

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月30日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790250

研究課題名（和文）カリウムチャネル機能を制御する新規細胞内生理活性物質探索の新戦略

研究課題名（英文）A New Approach to Searching for the Bioactive Molecules Regulating Potassium Channel

研究代表者

古谷 和春 (FURUTANI KAZUHARU)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40452437

研究成果の概要（和文）：細胞内在性物質のファーマコフォアをインシリコで解析し、薬物と共通するファーマコフォアを有する新規生理活性物質の発見を目指した。スフィンゴシンのファーマコフォアは内向き整流性カリウム（Kir）チャネル阻害薬のファーマコフォアモデルの特徴に適合した。電気生理学的解析によりスフィンゴシンが Kir チャネル阻害作用を持つことを実証した。さらに、細胞においてスフィンゴシンの生合成を刺激することで Kir チャネル機能が抑制されることを示した。スフィンゴシンはカリウムチャネル機能を制御する生理活性物質である可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to explore a novel bioactive molecule that regulate ion channel function by *in silico* screening with a pharmacophore model of its chemical ligands. Sphingosine fits the pharmacophore model for inwardly rectifier potassium (Kir) channel 4.1 blockers. Sphingosine has an inhibitory effect on Kir4.1 channels. When biosynthesis of sphingosine from sphingomyeline via ceramide is stimulated, Kir4.1 channel currents decrease. These results suggest that endogenous sphingolipids inhibit Kir4.1 channels via sphingosine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：内向き整流性カリウムチャネル、ファーマコフォア、スフィンゴ脂質、電気生理学、薬理学

1. 研究開始当初の背景

(1) 内向き整流性カリウムチャネル：

内向き整流性カリウム（Kir）チャネルは細胞膜の電氣的興奮性の制御や細胞膜を超えるカリウム輸送などを担うカリウムチャネルである。Kir チャネルに属する Kir4.1 チャネルはアストログリア細胞に豊富に発現し、そ

の細胞でカリウム輸送を担うことで脳内のカリウムイオン濃度の恒常性を保ち、中枢神経系の機能に関与すると考えられている。当該研究開始時点において、シグナル伝達系や細胞内代謝経路系によるこの Kir4.1 チャネルのダイナミックな機能制御はほとんど理解されていなかった。

(2) Kir チャンネル作用薬の解析：

当該研究課題を実施する以前に、研究代表者らは Kir4.1 チャンネルに対する薬物の作用を系統的に解析した。この研究の成果として、Kir4.1 チャンネルのポア領域と相互作用しチャンネル機能を阻害する薬物の構造活性相関に関する理解が進んだ。阻害薬のファーマコフォアモデルが作成され、リガンドの構造に基づいた Kir4.1 チャンネル阻害作用のインシリコ予測が可能になりつつあった。

(3) 細胞内在性生理活性物質の探索方法：イオンチャンネルなどの膜蛋白質の機能が生理活性物質との相互作用によって制御される。膜蛋白質の細胞外に面した領域に作用する分子の場合、chemical library を用意し、実際に様々な物質をロボットなどを活用して網羅的に投与して、細胞内 Ca²⁺シグナル応答や電気生理学応答を指標に作用評価するハイスループットスクリーニング(HTS)も可能である。しかし細胞質側から作用する分子の場合、物質の膜透過性などが問題となり、HTSには技術的な困難がある。

2. 研究の目的

本研究では、ファーマコフォアの共通性に基づいた薬理作用の予測とその実証研究を実施する。この方法論によりカリウムチャンネル、特に Kir4.1 チャンネルの機能を制御する生理活性物質を新たに同定することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) ファーマコフォア解析：

ファーマコフォアモデルの作成やモデルを使ったインシリコ探索には、分子モデリング・シミュレーションソフト Discovery Studio (accelrys 社製) に統合されたファーマコフォア解析の世界的標準ソフト Catalyst や他のモジュールを使用した。

生理活性物質の探索に virtual library として用いるデータベース (DB) には、無償で提供されている human Metabolome Database (HMDB, human metabolome project より提供、収容構造データ数およそ 6500) を用いた。この DB には糖、アミノ酸、ペプチド、脂質、ヌクレオチド、及びそれらの生合成・代謝過程に産生される中間代謝物の構造が網羅的に含まれている。

