

## ナトリウムチャンネルの不活性化ゲート関連ペプチドの立体構造

宮本和英\*

## Structures of Peptides Related to the Inactivation Gate on Sodium Channels

Kazuhide MIYAMOTO

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29  
Yoshidashimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan*

(Received August 15, 2002)

The peptides related to inactivation of sodium channels were synthesized by the solid-phase method for the purpose of proposing a more precise concept than so far obtained for the inactivation and to determine the main factors that control inactivation. The three-dimensional structures of the peptides were determined using  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy. It was newly discovered that hydrogen bonding was formed between the amide proton of Ile in the IFM (IFM1488–1490) motif of the III–IV linker and the hydroxyl oxygen atom of the side chain of Thr located adjacent to the IFM motif. This hydrogen bonding characterizes the structure around the IFM motif. By calculating the solvent-accessible surface area of the peptide corresponding to the III–IV linker, it was found that a hydrophobic cluster was formed. The hydrophobic cluster stabilizes the structure of the IFM motif. Moreover, the solvent-accessible surface area of the IFM motif correlated with the sustained currents of the incompletely inactivated sodium channels. The free energy of stabilization by hydrophobic interactions ( $\Delta G$ ,  $-3.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), which is calculated from the solvent-accessible surface area for the IFM motif ( $195 \text{ \AA}^2$ ), was in good agreement with that calculated for the equilibrium between the open and the inactivated states of the sodium channels ( $-4.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). The structure of the III–IV linker peptide in a phosphate buffer also formed a hydrophobic cluster, as well as in SDS micelles, although no hydrogen bonding was formed. This distinction results in the following conformational change in the IFM motif: in SDS micelles, the side chains of Ile and Phe in the IFM motif were directed to the hydrophobic cluster, whereas those in a phosphate buffer were directed opposite to the cluster and solvent exposed. The secondary structures of IIIS4–S5 and IVS4–S5, which are considered to form a receptor site, assumed  $\alpha$ -helical conformations around the *N*-terminal half of the sequences. The residue A1329 in MP-D3, which is considered to interact with F1489 of the IFM motif, was found to locate within the  $\alpha$ -helix. A hydrophobic cluster was formed on one side of the helix of MP-D4, which also plays an important role in the inactivation. A new concept for the process of fast inactivation is presented. In response to the voltage-dependent activation and the movement of the S4 segments, the two hydrophobic clusters due to the IVS4–S5 and the III–IV linker interact with each other. This interaction increases the hydrophobicity around the IFM motif. The increased hydrophobicity causes the conformational switching of the IF1488–1489 residues to allow F1489 to interact with A1329 of IIIS4–S5 and/or with N1662 in IVS4–S5. As a consequence of this process, the inactivation gate closes.

**Key words**—sodium channel; inactivation; solution structure; NMR

## 1. はじめに

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 K チャンネルと機能的に共役して、活動電位の発生及び伝搬の役割を担う膜タンパク質である。Na チャンネルは

$\alpha$ -,  $\beta$ -subunit から成っており、約 260 kd の  $\alpha$ -subunit に Na チャンネルの主要な機能であるイオン透過機構及び膜電位感受機能が備わっている。アミノ酸配列から、この  $\alpha$ -subunit は細胞膜を貫通する 6 本のヘリックス (セグメント 1—セグメント 6, S1–S6) が 4 回繰り返された構造 (ドメイン I—ドメイン IV) をとっていると考えられている。<sup>1)</sup> +電荷を持った塩基性アミノ酸 Lys 又は Arg が 3 残基ごとに規則正しく配列した各ドメインの S4 (電位センサー) が興奮性細胞の脱分極に伴ってコンフォメーション変化し、Na チャンネルのイオン透過孔

京都大学大学院薬学研究科 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

\*理化学研究所ゲノム科学総合研究センター (〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22)

E-mail: miyamoto@gsc.riken.go.jp

\*\*本総説は、平成 13 年度日本薬学会近畿支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

を開く.<sup>2)</sup> Na チャンネルの開口後, Na イオンはイオンを識別するためのフィルター, すなわち各ドメインの S5-S6 にある P 領域と呼ばれる親水性のループが 4 つ集まって形成している Na イオン選択フィルターを通過して細胞内に流入する.<sup>3)</sup> その数 mm 秒後, ドメイン III とドメイン IV を繋ぐ 53 残基のアミノ酸配列から成るリンカー (III-IV リンカー) が細胞質側から塞ぐことによって, Na イオンの細胞内への流入が抑制される (不活性化).<sup>4,5)</sup> 近年の電気生理学実験によれば, 不活性化は 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) が IFM モチーフのレセプターである 2 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 (III S4-S5)<sup>6)</sup> 及びドメイン IV のセグメント 4 とセグメント 5 を結ぶリンカー (IV S4-S5)<sup>7-10)</sup> と疎水性相互作用することにより生ずると考えられている (Fig. 1). 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 チャンネルの機能の解明は非常に重要である. 筆者は不活性化に関与する IFM モチーフ及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並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 及び分子動力学計算を用いて行った. 本研究において Fmoc 固相法で合成したペプチドのアミノ酸配列を Fig. 1 にまとめた. ペプチドの構造決定には核オーバーハウザー効果 (NOE) 及び主鎖の二面角 ( $\phi$ ) に基づく simulated annealing を用いた. 計算機として SGI 製の Origin2000 を使用した. また, IFM モチーフとそのレセプター (III S4-S5 と IV S4-S5) との相互作用は疎水性相互作用であり, 不活性化状態を模倣するために, 本研究の実験系には SDS ミセルを用いた. 本稿では, 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分子構造化学的手法により行った研究成果と共に,<sup>11-16)</sup> 電気生理学実験により得られている知見も併せて紹介する.

