

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04018

研究課題名(和文) 心臓徐脈を支える分子機構に基づく不整脈発生機構の数理解析

研究課題名(英文) Mathematical analysis of arrhythmogenesis for bradycardia

研究代表者

倉智 嘉久 (Kurachi, Yoshihisa)

大阪大学・国際医工情報センター・教授

研究者番号：30142011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：G蛋白質制御内向き整流性カリウム(KG)チャネルはG蛋白質共役型受容体-G蛋白質-効果器(R-G-E)シグナルで調節される。これまで我々はR-G-Eシグナルの数理解析モデルを構築し、心臓徐脈機構を解析してきた。しかし、上室性不整脈における異常KGチャネル活性を既存のモデルで合理的に再現することは困難であった。本研究では、数理解析モデルに組み込む新規調節機構の解明を目的とし、1) KGチャネル及び類似チャネルの機能分類を可能とする化合物とその作用機序を解明し、2) 新規アロステリックモジュレーター結合部位とモデル化合物を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

副交感神経の活動が活発になると、心臓ではKGチャネルが活性化し、心臓の拍動は緩やかになります。我々はチャネルの活性制御と心臓の拍動を共役させる統合的な数理解析モデルを開発してきました。しかし、そのモデルでは心臓不整脈のチャネルの活動を再現出来ないため、拡張性の高い数理解析モデルの構築には新たなチャネル活性調節機構を想定する必要がありました。本研究では、チャネルを阻害する新規の薬物を同定すると共に、情報科学的に内因性の低分子が新規薬物結合部位に結合し、チャネル活性を阻害することを見出しました。以上の知見は、既存のモデルの改善と拡張性の高いモデルの構築の手掛かりになることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：G protein-gated inwardly rectifying K⁺ (KG) channel is a model effector for studying the signaling through GPCRs, G proteins and their effectors. Previously we have developed mathematical models for the bradycardia by combining the models representing molecular interactions and electrical activity of myocytes. While atypical KG channel activity was reported in patients with some supraventricular arrhythmias, previous models has a limitation to reproduce the pathological conditions without any hypotheses. In this study, we planned to uncover physiological modulators of KG channel function. We identified acridine derivatives which blocked KG channels in multiple modes of binding. They would assist to classify the activity of Kir channel members in living cells. We also found an endogenous blocker which binds at a crevasse of cytoplasmic domain of a KG channel subunit member Kir3.2. This novel drug-channel interaction was expected to be involved in physiological regulation.

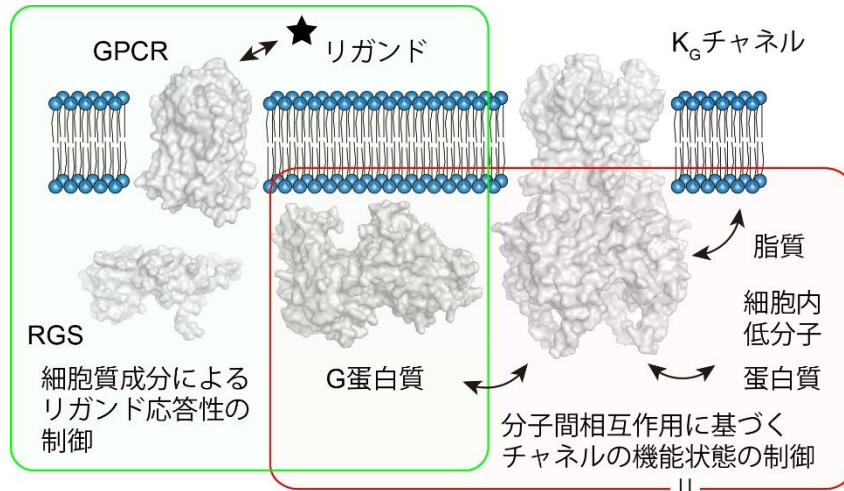
研究分野：心臓生理学

キーワード：心臓徐脈

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞表面に配置された G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) はプロトンから蛋白質までブロードスペクトラムな細胞外刺激を受容し、3 量体 G 蛋白質の GDP-GTP ヌクレオチド交換反応の促進、サブユニットの物理的な解離を通じて、効果器の活性を制御する。つまり、GPCR - G 蛋白質 - 効果器 (R-G-E) シグナルは細胞膜に局限した蛋白質間相互作用の総体である。G 蛋白質制御内向き整流性カリウム