(2) イオンチャンネル機能の解析：

培養哺乳類細胞 (HEK293 細胞) あるいはアフリカツメガエル卵母細胞にカリウムチャンネルを異所性に発現させ、パッチクランプ膜電位固定法あるいは二極電極膜電位固定法によりカリウム電流を測定し、チャンネル機能を評価した。

4. 研究成果

(1) ファーマコフォアに基づいた薬物の Kir4.1 チャンネル阻害作用の予測：

生理活性物質の探索を始める前に、薬物のファーマコフォアの解析から薬物の作用予測が可能かまず検討した。薬物構造情報 DB から Kir4.1 阻害薬のファーマコフォアモデルに適合する薬物をインシリコ探索することによって、Kir4.1 チャンネル阻害作用が事前に知られていなかった薬物 (ハロペリドールやベスナリノンなど) が新たに見出された。一方、構造的には Kir チャンネルを阻害する可能性が示唆されるものの、実証研究で作用が認められなかった薬物も探索結果に含まれた。予測と実際の結果が異なった理由としては、分子量の上限や脂溶性の低さなど候補薬物としては排除すべき特性の理解がこの時は十分でなかったと考察された。この予備的研究から薬物構造と作用の関連に対する理解が更に進み、ファーマコフォアモデルの精緻化やインシリコ探索の手法などに関する情報を得ることが出来た。

(2) ファーマコフォアに基づいた細胞内在性物質の Kir4.1 チャンネル阻害作用の予測：

細胞内に存在する分子による Kir チャンネル阻害をインシリコで予測するために、Kir4.1 チャンネル阻害薬のファーマコフォアモデルに適合する分子を human Metabolome Database からインシリコ探索した。結果として、スフィンゴ脂質に属するスフィンゴシン及び類縁代謝物が Kir4.1 チャンネル阻害薬のファーマコフォアモデルに適合する分子として見出され (図 1)、Kir4.1 チャンネル阻害作用を有する可能性が示唆された。



図 1 : Kir4.1 チャンネル阻害薬のファーマコフォアモデルにフィッティングさせたスフィンゴシンの分子構造

Kir4.1 チャンネル阻害薬のファーマコフォアモデルは 3 つの hydrophobic feature (青いメッシュ状の球) と 1 つの positively ionizable feature で構成されている。スフィンゴシンの分子構造は構成する窒素原子を青、酸素原子を赤、炭素分子を濃灰、水素分子を淡灰で表している。スフィンゴシンが阻害活性に必要なファーマコフォアを有することが分かる。

(3) Kir4.1 チャンネルに対するスフィンゴシンの作用の解析：

スフィンゴシンの Kir4.1 チャンネルに対する作用を解析した。Kir4.1 チャンネルを発現させた HEK293 細胞から inside-out パッチ、もしくは

outside-out パッチを作成し Kir チャンネルを流れるカリウム電流を測定しながら、細胞質側もしくは細胞外側にスフィンゴシンを投与して効果を解析した。10 μM スフィンゴシンの細胞質側へ投与により Kir4.1 チャンネル電流は抑制されるが、細胞外への投与ではほとんど抑制されなかった (図 2、図 3)。この結果より、スフィンゴシンが予測通りに Kir4.1 チャンネルを阻害することが明らかとなり、またスフィンゴシンの受容部位はイオンチャンネルの細胞質に面した領域に存在すると考えられた。

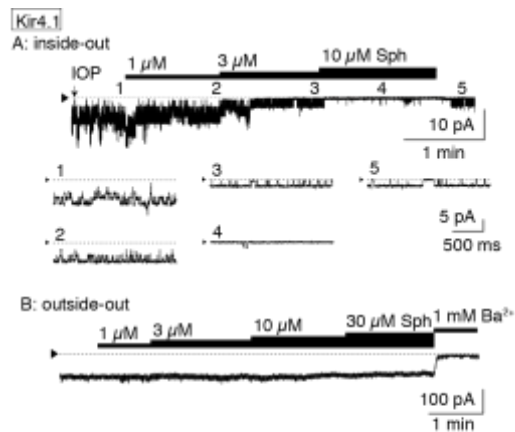


図 2: スフィンゴシンの投与による Kir チャンネル電流の抑制

Kir4.1 チャンネル電流をパッチクランプ法の inside-out patch (A) および outside-out patch (B) 条件下で測定している。A: 細胞質側にスフィンゴシン (Sph) を投与した時に濃度依存的な Kir4.1 電流の抑制が観察される。上段の記録の数字を付してある位置を拡大した記録が中段になる。B: 細胞外に Sph を投与しても電流の阻害は見られないが、Kir チャンネル阻害薬 Ba²⁺ を投与すると阻害される。

