

電位依存性カリウムチャンネル hERG と阻害剤 Astemizole 複合体のクライオ電子顕微鏡解析

浅井樹¹, 村田武士¹

¹千葉大学大学院理学研究院

Cryo-EM Structure of hERG Channel Complexed with Astemizole

Tatsuki ASAI¹, Takeshi MURATA¹

¹Graduate School of Science, Chiba University

Abstract

hERG チャンネルは心筋細胞の再分極において極めて重要なタンパク質である。その一方で、創薬現場では多様な化合物がこのタンパク質を阻害してしまうことが問題となっており、その解決が求められている。本研究では、阻害剤として名高い Astemizole の阻害機構を明らかにするため、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって hERG-Astemizole 複合体の立体構造を決定した。そして得られた構造より、阻害剤が選択性フィルターの直下に結合してカリウムの輸送を阻害する分子メカニズムについて明らかとなった。

1. はじめに

薬剤が呈する毒性は多様であり、主として肝臓、血管、血液、心臓に対するものが挙げられる。中でも心臓毒性の1つである不整脈は、開発中の薬剤が呈する毒性のおよそ3割程度を占め、抗不整脈薬、抗ヒスタミン薬、抗マラリア薬、向精神薬、抗生物質、胃腸薬など、幅広い種類の薬剤がこのタイプの毒性を示すことがわかっている [1]。不整脈に関与する因子として、電位依存性のイオンチャンネルから複数のタンパク質が明らかとなっているが、human ether-à-go-go related gene (hERG) チャンネルの阻害は、不整脈の原因として最も頻度の高いものになっている [2]。hERG は電位依存性カリウムチャンネルであり、神経細胞や心筋細胞の機能において非常に重要な役割を持つ [3]。特に心臓での機能はよく知られており、心臓の拍動における活動電位の迅速な終結（再分極）に寄与している。それゆえ、薬剤による hERG チャンネルのブロックは、再分極を遅らせ、拍動のリズムを崩し、結果としてロング QT 症候群や、トルサードデポワントといった致死性の不整脈発症へと繋がることになる。

Astemizole は临床上よく知られた hERG 阻害剤の1つである。元はアレルギー性鼻炎の治療薬として米国の製薬会社が開発し上市されていたが、薬剤と因果関係のある有害事象や、米国食品医薬品局 (FDA) が発表した副作用に関するレポートを受けて、市場から撤退した [4]。現在 FDA では、医薬品が持つ QT 間隔延長のリスクを評価するため、すべての候補品に対して hERG チャンネルへの作用を前臨床段階からテストするよう申請者に要求している。また近年では、インシリコ解析などの手法を利用して、候補化合物の hERG に対する毒性を軽減する試みが進められてい

るが、常に効果的なアプローチであるとはいえないのが現状である。原因の1つとして、hERG チャンネルに結合した化合物がどのような仕組みで機能を阻害するのか、つまり薬剤による阻害メカニズムに関する情報の不足が挙げられる。そこで求められる情報の一つが、阻害剤と hERG チャンネルの複合体構造である。しかしながら、hERG チャンネルの構造解析は難易度が非常に高く、1998年に最初のカリウムチャンネル構造が明らかにされ [5]、以降続々とチャンネル構造が報告されていく中においても、hERG に関しては、ほんの数年前まで構造の報告が無かった。

2017年、ついに Roderick MacKinnon らのグループが、クライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) を用いた解析により hERG チャンネルの構造を 3.8 Å の分解能で決定した [6]。この構造から、hERG チャンネルの基本的な機能について構造的に説明されることとなった。しかしながら報告の中では、構造の分解能や、hERG 分子の持つ四回対称性 (C4) の問題から、hERG に結合した阻害剤の座標情報は明らかにされていなかった。そのため、化学的に多様な化合物が hERG チャンネルに結合し、その機能を阻害する分子メカニズムに関しては、未だに不明瞭なままとなっている。そこで本研究では、hERG の阻害剤である astemizole と hERG との複合体構造を決定し、薬剤による hERG 阻害の分子メカニズムの解明をすることを目的とし、hERG の構造研究に着手した。

