

令和 5 年 6 月 21 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：20K09193

研究課題名(和文) 極低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析による局所麻酔薬の結合阻害機構の解明

研究課題名(英文) The structural analysis of the binding inhibition mechanism of local anesthetics using cryo-electron microscopy.

研究代表者

入江 克雅 (Irie, Katsumasa)

和歌山県立医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20415087

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)：当初の目的である極低温電子顕微鏡による単粒子解析でのイオンチャネルの局所麻酔薬との複合体の構造決定は、分解能が不十分であったため、結合様式を決定することはできなかったが、変異体解析を行い局所麻酔薬の認識に関わる残基と相互作用する残基を同定することができた。さらに、構造解析と分子動力学計算から、その残基の役割を明らかにすることができた。局所麻酔薬はイオンチャネルに結合し機能を発揮する際にはイオン化することが分かっており、イオン化した局所麻酔薬が如何にしてチャネル内にとどまるかについての重要な知見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

局所麻酔薬は広く使われる薬剤でありながら、未だにこれによる事故が起きています。そのため、より副作用の少ない局所麻酔薬の開発が期待されています。本研究成果は局所麻酔薬の結合の対象分子であるナトリウムチャネルと麻酔薬の結合状態についての知見を与えるものです。この結合機構が明らかになることで、既存の局所麻酔薬のどの部分を改良すればよいかの知見を得ることができます。本研究では結合に重要になるイオンチャネルのアミノ酸を明らかにし、どのように結合するかを丹念に調べることができました。

よって、今後さらなる研究を進めていくことでより安全な局所麻酔薬の開発につながることを期待されます。

研究成果の概要(英文)：Because of insufficient resolution of single-particle analysis with cryo-electron microscopy, it was not possible to determine the binding mode of local anesthetics with ion channel, which is the original purpose. But, mutant analysis was performed to identify residues that interact with residues involved in the recognition of local anesthetics. Furthermore, structural analysis and molecular dynamics simulations revealed the role of the residue. It was known that local anesthetics ionize when they bind to ion channels and exert their functions, providing important insights into how ionized local anesthetics stay in the channels.

研究分野：構造生理学

キーワード：イオンチャネル 局所麻酔薬 構造生物学 電気生理学

1. 研究開始当初の背景

局所麻酔剤は、外科手術における麻酔や術後痛の管理および鎮痛などの広範な用途に利用されるだけでなく、心筋性 Nav に作用することで抗不整脈剤としても利用されている。近年、Nav の各サブタイプについての理解が進み、痛覚や侵害受容に特化するサブタイプの存在が明らかとなった (Eijkelkamp *et al*, 2012, *Brain*)。すなわち、これらのサブタイプに高い特異性を示す類縁体の開発は、高い局所麻酔効果を有する薬剤の開発につながる。そのためには、局所麻酔剤による Nav の阻害機構を原子分解能で詳細に理解する必要がある。

高等生物 Nav の高分解能構造は極低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析により天然毒との複合体も含めいくつか明らかになったが (Pan *et al*, 2019, *Science*; Shen *et al*, 2019, *Science*; Pan *et al*, 2018, *Science*)、局所麻酔剤の複合体構造は未だ得られていない。その理由に、高等生物 Nav は分子量が 300kDa 程度の 6 回膜貫通のサブドメインを 4 回繰り返した膜タンパク質である一方で、局所麻酔剤は分子量が 200Da 程度と非常に小さく、自由に回転できる共有結合を複数持つなど柔軟性の高い分子構造であることが挙げられる。

原核生物由来 Nav (BacNav) は、Nav の繰り返し単位に相同なサブユニット (図 1 上実線囲み) がホモ四量体を形成したチャンネル (図 1 下) であり、2011 年以降に幾つかの立体構造が報告されている (Payandeh *et al*, 2011, *Nature*; McCusker *et al*, 2012, *Nat Commun.*)。BacNav チャンネル本体の分子量は 120 kDa 程度であり、Nav 同様に局所麻酔剤による阻害を受けることを確認している (Lee *et al*, 2012, *J Gen Physiol.*)。以上のことから、**BacNav と局所麻酔剤の高分解能構造は高等生物の Nav と局所麻酔剤の結合様式を理解するための基本構造と成り得る。**一方で、近年 BacNav の構造を用いた分子動力学計算や BacNav と局所麻酔剤の複合体の結晶構造解析が進められたが、明確な相互作用は捉えられていない (Boiteux *et al*, 2014, *Proc Natl Acad Sci USA*; Gamal El-din *et al*, 2018, *Proc Natl Acad Sci USA*)。その理由の一つに、BacNav がホモ四量体のチャンネルであることがあげられる。すなわち、局所麻酔剤分子が高等生物 Nav の非対称なイオンポア内腔に結合することを考慮すると、ホモ四量体の BacNav には結合可能部位が四か所あり、空間的制限のため BacNav 内腔