不整脈一心房細動、洞性徐脈 ← 機能状態の異常一擾乱

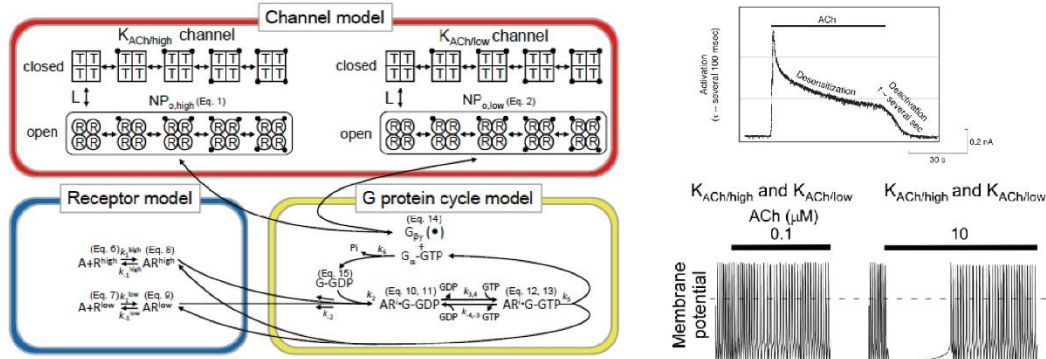
(K_G)チャンネルは迷走神経刺激による心臓徐脈の分子背景である。その機能状態は、受容体 - リガンド結合状態、つまり G 蛋白質の活性化状態を反映する。しかしながら、この既存の R-G-E シグナルの概念に反する知見が幾つか見出されてきた。

心筋に発現するイオンチャンネルの質的、量的変動は電気的リモデリングとして知られ、心臓不整脈の基質となる。近年、慢性化した心房細動患者の生検心房筋細胞から、通常心房筋には殆ど発現していない背景 K⁺電流チャンネルと恒常活性型の K_Gチャンネルの活性が見出された (Dobrev, Circulation, 2001, 2005)。後者の異常活性は蛋白質発現や翻訳後修飾では完全に説明できない。さらに、洞不全症候群でも過剰な K_Gチャンネル活性が報告されている。このような病態における異常なチャンネル活性に加え、応募者らは、細胞質由来の蛋白質である Regulators of G protein Signaling (RGS)蛋白質が G 蛋白質と共に m₂ ムスカリン受容体 (m₂R) の部分アゴニスト活性の作用発現に必須であることを報告した (Chen, J Physiol, 2014)。これらの知見は、正常な細胞・組織機能でさえ、既存の R-G-E シグナルの概念による解釈には限界があることを強く示唆する。

K_Gチャンネルの細胞内局在は驚くべき程多様である (Hibino, Physiol Rev, 2010)。例えば、心房筋細胞で K_Gチャンネルは細胞膜に局在するが (Yamada, Pharmacol Rev, 1998)、同じサブユニット組成のチャンネルは脳下垂体で分泌顆粒に分布する (Morishige, J Biol Chem, 1999)。このような細胞内膜系でのチャンネルの局在は精細胞のアクロゾーム (Inanobe, J Physiol, 2000) や、神経細胞の神経終末シナプス小胞にも見出される (Morishige, BBRC, 1996)。これら細胞内膜系に局在する K_Gチャンネルは細胞膜に局在するそれと同様に機能的であり、それぞれホルモンの過分泌抑制機構、精細胞分化、前シナプス抑制に機能する。しかしながら、このようなチャンネルの細胞内局在を制御する機構でさえ、その実体は捉えられてはいない。

