

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07304

研究課題名（和文）チャンネルのイオン選択性異常を是正する作用薬の同定：遺伝性チャンネル病の治療に向けて

研究課題名（英文）Identification of novel drug on the regulation of abnormal ion selectivity of channels: toward the therapy for channelopathy

研究代表者

陳 以珊 (Chen, I-Shan)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40757770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：GIRKチャンネルの遺伝子変異による異常なイオン選択性は過剰なNa⁺とCa²⁺流入による細胞死を引き起こす。このイオン調節機能の障害は先天性疾患の原因である。本研究では、GIRK2の病態変異体の解析を行い、異常なイオン選択性のメカニズム及び新規作用薬の同定を行った。その結果、イオン選択性フィルタが変異したG156S変異体では、通常のK⁺透過路とは別に、Na⁺やLi⁺が通過する第二のイオン透過路が新たに形成されたことがわかった。また、第二透過路の特異的阻害薬を探索するための化合物ライブラリーのスクリーニングを行った結果、異常な電流を阻害する新規薬物を見出し、イオン選択性調節への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、K⁺チャンネルの遺伝子変異による疾患における異常なイオン流入は、イオン選択性フィルタのゆがみ等が原因だと考えられているが、本研究で、チャンネルの第二のイオン透過路の存在が明らかになったことから、この第二のイオン透過路を阻害することにより異常なイオン流入を防ぐ新規治療薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Abnormal ion selectivity due to genetic mutations in GIRK channels causes cell death due to excessive Na⁺ and Ca²⁺ influx. Some congenital diseases are caused by such disorders of ion regulation function. In the present study, we investigated pathological mutants of GIRK2 to reveal the mechanism of abnormal ion selectivity and identify novel drugs. Our results demonstrate that a novel Na⁺, Li⁺-permeable pathway (the second pathway) exists in a selectivity filter (SF) mutant, GIRK2 G156S, in addition to the conventional ion conducting pathway formed by SF. To identify the inhibitors of the second permeation pathway, we screened a compound library and found some novel drugs that selective inhibits the abnormal currents. These novel drugs are potential to be applied to the regulation of ion selectivity.

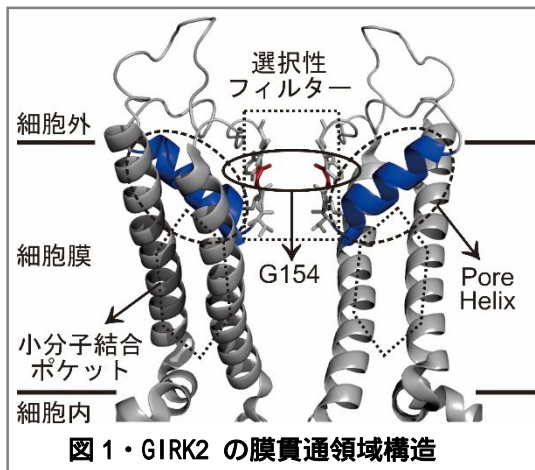
研究分野：イオンチャンネル・受容体

キーワード：イオン選択性

1. 研究開始当初の背景

イオンチャネルのイオン選択性は細胞の膜電位と電解質バランスの調節において、重要な特性である。G 蛋白質活性型内向き整流性 K^+ (GIRK) チャネルの遺伝子変異による異常なイオン選択性は、過剰な Na^+ と Ca^{2+} の流入による細胞死を引き起こす。このような変異した GIRK チャネルによるイオン調節機能の障害は、Keppen-Lubinsky 症候群 (KPLBS) や原発性アルドステロン症 (APA) 等先天性疾患の原因である。

GIRK (GIRK1 ~ GIRK4) チャネルは様々な細胞に分布し、特に神経細胞の興奮や心拍の調節において重要な役割を果たす分子である。正常な GIRK チャネル (野生型) においては、イオン選択性フィルタ (SF) の働きにより、 K^+ が選択的に透過し、 Na^+ はほとんど透過しません。KPLBS や APA の患者から、GIRK2 或は GIRK4 チャネルの SF 領域又はその近辺領域のアミノ酸残基に変異が見つかり (例: 図1、ヒトGIRK2 は Gly154Ser の変異; マウスでは Gly156Ser の変異)、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。



これまでの国内外の研究によって、GIRK チャネルの変異による先天性疾患の分子機構が明らかになったが、いまだにこの異常なイオン選択性を持つ変異体を標的とした作用薬はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、変異したGIRKチャネルの異常なイオン選択性を是正する新規メカニズムによる作用薬の探索である。我々は、既存のWeaver変異マウスが有するGIRK2 Gly156Ser 変異体の *in vitro* 発現系での解析を重点的に行い、異常なイオン選択性のメカニズムの解明及び新規作用薬の同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) 二電極膜電位固定法による各種 GIRK2 チャネル病態変異体のイオン選択性の解析

