

# リチウムイオンに高い選択性を持つ新奇イオンチャネルの創製

入江 克雅

和歌山県立医科大学薬学部薬品物理化学研究室

## 概要

膜電位依存性ナトリウムチャネル(Nav)は  $\text{Na}^+$ を選択的に透過して活動電位を発生させる。 $\text{Na}^+$ の透過効率は他の多くの陽イオンに比べて著しく高いが、 $\text{Li}^+$ は  $\text{Na}^+$ と同様に Nav を透過することができる。しかし、 $\text{Li}^+$ 透過機構についての分子基盤は不明のままであった。そこで、我々は  $\text{Li}^+$ 透過を高めた変異体 Nav を作成しその結晶構造から  $\text{Li}^+$ の透過に関わる Nav の分子基盤を明らかにした。

イオンチャネルのイオン選択性はイオンポアを中心に位置する選択性フィルターによって決定される。本研究では、選択性フィルターに変異を導入し、原核生物由来の Nav の一種である NavAb の  $\text{Li}^+$ 選択性を高めた変異体の作製に成功した。

電気生理学的解析と結晶学的解析から、(1)選択性フィルターの入り口が広がり、水和イオンとして水中に存在する  $\text{Li}^+$ が水和水をタンパク質の酸素原子によって脱水和されることなく選択性フィルターの深部まで侵入できること、(2)イオン認識部位の負電荷が水和した  $\text{Li}^+$ を強く引き寄せること、(3)選択性フィルターを透過する際に水和水の交換回数が少ないこと、が  $\text{Li}^+$ 選択性を向上させる重要な要因として明らかになった。

さらに、SF 周辺の広範な相互作用がイオン孔を安定化させることでイオン透過を支えていることも明らかになった。これらの知見は、様々な神経疾患をターゲットとした薬剤開発や、リチウムの広範な生物学的作用の解明に新たな方向性を与えるものである。

## 1. 研究目的

電位依存性ナトリウムチャネル(Navs)は、膜電位脱分極によって開口しナトリウムイオン( $\text{Na}^+$ )を選択的に透過する膜タンパク質である。この機能によって、神経伝導、筋肉の収縮、分泌、神経伝達などの多くの重要なプロセスが実現されている。そのため、Navs は薬物設計の重要なターゲットである<sup>1</sup>。

また、Navs は高い  $\text{Na}^+$ 選択性を持つ一方で、リチウムイオン( $\text{Li}^+$ )も透過する。リチウムの生理学的役割は不明だが、双極性障害の第一選択薬として今日まで使用されている。 $\text{Li}^+$ によるアルツハイマー病などの他の神経疾患における神経保護効果など、幅広い作用が知られている。これらの生体効果は広く研究されてきたが、 $\text{Li}^+$

が細胞内に侵入するメカニズム、すなわち  $\text{Li}^+$ が Navs に浸透する分子メカニズムは不明であった。

$\text{Na}^+$ の Nav における透過機構は細菌 Navs(BacNavs)の機能解析と三次元構造によって明らかになってきた<sup>2,3</sup>。BacNav は、脊椎動物の Navs のサブドメインに構造が似ている単一のサブユニットのホモ四量体で構成されている。系統発生解析に基づくと、BacNav の系統は真核生物の Nav と電位依存性カルシウムチャネル(Cavs)の祖先から分岐した可能性が高く、その構造的特徴は互いに保存されている。BacNav は、基本的な機能と単純な構造のために、イオンチャネルの分子基盤を解析するモデルタンパク質として有用である。BacNav も  $\text{Li}^+$ を透過し  $P_{\text{Li}}/P_{\text{Na}}$ ( $\text{Na}^+$ に対する  $\text{Li}^+$ の透過比である)は、各 BacNav で 0.6~0.8、哺乳類の Nav で 1 である。そこで、 $\text{Li}^+$ の選

択性を高めた BacNav 変異体を作れば、真核生物 Navs に共通する Li<sup>+</sup>の透過の重要な要因を特定することが可能であると考えた。

本研究では、BacNav で最も構造解析が進む NavAb を用いて Li<sup>+</sup>選択的な変異体を初めて作製することに成功した。その変異体は電気生理学的解析によって顕著な Li<sup>+</sup>選択性を持つことが明らかになった。さらに、結晶構造解析により、Li<sup>+</sup>の選択性を向上させる鍵は、(1)選択性フィルターの入口が広くなり、Li<sup>+</sup>が選択性フィルターに深く侵入すること、(2)イオン認識部位の負電荷による水和 Li<sup>+</sup>イオンの引き寄せ、(3)選択性フィルターを通過する際の水和水交換回数が少ないこと、であることが明らかになった。これは、Navs の Li<sup>+</sup>の透過における相互作用の構造的基盤の初めての知見である。これらの知見は、Li<sup>+</sup>が細胞内に侵入するメカニズムの解明をもたらし、さまざまな神経疾患の治療の改善やリチウムの生物学的影響の理解につながる。

## 2. 研究方法

### 2.1 NavAb 変異体の部位特異的突然変異導入と構築

pBiEX-1 ベクター (Novagen; 71234-3CN) の BamHI 部位と SalI 部位の間に NavAb 遺伝子をサブクローニングし、N 末端に His タグとトロンピン切断部位を付加した。変異導入のためのポリメラーゼ連鎖反応は、PrimeSTAR® Max DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ) を用いて行った。すべてのクローンは DNA シーケンシングによって配列確認を行った。これらの方法はこれまでに確立済みである<sup>4</sup>。