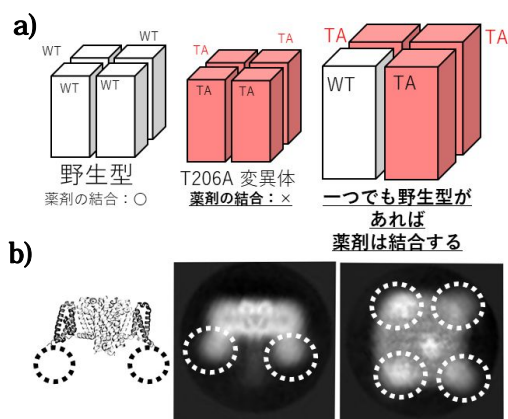
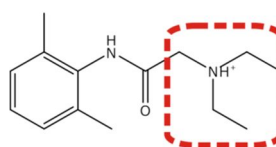


図 2 : a) 局所麻酔剤の結合が低下する T206A 変異導入の効果 b) .NavAb 二次元平均画像における MBP。左:MBP の予想位置、中(横向)・右(下向):MBP 融合 NavAb の二次元平均画像[Wisedchaisri, *et al* 2019 *Cell* より引用]

鏡を用いた単粒子構造解析により局所麻酔剤が結合したサブユニットを特定した高分解能構造解析が可能であると考えた。単粒子解析では、顕微鏡観察により取得したタンパク質分子画像一

a) **リドカイン**



**レボブピバカイン**

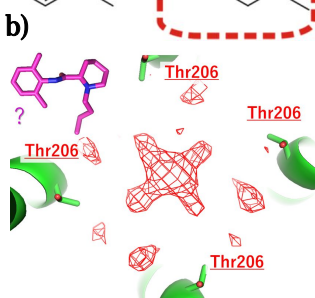
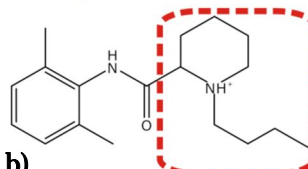


図 1 : a)局所麻酔剤の構造式と b)チャンネル内腔内に観察された電子密度.この電子密度ではレボブピバカイン(左上)の位置を決定することはできない

では一つの局所麻酔剤が四か所ある結合部位を自由に動くことが懸念される。実際に、前述の結晶構造でも化合物の平均化した電子密度が四つのサブユニットに観測された。

申請者はこれまでに、BacNav の一種である NavAb と三級アミン領域を環状にし分子内の自由度を制限した局所麻酔剤であるレボブピバカイン (図 1 a) を用いることで、複合体の安定性を向上させ分解能を改善した結晶を得ていた。しかしながら、チャンネル内腔で観測された電子密度はレボブピバカインが平均化されたものであり、詳細な結合機構を議論することはできなかった (図 1 b)。一方で、結合能が下がる T206A 変異が四量体中に 3 つ含まれても残り一つが野生型であれば局所麻酔剤は結合できることを活性測定により確認していた (図 2a)。また、近年報告された NavAb の単粒子解析において Maltose-binding protein (MBP) が観測可能な大きさであることが分かった (図 2b:Wisedchaisri, *et al* 2019 *Cell*)。そこで、**野生型を一つ持ちそれ以外の三つのサブユニットが MBP 融合の T206A 変異体のヘテロ四量体チャンネルの極低温電子顕微**