マウス GIRK2 チャネルの SF の Gly156Ser 変異体と Thr154 欠損変異体、Pore helix (PH) の Leu173Arg 変異体、細胞外ループの Thr163Ala 変異体等の先天性疾患に関連する変異体を作成し、種々の 1 価陽イオンの K^+ に対する透過性の比較を、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に解析した。

(2) パッチクランプ法による単一 GIRK2 Gly156Ser チャネルのイオン透過路の開閉の解析

マウス線維芽細胞を発現系として用い、単一 GIRK2 Gly156Ser 変異体チャネルが開口時にイオン透過路に透過するそれぞれのイオンの電流特性をパッチクランプ法により測定を行った (カナダ・University of British Columbia・Fedida 研究室より協力)。

(3) 小分子ライブラリーのスクリーニングによるイオン選択性調節モジュレーター探索

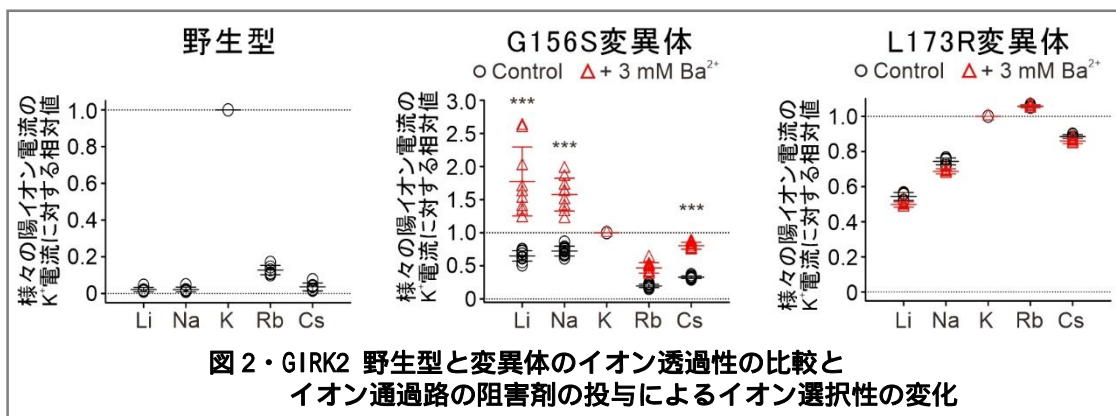
日本医療研究開発機構・創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (AMED-BINDS) から化合物ライブラリーを取得して、アフリカツメガエル卵母細胞の高効率 *in vitro* 解析系を利用して、GIRK2 Gly156Ser 変異体の異常な電流に対する化合物の抑制効果を測定した。