## 2. III-IV リンカーの IFM モチーフ中にある Phe を Gln に置換した時の IFM モチーフ近傍の構造変化

West らが行った電気生理学実験によれば, ラット脳タイプ II A 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 リンカー領域中に存在する IFM モチーフ中の Phe (F) 1489 を Gln (Q) に置換 (F/Q) することにより, 不活性化ゲ

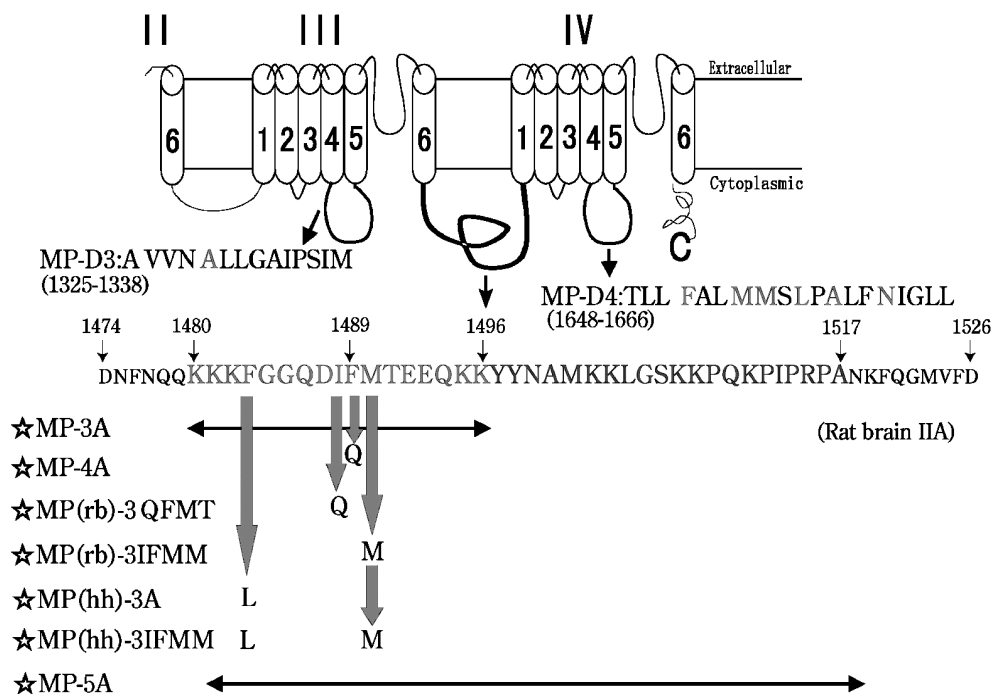


Fig. 1. Schematic Representation for the Sodium Channel  $\alpha$ -Subunit  
 The amino acid sequences of the peptides used in this study is shown using one-letter symbol.

トが完全に閉まらず約 86% の電流の漏れが生ずる。<sup>4)</sup> これは、F/Q 置換により IFM モチーフ近傍のコンフォメーションが変化したためだと推測される。この構造変化を明らかにするために、IFM モチーフを含むラット脳タイプ II A のアミノ酸配列に対応する 17 残基のペプチド (MP-3A, K1480-K1496) 及び MP-3A を F/Q 置換したペプチド (MP-4A) の溶液構造を決定した。<sup>13)</sup> MP-3A 及び MP-4A の Asp (D) 1487-Thr (T) 1491 領域の溶液構造を Fig. 2 に示した。MP-3A (Fig. 2A) は helical 構造をとっているのに対し、MP-4A (Fig. 2B) は扁平な構造となっており、F/Q 置換により大きく構造が変化していることを見出した。MP-3A における Ile (I) 1488 の主鎖のアミド N と T1491 の側鎖の水酸基との距離が約 3 Å であり水素結合し得る距離となっているが、一方の MP-4A では、この水素結合形成が F/Q 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ものと分かった。以上の結果より、I1488 と T1491 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 F/Q 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。

### 3. IFM モチーフに隣接する Thr を他のアミノ酸に置換した時の影響

Na チャンネルの III-IV リンカー領域中に存在する IFM モチーフ中の I1488 と IFM モチーフに隣接する T1491 との水素結合形成が不活性化機構に深く関わっていることを明確にするために、IFM モ