2. hERG (Astemizole free) の Cryo-EM 解析

解析用データの取得は高エネルギー加速器研究機構の透過型電子顕微鏡 Talos Arctica (電子直接検出機として Falcon 3EC) を用いた。そして、Cryo-EM 制御用ソフトウ

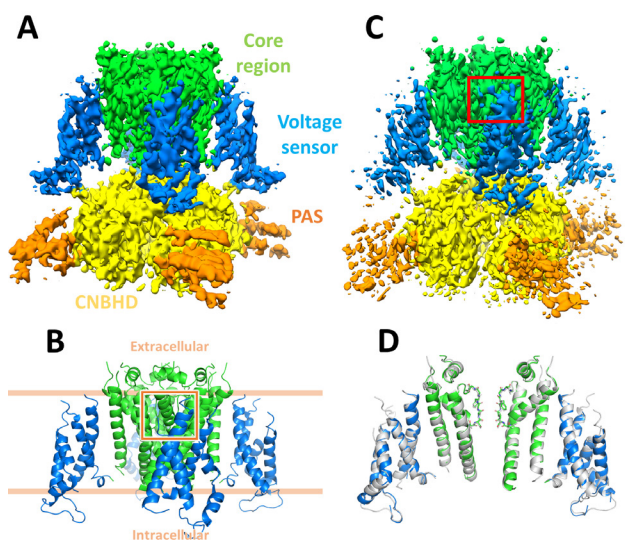


Figure 1 (A) Cryo-EM density map of astemizole-free hERG. (B) Ribbon representation of the hERG core region and voltage sensor domain (or transmembrane domain) in the same orientation and colors as the density map in A. (C) Cryo-EM density map of astemizole-bound hERG. (D) Superposition of the transmembrane domains of astemizole-bound hERG (colored) and astemizole-free hERG structures determined in this study (gray). The two structures were aligned using all four subunits. Only two opposing subunits are shown for clarity.

エア EPU による自動データ測定によって、合計で 1,496 枚の電子線像を取得し、最終的には 173,770 の粒子画像から 3.9 Å の全体分解能をもつ三次元密度マップの再構成に成功した (Fig. 1A)。カリウムイオンの輸送に関与している core region では 3.6 Å と比較的高い分解能を示していた一方で、core region を分子の中心とした時に、分子末端にあたる PAS domain などは局所分解能が 5 Å 程度に留まっていたため、モデルの構築には膜貫通ドメイン (core region, voltage sensor domain) の密度マップのみを使用した (Fig. 1B)。hERG 分子の内部に目を移すと、core region のイオン輸送機能を担う selectivity filter 内において、球形の密度マップが 2 つ観察された (Fig. 5A)。本研究では溶液条件や密度マップの位置からカリウムイオンとして解釈した。モデル構築した hERG 分子に関して各領域を調べると、先行研究と同様に、selectivity filter の直下に 4 つの深い疎水性ポケット構造が存在した [6]。また sensor domain においては、アルギニンやリシンといった塩基性残基が、細胞内側を向いた状態で集中しており、先行研究と同様 hERG チャネルの電位依存性を説明する構造となっていた。

3. hERG (Astemizole bound) の Cryo-EM 解析

クライオ電子顕微鏡解析によって hERG 単体の構造取得に成功したため、以下同様の手法で hERG と astemizole との複合体構造の取得をめざした。複合体の調製方法としては、精製後の hERG に対して過剰量の astemizole を加え、astemizole 存在下の条件でゲル濾過をすることで複合体を得ている。そして、このサンプルについても、hERG

