

氏名	みやもと かず ひで 宮 本 和 英
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 458 号
学位授与の日付	平成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	薬学研究科創薬科学専攻
学位論文題目	Studies on Solution Structures of Inactivation Gate Peptides of Sodium Channels (ナトリウムチャンネルの不活性化ゲートペプチドの溶液構造に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 中川照眞 教授 多賀 徹 教授 半田哲郎

論 文 内 容 の 要 旨

膜電位依存性 Na チャンネルは、神経や筋などの興奮性細胞に存在し、膜電位を介してカリウムチャンネルと機能的に共役して、活動電位の発生および伝搬の役割を担う膜タンパク質である。Na チャンネルのドメインⅢとドメインⅣを結ぶ 53 残基のアミノ酸配列から成るⅢ-Ⅳリンカー領域中に存在する疎水性アミノ酸配列 Ile-Phe-Met (IFM モチーフ) は、IFM モチーフのレセプターである二つのリンカー (ドメインⅢのセグメント 4 とセグメント 5 を結ぶリンカーおよびドメインⅣのセグメント 4 とセグメント 5 を結ぶリンカー) と疎水性相互作用することにより、チャンネルのイオン透過孔を細胞質側から塞ぎ、Na イオンの細胞内への流入を抑制する (不活性化)。この不活性化機能の欠損が周期性四肢麻痺を始めとしたヒト遺伝病の原因とされており、Na チャンネル機能の解明は非常に重要である。申請者は、不活性化に関与する IFM モチーフおよびレセプター部位の構造と機能との関連を明らかにするため、IFM モチーフを含むペプチドならびにレセプター部位に対応するペプチドを Fmoc 固相法で合成し、そのペプチドの構造解析を NMR および分子動力学計算を用いて行った。

先ず、ラット脳タイプⅡA のアミノ酸配列を持つ興奮性細胞における Na チャンネルのⅢ-Ⅳリンカー領域に存在する IFM モチーフ中の Phe を Gln に置換することにより引き起こされる IFM モチーフ近傍の構造変化を明らかにするために、IFM モチーフを含む 17 残基のアミノ酸配列を持つペプチド (MP-3A) および MP-3A の Phe を Gln に置換したペプチド (MP-4A) を合成した。不活性化には疎水性相互作用が関与していることから、合成したペプチドを疎水性環境を模倣するトリフルオロエタノール (TFE) または SDS ミセル溶液に溶かし、NMR の情報に基づいて溶液構造を決定した。その結果、MP-3A と MP-4A の構造は TFE 溶液中ではほとんど変わらないが、SDS ミセル溶液中では異なっていた。すなわち、SDS ミセル溶液中において、MP-3A では Ile の主鎖の NH と IFM モチーフに隣接する Thr の側鎖の OH とが空間的に近く、これらが水素結合し得る距離に在ることが分かったが、MP-4A では上記の水素結合が Phe を Gln に置換することにより阻害されて IFM モチーフの構造が変化したことが示唆された。以上の結果より、Ile と Thr との間の水素結合により形成される IFM モチーフの構造が、不活性化機構に重要な役割を担っていると考えられた。このことから、電気生理学実験から得られた Phe を Gln に置換することにより不活性化が阻害されるという従来の説を分子構造化学的に説明することができた。そこで、以下の研究は SDS ミセル実験系を用いて行った。

上述の Ile と Thr 間の水素結合形成が不活性化に深く関わっていることをより明確にするために、IFM モチーフ中の Ile を Gln に置換したペプチド (Ile/Gln) および Thr を Met に置換したペプチド (Thr/Met) を合成し、各ペプチドの構造を NMR を用いて決定した。Ile/Gln 置換ペプチド中の Gln の主鎖の NH と Thr の側鎖の OH との間の距離は、水素結合し得るものであったが、Thr/Met 置換ペプチドにおける Ile と Met 間の距離は非常に長くなった。また、心筋 Na チャンネルのⅢ-Ⅳリンカー領域に存在する IFM モチーフを含むアミノ酸配列を持つ 17 残基のペプチドにおいても同様の結果が得られた。さらに、Na チャンネルにおける IFM モチーフの Ile/Gln 置換は不活性化にほとんど影響を与えないが、