チーフ中の I1488 を Q に置換 (I/Q) したペプチド MP (rb)-3QFMT 及び T1491 を Met (M) に置換 (T/M) したペプチド MP (rb)-3IFMM を合成し、各ペプチドの溶液構造を NMR を用いて決定した (Fig. 3)。<sup>14)</sup> ここで筆者は、I/Q 置換した MP (rb)-3QFMT でも Q1488 の主鎖のアミド N が存在しているので、MP-3A の構造と同様に Q1488 と T1491 との間で水素結合形成がなされるであろう。しかしながら、一方の MP (rb)-3IFMM では T/M 置換することにより水素結合形成に必要な水酸基が存在しなくなるため、MP-3A とは大きく構造が変化するであろうと予測した。Fig. 3A には MP (rb)-3QFMT の溶液構造が示されており、Q1488 の主鎖のアミド N と T1491 の側鎖の水酸基との距離が約 3 Å であり水素結合し得る距離となっているが、一方の Fig. 3B に示されている MP (rb)-3IFMM では I1488 と M1491 との間の距離は非常に長くなっており、予想通りの結果を得た。次に、ヒト心筋 Na チャンネルにおいても、ラット脳タイプ II A のアミノ酸配列で見られたような I と T との間の水素結合が形成されるかどうかを調べるために、ヒト心筋 Na チャンネルのアミノ酸配列に対応するペプチド MP (hh)-3A (K1477-1493) 及び MP (hh)-3A を T/M 置換した MP (hh)-3IFMM の溶液構造を NMR で決定した。その結果、MP (hh)-3A の構造 (Fig. 3C) は MP-3A とほとんど同じ構造をとっており、MP (hh)-3A においても I と T との間で水素結合の形成がなされていることが分かった。MP (hh)-3IFMM の構造 (Fig. 3D) は、MP (rb)-3IFMM のそれとほとんど同じであった。以上の結