4. 研究成果

(1) 各種 GIRK2 チャネル病態変異体のイオン選択性

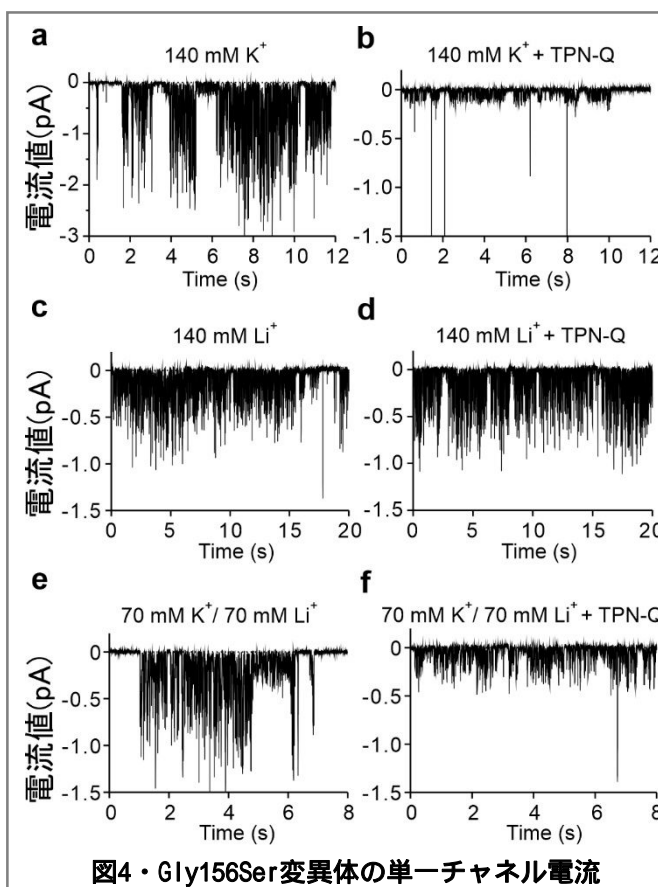
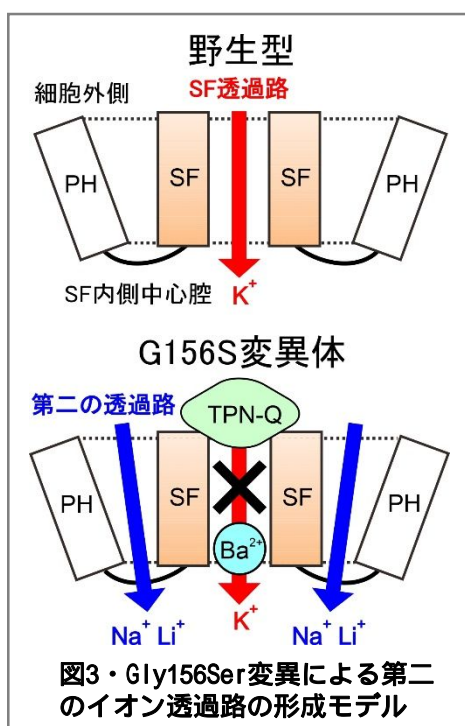
図2は電気生理学的に解析した結果である。野生型 GIRK2 チャネルは K^+ が選択的に透過し、 Li^+ と Na^+ はほとんど透過しません (図2左側黒丸)。Gly156Ser 変異体は K^+ に比して、 Li^+ と Na^+ に対する選択性が高く (図2中央黒丸)。Leu173Arg 変異体は Rb^+ と Cs^+ に対する選択性が

高いこと（図2右側黒丸）が明らかとなった。Thr154欠損変異体はL173R変異体と類似したイオン選択性を持つ、また、Thr163Ala変異体は野生型と同じ正常な K^+ 選択性が観察された。SFの構築するイオン透過路のブロッカーである Ba^{2+} （図2赤三角）やTPN-Qの投与により、Gly156Ser変異体のイオン選択性が変わり、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、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 K^+ の透過路とは異なるイオン選択性を持つ、 Na^+ や Li^+ が通過する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3）。



(2) GIRK2 Gly156Ser 変異体の第二のイオン透過路の形成

図4はパッチクランプ法を用いて、単一 GIRK2 Gly156Ser チャンネルが透過する K^+ と Li^+ の電流を測定した結果である。 K^+ 電流はTPN-Qにより阻害される一方で（図4aとb）、 Li^+ 電流はTPN-Qを投与しても阻害されにくいことが観察された（図4cとd）。また、 K^+ と Li^+ 両方を細胞外において記録すると、2種の異なるチャンネル活動が記録され（図4e）、 K^+ に相当すると考えられる電流のみがTPN-Qにより阻害されることが観察された（図4f）。これらの結果から、イオン選択性フィルタ透過路とは別の、第二のイオン透過路が変異により形成されていることが明らかになった。また、この第二のイオン透過路はイオン選択性フィルタ（SF）とPore helix（PH）の間に形成されていると考えられる（図3）。この結果は、「イオン選択性の異常は、イオン選択性フィルタのゆがみ、ゆるみによるもの」とされていた、これまでの考えを覆すものである。この研究成果をまとめた原著論文はThe Journal of Physiology 誌に発表した（文献1）。



(3) GIRK2 Gly156Ser 変異体の第二のイオン透過路の阻害薬の探索

GIRK2 Gly156Ser 変異体の Li^+ 電流に対する化合物の抑制効果を指標として、化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、約 40 個の化合物は Li^+ 電流に対して強い抑制効果を示し(図 5)、さらにその中の二つの化合物が K^+ 電流に対しては抑制効果が低いことが観察された(図 5 赤枠)。以上の研究成果から、第二のイオン透過路を選択的阻害する新規薬物による病態変異体チャネルのイオン選択性調節への応用が期待される。