単体の解析と同様に、Talos Arctica を用いた自動データ測定によって 1,865 枚の電子線像を取得し、最終的には 290,998 枚の粒子画像を用いて、密度マップを再構成した。画像処理のプロセスでは astemizole 非存在下の hERG の解析と同様に、C4 対称の制約のもと 3D classification と 3D refinement を実行し、全体分解能 3.5 Å のマップを再構築することに成功した (Fig. 1C, D)。Core region の selectivity filter 内部には astemizole 非存在下の hERG でも観察されたように、タンパク質モデルの構築後も残っている密度マップが観察された。これに関しても、hERG 単体における解釈と同様に、カリウムイオン由来の密度として解釈した (Fig. 2A)。

Selectivity filter の下部には、astemizole 非存在下の hERG から取得したマップでは観察されなかった余剰の密度マップが存在していた。さらに、この密度マップは selectivity filter 直下の空間のみならず、近傍に存在する hERG 特異的な疎水性ポケットをも埋めるように存在しており (Fig. 2C)、先行研究の情報や、本研究内で取得した構造同士の比較より、この余剰の密度マップが astemizole に由来するものと判断した。しかしながら、astemizole と考えられる密度マップは、C4 対称の軸上に重なって存在していたため、この astemizole と思われるマップの形状 (あるいはサイズ) が、hERG 分子内で astemizole の置かれている結合状態を反映しておらず、C4 対称の平均構造を示している懸念があった。そこで、密度マップから対称性による影響を除くため、C4 対称の制約を除き解析処理を再度試み、最終的には 102,128 枚の粒子画像から、3.7 Å の分解能で C1 (対称性の制約無し) 密度マップを得た (Fig. 3C, D)。構築したタンパク質モデルについて、各 chain を比較すると、それぞれの chain で大きな違いは無く類似し

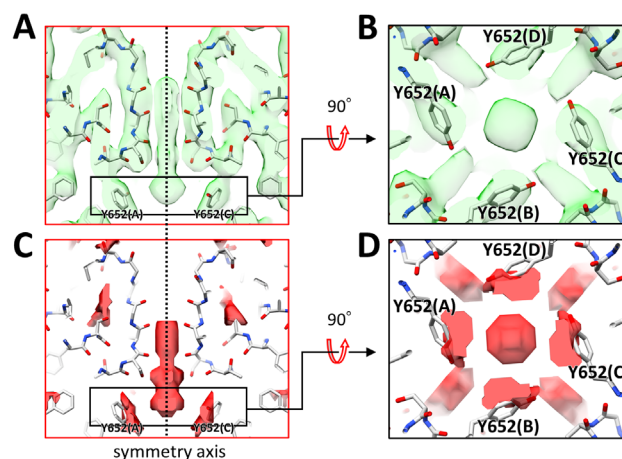


Figure 2 (A) Close-up view of the selectivity filter of astemizole-bound hERG indicated by the red square in Fig. 1C with the density map of the astemizole-bound hERG. Only two opposing subunits are shown for clarity. A dotted line shows the symmetry axis. (B) Cross-section views from the intracellular side, as indicated by the black square in A. (C) Close-up view of the selectivity filter of the astemizole-bound hERG with the differential maps. (D) Cross-section views from the intracellular side as indicated by the black square in C.