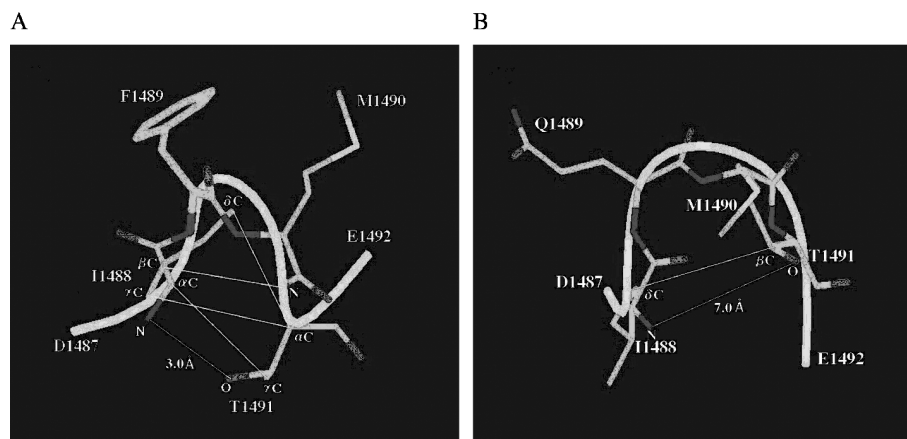


Fig. 2. Structures of (A) MP-3A and (B) MP-4A

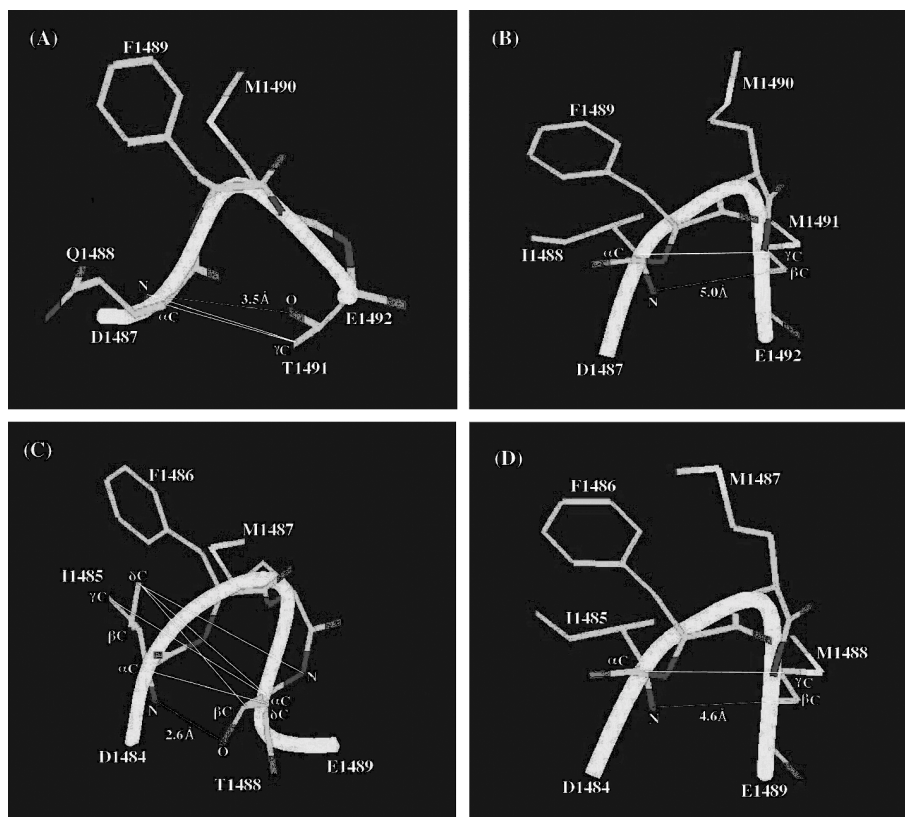


Fig. 3. Structures of (A) MP(rb)-3QFMT, (B) MP(rb)-3IFMM, (C) MP(hh)-3A, and (D) MP(hh)-3IFMM

果, Na チャンネルにおける IFM モチーフの I/Q 置換は不活性化にほとんど影響を与えないが, T/M 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,<sup>4,17)</sup> 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. IFM モチーフの Ile と Thr との間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.

#### 4. IFM モチーフよりも C 末端のアミノ酸配列の構造及び機能

IFM モチーフよりも C 末端側に位置するアミノ酸配列が不活性化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 リンカー領域中にある 36 残基から成るアミノ酸配列を持つペプチド (MP-5A, K1482-A1517) の溶液構造を NMR を用いて決定した.<sup>15)</sup> Fig. 4A に MP-5A の D1487-Ser(S) 1506 領域の構造を示し, Fig. 4B に Rohl らが既に報告しているリン酸緩衝液中 (pH 6.5) の構造を示した.<sup>18)</sup> MP-5A の構造を Rohl らが決定した構造と比較検討すると全体的にほとんど同じであったが, I1488 及び F1489 の側鎖の向き

が異なっていることを見出した. この相違は, I1488 と T1491 との間の水素結合形成の違いに因るものである. すなわち, 上述の MP-3A と同様に MP-5A の構造においても I1488 と T1491 との間で水素結合が形成されることによって IFM モチーフの構造が安定化されているが, 一方の Rohl らが決定した構造ではこの水素結合が形成されておらず, IFM モチーフ中の I1488-F1489 の側鎖の向きが MP-5A の構造のそれとは逆の向きになっている. この水素結合形成の有無による IFM モチーフ近傍のコンフォメーションの違いにより, Rohl らが決定したリン酸緩衝液中の構造で形成されていた M1490, TyrTyr (YY) 1497-1498, 及び M1501 から成る疎水性クラスターに加えて, MP-5A の構造では I1488-F1489 を伴った大きな疎水性クラスターが形成されていることが分かった. Fig. 5 にコノリーアルゴリズム<sup>19)</sup>を用いた MP-5A の構造の溶媒接触表面を示した. これより, I1488, F1489, M1490, YY1497-1498, 及び M1501 から成る疎水性クラスターが形成されていることが分かる. 次に, IFM モチーフの表面積と不活性化ゲートの開閉との関係

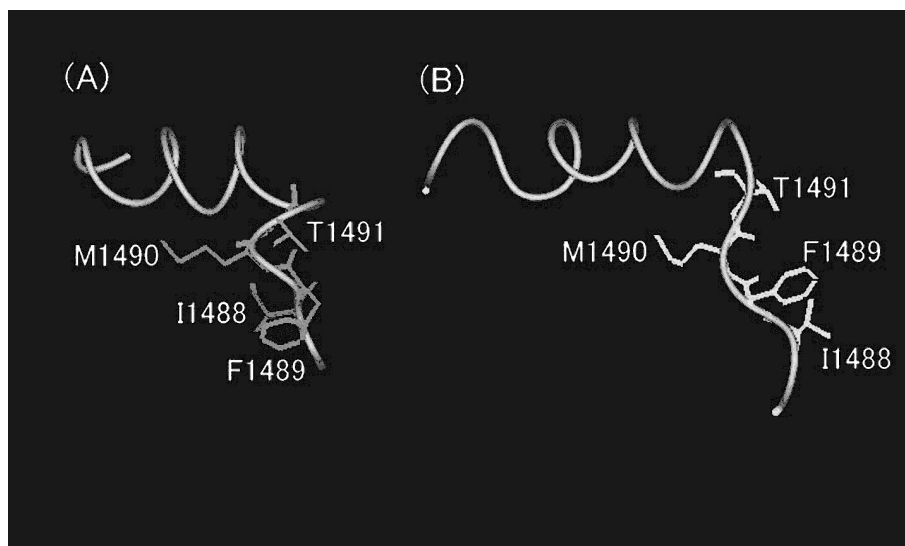


Fig. 4. Comparison of the Structures at the IFM Motif in the III-IV Linker (A) Determined in SDS Micelles and (B) Determined by Rohl et al. in a Phosphate Buffer

