゲートを制御するという新しいゲーティング機構の存在が示唆される。

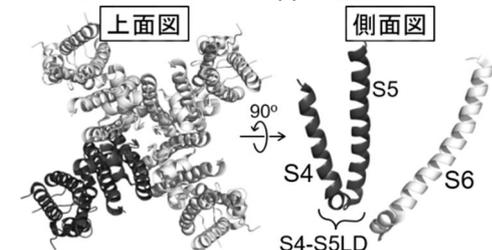
## 2. 研究の目的

本研究では、Non-domain swapped 構造に伴う S4-S5LD と CLD 間の相互作用に焦点を当て、相互作用に最も重要な部位(アミノ酸ペア)はどこか、相互作用部位がチャンネルの開閉状態に依存して構造変化するか、また、この相互作用が遅い脱活性化の制御機構にどのように関与するかを明らかにするため、膜電位固定下でのシステイン架橋形成実験を主とした分子生物学・電気生理学的な解析を行い、hERG チャンネル独自の構造機能連関の解明を目指す。

図 1 4 量体時における膜貫通領域の構造  
Kv1.2-2.1(Domain swapped構造)



hERG (Non-domain swapped構造)



Kv1.2-2.1(上)と hERG チャンネル(下)の 4 量体形成時の上面図、および S4-S5LD 周辺の側面図。いずれも 1 つのサブユニットのみ濃灰色、その他 3 つのサブユニットを薄灰色で示す。

### 3. 研究の方法

本研究では、hERG チャンネルの S4-S5LD と CLD との間で形成される相互作用を解析するため、両ドメインにシステイン (Cys) を導入した二重変異体を作製し使用する。これを HEK293 細胞に発現後、細胞内を強制的に酸化的環境にし、その際のジスルフィド結合 (S-S 結合) 形成の様子を表現型の変化 (電流トレースの変化など) として、主にパッチクランプ法による測定・解析を行う。S-S 結合の形成は、両ドメインが物理的に相互作用し得る位置にあることを示唆する。この方法により、最も重要となる相互作用部位、膜電位依存的なチャンネルの構造変化に伴う、相互作用部位の位置・距離関係の変化、および、遅い脱活性化の制御機構に重要とされる他のドメインとの関係性を解析し、「研究の目的」の内容の遂行を目指す。

### 4. 研究成果

#### (1) S4-S5LD と CLD との間で形成される相互作用に関する解析

S4-S5LD と CLD の Cys 二重変異体への酸化剤添加は、hERG チャンネル電流を変化させた。

細胞内は基本的に還元的環境であり、強制的に酸化的環境にすることで、ごく近傍に位置する2つの Cys のチオール基の間でカップリングが起き、S-S 結合が形成される。S-S 結合はドメイン同士を強固に繋ぐため、ゲーティングに伴うチャンネルの構造変化に支障をきたすと予想される。

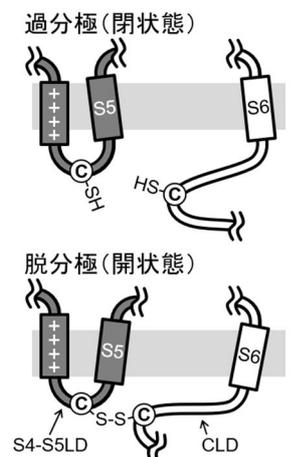
S4-S5LD と CLD 間の相互作用への関与が示唆されるアミノ酸を網羅的に Cys に置換し、各 Cys 単変異体を組み合わせた Cys 二重変異体を作製したところ、いくつかの組合せにおいて電流トレースの変化が見られた。例として、S4-S5LD のグルタミン酸 (Glu) 544 と CLD のアルギニン (Arg) 681 の2つのアミノ酸を Cys に置換した二重変異体においては、細胞を過分極させた状態で酸化剤を添加した場合、わずかな脱活性化の減速が観察された。一方で、細胞を脱分極させた状態で酸化剤を添加した場合は、電流量の有意な増加と脱活性化の著しい減速が観察された。これらの結果は、Glu544 と Arg681 が S-S 結合を形成できるほど近傍に位置すること、その位置関係はチャンネルの状態に依存して変化すること、また、S4-S5LD と CLD 間に架橋を形成することで遅い脱活性化を再現できることを示唆する (図 2)。したがって、S4-S5LD と CLD 間には直接的な相互作用が存在し、それがチャンネル状態依存的な構造変化 (ゲーティング機構) に関与している可能性が示された。