Thr/Met 置換は不活性化に対して大きく影響を与えるという電気生理学的知見を、本研究による構造解析結果に基づいて、水素結合形成の有無の観点から説明できることが分かった。以上の結果から、上述の水素結合形成が不活性化に深く関わっていることが結論された。

次に、IFM モチーフよりも C 末端側のアミノ酸配列がゲートの開閉に対してどのような役割を果たしているのかを検討するために、Ⅲ-Ⅳリンカー領域中に在る36残基から成るアミノ酸配列を持つペプチド (MP-5A) の SDS ミセル溶液中での構造を NMR を用いて決定した。その結果、IFM モチーフよりも C 末端側において、疎水性クラスターが形成されており、それが IFM モチーフの構造を安定化させていることが分かった。また、既に報告されているリン酸緩衝液中 (pH6.5) におけるⅢ-Ⅳリンカー領域中のアミノ酸配列を持つペプチドの構造においても同様の疎水性クラスターが形成されるが、IMF モチーフ中の Ile と Phe の側鎖の方向が立体的に異なっていることが分かった。このことにより、不活性化ゲートの開閉が Phe の移動を伴うⅢ-Ⅳリンカーのコンフォメーション変化により生じるという従来の仮説を分子構造化学的に説明することができた。以上の結果から、IFM モチーフのコンフォメーション変化が不活性化ゲートの開閉制御因子であると結論した。

次に、IFM モチーフのレセプターを形成していると考えられるドメインⅢのセグメント4とセグメント5を結ぶリンカー (MP-D3) およびドメインⅣのセグメント4とセグメント5を結ぶリンカー (MP-D4) の構造を NMR を用いて決定した。その結果、MP-D3 および MP-D4 の構造はトランス配座をとった Pro の位置で折れ曲がっており、Pro はヒンジとして機能していることが分かった。ドメインⅢとドメインⅣのセグメント4からそれぞれ MP-D3 および MP-D4 の Pro までのアミノ酸配列は α ヘリックス構造をとり、Pro より N 末端側は β 構造またはランダム構造をとっていることが分かった。

以上の研究により、Ⅲ-Ⅳリンカー領域に存在する IFM モチーフ中の Ile と IFM モチーフに隣接する Thr との間の水素結合形成が、Na チャンネルの不活性化機構に深く関わっていることを解明すると共に、IFM モチーフのコンフォメーション変化が不活性化ゲートの開閉制御因子であることも分子構造化学的に証明された。本研究は、先に述べた周期性四肢麻痺を始めとする各種疾患に対する新規治療薬開発の推進に貢献するものである。

論文審査の結果の要旨

本論文は、分子構造化学的手法により、神経や筋などの興奮性細胞に存在する Na チャンネルの不活性化機構の解明を行った研究の成果をまとめたものである。不活性化機能の欠損は周期性四肢麻痺を始めとしたヒト遺伝病の原因であるとされており、この不活性化機能に関与する Na チャンネル中のⅢ-Ⅳリンカー領域中に在る IFM モチーフおよび IFM モチーフのレセプター部位の構造と機能との関連を明らかにするため、著者は、IFM モチーフを含むペプチドならびに IFM モチーフのレセプター部位に対応するペプチドをそれぞれ Fmoc 固相法で合成し、そのペプチドの構造解析を NMR および分子動力学計算を用いて行った。