### 2.2 昆虫細胞の電気生理学的測定

電気生理実験には昆虫細胞である SF-9 細胞 (ATCC カタログ番号 CRL-1711) を用いた。SF-9 細胞は、Sf-900™ II 培地 (Gibco) に 1% 100×Antimycotic (富士フイルムワコー) を添加し、27°C で増殖させた。pBiEX-1 ベクターに組み込んだ標的遺伝子をポリエチレンイミン (PEI) 試薬を用いて増強緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を組み込んだ pBiEX-1 ベクターとともに遺伝子導入を行った。遺伝子導入後 24~48 時間のインキュベーション後、細胞を全細胞電気生理測定に使用した。

Li<sup>+</sup>およびその他の陽イオンの相対透過性を決定するための反転電位測定のために、35 mM NaCl, 115 mM NaF, 10 mM EGTA, および 10 mM HEPES-NaOH の (pH 7.4) を含む内部ピペット溶液を用いた。陽イオン選択

性の評価には、Li<sup>+</sup>用細胞外溶液として (150 mM LiCl, 10 mM HEPES, 10 mM グルコース, 2 mM CaCl<sub>2</sub>) を作製した。同様に K<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>の細胞外溶液を調整した。細胞外液の交換は Dynaflo を使用して交換した。すべての実験は、HEKA EPC 10 アンプおよびパッチマスターデータ収集ソフトウェア (v2x73) を使用した全細胞パッチクランプモードを使用して、25°C ± 1°C で実施した。

### 2.3 タンパク質の発現と精製

タンパク質発現には大腸菌 KRX 株 (プロメガ) を使用した。まず 37°C で培養し細胞の濁度である OD<sub>600</sub> が 0.3 になると、発現温度を 20°C まで下げ濁度である OD<sub>600</sub> が 0.8 になった状態で 0.1% のラムノースで発現誘導を行った。その後、一晚培養し菌体を TBS バッファー (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl) で回収・懸濁し、LAB1000 (SMT 社) を用いて 12000 psi で菌体破碎を行った。膜画面分は 100000×g, 1 時間, 4°C の超遠心で回収した。回収した膜画面分を 30 mM n-ドデシル-β-D-マルトシドを含む TBS バッファー (DDM, Anatrace) でホモジナイズして可溶化し、遠心分離 (40000×g, 30 分, 4°C) 後、上清を HIS-Select® Cobalt Affinity Gel カラム (Sigma) にて粗精製を行った。カラム上で DDM を 0.05% ラウリルマルトースネオペンチルグリコール (LMNG, Anatrace) に置換してその後の精製を行った。トロンピン消化により His タグを除去し、0.05% LMNG を含む TBS バッファー中の Superdex-200 カラム (Cytiva) で精製した。

### 2.4 結晶化と構造決定

結晶化のために精製タンパク質を ~10 mg/ml に濃縮した。そして bicelle mix (2.8:1 (1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン)[DMPC, アナトレース]:3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸 [CHAPSO, DOJINDO]) に再構成させて結晶化を行った。調製したタンパク質は、300 nl 容量のタンパク質溶液 (8~10 mg/ml) とリザーバー溶液 (9%~11% polyethylene glycol monomethyl ether [PEG MME] 2000, 100 mM 塩化ナトリウム, 100 mM 硝酸マグネシウム, 25 mM 硝酸カドミウムおよび 100 mM Tris-HCl, pH 8.4) を混合し、20°C でシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化した。結晶を 1~3 週間成長させた後、結晶は硝酸カドミウムを含まない以下の凍結保護液に移し凍結した。凍結保護剤溶液には、11% PEG MME 2000, 100 mM Tris-HCl pH 8.4,

2.5 M 塩化ナトリウム, 100 mM 硝酸カルシウム, および 20% (v/v) DMSO を用いた。

すべてのデータは, SPring-8 の BL32XU と BL41XU 及び BL45XU にて収集した。得られたデータは STARANISO サーバー (Global Phasing Ltd) による異方性の分析により, 異方性が高い結晶であることが明らかになった。そこで, 不十分な回折データが含まれるのを最小限に抑えるために収集したデータは異方性に従って再スケーリングした。

分子置換法によって初期位相を決定した。NavAb 初期モデルには N49K 変異体 (pdb コード; 8H9W) を使用した。最終モデルは COOT (バージョン 0.9.2) で構築した。構造の精密化には Phenix (バージョン 1.18) を使用した。CCP4 パッケージ (v.7.0.078) は, 構造解析に使用した。

### 3. 研究結果

#### 3. 1 イオン選択性の電気生理学的評価

NavAb の選択性フィルターは 5 つのアミノ酸配列である TLESW 配列で構成される。Ser178 の側鎖のヒドロキシル基がイオン透過経路の細胞外入口に位置する (図 1A)。Na<sup>+</sup> が外部からイオン透過経路に近づくとき, Ser178 側鎖の酸素原子は, Glu177 の側鎖と 4 つの水分子とともに Na<sup>+</sup> イオンに直接配位すると考えられている。そこで, Ser178 の側鎖がイオン透過の際に最初にイオンに水和することに注目し, この変異体を作成した。活性測定の実験のために N49K を導入した NavAb 変異体に Ser178 への変異を導入した変異体 (S178X<sup>NK</sup>) の Li<sup>+</sup> 選択性を調べた。