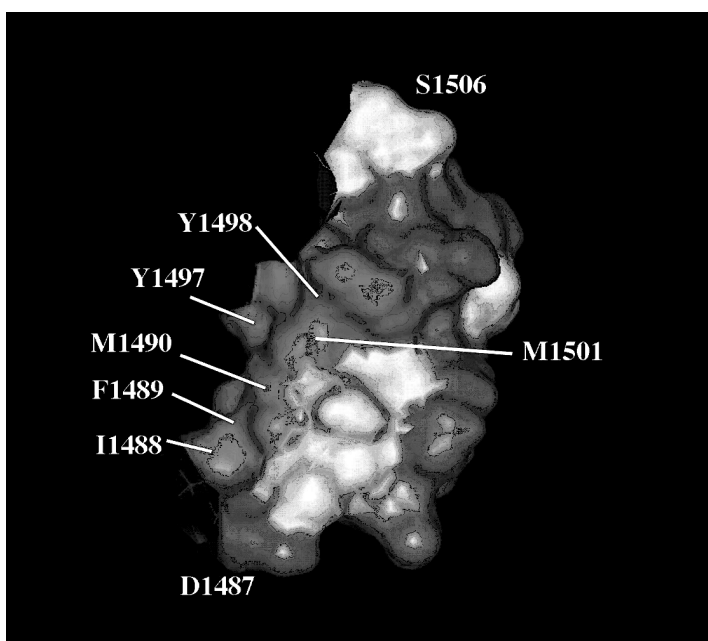


Fig. 5. Solvent Accessible Surface for the Residues between I1488 and S1506 in MP-5A

を調べるために、横軸に本研究で得られた IFM モチーフの表面積 ( $\text{\AA}^2$ )、縦軸に電気生理学実験により得られた Na イオンの遺漏率をとったグラフを Fig. 6 に示した。IFM モチーフの表面積と Na イオンの遺漏率とに相関性がある事を見出し、不活性化ゲートを完全に閉じるためには IFM モチーフの表面積が  $190\text{--}200 \text{\AA}^2$  程度の大きさを要することも分かった。疎水性相互作用によるペプチドの安定性を示すギブズ自由エネルギー ( $\Delta G$ ) を MP-5A の

IFM モチーフの表面積から単位面積あたり  $20 \text{ cal}/\text{\AA}^2$  として算出した。<sup>20)</sup> その値 ( $-3.9 \text{ kcal/mol}$ ) は、電気生理学実験による開状態と不活性化状態との間の平衡定数から算出された値 ( $-4.1 \text{ kcal/mol}$ ) と良く一致した。

IFM モチーフ中の F を Cys (C) に置換した ICM に対する methanethiosulfonate 試薬 (MTS) の反応性が電気生理学実験により報告されている (Fig. 7).<sup>21)</sup> ICM は不活性化ゲートが閉じた状態の時に

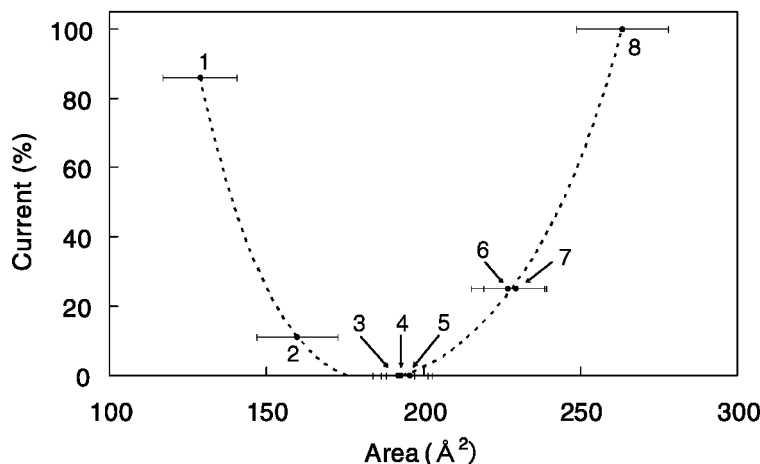


Fig. 6. A Plot of Surface Area (in  $\text{\AA}^2$ ) of the IFM Motif Determined for Variously Substituted Peptides at Round the IFM Motif versus Sustained Current (in %) for the Corresponding Mutant Sodium Channel Proteins: (1) MP-4A, (2) MP (rb)-QFMT, (3) MP-3A, (4) MP (hh)-3A, (5) MP-5A, (6) MP (rb)-3IFMM, (7) MP (hh)-3IFMM, (8) the structure determined by Rohl *et al.*