(4) 他の Kir チャンネルに対するスフィンゴシンの作用の解析:

Kir4.1 チャンネルを阻害する薬物の多くは同じファミリーに属する他の Kir チャンネル、特に薬物受容部位の構造がアミノ酸レベルで類似している Kir2.1 チャンネルに対して同じような強度で阻害することが知られている。Kir4.1 チャンネル以外の Kir チャンネルに対するスフィンゴシンの作用を解析し、Kir2.1 チャンネルや Kir1.1 チャンネルの機能も抑制することが分かった。スフィンゴシンによる Kir2.1 チャンネル電流抑制の IC₅₀ は 1.2 μM (細胞質側に投与時) であり、他の Kir チャンネルも数 μM のオーダーであった (図 3)。

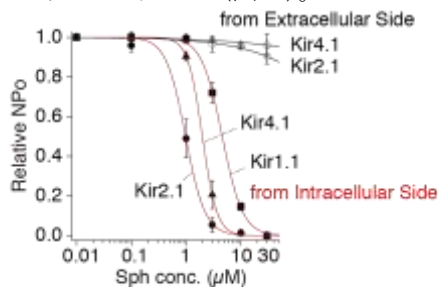


図 3: スフィンゴシンによる Kir チャンネル電流の抑制の濃度依存性

(5) スフィンゴ脂質シグナル伝達系による Kir チャンネル機能制御の解析:

精製されたスフィンゴシンの外因的な投与ではなく、内因性スフィンゴシンによって Kir チャンネルの阻害がおこるか調べるために、細胞においてスフィンゴシンの生合成を刺激する実験を行った。通常、細胞において最も豊富に存在するスフィンゴ脂質は細胞膜のスフィンゴミエリンであり、スフィンゴシンはスフィンゴミエリンからセラミドを介して代謝的に生合成される。スフィンゴミエリンの加水分解により数分間にわたって Kir4.1 チャンネル電流は減少を続ける (図 4 A)。さらに、この電流減少はスフィンゴシンの生合成経路に対する薬理的阻害により抑制された (図 4 B, C)。つまり、細胞膜のスフィンゴミエリンの分解によって引き起こされる内因性スフィンゴ脂質シグナル伝達が Kir チャンネル機能を負に制御することを発見した。

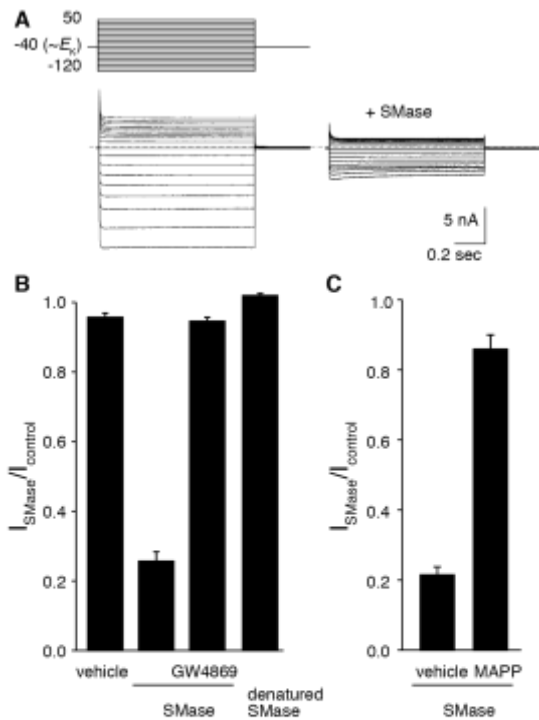


図 4: SMase による Kir4.1 電流の抑制

HEK293 細胞に発現させた Kir4.1 電流を Whole-cell 記録している。A: スフィンゴミエリン分解酵素スフィンゴミエリナーゼ (SMase) の濃度により電流が減少する。B: -80 mV の pulse end における SMase の効果を示す。SMase による Kir4.1 電流の抑制は SMase 阻害薬 GW4869 (10 μM) で抑えられ、また熱変性させた SMase では電流抑制は見られない。C: セラミドからスフィンゴシンを合成する酵素セラミダーゼの阻害薬 MAPP (10 μM) によって SMase による Kir4.1 電流抑制は抑えられる。