先ず、ラット脳タイプⅡA のアミノ酸配列を持つ興奮性細胞の Na チャンネルにおけるⅢ-Ⅳリンカー領域中に存在する IFM モチーフを含むペプチド (MP-3A) および IFM モチーフ中の Phe を Gln に置換したペプチド (MP-4A) を合成し、そのペプチドをトリフルオロエタノール (TFE) または SDS ミセル溶液に溶かして、各ペプチドの溶液構造を NMR の情報に基づいて決定した。その結果、MP-3A と MP-4A の構造は TFE 溶液中ではほとんど変わらないが、SDS ミセル溶液中では異なっていた。すなわち、SDS ミセル溶液中において、MP-3A では Ile の主鎖の NH と IFM モチーフに隣接する Thr の側鎖の OH とが空間的に近く、これらが水素結合し得る距離に在ることが分かったが、MP-4A では上記の水素結合が Phe を Gln に置換することにより阻害されて IFM モチーフの構造が変化したことが示唆された。以上の結果より、Ile と Thr との間の水素結合により形成される IFM モチーフの構造が、不活性化機構に重要な役割を担っていると考えられた。このことから、電気生理学実験から得られた Phe を Gln に置換することにより不活性化が阻害されるという従来の説を分子構造化学的に説明することができた。そこで、以下の研究は SDS ミセル実験系を用いて行った。

IFM モチーフ中の Ile と IFM モチーフに隣接する Thr 間の水素結合形成が不活性化に深く関わっていることをより明確にするために、IFM モチーフ中の Ile を Gln に置換したペプチド (Ile/Gln) および IFM モチーフに隣接する Thr を Met

に置換したペプチド (Thr/Met) を合成し、各ペプチドの構造を NMR を用いて決定した。Ile/Gln 中の Gln の主鎖の NH と IFM モチーフに隣接する Thr の側鎖の OH との間の距離は、水素結合し得るものであったが、Thr/Met における Ile と Met 間の距離は非常に長くなった。また、心筋 Na チャンネルの III-IV リンカー領域に存在する IFM モチーフを含むアミノ酸配列を持つ 17 残基のペプチドの構造においても IFM モチーフ中の Ile と IFM モチーフに隣接する Thr 間で水素結合が形成していることが分かった。さらに、Na チャンネルにおける IFM モチーフの Ile から Gln への置換は不活性化にほとんど影響を与えないが、IFM モチーフに隣接する Thr を Met に置換した時には不活性化に対して大きく影響を与えるという電気生理学的知見を、本研究による構造解析結果に基づいて、水素結合形成の有無の観点から説明できることが分かった。以上の結果から、上述の水素結合形成が不活性化に深く関わっていることが結論された。

次に、IFM モチーフよりも C 末端側のアミノ酸配列がゲートの開閉に対してどのような役割を果たしているのかを検討するために、III-IV リンカー領域中に在る 36 残基から成るアミノ酸配列を持つペプチド (MP-5A) の SDS ミセル溶液中での構造を NMR を用いて決定した。その結果、IFM モチーフよりも C 末端側において、疎水性クラスターが形成されており、それが IFM モチーフの構造を安定化させていることが分かった。また、既に報告されているリン酸緩衝液中 (pH6.5) における III-IV リンカー領域中のアミノ酸配列を持つペプチドの構造においても同様の疎水性クラスターが形成されるが、IFM モチーフ中の Ile と Phe の側鎖の方向が立体的に異なっていることが分かった。このことにより、不活性化ゲートの開閉が III-IV リンカーのコンフォメーション変化により生じるという従来の仮説を分子構造化学的に説明することができた。以上の結果から、IFM モチーフのコンフォメーション変化が不活性化ゲートの開閉制御因子であると結論した。

次に、IFM モチーフのレセプターを形成していると考えられるドメイン III のセグメント 4 とセグメント 5 を結ぶリンカー (MP-D3) およびドメイン IV のセグメント 4 とセグメント 5 を結ぶリンカー (MP-D4) の構造を NMR を用いて決定した。その結果、MP-D3 および MP-D4 の構造はトランス配座をとった Pro の位置で折れ曲がっており、Pro はヒンジとして機能していることが分かった。ドメイン III とドメイン IV のセグメント 4 からそれぞれ MP-D3 および MP-D4 の Pro までのアミノ酸配列は α ヘリックス構造をとり、Pro より N 末端側は β 構造またはランダム構造をとっていることが分かった。

以上、本研究の成果は興奮性細胞に存在する Na チャンネルの不活性化の分子機構を解明したものであり、周期性四肢麻痺等の神経・筋機能疾患の病因の解明およびその治療薬の開発に基礎的知見を与えるものである。

よって、本論文は博士 (薬学) の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 13 年 3 月 1 日論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果合格と認めた。