2. 研究の目的

我々は R-G-E シグナルの概念に基づく心臓徐脈の数理モデルを構築してきた (Hosoya, J Gen Physiol, 1996; Yamada, Pharmacol Rev, 1998; Hibino, Physiol Rev, 2010)。そして、K_Gチャンネルの m₂R シグナル応答の短期脱感作現象に着目し、m₂R と K_Gチャンネルの機能的な多様性を反映した非線形数理モデルを下図のように作成した (Murakami, Biophys J, 2013)。このモデルをより高次の洞結節活動電位モデルに統合することで、組織レベルの応答である迷走神経性の一過性心停止を再現することが可能となった。つまり、短期脱感作現象が 2 つの異なる階層間の事象をつなぐ鍵となることが判った。



本申請研究ではこの統合数理モデルをプラットフォームとして、ロバストに R-G-E シグナルを再現するシュミレーションモデルの作成を目指す。しかしながら、本モデルでは、上述した上

室性不整脈時の異常 K_G チャネル活性や細胞質因子による受容体リガンド応答の調節等、既存の概念では合理的に説明できない知見は当然再現できない。そのため、未知の K_G チャネル生理調節機構の解明を計り、数理モデルの精密化することが研究目的である。

3. 研究の方法

(1) 選択的な Kir チャネル阻害薬の解析

我々は独自の K^+ 輸送体機能修飾薬の探索システムで、化合物ライブラリーから Kir3.2 阻害薬として静菌薬 proflavine を単離した。類似化合物の多くが市販されている。そこで、類似化合物の抑制作用を、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた各種 Kir チャネルで検討することによって、薬物活性発現のサブユニット選択性を解明する。さらに、薬物感受性、非感受性チャネル分子のキメラと変異導入体の薬物感受性を解析し、薬物結合部位の特定を行う。

(2) K_G チャネルアロステリックモデュレーターの *in silico* 探索

Kir3.2E236R 変異の細胞質領域の蛋白質結晶を作成し、X 線構造解析を行う。高分解能の構造情報を精密化し、非蛋白質性電子密度から、結合する低分子を特定する。モデル化合物の作用を電気生理学的に検討する。

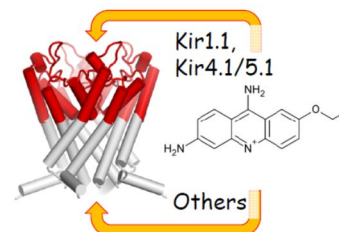
同領域に結合する低分子を医薬品化合物設計によって、*in silico* で探索する。高い結合エネルギーを示す低分子によるチャネル阻害活性を電気生理学的に解析する。

4. 研究成果

(1) 選択的な Kir チャネル阻害薬の解析

我々は以前アクリジン骨格を有する化合物が K_G チャネルの属する Kir チャネルを阻害することを報告した(Kawada, Neuropharmacology, 2016)。アクリジン類似化合物のチャネルに対する作用を比較検討すると、外皮用殺菌薬 acrinol が特徴的な様式で、チャネルを阻害することが判った。即ち、静菌薬 proflavine 等の多くのアクリジン誘導体は細胞質側からアクセスし、細胞膜貫通領域の中心洞に結合するのに対し、acrinol はチャネルの細胞外領域に結合して、阻害活性を示した。ところが、この acrinol 型の阻害作用は Kir チャネルサブタイプに選択的であった。洞結節細胞を始めとする心筋細胞には、 K_G チャネルだけでなく、複数の Kir チャネルが発現する。そのため、選択的な薬物作用は、モデルの精密化に欠かせないイオン電流の構成成分の定量化を可能とすることが期待された。

チャネルの細胞外領域に結合し、チャネルを活性化する薬物も見出されている。そのため、これらの知見は、チャネルの開閉は膜貫通領域、細胞質領域に局限された領域での分子運動ではなく、分子全体の構造変化を伴うこと、その構造に親和性を示す化合物はチャネル活性を調節できることを示唆した。さらに、細胞外から直接チャネルに結合する薬物には特異性が期待できる。そのため、Kir チャネルを標的とする新たな作用基盤を持った創薬の可能性が考えられた。