(6) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望:

① 生理活性物質の同定やその作用の解明は生命現象の分子機構の理解、病気の分子機構の理解、そして治療ターゲットの発見に繋がる。今回の研究の第一の成果として、生理活

性物質の探索に計算機を用いた次世代の方法論を提唱できたことにある。作用が既知な薬物のファーマコフォアをまずモデル化し、次いでそのファーマコフォアを有する生体内物質をインシリコ探索することで、論理的に生理活性物質候補物質を見つけることが出来る。現在においては、薬物のファーマコフォア研究は今回着目したカリウムチャンネルに限らず、様々なシグナル伝達分子に関して実施されている。作成されたファーマコフォアモデルを再利用することで新たな細胞機能、およびシグナル伝達の制御機構を見つけることが出来る可能性がある。

② スフィンゴ脂質シグナル伝達系を活性化するホルモンや伝達物質に関する研究が進められている。今回の研究は、スフィンゴ脂質シグナル伝達系の下流でカリウムチャンネルが標的となる可能性を初めて示唆している(図5)。今回の研究の成果に立脚し、スフィンゴ脂質シグナル伝達系の理解がさらなる研究によって深められていくと期待される。

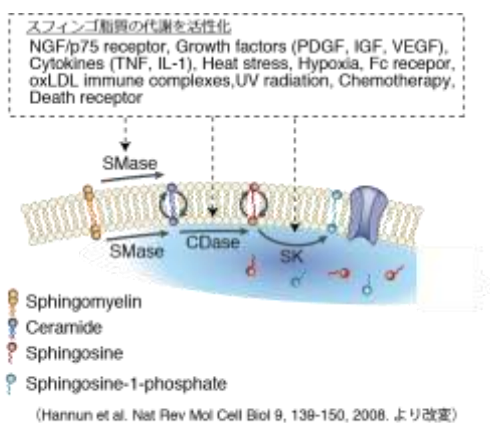


図5: 新たに示唆されたスフィンゴ脂質による Kir チャンネル制御

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

(1) Daisuke Kamimura, Tomohito Ohtani, Yasushi Sakata, Toshiaki Mano, Yasuharu Takeda, Shunsuke Tamaki, Yosuke Omori, Yasumasa Tsukamoto, Kazuharu Furutani, Yutaka Komiyama, Masamichi Yoshika, Hakuo Takahashi, Toshio Matsuda, Akemichi Baba, Satoshi Umemura, Takeshi Miwa, Issei Komuro, Kazuhiro Yamamoto. Ca²⁺ entry mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger as a new therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction. *European Heart Journal*. in press, 2012. (査読有り)

(2) Yuko Yamakawa, Kazuharu Furutani, Atsushi Inanobe, Yuko Ohno, Yoshihisa Kurachi. Pharmacophore modeling for hERG channel facilitation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 418(1), 161-166, 2012. (査読有り)

(3) Kazuharu Furutani, Yuko Yamakawa, Atsushi Inanobe, Miki Iwata, Yuko Ohno, Yoshihisa Kurachi. A mechanism underlying compound-induced voltage shift in the current activation of hERG by antiarrhythmic agents. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 415(8), 141-146, 2011. (査読有り)

[学会発表] (計19件)

(1) 古谷和春、倉智嘉久、スフィンゴ脂質による内向き整流性カリウムチャンネル機能制御、第89回日本生理学会大会、2012年3月29日、長野県松本文化会館(長野県)

(2) Kazuharu Furutani, Kunichika Tsumoto, Yoshihisa Kurachi. Antiarrhythmic Agents Can Facilitate Voltage-Dependent Activation of hERG Potassium Channel、第76回日本循環器学会学術集会、2012年3月16日、福岡国際会議場(福岡県)

(3) 古谷和春、倉智嘉久、スフィンゴ脂質は Kir チャンネル機能を制御する、第85回日本薬理学会年会、2012年3月14日、国立京都国際会館(京都府)

(4) Yuko Yamakawa, Kazuharu Furutani, Atsushi Inanobe, Yoshihisa Kurachi. The character of compounds facilitating hERG channel activation. The 1st HD Physiology International Symposium: Integrative multi-level systems biology for in silico cardiology and pharmacokinetics、2012年1月21日、東京大学武田ホール(東京都)