一つを同じ向きのものを重ね合わせてコントラストを増強し、二次元平均画像を作成する。さらに、作成したあらゆる角度の二次元平均画像を三次元再構成することによってタンパク質の高分解能分子構造を取得することが可能である。この手法では、局所麻酔剤が結合するサブユニットを区別した二次元平均画像が作成できれば、チャンネル内腔に結合した局所麻酔剤の結合様式の詳細な観察が可能である。そこで、MBP で T206A 変異サブユニットを区別することで、局所麻酔剤が結合した野生型サブユニットを特定しつつ単粒子構造解析を行うことができると考えた。

## 2. 研究の目的

### (1) NavAb のレボブピバカインとの複合体の単粒子構造解析

局所麻酔剤が結合した NavAb の原子分解能構造を得ることで、局所麻酔剤のイオンチャンネルを阻害する機構を明らかにする。

### (2) 局所麻酔剤の結合にかかわる残基の同定

局所麻酔剤の結合構造が得られない場合においては、結合に重要であることを明らかにした残基である Thr206 が相互作用する残基を解析することで阻害機構についての示唆を得る。

### (3) カチオンと相互作用するタンパク質側鎖の相互作用解析

局所麻酔剤はチャンネル阻害時はカチオンとして存在する、そこでチャンネル内腔でのカチオンとタンパク質分子との相互作用を調べることで局所麻酔剤の結合しやすい領域を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) NavAb のレボブピバカインとの複合体の単粒子構造解析

薬剤耐性の異なる発現用プラスミドベクターに MBP 融合 T206A 変異体と MBP なしの His タグ融合野生型 NavAb をそれぞれ組み込み、この二つのプラスミドを大腸菌 BL21 株に形質転換する。精製法は NavAb の結晶化試料の調製方法に準ずるが、以下の点を考慮する。メタルキレートアフィニティ精製により少なくとも一つ以上の His タグ融合野生型サブユニットを含むチャンネルを精製する。さらに、MBP の分子量の違いを利用してサイズ排除クロマトグラフィーにより、最も大きい分子量をもつ MBP 融合 T206A 変異体サブユニットが 3 つで野生型が一つのチャンネルを精製する。精製したチャンネル試料から GraDer 法 (Hauer et al. *Structure* 2015) を用いて余分な界面活性剤を除去し電子顕微鏡観察試料とする。

電子顕微鏡観察では、まず負染色観察画像から精製試料の単分散性を指標にし、極低温電子顕微鏡観察に適した試料が評価する。分散状態が良く極低温電子顕微鏡に適した試料であれば、試料凍結条件を検討する。良好な電子顕微鏡像の取得には、溶液の厚みを薄くして凍結する必要があるが、薄すぎることは観察試料の変性を引き起こす。作製した試料の厚さは極低温電子顕微鏡画像から判断可能である。観察画像のフーリエ変換画像から 3 以上の散乱強度の振幅が見られれば、画像収集し二次元平均画像の解析と三次元再構成を行う。精製試料の純度によっては、MBP 融合サブユニットの数が二個以下のチャンネルが含まれる可能性がある。よって、MBP 融合サブユニットの数を二次元平均画像で区別できているかを注意深く評価する。平均画像で MBP を四つもつものや MBP 領域が不明瞭なものが含まれる場合は、局所麻酔剤の位置決定が困難になるため精製条件を再検討する。

解析には単粒子解析に必要なプログラムのパッケージである Relion Cryo-EM パッケージを使用する。化合物複合体の分子構造の精密化には ccp4 や phenix を用いる。最終的に化合物とチャンネルの相互作用が議論可能な 3 分解能を越える構造の構築を目指す。

### (2) 局所麻酔剤の結合にかかわる残基の同定

局所麻酔剤との相互作用に関わると思われる残基について、変異体を作製し電気生理実験より結合能への影響を評価する。NavAb は C 末端の細胞内ヘリカルバンドルを除くことで開構造となることが分かっており、閉構造と開構造で Thr206 との位置関係が大きく変化する残基を調べる。該当する残基の変異体を作成し、変異体チャンネル分子を一過性発現した昆虫細胞を全細胞パッチクランプ法にて測定する。同定後には構造解析を行うため、安定性が低下する変異はあらかじめ除外する。さらに、阻害効果の評価のために、Celectricon 社製 dynaflo resolve システムを導入しており、迅速にかつ完全に溶液を置換できる。これにより、正確な阻害効果の評価が可能となった。