(2) K_G チャネルアロステリックモデュレーターの *in silico* 探索

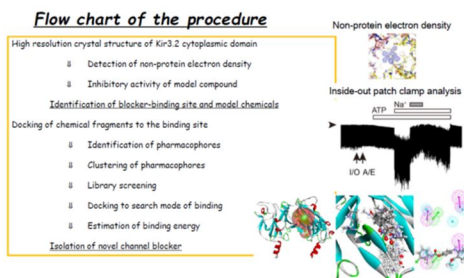
K_G チャネルは膜貫通領域と細胞質領域から構成され、4 つのサブユニットの集合中心軸にイオン透過経路が位置する。大きな構造変化を伴うチャネル開閉の構造平衡は、活性化因子リン脂質 PIP_2 や G 蛋白質 サブユニットによって調節され、機能状態が規定される。

K_G チャネル Kir3.2 の細胞質領域内の外向きのイオン移動を調節するポリアミン、 Mg^{2+} 結合部位(Glu)に Arg を導入すると、イオン透過性の低下、サブユニット非依存的な活性化が観察された (Inanobe, PLOS One, 2013)。その構造基盤を X 線結晶構造解析するため、変異体の細胞質領域の結晶化を検討した。すると、易結晶化特性を示したため、変異効果の一つが構造の安定化であることが判った。結晶化に使用した沈殿溶液によって、結晶の質に大きな違いがあったが、一つの条件で産生された結晶から、1.4 Å の高分解能の構造情報の入手に成功した。精密化した立体構造モデルから、導入した Arg は隣のサブユニットの主鎖と水素結合することで、領域内の構造を安定化させていることが判った。しかしながら、この高分解能の電子密度から、非蛋白質性低分子がサブユニット境界面に存在することが判った。本低分子の特定は困難であったが、類似構造のモデル化合物を、インサイドアウトパッチクランプ条件で、細胞質側に灌流すると、明らかにチャネル活性が阻害されることが判った。つまり、同領域が阻害薬の結合部位であることが判った。通常、チャネル阻害薬は細胞膜貫通領域の中心洞に結合し、イオン透過を阻害する。そのため、この知見は、新規のアロステリックモデュレーター結合部位を意味する。空間分解能の高い構造情報は、情報科学的に正確な薬物との結合様式の抽出と、新規の結合

薬物の設計を可能とする。そこで、我々は情報科学的に同領域に結合する低分子化合物の探索を行った。まず、同領域中で、薬物結合要因を抽出し、その空間配置に加えて、排除環境を設定した。このスクリーニング条件で結合し得る化合物を探索し、結合エネルギー評価によって分子を絞り込むと、2つの低分子が選抜された。その内、1つの低分子(PMG)を細胞外から投与すると、明らかに、チャネル活性が抑制されることが判った。以上の結果は、PMGがK_Gチャネルのアロステリックモデューレーターのリード化合物である

