弉

集

Na チャンネルの分子構造とトキシン,薬物の結合部位

中山 仁*

はじめに

Na チャンネルは、脳はもとより心筋を含めた 多くの興奮性細胞膜において, 膜興奮の初期に大 きな一過性の電気信号 (活動電位) の発生と伝播 を担う膜タンパク質である。動・植物界には脳・ 神経系に作用する毒物の存在が数多く知られてい るが、これらトキシンの標的分子がイオンチャン ネルの場合には、そのターゲットは Na チャンネ ルであることが多い. 起源や化学構造の違った多 様な Na チャンネル毒 (薬物) は、Na チャンネ ル分子上の異なった部位に結合し、それぞれ特有 の薬理効果・生理作用を示すことが知られている. このように多様な特異的トキシンの存在は、他の イオンチャンネルにもまして、Na チャンネル機 能を分子レベルで研究する格好のプローブを提供 してきたといえる. 電気ウナギ発電器官 Na チャ ンネルの一次構造が初めて明らかにされて1)以後、 脳2)や骨格筋、心筋の同チャンネル構造3)が明ら かとなり (図1)、他方、新たなトキシンの発見 もあって、Na チャンネル機能を分子構造の視点 で理解しようとする研究はますます盛んになって いる。

本稿ではこれらトキシンと Na チャンネルの相 互作用を中心に、Na チャンネルの分子レベルの 理解がどこまで進んでいるのかを、心筋 Na チャンネルの最近のトピックスを含めて概説する。

I. Na チャンネル毒(薬物)の結合とチャンネル機能の変化

現在までに知られている代表的な Na チャンネル毒 (薬物) は、その作用効果から表1のように

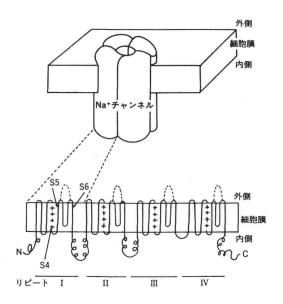


図1 最近の知見をもとに想定された Na チャンネル の膜配置モデル

分類される4).

Na チャンネルは生体膜の膜電位変化によってチャンネルの開閉がコントロールされる,いわゆる「電位依存性イオンチャンネル」の典型的なものである。したがって、膜電位とチャンネル分子の状態(静止状態、活性化状態、不活性化状態)および Na 電流の発生(Na+の細胞内への急速流入)は密接に関連しており、それを模式的に示したのが図 2 である。この図と表 1 を組み合わせると、各種トキシンが Na チャンネル機能のどの部分を修飾するか、定性的には理解しやすくなる。

1. チャンネルの状態とトキシン(薬物)結合 興奮性細胞膜が刺激を受けていない状態では、 細胞膜は電気的に分極しており、多くの細胞の内 側は外に対して-50~-80 mV の膜電位を示す. このとき、細胞膜上の Na チャンネルも "静止状

^{*}熊本大学薬学部放射薬品学教室

表1 Na チャンネルに結合するトキシン群とその作用

結合サイト	トキシン	結合する チャンネル の状態*	活性化過程	Na チーンネルの性質 不活性化過程	イオン選択性
1. グアニジニウ	ム型化合物	R/A/I		遅い不活性化 の増大	測定不可 (イオン透過の阻止)
テトロドトキ	シン (TTY)				
サキシトキシ	> (STX)				
ペプチド性(I)		R/A/I		不明	測定不可
μ-コノトキシ	$\sim \sim (\mu - CTX)$				(イオン透過の阻止)
2. 脂溶性アルカ	ロイドおよびテルペン	R/A	過分極側に シフト	遅延による 活性化の持続	低 下
バトラコトキ	シン (BTX)				
ベラトリジン	(VTD)				
アコニチン					
グラヤノトキ	シン (GTX)				
3. ペプチド性(II)	R/A	影響せず	遅延による 開口時間延長	
北アメリカ産	α – サソリ毒(α ScTX)				
イソギンチャ	ク毒 (ATX)				
ゴニオポラト	キシン				
4. ペプチド性(Ⅲ)	R/A	過分極側に シフト	遅延と反復発射	
	産β_サソリ毒(βScTX) γ_サソリ毒(γScTX)				
5. ポリエーテル	型化合物	R/A	過分極側に シフト	遅い不活性化の 消失と反復発射	低 下
プレベトキシ	> (BvTX)				
シガトキシン	(CgTX)		活性化の遅延		
未同定 局所麻酔	薬(抗不整脈薬)	A/I			
リドカイン	and the second section of the section of t	51 OE.	刺激頻度および	膜電位に	
メキシレチン			依存した活動電位の短縮		
キニジン			活動電位の延長		