### (3) カチオンと相互作用するタンパク質側鎖の相互作用解析

水溶液中ではイオンは水和イオンとして存在している。すなわち、カチオンとタンパク質側鎖の相互作用を詳細に理解するためには水和イオンに水和する水と水も含めてその振る舞いを解明する必要がある。水和イオンの水と水の交換速度は 100 ピコ秒であり、このようなナノ秒程度の微小時間で完了する現象を直接観察することは困難だが、分子動力学計算では 2 フェムト秒程度の時間分解能で事象を再現できる。そこで、チャンネル電流を阻害する二価カチオンとチャンネルとの相互作用の解析のためにこれを活用する。



#### 4. 研究成果

##### (1) NavAb のレボピバカインとの複合体の単粒子構造解析

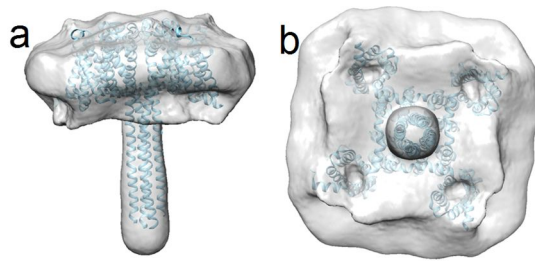


図3. NavAb の単粒子解析像

a: 横向きに見た図。モデルは得られた構造から大きくはみ出ることにはなかった。

b: 細胞内側から見た図。VSD の細胞内側にできる窪みの位置と構造で見られた窪みの位置が一致している。

精製した NavAb の極低温電子顕微鏡観察のための凍結条件の検討を行い、分解能が 5 Å 程度の単粒子解析によるチャンネル構造を得ることができた。しかしながら、薬剤の結合様式を解析するには十分な分解能ではなかった。分解能が向上しない原因を調べるために、熱安定性の評価

を行ったところ、タンパク質発現に使用する大腸菌株によって熱安定性に違いがあることが分かった。熱安定性が向上する大腸菌株ではタンパク質の発現量が少なく、この大腸菌株を用いたタンパク質の大量調整系の再構築が必要なことが分かった。

##### (2) 局所麻酔剤の結合にかかわる残基の同定

電気生理実験から明らかにした NavAb の局所麻酔剤の結合に重要な残基である Thr206 と相互作用する残基の解析をおこない、Thr206 が選択性フィルターの細胞内内腔との境界に位置する Leu176 と相互作用していることを見いだした。そこでこの残基の変異体を作製し活性への影響を解析した。電気生理実験より Leu176 の変異体は親水性残基に変異した時と側鎖が小さい残基に変異した時において、カルシウムイオンなどの二価カチオンによる電流阻害を受けることが明らかになった。局所麻酔剤はチャンネルに結合する際はカチオンとなっていることが分かっており、この二価カチオンによる活性阻害は局所麻酔剤のカチオン部分の相互作用について重要な知見を与える可能性が高い。

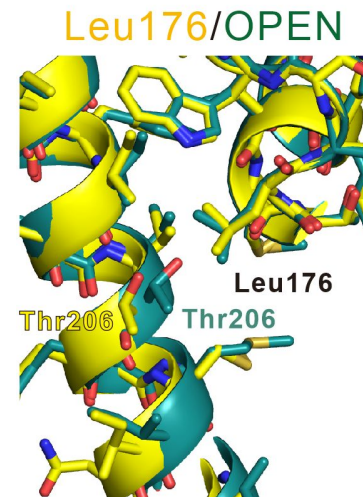


図4: Thr206 と相互作用する Leu176 の位置関係。OPEN はチャンネルの開状態の構造。チャンネルの開口に伴い Thr206 が Leu176 に接近する。

##### (3) カチオンと相互作用するタンパク質側鎖の相互作用解析

二価カチオンによる阻害を受ける変異体について L176G と L176Q 変異体の結晶構造を決定した。これらの変異体では、変異導入によりチャンネル内腔の親水性が増加しており、これが二価カチオンによる阻害を生み出すと示された。この結晶構造が示唆するイオンの振る舞いを分子動力学計算により検証した。分子動力学計算において二価カチオンのような、価数の高いイオンの挙動を正確に再現することはこれまで困難であったが、イオンのパラメータの最適化により阻害現象の再現に成功した。この検証によって、阻害が生じる変異体ではチャンネル内腔での二価カチオンの自由エネルギーが低下することが明らかとなった。これは、結晶構造が示す内腔における二価カチオンの結合を支持する結果である。以上の結果をまとめた論文を投稿し、現在は査読結果をうけ改定を進めている。