ことを強く示唆する。しかしながら、結合状態を分子動力的に解析すると、結合状態が不安定である。現在、両者の複合体の結晶を作成し、その構造入手を目指している。

本化合物は細胞内代謝低分子であり、細胞外からは3種の輸送経路で細胞内に運ばれる。このような知見がある一方で、当該分子の細胞内濃度はチャネル阻害作用を発現する濃度と比して、明らかに低い。そのため、同化合物はアロステリックモデューレーターのリード化合物ではあるが、生理的にはチャネル活性を修飾できないと考えられる。しかしながら、当該分子結合領域は、他の低分子と相互作用を介し、チャネル活性を調節できる。同領域は大きなクレバスを形成している。薬物探索条件を変えることで、新たな結合分子の特定が十分に期待できると共に、新規のチャネル制御の側面が明らかになる可能性がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Inanobe A, Itamochi H, Kurachi Y.	4. 巻 93
2. 論文標題 Kir Channel Blockages by Proflavine Derivatives via Multiple Modes of Interaction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 592-600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/mol.117.111377	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kinboshi M, Mukai T, Nagao Y, Matsuba Y, Tsuji Y, Tanaka S, Tokudome K, Shimizu S, Ito H, Ikeda A, Inanobe A, Kurachi Y, Inoue S, Ohno Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Inhibition of Inwardly Rectifying Potassium (Kir) 4.1 Channels Facilitates Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Expression in Astrocytes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Front Mol Neurosci	6. 最初と最後の頁 408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2017.00408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsumoto K, Kurata Y, Furutani K, Kurachi Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Hysteretic Dynamics of Multi-Stable Early Afterdepolarisations with Repolarisation Reserve Attenuation: A Potential Dynamical Mechanism for Cardiac Arrhythmias.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 10771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-11355-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nin F, Yoshida T, Murakami S, Ogata G, Uetsuka S, Choi S, Doi K, Sawamura S, Inohara H, Komune S, Kurachi Y, Hibino H.	4. 巻 3
2. 論文標題 Computer modeling defines the system driving a constant current crucial for homeostasis in the mammalian cochlea by integrating unique ion transports.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 NPJ Syst Biol Appl.	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41540-017-0025-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Numata T, Tsumoto K, Yamada K, Kurokawa T, Hirose S, Nomura H, Kawano M, Kurachi Y, Inoue R, Mori Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Integrative Approach with Electrophysiological and Theoretical Methods Reveals a New Role of S4 Positively Charged Residues in PKD2L1 Channel Voltage-Sensing.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 9760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-10357-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chen IS, Furutani K, Kurachi Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Structural determinants at the M2 muscarinic receptor modulate the RGS4-GIRK response to pilocarpine by impairment of the receptor voltage sensitivity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 6110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-05128-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furutani K, Tsumoto K, Kurachi Y; for HD physiology project investigators.	4. 巻 3
2. 論文標題 HD Physiology Project-Japanese efforts to promote multilevel integrative systems biology and physiome research.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 NPJ Syst Biol Appl.	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41540-016-0001-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kodama M, Furutani K, Kimura R, Ando T, Sakamoto K, Nagamori S, Ashihara T, Kurachi Y, Sekino Y, Furukawa T, Kanda Y, Kurokawa J.	4. 巻 140
2. 論文標題 Systematic expression analysis of genes related to generation of action potentials in human iPS cell-derived cardiomyocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 325-330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.06.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada N, Asano Y, Fujita M, Yamazaki S, Inanobe A, (w/ 30 authors), Kurachi Y, Sakata Y, Minamino T, Kitakaze M, Takashima S.	4. 巻 139
2. 論文標題 Mutant KCNJ3 and KCNJ5 Potassium Channels as Novel Molecular Targets in Bradyarrhythmias and Atrial Fibrillation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 2157-2169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Uchida S, Asai Y, Kariya Y, Tsumoto K, Hibino H, Honma M, Abe T, Nin F, Kurata Y, Furutani K, Suzuki H, Kitano H, Inoue R, Kurachi Y.	4. 巻 69
2. 論文標題 Integrative and theoretical research on the architecture of a biological system and its disorder.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Physiol Sci.	6. 最初と最後の頁 433-451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-019-00667-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furutani K, Tsumoto K, Chen IS, Handa K, Yamakawa Y, Sack JT, Kurachi Y.	4. 巻 151
2. 論文標題 Facilitation of I _{Kr} current by some hERG channel blockers suppresses early afterdepolarizations.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Gen Physiol.	6. 最初と最後の頁 214-230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1085/jgp.201812192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 稲野辺厚, 倉智嘉久
2. 発表標題 Probing conformational change in inward rectifier K ⁺ (Kir) channels by small molecules.
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inanobe A., Kurachi Y.
2. 発表標題 APPLICATION OF A PROTEIN FRAGMENT COMPLEMENTATION ASSAY TO REVEAL MOLECULAR ORIENTATION WITHIN HETERO-OLIGOMERIC MEMBRANE PROTEIN ASSEMBLY
3. 学会等名 Biophysical Society 62nd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究分担者	稲野辺 厚 (Inanobe Atsushi) (00270851)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	津元 国親 (Tsumoto Kunichika) (70353331)	金沢医科大学・医学部・准教授 (33303)	