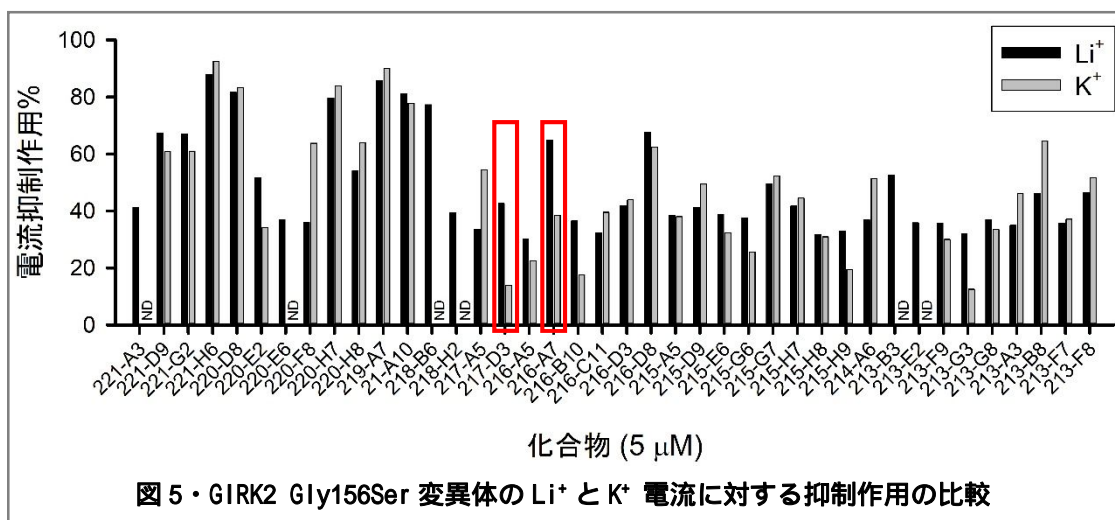


図 5・GIRK2 Gly156Ser 変異体の Li^+ と K^+ 電流に対する抑制作用の比較

(4) まとめ

本研究で、GIRK2 チャネルの変異による重篤な遺伝性疾患における、異常なイオン選択性のメカニズムがわかりました。新たに発見した第二のイオン透過路を阻害すれば、異常なイオン流入が是正できる可能性があり、同定した異常電流阻害薬が新規治療薬の開発につながる成果だと期待できる。

< 引用文献 >

Chen IS, Eldstrom J, Fedida D, Kubo Y. A novel ion conducting route besides the central pore in an inherited mutant of G-protein-gated inwardly rectifying K^+ channel. *The Journal of Physiology*. 600(3):603-622, 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 I Shan Chen, Jodene Eldstrom, David Fedida, Yoshihiro Kubo	4. 巻 600
2. 論文標題 A novel ion conducting route besides the central pore in an inherited mutant of G protein gated inwardly rectifying K+ channel	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 603 ~ 622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP282430	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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshihiro Kubo
2. 発表標題 A novel ion conducting route besides the central pore in an inherited mutant of G-protein-gated inwardly rectifying K+ channel
3. 学会等名 The 39th World Congress of The International Union of Physiological Sciences (IUPS2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 陳以珊、西谷(中村)友重
2. 発表標題 新規GIRKチャネル作用薬の発見と作用機序の解明
3. 学会等名 第114回近畿生理学談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 陳以珊、西谷(中村)友重
2. 発表標題 Effects of glycyrrhizic acid and its metabolite on the GIRK channel activity
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 陳以珊、西谷(中村)友重
2. 発表標題 Effects and underlying mechanisms of bioactive components of licorice on GIRK channel activity
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 陳以珊、久保義弘
2. 発表標題 遺伝性疾患に関連する変異GIRKチャネルのイオン選択性の新規制御機構の解明
3. 学会等名 第113回近畿生理学談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陳以珊、久保義弘
2. 発表標題 GIRK2チャネル遺伝子変異による異常なイオン選択性のメカニズムの解明
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 陳以珊、西谷友重
2. 発表標題 GIRKチャネルとその疾患関連変異体への新規作用薬の同定
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 陳以珊,久保義弘
2. 発表標題 GIRKチャネルの変異による異常なイオン選択性の発生の新規機構の解明
3. 学会等名 第67回中部日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 陳以珊、久保義弘
2. 発表標題 GIRKチャネル遺伝子変異による異常なイオン選択性の新規制御機構
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>生理学研究所プレスリリース：病態変異は第二のイオンの通り道を形成する https://www.nips.ac.jp/release/2021/12/_-_-_.html</p>
--

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
研究協力者	久保 義弘 (Kubo Yoshihiro) (80211887)	生理学研究所・分子細胞生理研究領域・教授 (63905)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	Eldstrom Jodene (Eldstrom Jodene)	University of British Columbia, Canada	
研究協力者	Fedida David (Fedida David)	University of British Columbia, Canada	
研究協力者	西谷 友重 (Nishitani Tomoe)	和歌山県立医科大学	

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		
カナダ	University of British Columbia		