S4-S5LD と CLD の電荷をもつ各アミノ酸への変異導入は、遅い脱活性化の速度に影響した。

負電荷をもつ S4-S5LD の Glu544 について、正電荷をもつリジン (Lys) への置換は、脱活性化を著しく加速させた。また、CLD の Glu698 と Glu699 を同時に Lys に置換した二重変異体も、脱活性化の著しい加速を示した。しかし、これらの変異を合わせた三重変異体を作製した場合、脱活性化の速度は野生型に似た程度まで回復した。これらの結果は、S4-S5LD と CLD との間に静電的な相互作用が存在することを示唆する。したがって、その静電相互作用部位への変異の導入が S4-S5LD と CLD の位置関係を変化させることで、脱活性化の速度に影響している可能性が示された。

以上のように、hERG チャンネルの S4-S5LD と CLD との間に存在する相互作用は膜電位の変化に依存して構造変化しており、遅い脱活性化の制御機構に重要な役割をもつことが示唆された。これらの結果を踏まえ、今後とも hERG チャンネルの遅い脱活性化に関する構造機能連関の詳細の解明を目指したい。

図 2 S-S 結合の模式図



S-S 結合形成は、チャンネルの開閉状態の構造変化に依存している。

## (2) 抗悪性腫瘍薬であるゲムシタピンの hERG チャンネルへの影響の解析

上述した当初の研究計画の他に、本研究ではパッチクランプ法を使用した測定・解析を応用することにより、hERG チャンネルなどのヒト心臓機能に重要とされるイオンチャンネルの研究も行ってきた。特に hERG チャンネルに関しては、心室筋の活動電位における再分極の調節に関与しており、心臓の正常な生理機能において極めて重要な役割を担う。そのため、遺伝子の異常や薬剤の投与により機能不全が生じると、不整脈や突然死のリスクを伴う QT 延長症候群のような疾患の原因となり得る。

ゲムシタピンは抗悪性腫瘍薬であり、特に非小細胞肺癌や膀胱癌、乳癌などの実質臓器における悪性腫瘍の治療に使用される。この薬物はピリミジン拮抗薬に分類され、癌細胞が増殖する際の DNA 合成を阻害するなど、癌細胞を死滅させることにより抗腫瘍効果を示す。しかし、正常な細胞にも作用してしまうため、吐き気や嘔吐、下痢などの消化器系の症状や、白血球をはじめ赤血球や血小板の減少といった造血性障害のほか、肝機能や腎機能の低下などの副作用が知られている。また、ゲムシタピン治療中の患者では、心筋虚血や心膜疾患、心不全をはじめ、心房細動などの不整脈といった循環器系への副作用も報告されており、少数ではあるがゲムシタピンと心電図における QT 間隔延長との関係性も報告されている。しかし、ゲムシタピンによって誘発される不整脈などの機序は、現在まで不明のままである。

本研究では、ゲムシタピンによる QT 間隔延長などの不整脈の主要な原因が hERG チャンネルの機能阻害に起因すると仮定し、HEK293 細胞を用いたパッチクランプ法を主とした解析を行うことにより、ゲムシタピンによる不整脈の発生機序の解明を目指した。