(5) Kazuharu Furutani, Yuko Yamakawa, Atsushi Inanobe, Kunichika Tsumoto, Yoshihisa Kurachi. A mechanism underlying compound-induced voltage shift in the current activation of hERG by antiarrhythmic agents. The 1st HD Physiology International Symposium: Integrative multi-level systems biology for in silico cardiology and pharmacokinetics、2012年1月21日、東京大学武田ホール(東京都)

(6) 古谷和春、津元国親、倉智嘉久、薬物の hERG チャンネルと心筋活動電位に対する作

用のシミュレーション研究、平成 23 年度筋生理の集い（招待講演）、2011 年 12 月 17 日、東京慈恵会医科大学高木会館（東京都）

（7）山川祐子、古谷和春、稲野辺厚、倉智嘉久、hERG チャンネル増強作用を持つ薬物の構造活性相関解析、第 21 回日本循環薬理学会、2011 年 12 月 2 日、岡山大学 50 周年記念館（岡山県）

（8）Daisuke Yamasaki, Kazuharu Furutani, Atsushi Inanobe, Yoshihisa Kurachi, Takefumi Doi. Predicting and identifying novel ER alpha agonists by pharmacophore-based virtual screening. The 4th Global COE International Symposium on Physiome and Systems Biology for Integrated Life Sciences and Predictive Medicine, 2011 年 11 月 21 日、千里阪急ホテル、千里ライフサイエンスセンター（大阪府）

（9）Kazuharu Furutani, Yoshihisa Kurachi. Antiarrhythmic Agents Can Facilitate Voltage-Dependent Activation of hERG Potassium Channel. The 4th Global COE International Symposium on Physiome and Systems Biology for Integrated Life Sciences and Predictive Medicine, 2011 年 11 月 21 日、千里阪急ホテル、千里ライフサイエンスセンター（大阪府）

（10）古谷和春、倉智嘉久、スフィンゴ脂質によるカリウムチャンネル機能制御、第 120 回薬理学会近畿部会、2011 年 11 月 11 日、ホテルグランピア京都（京都府）

（11）古谷和春、倉智嘉久、スフィンゴ脂質によるカリウムチャンネル機能制御、生理学研究所研究会「超階層シグナル伝達研究の新展開」（招待講演）、2011 年 9 月 29 日、自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター（愛知県）

（12）Yuko Yamakawa, Kazuharu Furutani, Yoshihisa Kurachi. In Silico Pharmacophore Model of hERG Channel Facilitators. The 7th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies, 2011 年 9 月 12 日、NTUH International Convention Center, Taipei（台湾）

（13）古谷和春、山川祐子、稲野辺厚、岩田美紀、倉智嘉久、薬物の hERG チャンネルファシリテーション作用、第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会 合同大会、2011 年 3 月 28 日、東日本大震災のため紙上開催

（14）古谷和春、山川祐子、稲野辺厚、倉智嘉久、薬物による hERG チャンネルの活性化ゲート機能制御、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 24 日、東日本大震災のため紙上開催

（15）古谷和春、稲野辺厚、山川祐子、岩田美紀、倉智嘉久、薬物の hERG チャンネル機能制御、平成 22 年度筋生理の集い（招待講演）、2010 年 12 月 4 日、東京慈恵会医科大学高木会館（東京都）

（16）古谷和春、山川祐子、稲野辺厚、岩田美紀、倉智嘉久、抗不整脈薬による hERG チャンネルの活性化ゲート機能制御、第 20 回日本循環薬理学会、2010 年 11 月 11 日、札幌市教育文化会館（北海道）

（17）古谷和春、山川祐子、稲野辺厚、岩田美紀、倉智嘉久、薬物の hERG チャンネルファシリテーション作用、生理研研究会「イオンチャンネル・トランスポーターと心血管機能：細胞機能の分子機序とその統合的理解」（招待講演）、2010 年 11 月 4 日、自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター（愛知県）

（18）古谷和春、稲野辺厚、日比野浩、倉智嘉久、抗うつ薬は ATP 感受性カリウムチャンネルを阻害する、第 87 回日本生理学会大会、2010 年 5 月 19 日、マリオス盛岡地域交流センター（岩手県）

（19）Kazuharu Furutani, Atsushi Inanobe, Hibino Hiroshi, Yoshihisa Kurachi. Molecular determinants of drug-Kir channel interactions, XX World Congress of International Society for Heart Research, 2010 年 5 月 14 日、Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古谷 和春 (FURUTANI KAZUHARU)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40452437