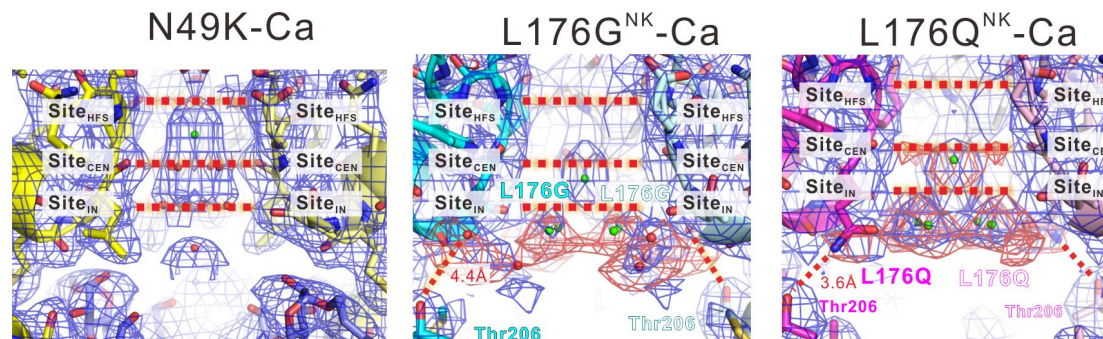


図5.  $\text{Ca}^{2+}$ による電流阻害を受ける L176G, L176Q 変異体の選択性フィルターとイオン内腔周辺の電子密度。フィルターの内腔入り口において  $\text{Ca}^{2+}$ による電子密度の増加がみられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 SHIMOMURA Takushi、IRIE Katsumasa	4. 巻 61
2. 論文標題 Selectivity Determinant of Ancestor-like Prokaryotic Calcium Channel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 223 ~ 226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.61.223	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 Irie Katsumasa	4. 巻 18
2. 論文標題 The insights into calcium ion selectivity provided by ancestral prokaryotic ion channels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 274 ~ 283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v18.033	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 Abe Kazuhiro、Yamamoto Kenta、Irie Katsumasa、Nishizawa Tomohiro、Oshima Atsunori	4. 巻 12
2. 論文標題 Gastric proton pump with two occluded K <sup>+</sup> engineered with sodium pump-mimetic mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26024-1	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 下村 拓史・入江 克雅	4. 巻 未定
2. 論文標題 細菌の祖先型イオンチャネルから探る、普遍的なカルシウム選択機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Irie Katsumasa, Oda Yoshinori, Sumikama Takashi, Oshima Atsunori, Fujiyoshi Yoshinori	4. 巻 未定
2. 論文標題 The structural basis of the divalent cation blocking on tetrameric cation channel	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Research square	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21203/rs.3.rs-2252854/v1	査読の有無 無
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6件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 入江克雅
2. 発表標題 細菌由来のイオンチャンネルに見いだされたカルシウムの選択的透過と機能阻害
3. 学会等名 生理研研究会 " 構造情報を基盤とした膜機能分子の生理機能理解に向けて " (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 入江克雅
2. 発表標題 細菌のカルシウムチャンネルが示すカルシウム選択的なイオン透過機構
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katsumasa Irie, Yoshinori Oda and Atsunori Oshima
2. 発表標題 The generation of the divalent cation blocking on tetrameric sodium channel
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 入江 克雅, 下村 拓史, 米川 佳樹, 名倉 仁, 立山 充博, 藤吉 好則
2. 発表標題 天然の原核生物由来カルシウムチャンネルにおけるイオン透過選択性の進化とその決定残基の同定
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 入江克雅
2. 発表標題 結晶構造と分子動力学計算によるイオンチャンネルにおける 二価カチオンの阻害機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 入江克雅
2. 発表標題 原核生物由来ナトリウムチャンネルに創出された二価カチオンによる電流阻害の分子機構
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会 (招待講演)
4. 発表年 2023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
---------	---------