^{*:}チャンネルの状態は、静止膜電位下の状態(R)、チャンネルが活性化されて開いた状態(A)、不活性化が進んで閉じた状態(I)の3つに分けた。

態"にあってチャンネルを閉じている.ここに膜電位の脱分極方向への変化をもたらす刺激が加り、それが閾値を越えると Na チャンネルは"活性化状態"となり、急速に開口して活動電流を発生する.この活性化状態 Na チャンネルではは永く続かず、徐々にチャンネルを閉じる"不活性化状態"へと移行した後、最終的にもとの静止状態である(図2).表1で示したように多くをおと戻る(図2).表1で示したように多くテンンは静止状態と活性化状態にある Na チャンネルと結合する.しかし、結合サイト1に結合もないと結合する.循環器疾患治療上、抗不整脈薬としてチャンネルとは結合しないことが知られている5).

2. トキシン(薬物)の結合部位

脳をはじめ、いくつかの組織のNa チャンネルー次構造が判明していることすでに述べたが、細胞膜を貫通して存在するチャンネル分子のどちら側(細胞膜外側、膜貫通部、または細胞質側)に各々のトキシン結合部位が局在するのかを知ることは、チャンネル分子の作動機構(開閉をつかさどるゲート機構やイオン透過の高い選択性を決めるフィルター機構)を理解していくうえからも重要である。図3はNa チャンネル分子の構造モデルといくつかのトキシンの結合部位の推定図である6).

表1で分類した第1群,第3群,第4群のトキシン類は水溶性の高い強塩基性化合物あるいはペ

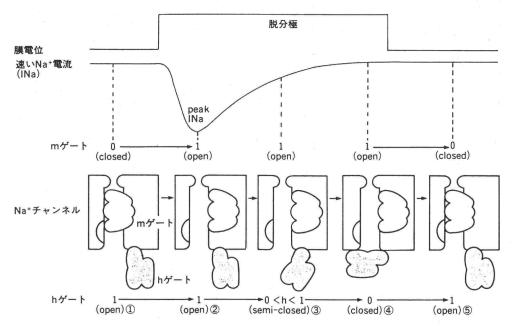


図2 Hodgkin-Huxley 理論による Na チャンネル開閉の模式図 ①静止電位ではmゲートが閉じており、Na 電流は流れない. ②脱分極が起こるとm ゲートは急速に開き(活性化状態)Na+が急速に細胞内に流入する. ③, ④しかし, 時間とともに h ゲートがゆっくり閉じてきて(不活性化)Na+流入はしだいに停止 する. ⑤膜の再分極に伴い m ゲートが急速に閉じる.

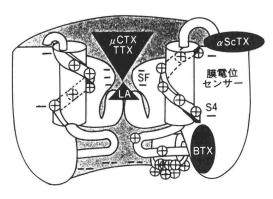


図3 Na チャンネルの分子構造モデルといくつかの トキシンの推定結合部位 トキシンの略号は表1に同じ.

プチドであるから、脂質二重層を主構成要素とする生体膜を通過するとは考えにくいので、細胞膜の外側から作用するとみなされる。 α -サソリ毒 7 や、後述する第1群トキシンのように、結合部位が細胞膜外側にあることを化学的に証明した例もある。これに対し第2群および第5群のトキシン

類は,脂溶性に高いことから,一度脂質二重層に溶け込み,膜貫通部または細胞質側に近い部位に結合すると考えられている.

結合サイト未同定と分類された局所麻酔薬(抗不整脈薬)については次節で述べる.

3. 抗不整脈薬の作用点

Lidocaine, mexiletine, flecanide などの Na チャンネルに作用する薬物は、クラス I 抗不整脈薬として分類されている。これらの薬物は、速い Na 電流(INa)を抑制することにより、活動電位の V max を抑え、伝導遅延やブロック、期外収縮の発生抑制などをもたらす。クラス I 抗不整脈薬は、活動電位持続時間を延長させるもの(Ia)、短縮させるもの(Ib)、変化させないもの(Ic)、と整理する Vaughan Williams の分類があるが8)、これに使用依存性ブロックからの回復時定数、および薬物がどの状態のチャンネルに親和性をもつかを加味した分類 9,18)(図 4)が、より実状に近い