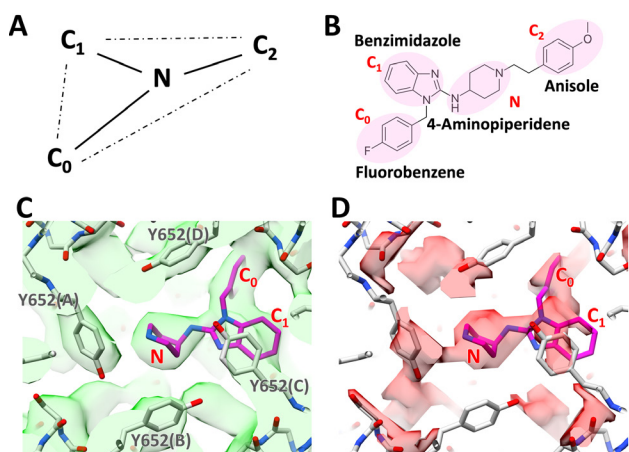


Figure 3 (A) Schematic diagram of the pharmacophore for QT-prolonging drugs. (B) Chemical structures of astemizole, Fluorobenzene, benzimidazole, anisole, and 4-aminopiperidine in the pink circles are pharmacophoric points. (C, D) Close-up views of the astemizole (magenta) binding site in the astemizole-bound hERG C1 structure. The density map (C) and the differential map (D) as well as the orientation, magnification, and depth, are the same as in the figures 2B and 2D.

た構造をとっていた。また分子全体を覗いた際も、各 chain が 90° ずつ回転した位置関係にあり、hERG 分子が C4 対称の分子であることが、対称性の制約を除いた解析からも改めて示された。

C1 密度マップにおいても、selectivity filter 直下にはタンパク質モデル構築後も残っている余剰の密度マップが観測され、さらに C4 対称のマップとは異なり、非対称的な形状で存在していた (Fig. 3C, D)。そして、この astemizole 分子の結合位置に基づき、astemizole をはじめとした hERG 阻害剤による、チャンネル機能阻害のメカニズムについて、以下のように考察した。(1) Astemizole は、hERG チャンネルの selectivity filter 直下に存在する疎水性ポケットにはまり込むように結合し、蓋のようにフィルターの穴を塞いでいる。Selectivity filter はイオン輸送機能を担っているため、カリウムイオンの輸送は astemizole の存在によって物理的かつ立体障害的に阻害される。(2) イオンが selectivity filter を通過する際には、イオンの脱水和が必要であり [5]、hERG チャンネルにおいては、selectivity filter の細胞内側孔に位置する S624 残基がカリウムイオンの脱水和に寄与している。そして astemizole の結合位置を考慮に入れた際、この S624 は astemizole と相互作用を持っており、その結果カリウムイオンの脱水和に必要な残基がふさがり、その結果カリウムイオンの脱水和に必要となる。そのため、hERG 孔内にアクセスしたカリウムイオンは脱水和状態に至ることができず。輸送が阻害される (3) 一方で astemizole は、結合によって hERG チャンネルの構造変化を誘起しておらず、ダイナミックなコンフォメーション変化によるアロステリックな阻害作用は持っていない。本研究の結果より予想されるこれらの機序によって、hERG チャンネルに作用した astemizole はイオン輸送を阻害していると考えられた。

4. 推定される astemizole の結合メカニズム

hERG のイオンチャンネル活性を阻害し、Long QT 症候群を引き起こすとされている薬剤群にはファーマコフォリックな領域として、芳香族骨格に由来する 3 つの質量中心 (C₀, C₁, C₂) と、それらの質量中心のさらに中央に位置している塩基的な窒素原子 (N) が存在するとされており [7]、astemizole 分子の場合、C₀, C₁, C₂, および N がそれぞれ Fluorobenzene, Benzimidazole, Anisole, および 4-Aminopiperidine に対応している (Fig. 3B)。また、hERG チャンネルの変異体解析によって、薬物に対する感受性や、イオンチャンネル活性に影響を与える、いくつかのアミノ酸残基が同定されており [8]、中でも core region に存在する Y652 は、多くの薬物との結合に関与している事が明らかとなっている。とりわけ Y652 側鎖の芳香環が持つ π 電子は、astemizole を含む多くの hERG チャンネルプロトコラーとの結合で不可欠とされている。Astemizole 存在下の hERG 分子のマップから、astemizole 非存在下の hERG のマップを差し引くことで生成した differential map では、Y652 残基の芳香環周辺に大きな余剰のマップが観察されている。この結果は、Y652 周辺に存在する密度マップが、Y652 残基の側鎖のみでは説明できないことを意味しており、astemizole と Y652 が π-π あるいは π-カチオン相互作用を持っていることを示唆している。そして本研究では、先行研究で報告されている事実と、これらの実験データから、密度マップの大きさや形状に基づいて、Y652 残基と astemizole が π-π 相互作用を介して結合している分子モデルを構築した (Fig. 3C, D)。