作製した 4 つの変異体, S178V<sup>NK</sup>, S178T<sup>NK</sup>, S178A<sup>NK</sup>, S178G<sup>NK</sup> のうち S178V<sup>NK</sup> では電流は観察されなかった。S178T<sup>NK</sup>, S178A<sup>NK</sup>, S178G<sup>NK</sup> では細胞外液を Li<sup>+</sup> を多く含む溶液に置換したときに, 電流の流れる向きが逆転する電位である逆転電位が N49K 変異体よりも正側に移動していた (図 1B)。これは変異導入によって Li<sup>+</sup> の選択性が向上したことを示していた。

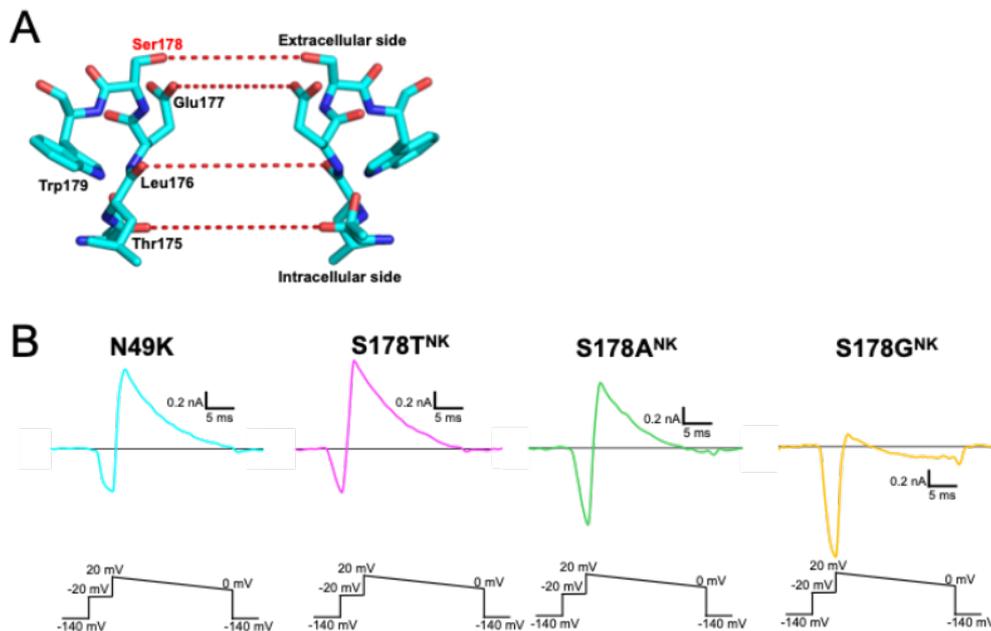


図 1. NavAb N49K, S178T<sup>NK/TA</sup>, S178A<sup>NK</sup>, S178G<sup>NK</sup> の代表的な電流トレース

A) NavAb-N49K 変異体 (PDB コード: 8H9W) の選択性フィルター (SF) を構成する残基 175~179 の側面図。赤い破線は, SF の主鎖と側鎖の酸素原子によって形成される, イオンが通過する水和水交換部位を表す。

B) Li<sup>+</sup> 細胞外溶液を用いたランプ刺激から得られた NavAb N49K, S178T<sup>NK</sup>, S178A<sup>NK</sup>, および S178G<sup>NK</sup> 変異体の電流応答の記録。電流は, -140 mV の保持電位から -20 mV のステップ刺激によって生成され, 続いて異なる電圧値のランプ刺激 (下部に表示) によって生じた。