クラス I 抗不整脈薬を作用させたとき、心筋 Na チャンネルの使用依存性ブロック(use-depen-

薬剤	活動電位持続時間	使用依存性ブロック	状態親和性
Lidocaine	超縮 (は)	Fast	不活性化状態
Mexiletine	學精(b)	Fast	不活性化状態
			1
Tocainide	短縮 (比)	Fast	不活性化状態
			1
Aprindine	短編 (ib)	Intermediate	不活性化状態
			1
Procainamide	延長 (lb)	Intermediate	不活性化状態
Quinidine	延長 (la)	Intermediate	活性化状態
	\	\	(
Disopyramide	延長 (la)	Intermediate	活性化状態
	\	\	\
Flecainide	不変(Ic)	Stavi	活性化状態

図4 クラス [抗不整脈薬の新分類 (文献18より引用)

dent block: 薬物の使用ごとに Na 電流の減少が起きる)または頻度依存性ブロック(frequency-dependent block: 心筋細胞の刺激頻度の増大につれて最大 Na 電流が減少する)が起こる 10). したがってこれら薬物は、いわゆる"open-channel blocker"であり、その作用部位は細胞質側と考えられている。パッチクランプ法を用いた最近の詳しい解析では、lidocaine の心筋 Na チャンネルに対する作用は、薬物の化学種がどのようなチャンネル状態に結合するかによって阻害速度が異なることが報告された 11)。注意深い実験と解釈が必要とされる.

 Kチャンネルに注目する方向に移行しつつあるといえるかもしれない。

最近、Duff らは mexiletine(クラス Ib)のラットへ慢性投与によって心筋 Na チャンネル数が増加するが、それは Na チャンネルα サブユニットの mRNA レベルを増加させることを明らかにしている¹³⁾. これが抗不整脈薬の作用機序とどのように関連するかは今後の課題であろう.

II. テトロドトキシンの結合部位とイオン選択 性フィルター部の構成

Na チャンネル研究における最近の一つのトピックスは、テトロドトキシン(およびサキトキシン)がチャンネルタンパクの一次構造上どの部分に結合するのかが解ってきたこと、さらにその部分が、イオンチャンネルの最も基本的な性質の一つ、イオン透過選択性(Na チャンネルでは Na+)をきめる"イオン選択フィルター部"と密接に関連していることを示す重要な結果が得られてきたことである。

テトロドトキシン(TTX)、サキシトキシン(STX)は膜の外側から与えた時のみ Na 電流をブロックし、内側から与えても効果がないこと、および TTX、STX が有機溶媒や生体膜を構成する主成分である脂質にほとんど溶けないことから

も、その結合部位は膜の外側(extracellular side) に面した Na チャンネルの入口近くであろうと推 定されていた。

このトキシン結合には、TTX (STX) 分子中の グアニジニウム基(正電荷をもつ)が主要な役割 を果たしていることから、チャンネル側の受け手 としては特定位置にあるカルボキシル基(負電荷) が第一に想定される. ラット脳 Na チャンネルに 対応する cDNA の site-directed mutagenesis によ って, 特定のアミノ酸残基のみを変換する綿密な 実験が行われた¹⁴⁾.図5に示すように,チャン ネルタンパクの2つのセグメント (S5とS6) をつないでいるリンカー部の中には、SS2とよ ばれる小セグメントがあるが、この中のいずれか 一つの酸性アミノ酸残基(カルボキシル基をもつ) を変異させた場合に、トキシン結合能の著明な減 少が起こることが明らかにされた.したがって、 この部位の酸性アミノ酸残基がトキシン結合に深 く関わっていることが判明した. これらの酸性ア ミノ酸残基は各リピート中, 2つの同等部位に整 列している(図5の▼印)から、4つのリピート が集合してドーナッツ状のチャンネル分子を形成 すると、酸性アミノ酸は2つのリング上に配置す ることになる.

リピートI L F R L M T Q D F W E N L Y Q L T リピートII V F R V L C G E W I E T M W D C M リピートIII L L Q V A T F K G W M D I M Y A A リピートIV L F Q I T T S A G W D G L L A P I

図5 ラット脳 Na チャンネルの SS 2 領域のアミノ酸配列

点変異が行われたアミノ酸には番号が付してあり、負電荷をもつ残基は実線で、正電荷をもつ残基は点線で囲ってある。▼印が二つの負電荷クラスターを形成する(文献14より引用).

ただ、Lys-1422などリピートⅢとⅣ上にあるいくつかのアミノ酸残基の役割については、これだけでは十分説明できない。我々は光反応性TTX誘導体を用いた光アフィニティラベルでその結合部位を解析した結果をもとに、TTXの結合にはLys-1422の正電荷とTTX分子中のヘミアセタール酸素原子(負電荷をもつ)との静電気的

相互作用が、上記の酸性アミノ酸残基群とともに深く関与するとのモデルを提唱した¹⁵⁾.