Astemizole 分子の結合様式としては、C₀ にあたる Fluorobenzene が、selectivity filter 直下から伸びる疎水性ポケットにはまり込み、C₁ にあたる Benzimidazole は、Y652 の細胞外側に位置し π-π 相互作用を形成、N にあたる 4-Aminopiperidine は selectivity filter 直下の分子中央に存在する形となっている。ファーマコフォア C₂ にあたる Anisole は、モデルを構築するための空間として十分な領域が hERG 分子内に残されていたものの、モデルの構築に用いた C1 マップ内では、N と C₂ の結合を示す密度のシグナルが弱かったため、今回は分子モデルから除いている。モデル構築された hERG 分子の構造において、astemizole と一定距離内に位置する残基を示した (Fig. 4)。Astemizole を取り囲んでいる残基をみると、両者は広く疎水性相互作用を形成している事がわかる (chain A の Y652, chain B の Y652, chain C の T623, V625, F656, chain D の S624, G648, S649, Y652 が astemizole と疎水性相互作用を持つ)。その他、特徴的なものとしては、astemizole の Benzimidazole の芳香環が、Y652 (chain C) の芳香環と平行に重なるように 4 Å の位置に存在していること、Benzimidazole の窒素原子が chain C の S624 と 2.9 Å の距離に位置していることが挙げられる。そこから、ファーマコフォアの C₁ である Benzimidazole は、hERG の chain C が持つ Y652 残基との π-π 相互作用、および S624 との水素結合を形成している可能性が非常に高いと考え

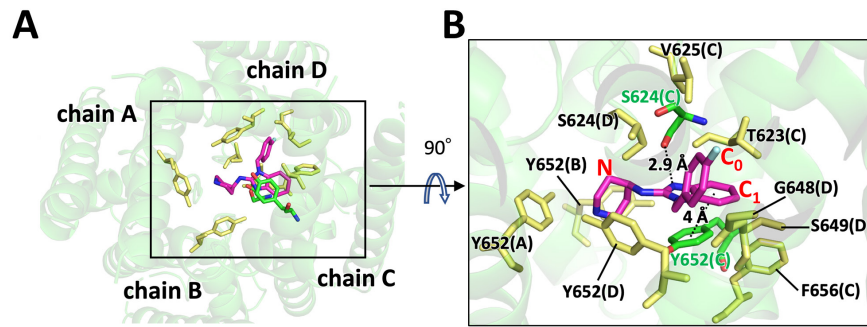


Figure 4 Orthogonal views of the key involved in astemizole binding. The hydrogen bond and π - π interaction are shown as dashed lines.