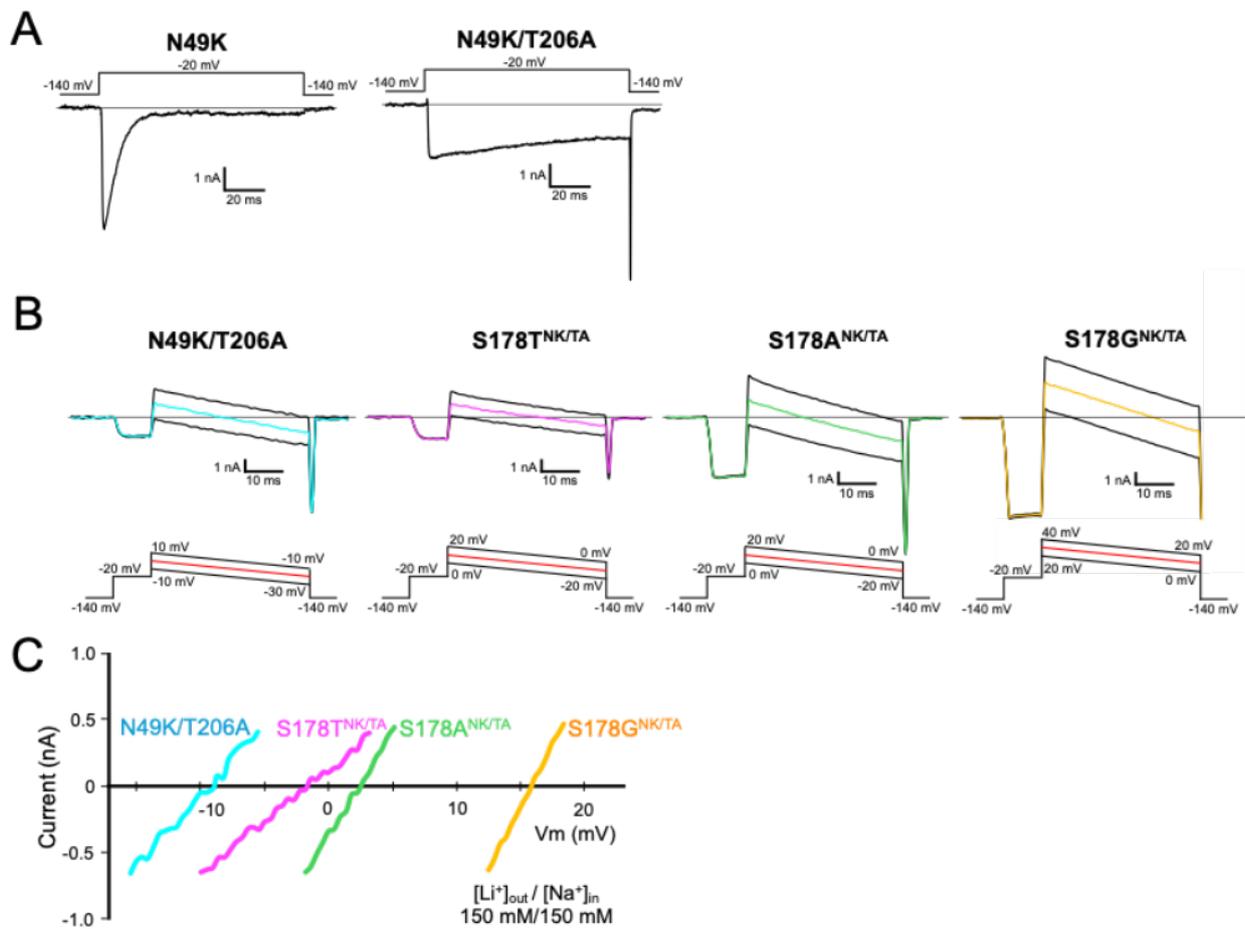


図 2. NavAb N49K/T206A, S178T<sup>NK/TA</sup>, S178A<sup>NK/TA</sup>, および S178G<sup>NK/TA</sup> 変異体における点突然変異の位置と Li<sup>+</sup>選択性評価

- A) N49K の-140 mV の保持電位から-20 mV のパルスが 100 ms えられた場合の全細胞電流。  
 B) N49K/T206A, S178T<sup>NK/TA</sup>, S178A<sup>NK/TA</sup>, および S178G<sup>NK/TA</sup> の代表的な電流。3 つの異なるランプパルスで記録された反転電位の値を平均化した。電流は 150 mM [Li<sup>+</sup>]<sub>out</sub> および 150 mM [Na<sup>+</sup>]<sub>in</sub> で測定した。  
 C) 150 mM [Li<sup>+</sup>]<sub>out</sub> および 150 mM [Na<sup>+</sup>]<sub>in</sub> のランプパルスによって生成された N49K/T206A, S178T<sup>NK/TA</sup>, S178A<sup>NK/TA</sup>, および S178G<sup>NK/TA</sup> の電流-電圧関係グラフ。

イオン選択性を正確に評価するためには、逆転電位を正確に測定することが必要である。そこで、チャネルの不活性化速度を遅くする変異である T206A 変異をさらに導入して各変異体の正確な逆転電位を測定した(図 2)。逆転電位は S178G<sup>NK/TA</sup> が他の変異体の中でも最も高く、この逆転電位から計算される Na<sup>+</sup>に対する Li<sup>+</sup>の透過比 ( $P_{Li}/P_{Na}$ ) は  $2.18 \pm 0.14$  であった(図 2)。他の変異体の  $P_{Li}/P_{Na}$  は、S178A<sup>NK/TA</sup>, S178T<sup>NK/TA</sup>, および N49K/T206A でそれぞれ、 $1.09 \pm 0.05$ ,  $0.96 \pm 0.01$ , および  $0.71 \pm 0.02$  であった。すなわち、S178G<sup>NK/TA</sup> は野生型に相当する

N49K/T206A よりも、約 3 倍 Li<sup>+</sup>をよく通すことができる。他の 3 種類のイオン(K<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>)の選択性も評価したところ、野生型との変化は観察されなかった。

### 3. 2 Li<sup>+</sup>選択性変異体の結晶構造

Li<sup>+</sup>選択性向上の分子メカニズムを明らかにするために、S178T<sup>NK</sup>, S178A<sup>NK</sup>, S178G<sup>NK</sup> の変異体の結晶化を行い、約 3.0 Å の分解能で構造を決定した(図 3)。T206A を含む変異体でも結晶化を行ったが、T206A を含むことで分解能は悪化した。T206A 変異を含む変異体で最も分解能がよかった S178T<sup>NK/TA</sup> 変異体において S178T<sup>NK</sup> 変異体と