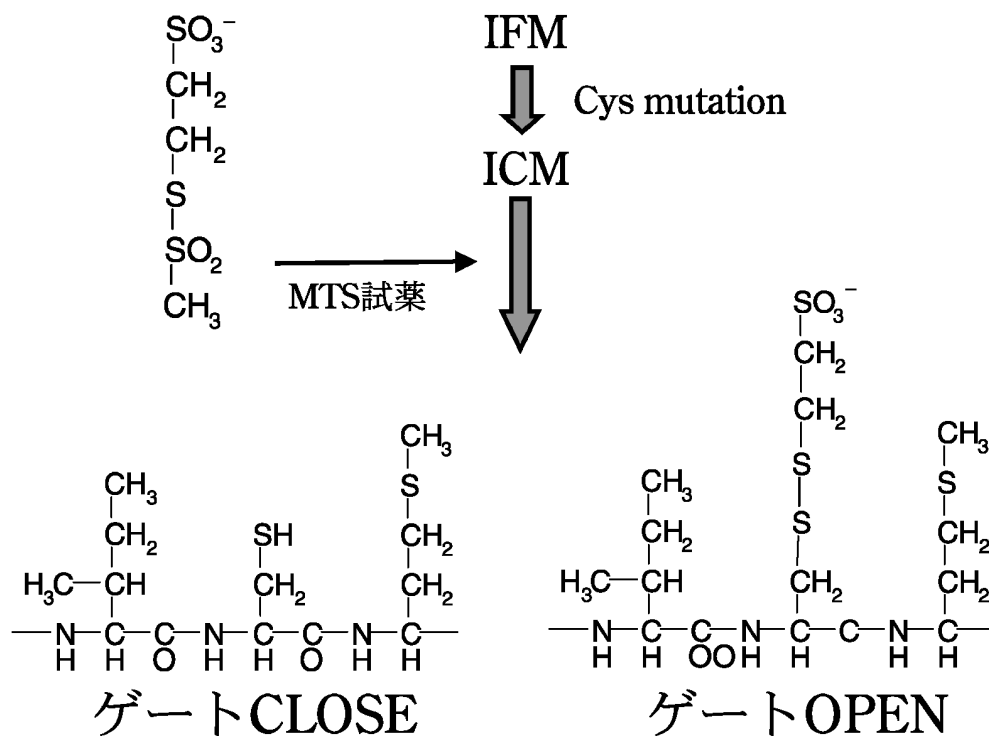


Fig. 7. Reactivities of the F1489C Substituted Sodium Channel and the MTS Reagent

は MTS 試薬とは反応しないが、開いた状態の時には MTS 試薬と反応する。これにより、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ことが推測された。本研究で見出した IFM モチーフ中の I1488 と T1491 との間の水素結合形成の有無により生じる I1488 及び F1489 の側鎖の向きの違いにより、上述の反応性の違いを分子構造化学的に説明ができる。以上よ

り、IFM モチーフ中の Ile 及び Phe の側鎖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。

#### 5. IFM モチーフのレセプターであるⅢS4-S5 及びⅣS4-S5 の構造及び機能

Smith & Goldin は、不活性化が起こる際ⅢS4-S5 領域中の Ala(A)1329 が IFM モチーフ中の F と相互作用することを電気生理学実験により報告し

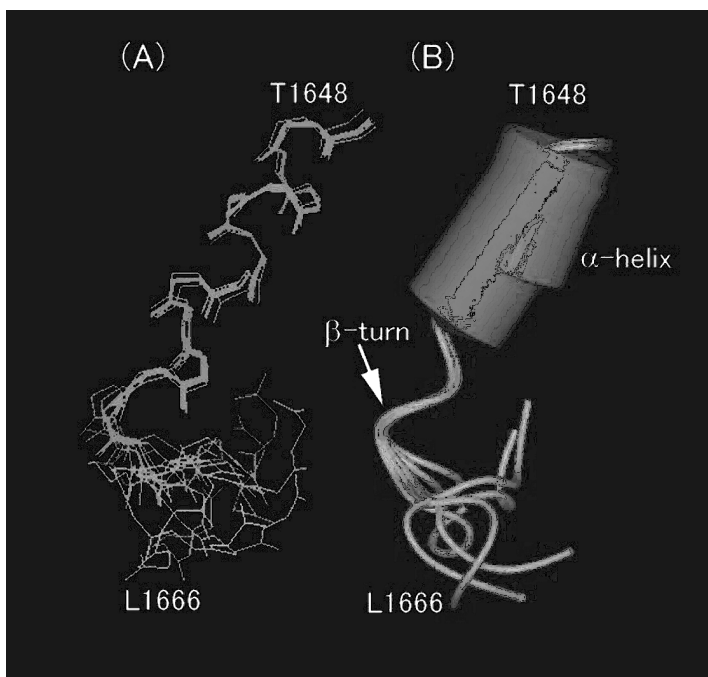


Fig. 8. Structures of MP-D4 Superimposed between Residues T1648 and L1666  
(A) Backbone heavy atoms, (B) Cylinders for an  $\alpha$ -helix and ribbons for the rest.

