

氏 名 条 慎一郎

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1868 号

学位授与の日付 平成28年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Structural determinants in the C-terminal cytoplasmic region
for the slow deactivation of hERG K⁺ channel

論文審査委員 主 査 教授 西田 基宏
教授 久保 義弘
教授 鍋倉 淳一
教授 岡村 康司 大阪大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

Human Ether-a-go-go Related Gene (hERG) channel, which belongs to the voltage-gated K^+ channel (Kv) family, is well known for its very slow deactivation kinetics. This slow deactivation is important for the repolarization of cardiac action potential in myocytes, and is known to be regulated by its intracellular regions.

In the C-terminal intracellular region, members in the KCNH subfamily including hERG channel have Cyclic Nucleotide Binding (CNB) domain which is connected to the sixth transmembrane helix by C-linker domain. Although the binding of cyclic nucleotides to the ligand binding pocket of CNB domain regulates the channel gating in Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-modulated (HCN) and Cyclic Nucleotide-Gated (CNG) channels, KCNH channels are known to lack the sensitivity to cyclic nucleotides. In hERG channel, several mutations and truncation of C-linker or CNB domains show accelerated deactivation kinetics, suggesting that the roles of these domains of hERG channel differ from those of HCN and CNG channels. It remains unknown, however, how these domains control the slow deactivation of hERG channel.

The crystal structures of C-linker and CNB domains of two KCNH channels, zebrafish Ether-a-go-go Like K⁺ (zELK) and Anopheles gambiae ERG (agERG) channels, were solved recently. These studies suggest that the structures of them basically resemble one another, but have some differences from that of mHCN2 channel. To obtain the structural insight of C-linker and CNB domains of hERG channel, I performed the structure homology modeling of these domains of hERG channel based on those of agERG channel.

The homology model of hERG channel showed that a side chain of an amino acid residue Phe860 occupied the ligand binding pocket as if Phe860 is an endogenous ligand. This may explain the lack of sensitivity to cyclic nucleotides. It was also indicated that there are two electrostatic interactions between C-linker and CNB domains in hERG channel, similarly to HCN and CNG channels. The two interactions are possibly formed between Arg696 in C-linker domain and Asp767 in CNB domain, and Arg696 and Asp727 in C-linker domain, respectively. In this study, I aimed at elucidation of the role of Phe860 in the gating, and functional conformation of the existence of the two electrostatic interactions between C-linker and CNB domains. I analyzed the functional electrophysiological properties of various mutants by two electrode voltage clamp technique using *Xenopus* oocytes.

The substitution of Phe860 with charged Arg or Glu accelerated the deactivation kinetics, but that with hydrophobic Ile or Val did not change the kinetics. In addition, the substitution to small hydrophobic Ala also accelerated the deactivation. These results indicate that the hydrophobicity and bulkiness of the amino acid side chain are necessary to maintain the slow deactivation in this position, and that Phe860 occupies the ligand binding pocket to play an important role to control the slow deactivation in

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

hERG channel, unlike the mechanisms of HCN and CNG channels.

Next, I investigated two electrostatic interactions in C-linker and CNB domains. The mutant of Arg696 to Glu showed slower deactivation kinetics than wild type (WT). In contrast, when Asp767 or Asp727 was substituted with Lys, both mutants accelerated the deactivation. Their different phenotypes suggest that there is no direct electrostatic interaction between Arg696 and Asp767, and Arg696 and Asp727, unlike the case of HCN and CNG channels. However, only the double mutant of Arg696Glu and Asp767Lys showed much slower deactivation kinetics than WT and each single mutant. The results suggest that Arg696 and Asp767 are not independent and have indirect but functional interaction.

Regarding Asp727 which was shown not to be the counterpart for Arg696, I identified a novel direct electrostatic interaction by systematic mutagenesis. When I substituted Arg752 in CNB domain to Glu, this mutant showed accelerated deactivation kinetics like Asp727Lys. Furthermore, the double mutant of Asp727Lys and Arg752Glu recovered the slow deactivation kinetics to the same degree of WT. These results suggest that Asp727 directly interacts with Arg752 electrostatically to maintain the slow deactivation. As a positively charged amino acid at 752 is conserved only in KCNH subfamily, but not in HCN and CNG channels, it is thought that this interaction is a unique one of KCNH family members.