の Ca 炭素のずれはほとんど見られなかったため、すべての構造解析を、T206A 変異は導入せずに行った。

178 番目の残基は、イオン透過経路の入り口に位置しており、そのバルク溶液側に Met181 が配置している。その Met181 の側鎖付近に水分子が観察された(図 3: 矢印)。最も高い Li<sup>+</sup> 選択性を示す S178G<sup>NK</sup> 変異体では、グリシン変異によって側鎖がなくなったために 178 番目の残基位置の周辺に大きな空間が生じていた(図 3D)。この

空間に、水分子が深く入り込んでいる様子が観察された。この違いは Li<sup>+</sup> 選択性の向上に寄与すると考えられた。S178A<sup>NK</sup> 変異体では、S178G<sup>NK</sup> 変異体の水分子に対応する位置に弱い電子密度ではあるものの、同様の水分子が観察された(図 3D)。S178A<sup>NK</sup> 変異体が 2 番目に高い Li<sup>+</sup> 選択性を有することを考慮すると、チャンネル入口に接近する水分子は Li<sup>+</sup> 選択性にとって好影響があると考えられる。

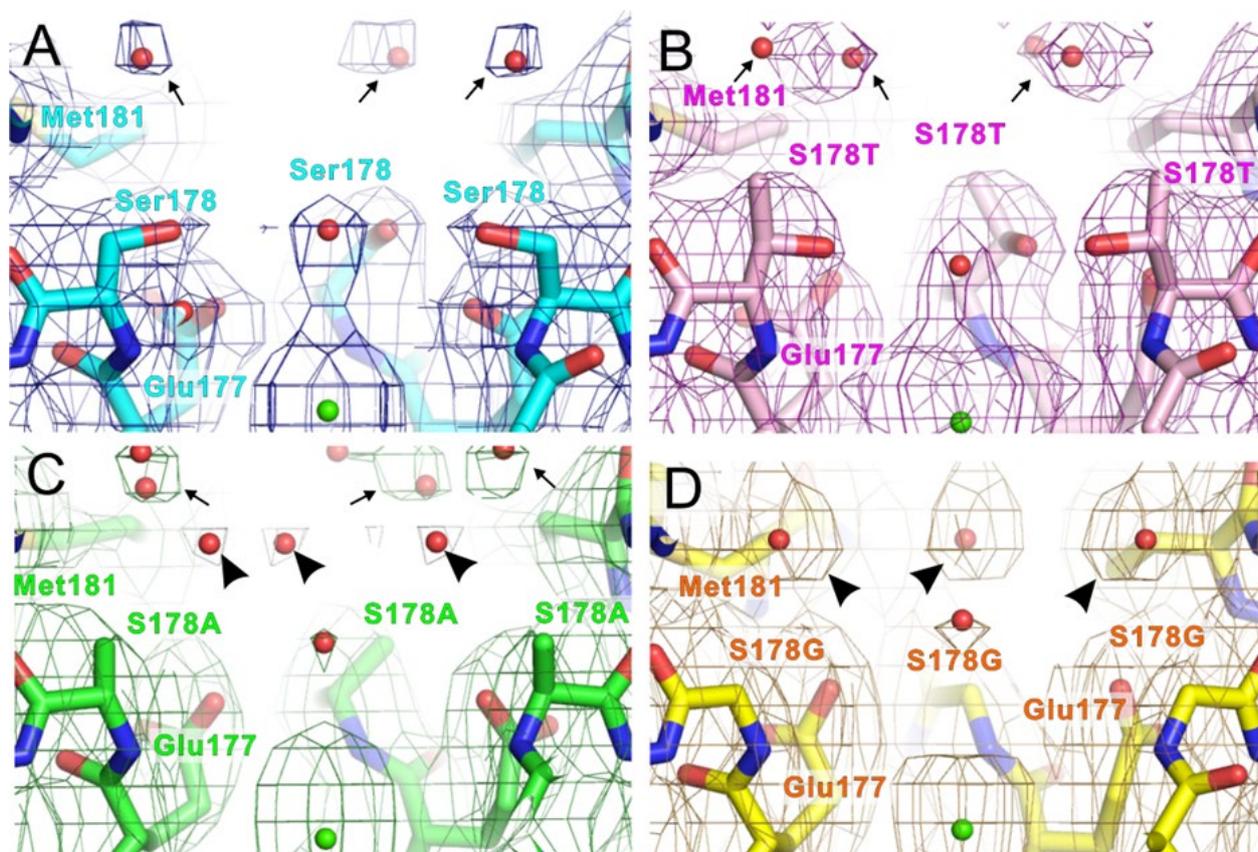


図 3. NavAb N49K, S178T<sup>NK</sup>, S178A<sup>NK</sup>, および S178G<sup>NK</sup> 変異体の選択性フィルター構造

A-D) NavAb N49K, S178T<sup>NK</sup>, S178A<sup>NK</sup>, S178G<sup>NK</sup> 変異体のイオン経路を脂質二重膜に対して水平な方向から観察した電子密度図。電子密度は  $1\sigma$  の  $2F_o - F_c$  電子密度マップ。