心筋 Na チャンネルが TTX や STX 感受性がき わめて低いことはよく知られた事実である. 遺伝 子工学的に心筋 Na チャンネル分子 α サブユニッ トの全一次構造が解明された結果, このチャンネ ル分子の TTX (STX) 非感受性を支配している のは酸性アミノ酸残基でも Lys-1422でもなく, Phe-385が Cys に置換していることによると結論 された¹⁶⁾.

これらの結果は、巨大な分子サイズ(250-300kDa)をもつ Na チャンネル中のごく一部の構造部(図 5 で示したSS2部分)が基本的にTTX(STX)結合能を規定している、といえるかもしれない。また、SS2上の酸性アミノ酸残基(とくに Asp-384、Glu-942)は、Na チャンネルがもつ特徴の一つである Na イオンの透過選択性とも密接につながっていることが示されている17)。

これまでみてきたように、特異的なトキシンをプローブとしてイオンチャンネル機能を構築する本質的構造部が明らかになってきている. Na チャンネルには、作用部位が異なる多くのトキシンが存在するだけに、これらをさらに活用することによって、イオンチャンネルの構造と機能関連がより精密に解き明かされることが期待される.

文 献

- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., et al.: Primary strucuture of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. Nature 312: 121-127,1984.
- Noda, M., Ikeda, T., Kayano, T., et al.: Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. Nature 320: 188-192, 1988,
- Rogart, R.B., Cribbs, L.L., Muglia, L.K., ett al.: Molecular cloning of putative tetrodotoxin-resistant rat heart Na+ channel isoform. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86: 8170-8175, 1989.
- 4) 中山 仁:ナトリウムチャンネル関連試薬. 生体の科 学40:422-425, 1989.
- 5) Hondegham, L.M. and Katzung, B.G.: Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channells. Biochim. Biophys. Acta 472: 373-398, 1977.
- 6) Guy, H.R.: A model relating the structure of the sodium channel to its function. in Curr. Topics in Membrane and Transport voll.33. Academic Press, San Diego, 1988, pp. 289-308.
- 7) Tejedor, F.J. and Catterall, W.A.: Site of covalent

- attachment of α -scorpion toxin derivatives in domain I of the sodium channel α -subunit. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.. **85**: 8742-874, 1988.
- Vaughan Williams, E.M.: Classfication of antiarrhythmic drugs. in Symposium on cardiac arrhythmias. Sndoe, E., Flinsted-Jensen, E., Clesen, K.H. (eds.) Astra. Sweden, 1970, pp. 449-49.
- 9) Kodama, I., Toyama, J., Takenaka, C., et al.-Block of activated and inactivated sodium channels by class-I antiarrhythmic drugs studied by using the maximum upstroke velocity of action potential in guinea-pig cardiac muscles. J. Mol. Cardiol., 19: 367-377, 1987.
- Hondeghem, L. and Katzung, B.G.: Test of a model of antiarrhythmic drug action. Effects of quinidine and lidocaine on myocardial conduction. Circulation 61: 1217-1224.
- 11) Sunami, A., Fan, Z., Nitta, J., et al: Two components of use-dependent block of Na + current by disopyramide and lidocaine in guinea-pig ventricular myocytes. Cir. Res., 68: 653-661, 1991.
- CAST investigators: Preliminary report: effect of encamide and flecanide on mortality in a randomized

- trial of arrhythmia suppression after myocardial infraction. N. Engl. J. Med., **321**: 406-412, 1989.
- 13) Duff, H.J., Offord, J., West, J., et al.: Class I and IV antiarrhythmic drugs and cytosolic calcium regulate mRNA encording the sodium channel α-subunit in rat cardiac muscle. Mol. Pharmacol., 42: 570-574, 1992.
- 14) Terlau, H., Heinemann, S.H., Stuehmer, W. et al.: Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. FEBS Lett., 293:93-96, 1991.
- 15) Nakayama, H., Hatanaka, Y., Yoshida, E. et al.: Photolabeled sites with a tetrodotoxin derivative in the domain III and IV of the electroplax sodium channnel. Biochem. Biophys. Res. Commun., 184: 900-907, 1992.
- 16) Satin, J., Kyle, J.W., Chen, M., et al.: A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. Science 256: 1202-1205, 1992.
- 17) Heinemann, S.H., Terlau, H., Stuehmer, W. et al.: Calcium channel chracteristics confered on the sodium channel by single mutations. Nature 356: 441-444, 1992.
- 18) 角南明彦, 平岡昌和. 抗不整脈薬の新しい分類. Mebio 6:24-31, 1989.