Taken together, I found that the C-linker and CNB domains of hERG channel contribute to the control of slow deactivation by different mechanisms from those of HCN and CNG channels, such as the endogenous ligand like role of Phe860 and the novel electrostatic interaction between Asp727 and Arg752. As some amino acids residues related to these mechanisms were reported as a cause of the cardiac diseases such as LQT2, it is thought that the results in this study would contribute to elucidate the mechanisms of these diseases.

(別紙様式 3)
(Separate Form 3)

博士論文の審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

ヒト由来の Human Ether-a-go-go Related Gene (hERG) チャンネルは、心筋活動電位の再分極を担う、脱活性化のキネティクスが極めて遅い電位作動性 K⁺チャンネルである。本論文は、ホモロジーモデリング法を用いて得られた空間構造情報を基に、hERG 遺伝子に点変異を導入し、アフリカツメガエル卵母細胞にアミノ酸変異体を発現させて電気生理学的解析を行うことで、C末端側細胞内ドメイン間相互作用による遅い脱活性化の制御機構を分子レベルで明確に証明した研究である。

hERGの遅い脱活性化には、hERGのC末端側細胞内ドメインの関与が示唆されていたが、その詳細はよくわかっていなかった。出願者は、hERGのC末端側にある2つのドメイン (cyclic nucleotide binding (CNB)ドメインとC-linkerドメイン) に着目した。CNBドメインをもつ他のチャンネル (HCNやCNGなど) では、環状ヌクレオチドの結合によりチャンネルの開閉が制御される。hERGチャンネルは環状ヌクレオチドに対する感受性がないものの、CNBドメインのアミノ酸変異や欠損によりhERGの脱活性化が速くなる。出願者は、*Anopheles gambiae* (ガンビエハマダラカ) のERGチャンネルで解かれた結晶構造情報を基に、hERGではPhe860残基の側鎖が内因性リガンドを模倣する形で環状ヌクレオチド結合部位を占拠している可能性を見出した。実際、Phe860を分子量の小さい疎水性アミノ酸 (Ala) や電荷をもつアミノ酸 (ArgやGlu) に置換することでhERGの脱活性化が速くなったことから、Phe860のCNBリガンド結合部位占拠がhERG脱活性化の制御に重要であることを示した。

次に、C-linkerおよびCNBドメインに多く存在する電荷をもつアミノ酸に着目し、それぞれのアミノ酸を逆の電荷をもつアミノ酸に変異させて電気生理学的解析を行った。HCNやCNGチャンネルで示唆されているArg696をGluに置換したところ、脱活性化が遅延した。一方で、Arg696のcounterpartと考えられているC-linkerのAsp727あるいはCNBドメインのAsp767を逆の電荷をもつアミノ酸Lysに置換した変異体はいずれも著しく速い脱活性化を示したことから、Arg696との直接的な静電相互作用が否定された。しかし、Arg696GluとAsp767Lysの二重変異体が著しい脱活性化遅延を示したため、両者は間接的に相互作用している可能性が示された。さらに、系統的なアミノ酸変異体解析によりAsp727のcounterpart探索を行い、新たに、Arg752を直接的に静電的に相互作用しているアミノ酸残基として同定した。

さらに出願者は、ドメイン間相互作用が4量体からなるhERGのサブユニット内相互作用によるものか、あるいはサブユニット間相互作用によるものかを検討するため、hERG野生型と2アミノ酸変異体または異なる1アミノ酸変異体をタンデムにつなげたコンストラクトを作成し、電気生理学的解析を行った。その結果、hERG野生型と2アミノ酸変異体のタンデムコンストラクトにおいてのみ脱活性化が早くなったことから、サブユニット内

(別紙様式 3)
(Separate Form 3)

の相互作用がhERGの脱活性化制御に重要であることを証明した。

本研究は、hERGのC-linkerドメインのAsp727を中心とするC末端側細胞内ドメイン間相互作用がhERGの遅い脱活性化の制御に重要であることを明確に証明した極めて優れた内容であり、今後の当該分野の発展に資するものと考えられる。従って、本論文は学位論文として十分な内容を有しているものと審査委員会において全会一致で判定された。