NavAb N49K, S178T<sup>NK</sup>, S178A<sup>NK</sup>, S178G<sup>NK</sup> 変異体の炭素原子をそれぞれシアン、マゼンタ、緑、黄色に着色した。NavAb N49K, S178T<sup>NK</sup>, S178A<sup>NK</sup>, S178G<sup>NK</sup> 変異体の電子密度は、それぞれ青色、濃いマゼンタ、濃い緑、オレンジ色に着色した。NavAb S178A<sup>NK</sup> で観察された  $0.5\sigma$  の弱い電子密度は、灰色で示した。黒矢印は水分子を示す。イオン透過経路近傍の水分子は黒色の矢尻で示した。

### 3.3 イオン経路の形状

S178T<sup>NK</sup> 変異体では、変異した側鎖の部分が選択性フィルター内での最も狭い領域になり、その半径は 2 Å 未満になる。野生型の Ser 残基でも同様の最も狭い領域でありイオン孔の半径は 2 Å を超える。S178A<sup>NK</sup> 変異体および S178G<sup>NK</sup> 変異体では、小さな側鎖の残基への変異であるため、この領域のイオンポアの形状がより広がる。これら 2 つの変異体がリチウム選択性の向上を示すことを考えると、細孔を広げることでリチウム選択性が向上した可能性がある。一方、透過経路が狭くなった S178T<sup>NK</sup> でも Li<sup>+</sup> 選択性がわずかながらも向上したという事実とは矛盾する。

そこで次に、イオン孔を形成する残基に着目した(図 4)。イオン透過経路は、NavAb の選択的フィルター配列で

ある TLESW によって形成され、イオン透過経路の表面には「176-LES-178」の 3 つの残基が配置している(図 4)。Met181 は、178 番目のアミノ酸残基の細胞外側に位置しており、S178G<sup>NK</sup> の場合、Met181 側鎖は Gln172 側鎖に向かって移動していた(図 4D)。Gln172 はイオン透過経路の裏側に位置し、イオン透過経路に面していない。その一方で、Gln172 の側鎖は Glu177 主鎖のカルボニル基と水素結合を形成していた(図 4)。Glu177 の側鎖はカルボン酸であり、イオン透過経路内での重要なイオン認識部位を形成する。その為、Gln172 と Glu177 の主鎖の水素結合は、イオン透過経路の構造の安定化に寄与すると考えた。したがって、S178G<sup>NK</sup> で観察された Met181 の側鎖の Gln172 への移動と Li<sup>+</sup> 選択性の関連を検討した。