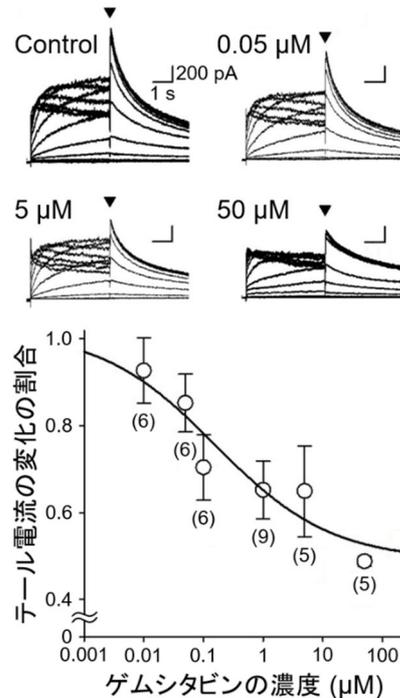
培地への長期間(24 時間)のゲムシタピン添加は、hERG 電流を減少させた。

hERG チャンネルを安定発現する HEK293 細胞の培地にゲムシタピンを添加し、パッチクランプ法によりその電流量を測定したところ、短期間(5 分間)の添加による影響は見られなかった。一方で、長時間(24 時間)の場合、添加したゲムシタピンの濃度に依存して hERG チャンネル電流が有意に減少することが分かった(図 3)。これらの結果から、ゲムシタピンは hERG チャンネルを直接的に阻害するのではなく、hERG チャンネルの発現系を阻害することでその膜発現量を減少させ、hERG チャンネル電流量を減少させている可能性が示唆された。

ゲムシタピンは hERG チャンネルの糖鎖修飾を阻害することにより、その膜発現量を減少させた。

上述の hERG チャンネル発現 HEK293 細胞に対して、ゲムシタピンを添加すると共に転写、翻訳、糖鎖修飾の各段階を阻害する薬物をそれぞれ添加し、膜発現量への影響を電流量としてパッチクランプ法により測定した。その結果、長時間のゲムシタピン添加は糖鎖修飾の過程を阻害し、膜発現量を減らすことにより hERG チャンネル電流量を減少させていることが示された。

図 3 ゲムシタピンによる電流量の減少



上図は、ゲムシタピンを添加していない Control、および各濃度で添加した場合の 24 時間後の電流トレースを示す。図中の ▼ はテール電流のピークを示す。

下図は、各濃度でゲムシタピンを添加した際のテール電流のピーク値を Control と比較した場合の割合を示す。各濃度における実験サンプル数は括弧内に記載する。

以上のように、培地への長期間のゲムシタピン添加は、培養細胞における hERG チャンネルの糖鎖修飾の過程を阻害することでその膜発現量を減らし、結果として hERG チャンネル電流量を減少させていることが示唆された。hERG チャンネル電流量の減少は心室筋の活動電位における再分極の速度を低下させ、心電図における QT 間隔の延長を引き起こす。したがって、本研究で得られた結果は、ゲムシタピンによる QT 間隔延長などの不整脈の主要な原因が hERG チャンネルの機能阻害に起因するという当初の仮定と矛盾しない。

ここまでの解析はヒト由来の培養細胞を用いて実施されたが、倫理上の理由から実際のヒト心臓での実験は不可能である。しかし興味深いことに、生体(ラット新生獣)から得られた心筋細胞を使用して解析した場合でも、本研究の成果と類似した結果が得られている。したがって、本研究で明らかになったゲムシタピンによる不整脈誘発のメカニズムは、同じ哺乳類であるヒトの心臓においても類似の機序を介していると推測できる。