た.<sup>6)</sup> また, Filatov らは, 電気生理学実験により, F1651, MM1654-1655, Leu (L) 1657 及び A1659 の各アミノ酸を電荷を有するアミノ酸に置換すると不活性化が不安定に成ると述べている.<sup>10)</sup> これらのアミノ酸が不活性化機構にどのような役割を担っているのかを分子構造化学的な側面から明確にするために, III S4-S5 及び IV S4-S5 のアミノ酸配列に対応するペプチドである MP-D3 並びに MP-D4 の溶液構造を決定した.<sup>16)</sup> MP-D3 の構造は, V1326 から L1331 の領域で helical 構造であり, A1329 はその helical 構造の中に位置していた. 一方, MP-D4 は L1650 から S1656 の領域で helical 構造, トランス配座の Pro (P) 1658 で bent しており, A1659-Asn (N) 1662 では  $\beta$ -turn (type I) 構造をとっていることが分かった (Fig. 8). MP-D4 の溶媒接触表面を調べた結果, Fig. 9 に示されているような F1651, MM1654-1655, L1657 及び A1659 による疎水性クラスタが形成されていた. この結果より, Filatov らの電気生理学実験の結果を分子構造化学的に説明できる.

本研究で得られた結果から, Na チャンネルの不活性化機構に次のような新たなコンセプトを導入したい (Fig. 10). まず, 脱分極に伴い電位センサー

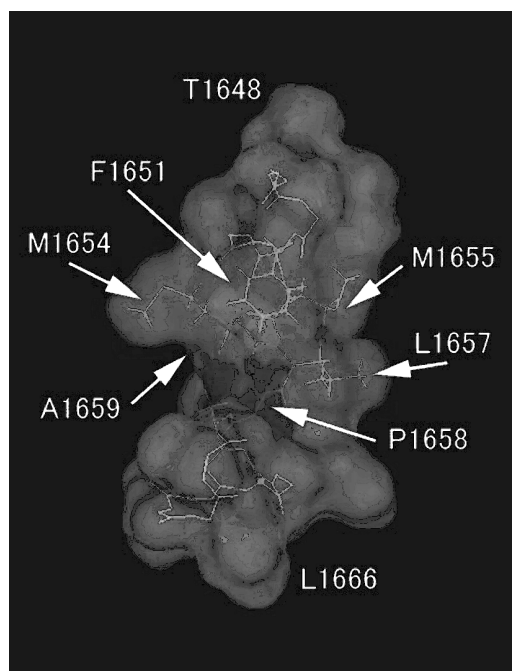


Fig. 9. Solvent Accessible Surface for the Residues between T1648 and L1666 in MP-D4

である各ドメインの S4 が細胞外に約 5 Å 移動する.<sup>2)</sup> Fig. 4B に示された緩衝液中の III-IV リンカーの構造で形成されていた疎水性クラスタが, IV S4-S5 の疎水性クラスタと相互作用する. その際,

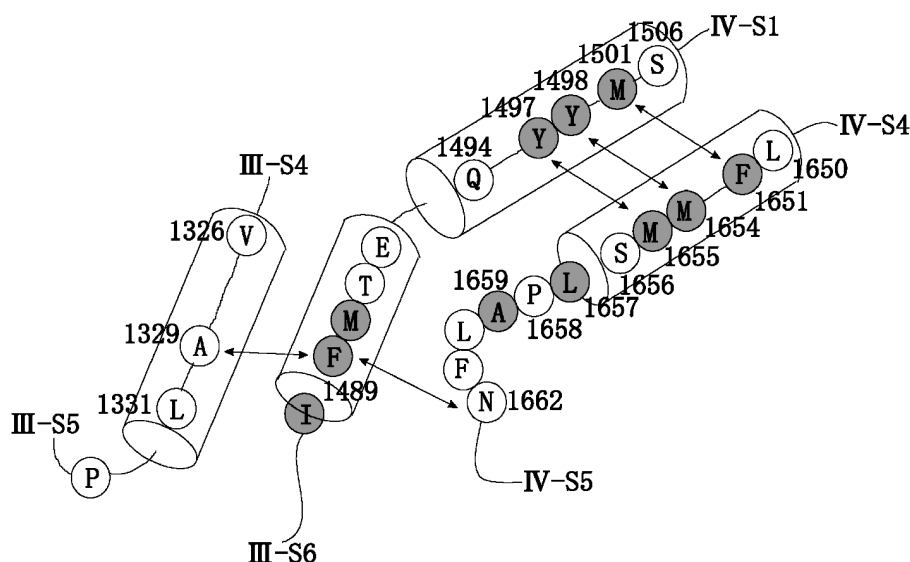


Fig. 10. A Schematic Representation for the Interactions between III-IV Linker and Its Receptors