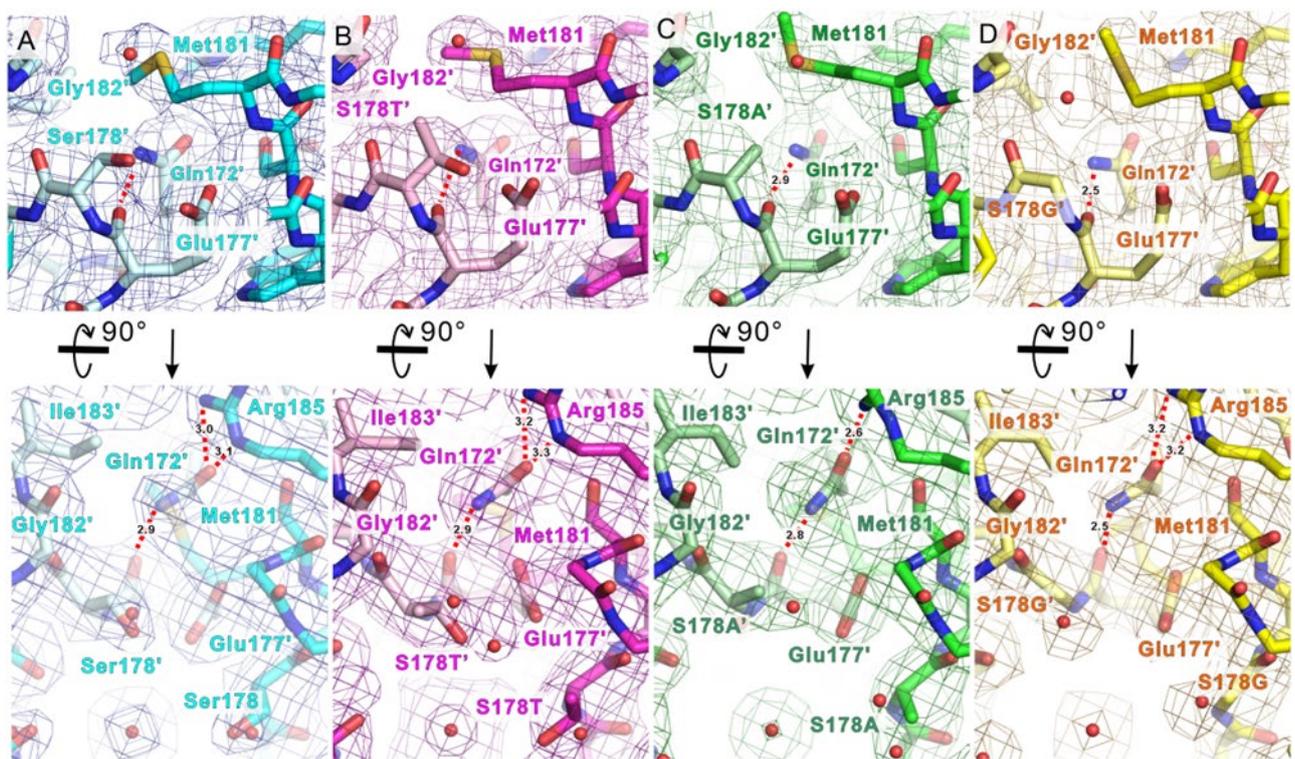


図 4. 選択性フィルターの裏庭にある水素結合ネットワーク

A-D) 上図: NavAb N49K, S178T<sup>NK</sup>, S178A<sup>NK</sup>, S178G<sup>NK</sup> 変異体の選択性フィルターの Met181 および隣のサブユニットの Glu177 および Gln172 の電子密度とタンパク質構造のイオン経路の中心からの脂質二重膜に対して水平方向から見た図。これらの図は、図 4 の背面中央にあるサブユニットの拡大図に対応する。1 $\sigma$  の 2F<sub>o</sub> - F<sub>c</sub> 電子密度マップ(青, 濃いマゼンタ, 濃い緑, オレンジ)。

下図: Met181 周辺の電子密度とタンパク質構造の細胞外側からの脂質二重膜に対して細胞外側から垂直方向から見た図。Arg185 の相互作用が S178G<sup>NK</sup> で失われたことを示す。

表 1. NavAb Met181 変異体のイオン選択性

	$P_{Li}/P_{Na}$		$P_K/P_{Na}$		$P_{Ca}/P_{Na}$		$P_{Ca}/P_{Na}$	
N49K/T206A-M181A	0.84 ± 0.03	$p < 0.01$	<0.05* ± 0.03	NS	<0.01*	$p < 0.01$	0.36 ± 0.02	$p < 0.01$
	(n = 8)		(n = 3)		(n = 6)		(n = 4)	
S178A <sup>NK/TA</sup> -M181A	1.09 ± 0.04	NS	0.09 ± 0.01	$p < 0.01$	<0.05*	NS	0.41 ± 0.05	$p < 0.01$
	(n = 7)		(n = 5)		(n = 5)		(n = 7)	
S178G <sup>NK/TA</sup> -M181A	0.99 ± 0.04	$p < 0.01$	<0.05* ± 0.01	NS	<0.05*	NS	0.47 ± 0.05	$p < 0.01$
	(n = 3)		(n = 3)		(n = 3)		(n = 4)	

p 値は、M181A 前変異体(N49K/T206A, S178ANK<sup>TA</sup> および S178GNK<sup>TA</sup>)を用いた t 検定の結果を示す。

\*反転電位が不活性化電位を下回った場合、 $P_M/P_{Na}$ は<0.05 と記載され、これは各変異体の測定可能な最小反転電位から計算された値である。すべての値に± SEM を示した。

### 3. 4 Met181 と Gln172 の突然変異効果

Li<sup>+</sup>選択性が最も高い S178G<sup>NK</sup> では、水分子の電子密度がイオン透過経路の入り口付近でも観察されており、水とイオンがイオン透過経路近傍まで侵入することが Li<sup>+</sup>の選択性を向上させると考えた。Met181 は細イオン透過経路の最狭部位に続く細胞外の漏斗の底部である。そこで、Met181 に変異導入し、イオン透過経路への経路を広げることによる Li<sup>+</sup>の選択性の変化を評価した(表 1)。M181A 変異を NavAb N49K/T206A と S178T<sup>NK/TA</sup>, S178A<sup>NK/TA</sup> および S178G<sup>NK/TA</sup> に導入し逆転電位の変化を測定した。S178T<sup>NK/TA</sup>-M181A 変異体では発する電流が微弱であり活性の評価が困難であった。また、S178A<sup>NK/TA</sup>-M181A, S178G<sup>NK/TA</sup>-M181A では、信頼性のある逆転電位が測定された。その結果、Li<sup>+</sup>の選択性は、N49K/T206A-M181A ( $p < 0.01$ )では有意に増加した( $P_{Li}/P_{Na} = 0.84 \pm 0.03$ )。S178G<sup>NK/TA</sup>-M181A ( $p < 0.01$ )では、変異体前と比較して有意に減少した( $P_{Li}/P_{Na} = 0.99 \pm 0.04$ )。S178A<sup>NK/TA</sup>-M181A では、Li<sup>+</sup>の選択性はほとんど変化しなかった( $P_{Li}/P_{Na} = 1.09 \pm 0.04$ )。M181A 変異の導入により、どの変異体も  $P_{Li}/P_{Na}$  が 1 に近づいており、Na<sup>+</sup>と Li<sup>+</sup>の分別が行われていないことが明らかになった。また、 $P_{Ca}/P_{Na}$  は、すべての変異体で有意に増加していた。これらの結果は、M181A 変異導入によって全体的な陽イオン選択性の喪失を引き起こしたことを示している。

結晶構造によると、Met181 はイオン透過経路への広い入り口である細胞外漏斗にあり、その側鎖は隣接するサブユニットの Gln172 および Ile183 に向かってつま先を伸ばしている。特に Gln172 の側鎖は選択性フィルターを構成する Glu177 の主鎖のカルボニル基および Arg185 の側鎖

と高度な水素結合ネットワークを形成する。したがって、NavAb の Met181 は、Glu177 と直接相互作用する Gln172 を介してイオン選択性を制御すると予測できる。