本研究を通じて得られた結果は、hERG チャンネル独自の構造機能連関の理解を深めるだけでなく、心疾患誘発の原因となる突然変異や薬物の予測をより容易にし、心疾患へのリスクの軽減やその予防・治療などへの貢献も期待できる。そのため、今後とも更なる研究の発展を目指したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wei Mengyan, Wang Pu, Zhu Xiufang, Morishima Masaki, Liu Yangong, Zheng Mingqi, Liu Gang, Osanai Hiroki, Yoshimura Kenshi, Kume Shinichiro, Kurokawa Tatsuki, Ono Katsushige	4. 巻 18
2. 論文標題 Electrophysiological evaluation of an anticancer drug gencitabine on cardiotoxicity revealing down-regulation and modification of the activation gating properties in the human rapid delayed rectifier potassium channel	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0280656
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0280656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wang Pu, Zhu Xiufang, Wei Mengyan, Liu Yangong, Yoshimura Kenshi, Zheng Mingqi, Liu Gang, Kume Shinichiro, Kurokawa Tatsuki, Ono Katsushige	4. 巻 36
2. 論文標題 Disruption of asparagine-linked glycosylation to rescue and alter gating of the NaV1.5-Na <sup>+</sup> channel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 589 ~ 596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00380-020-01736-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wang Pu, Wei Mengyan, Zhu Xiufang, Liu Yangong, Yoshimura Kenshi, Zheng Mingqi, Liu Gang, Kume Shinichiro, Morishima Masaki, Kurokawa Tatsuki, Ono Katsushige	4. 巻 11
2. 論文標題 Nitric oxide down-regulates voltage-gated Na <sup>+</sup> channel in cardiomyocytes possibly through S-nitrosylation-mediated signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-90840-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu Yangong, Wang Pu, Ma Fangfang, Zheng Mingqi, Liu Gang, Kume Shinichiro, Kurokawa Tatsuki, Ono Katsushige	4. 巻 69
2. 論文標題 Asparagine-linked glycosylation modifies voltage-dependent gating properties of CaV3.1-T-type Ca <sup>2+</sup> channel	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 335-343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12576-018-0650-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 魏 孟巖、糸 慎一郎、小山内 博基、吉村 健司、黒川 竜紀、小野 克重
2. 発表標題 細胞内Ca <sup>2+</sup> はMEK1,2-ERK1,2経路およびCaM-CaMK経路を介する転写制御作用によってhERGチャネル電流を調節する
3. 学会等名 第73回西日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 魏 孟巖、小山内 博基、吉村 健司、糸 慎一郎、黒川 竜紀、小野 克重
2. 発表標題 心筋細胞内Ca <sup>2+</sup> 濃度の上昇はPKCとCaMKシグナルを介してhERGチャネル発現を制御する
3. 学会等名 第30回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mengyan Wei, Kenshi Yoshimura, Shinichiro Kume, Tatsuki Kurokawa, Katsushige Ono
2. 発表標題 An anti-cancer drug gemcitabine inhibits and modifies N-glycosylation of the hERG channel resulting in a suppression of I <sub>hERG</sub>
3. 学会等名 第72回西日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinichiro Kume, Xiufang Zhu, Pu Wang, Mengyan Wei, Kenshi Yoshimura, Tatsuki Kurokawa, Katsushige Ono
2. 発表標題 Mechanisms of hERG channel current inhibition by an anticonvulsant valproic acid
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Xiufang Zhu, Pu Wang, Mengyan Wei, Kenji Yoshimura, Shinichiro Kume, Tatsuki Kurokawa, Katsushige Ono
2. 発表標題 An anticonvulsant valproate decreases hERG K <sup>+</sup> channel current IKr through the histone deacetylase inhibition
3. 学会等名 第71回西日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Pu Wang, Yangong Liu, Mengyan Wei, Shinichiro Kume, Tatsuki Kurokawa, Katsushige Ono
2. 発表標題 Asparagine-linked glycosylation as a key regulator of gating properties in cardiac Nav1.5 channels
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mengyan Wei, Yangong Liu, Pu Wang, Shinichiro Kume, Tatsuki Kurokawa, Katsushige Ono
2. 発表標題 -mannosidase I-dependent N-linked glycosylation modifies distinct gating properties of the hERG channel
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yangong Liu, Pu Wang, Mengyan Wei, Shinichiro Kume, Tatsuki Kurokawa, Katsushige Ono
2. 発表標題 N-glycosylation inhibition attenuates heart automaticity by deranging T-type Ca <sup>2+</sup> current and HCN current
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shinichiro Kume, Yangong Liu, Pu Wang, Tatsuki Kurokawa, Katsushige Ono
2. 発表標題 Asparagine-linked glycosylation modifies voltage-dependent gating properties of Cav3.1-T-type Ca <sup>2+</sup> channel
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yangong Liu, Pu Wang, Shinichiro Kume, Tatsuki Kurokawa, Katsushige Ono
2. 発表標題 N-glycosylation inhibition attenuates heart automaticity by deranging T-type Ca <sup>2+</sup> current and HCN current
3. 学会等名 第29回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桑 慎一郎、下村 拓史、立山 充博、久保 義弘
2. 発表標題 hERGチャネルの細胞内ドメインに関するFRET解析を用いた構造機能連関の研究
3. 学会等名 第70回西日本生理学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------