F1651-M1501, M1654-Y1498, 及び M1655-Y1497 の 3 組の相互作用も生じているであろうと推測される.<sup>22)</sup> その結果, IFM モチーフ近傍の環境が疎水性に成ることによって IFM モチーフ中の I1488 と T1491 との間の水素結合形成が促進される. これにより, IFM モチーフ中の I1488 及び F1489 の側鎖のコンフォメーション変化が引き起こされて (Fig. 4B から Fig. 4A への構造変化), III-IV リンカー中の M1490, YY1497-1498 及び M1501 から成る疎水性クラスターに I1488-F1489 が加わる (Fig. 5). その際, F1489 が III S4-S5 中の A1329 及び IV S4-S5 中の N1662 と相互作用することにより不活性化ゲートが閉じると考えられる.<sup>6,8)</sup>

## 6. おわりに

本研究により, 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 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した. 本研究結果は, 先に述べた Na チャンネルの変異に因る周期性四肢麻痺を始めとする各種疾患の病因の理解だけでなく, 正常なチャンネルの分子レベルでの解明の一助と成り得る. 今後, 本研究で取り上げることができなかった巨大なタンパクである Na チャンネル全体の構造と機能との関係を解明するための新規

手法の開発を行う必要があることは言うまでもなく, その開発が期待される.

**謝辞** 本総説で紹介させて頂いた研究は, 京都大学大学院薬学研究科薬品機能解析学分野において行われたものであり, 終始懇切な御指導御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科教授の中川照眞先生並びに同助教授の黒田義弘先生に心より厚く御礼申し上げます. また, 本研究の遂行に当たり, 御協力を頂きました京都大学大学院薬学研究科助教授の山岡清先生, 同助教授の渋川明正先生並びに京都工芸繊維大学の金折賢二先生に深く感謝致します.

## REFERENCES

- 1) Noda M., Ikeda T., Kayano T., Suzuki H., Takeshima H., Kurasaki M., Takahashi H., Numa S., *Nature*, **320**, 188-192 (1986).
- 2) Yang N., George A. L., Horn R., *Neuron*, **16**, 113-122 (1996).
- 3) Marban E., Yamagishi T., Tomaselli G. F., *J. Physiol.*, **508**, 647-657 (1998).
- 4) West J. W., Patton D. E., Scheuer T., Wang Y., Goldin A. L., Catterall W. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 10910-10914 (1992).
- 5) Patton D. E., West J. W., Catterall W. A., Goldin A. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 10905-10909 (1992).
- 6) Smith M. R., Goldin A. L., *Biophys. J.*, **73**, 1885-1895 (1997).



- 7) Tang L., Kallen R. G., Horn R., *J. Gen. Physiol.*, **108**, 89–104 (1996).
- 8) McPhee J. C., Ragsdale D. S., Scheuer T., Catterall W. A., *J. Biol. Chem.*, **273**, 1121–1129 (1998).
- 9) Lerche H., Peter W., Fleischhauer R., Pika-Hartlaub U., Malina T., Mitrovic N., Lehmann-Horn F., *J. Physiol.*, **505**, 345–352 (1997).
- 10) Filatov G. N., Nguyen T. P., Kraner S.D., Barchi R L., *J. Gen. Physiol.*, **111**, 703–715 (1998).
- 11) Kuroda Y., Maeda Y., Miyamoto K., Tanaka K., Kanaori K., Otaka A., Fujii N., Nakagawa T., *Biophys. J.*, **77**, 1363–1373 (1999).
- 12) Kuroda Y., Miyamoto K., Tanaka K., Maeda Y., Ishikawa J., Hinata R., Otaka A., Fujii N., Nakagawa T., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1293–1298 (2000).
- 13) Kuroda Y., Miyamoto K., Matsumoto M., Maeda Y., Kanaori K., Otaka A., Fujii N., Nakagawa T., *J. Peptide Res.*, **56**, 172–184 (2000).
- 14) Miyamoto K., Kanaori K., Nakagawa T., Kuroda Y., *J. Peptide Res.*, **57**, 203–214 (2001).
- 15) Miyamoto K., Nakagawa T., Kuroda Y., *Biopolymers*, **59**, 380–393 (2001).
- 16) Miyamoto K., Nakagawa T., Kuroda Y., *J. Peptide Res.*, **58**, 193–203 (2001).
- 17) Kellenberger S., West J. W., Scheuer T., Catterall W. A., *J. Gen. Physiol.*, **109**, 589–606 (1997).
- 18) Rohl C. A., Boeckman F. A., Baker C., Scheuer T., Catterall W. A., Klevit R. E., *Biochemistry*, **38**, 855–861 (1998).
- 19) Connolly M. L., *Sciences*, **221**, 709–713 (1983).
- 20) Eriksson A. E., Baase W. A., Zhang X. J., Heinz D. W., Blaber M., Baldwin E. P., Matthews B. W., *Science*, **255**, 178–183 (1992).
- 21) Kellenberger S., Scheuer T., Catterall W. A., *J. Biol. Chem.*, **271**, 30971–30979 (1996).
- 22) Stapley B. J., Rohl C. A., Doig A. J., *Protein Sci.*, **4**, 2383–2391 (1995).