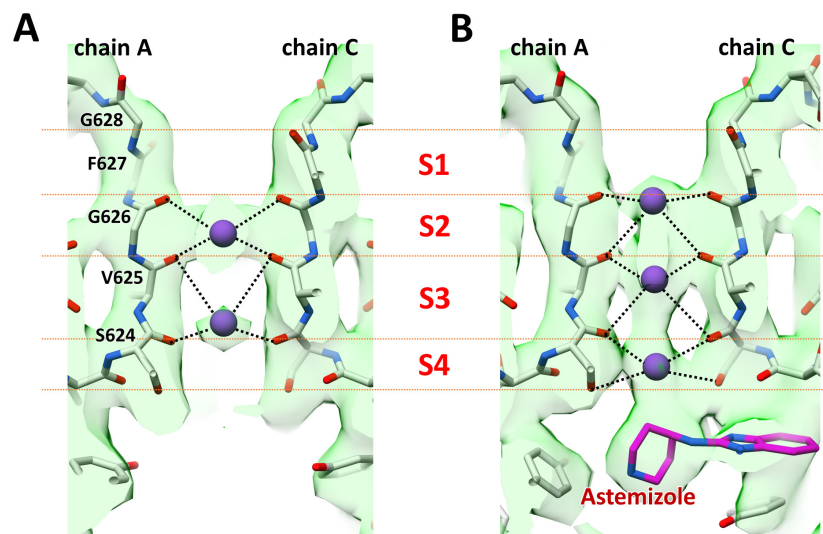


Figure 5 Close-up views of the selectivity filter of astemizole-free (A) and astemizole-bound (B) hERG, K⁺, and astemizole with the density map of the astemizole-free (A) and astemizole-bound (B) hERG. Dashed lines show interactions between K⁺ and oxygen atoms in the selectivity filters. Only two opposing subunits are shown for clarity.

られる。Fluorobenzene (C₀) は、hERG 分子の selectivity filter 直下の空間から伸びる、hERG チャンネル特有の疎水性ポケットを埋めるように存在しており、4-Aminopiperidene (N) は selectivity filter 直下の空間を埋めていた。特に、4-Aminopiperidene は、selectivity filter を細胞内側から塞ぐ蓋としての機能を果たしていると考えられ、hERG チャンネルの機能障害の主たる役割を担っているものと推測することができる。以上から明らかとなった astemizole と hERG 分子の相互作用や、それぞれの官能基とアミノ酸残基の位置関係から、astemizole は 4 つの異なるタイプの相互作用 (静電相互作用、 π - π 相互作用、水素結合、疎水性相互作用) を介して、hERG チャンネルの selectivity filter 直下に広がっているアミノ酸残基群とコンタクトし、強固に hERG チャンネルと結合するものと解釈することができる。

5. カリウムイオン結合サイトについて

hERG チャンネルの selectivity filter に存在する 4 つのカリウムイオン結合部位 (S1, S2, S3 および S4) は、Kv チャンネルのみならずカリウムチャンネル間で高度に保存されている [9]。本研究では、astemizole 非存在下の hERG 単体の

密度マップにおいて、S2, S3 サイトにカリウムイオンと思われる密度マップを観測した (Fig. 5A)。それぞれの密度を比較すると、S2 サイトに存在するものがより強いシグナルを有しており、比較的強固に結合しているものと考えられる。一方で、S1 と S4 サイトでは密度マップは観察されなかった。Selectivity filter 内で対面する chain の距離を測ると、全体的に先行研究で報告されたものより大きくなっており、F627 のカルボニル酸素間の距離は 8.2 Å となっていた。

Astemizole 存在下の hERG より得られた密度マップにおいては、selectivity filter 内の S2, S3, S4 サイトでカリウムイオン様の密度マップが観測された (Fig. 5B)。S1 サイトを構成する F627 のカルボニル酸素間の原子距離は、chain A と chain C とで 8.7 Å、chain B と chain D でも 8.7 Å であり、hERG 単体の構造と同様に、S1 サイトに対するカリウムイオンの親和性は低いものと推測される。そして S1 サイトに密度マップが観測されない事実を支持していると考えられる。また、astemizole 非存在下の hERG との違いとして、S4 サイトにおける密度の有無が挙げられる。こちらに関しては、selectivity filter 直下の astemizole の存

在が、S4 サイトに結合したイオンの乖離を妨げている事によると考えられる。そしてこれらの事実は、「Astemizole が結合することによって selectivity filter に蓋がされ、結果としてイオン輸送を立体障害的に阻害する」という、上述の解釈を強く示唆する結果であるとも思われる。

6. 結び

本研究では、hERG チャンネルの阻害剤がどのようなメカニズムで hERG に結合し、イオン輸送を阻害するのかについて解明するため、代表的な阻害剤である astemizole と hERG との複合体構造を、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって決定した。得られた立体構造より、過去の様々な研究によって予測が立てられながらも、構造的な明示はされてこなかった hERG 阻害剤の結合サイトを、世界で初めて示すことができた。また hERG 内部の astemizole 配向や、astemizole 周辺に位置する残基との関係から「なぜ多様な薬剤が hERG に結合し、その機能を阻害してしまうのか？」という問いに対しても、真実に迫る仮説が立てられたと考える。一方で、追加の検証が必要な事柄も多数残されている。例えば、結合サイトへ阻害剤がアクセスするための経路や、hERG が脱分極期に不活性化するメカニズムは未だに明確な説が存在せず、これらを明らかにすることが今後の hERG 研究の課題だろう。まずは本研究の成果が、医薬品の毒性予測、回避、ひいては患者様の安全の、一端でも担うことができるのであれば幸いである。

謝辞

本研究は、Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社、アステラス製薬株式会社、小野薬品工業株式会社、第一三共 RD ノバーレ株式会社、武田薬品工業株式会社、AMED BINDS などの支援を受けて実施されました。また Cryo-EM 実験は、高エネルギー加速器研究機構の Talos Arctica をグリッドスクリーニングからデータコレクションまで一貫して利用させていただき、KEK SBRC のスタッフの皆様が大変お世話になりました。この場をお借りして心より御礼申し上げます。

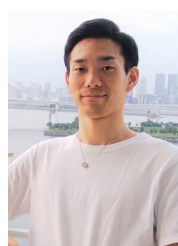
引用文献

- [1] J. L. Stevens, T. K. Baker, Drug Discov. Today. **14**, 162 (2009).
- [2] G. A. Gintant, B. F. Hoffman, Eur. J. Appl. Physiol. **400**, 121 (1984).
- [3] M. Zhang, J. Liu, G. Tseng, J. Gen. Physiol. **124**, 703 (2004).
- [4] J. T. Barbey, M. Anderson, G. Ciprandi, A. J. Frew, M. Morad, S. G. Priori, E. Ongini, M. B. Affrime, Am. J. Rhinol. Allergy. **13**, 235 (1999).
- [5] D. A. Doyle, J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon, Science. **280**, 69 (1998).

- [6] W. Wang, R. MacKinnon, Cell. **169**, 422 (2017).
 - [7] A. Cavalli, E. Poluzzi, F. D. Ponti, M. Recanatini, J. Med. Chem. **45**, 3844 (2002).
 - [8] J. S. Mitcheson, J. Chen, M. Lin, C. Culberson, M. C. Sanguinetti, Natl. Acad. Sci. U.S.A. **97**, 12329 (2000).
 - [9] Z. Lu, A. M. Klem, Y. Ramu, Nature. **413**, 809 (2001).
- (原稿受付日：2022 年 3 月 17 日)

著者紹介

浅井樹 Tatsuki ASAI



エーザイ株式会社筑波研究所 研究員
〒300-2635

茨城県つくば市東光台 5-1-3

e-mail: t2-asai@hhc.eisai.co.jp

略歴：2021 年千葉大学大学院融合理工学府博士課程修了，2021 年 4 月より現職，理学博士。

最近の研究：創薬標的タンパク質の X

線結晶構造解析・Cryo-EM 解析

趣味：ロックフェス参加

村田武士 Takeshi MURATA



千葉大学大学院理学研究院 教授
〒263-8522

千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33

e-mail: t.murata@faculty.chiba-u.jp

略歴：2000 年東京理科大学大学院基礎工学研究科博士課程修了，2000 年英国 MRC 博士研究員，2005 年理化学研究所基礎科学特別研究員，2006 年 JST

ERATO 岩田ヒト膜受容体構造プロジェクトグループリーダー，2007 年京都大学大学院医学研究科助教，2009 年千葉大学大学院理学研究科特任准教授，2013 年同准教授，2014 年 7 月より現職，工学博士。

最近の研究：疾患関連膜タンパク質の構造機能解析

趣味：千葉ジェッツ