### 4. 考察

これまでに報告された BacNav のイオン選択性解析では Li<sup>+</sup>の選択性は野生型で  $P_{Li}/P_{Na}$  が 0.6~0.8 程度であり  $P_{Li}/P_{Na}$  が 1 を超えるものの報告はなかった<sup>5, 6</sup>。このことから、今回創出した NavAb S178G<sup>NK/TA</sup> 変異体は初めての Li<sup>+</sup>選択的チャネルすなわち LivAb と呼ぶことができる。また、LivAb の構造解析から Li<sup>+</sup>の透過にはイオン透過経路への水分子の侵入が重要であることが示唆された。

これまでの研究で、Navs のイオン透過において水と水の交換が重要であることが示されている<sup>7</sup>。NavAb の結晶構造から、選択性フィルター内には主鎖と側鎖の酸素原子で構成される 4 つの水と水交換サイトがあることが分かっている(図 1A)。バルク溶液中の完全に水和した Na<sup>+</sup>は水溶液中の水分子を水和水として次々と交換しながらブラウン拡散によって溶液中を移動する。Na<sup>+</sup>がイオン透過経路に近づくと、まず水和水を介してタンパク質と相互作用する。NavAb の場合、水と Na<sup>+</sup>イオンから 2 つの水和水が引きはがされる必要があり、引きはがされた水和水の代わりに Ser178 側鎖の酸素原子と Glu177 の側鎖のカルボニル基の酸素原子が配位する<sup>8</sup>。Na<sup>+</sup>は Glu177 の側鎖との水和水によってイオン透過経路内に入ると、次の水和水交換部位である Leu176 および Thr175 の主鎖のカルボニル基の酸素原子を水和水の代わりに配位して、チャンネル内腔に到達する。これらの水和水交換過程はほぼ自由拡散の

速度で進行する。Navs の選択性フィルターの直径は十分に広いので、2~3 個の Na<sup>+</sup>イオンがイオン透過経路内に保持され、部分的に脱水された状態で透過する。

Na<sup>+</sup>と Li<sup>+</sup>は一価の単一原子陽イオンであり、Li<sup>+</sup>のイオン半径 (0.6 Å) は Na<sup>+</sup>のイオン半径 (0.95 Å) よりも小さい。半径が小さいため、Li<sup>+</sup>は Na<sup>+</sup>よりも水分子との電気的相互作用が強く、水和水交換の速度が遅い。透過経路内では、タンパク質の酸素原子が水分子の代わりにイオンは水和水の交換速度に従って段階的に通過する。そのため、水和水交換の回数が減少すると、律速段階が減少するため、イオンはイオン透過経路をより速く通過できる。その効果は、交換速度が遅いイオンにとってより大きなメリットとなる。したがって、透過経路内で相互作用する酸素原子が多いほど、Li<sup>+</sup>の透過速度は遅くなり、透過効率は低下する。この研究では S178A<sup>NK/TA</sup> および S178G<sup>NK/TA</sup> (LivAb) では、NavAb の N49K/T206A と比較して、178 番目の位置での水酸基が一つ欠失する。この水和水交換サイトの減少が Li<sup>+</sup>の透過性を増加させたと考えられた。

次に、イオン透過経路の入口が広いことが Li<sup>+</sup>の透過には有利であると考えられる。主な理由の 1 つは、入口を広げると最も強力なイオン結合サイトが露出することである。最も強力なイオン認識サイトは Glu177 の側鎖のカルボン酸による負に帯電した陽イオン結合部位である。178 番目の残基の側鎖のグリシン変異による欠損は Glu177 側鎖を直接細胞外にさらすことになる。Li<sup>+</sup>は Na<sup>+</sup>よりも強力な電子相互作用力を持っているため、グルタミン酸の負電荷により強く引き付けられる。したがって、S178G<sup>NK/TA</sup> のイオン透過経路でのむきだしの Glu177 の側鎖が強くイオンを引き寄せる。その結果、より強くカルボン酸と相互作用可能な Li<sup>+</sup>とがより引き寄せられるため、Li<sup>+</sup>の透過性が向上すると考えられる。

この Li<sup>+</sup>選択性の向上のための微調整は、一部の BacNav ホモログで観察された選択性フィルターへの負電荷の追加による Ca<sup>2+</sup>選択性の向上<sup>9</sup>に類似する。NavAb-S178G<sup>NK/TA</sup> 変異体は低い Ca<sup>2+</sup>選択性を保持 ( $P_{Ca}/P_{Na} < 0.01$ ) しながら、Li<sup>+</sup>選択性を向上することができた。以前に報告した唯一の原核生物由来の Cav である CavMr は BacNav のようなホモ四量体として機

能し選択性フィルターの配列は "TLEGW"である<sup>10</sup>。これは LivAb の配列 と同一である。CavMr の選択性フィルター配列 (TLEGW) の中でグリシン残基は、Ca<sup>2+</sup>選択性において重要な役割を果たしており、そのグリシンからセリンへの点変異で Ca<sup>2+</sup>選択性が消失する。一方、NavAb の S178G 変異は Li<sup>+</sup>のみに影響を及ぼしている。CavMr では Met181 の位置はアスパラギン酸であり、アスパラギン酸側鎖の電子的相互作用により陽イオン透過性に影響を与えられ<sup>10</sup>。

これらの Navs における Li<sup>+</sup>透過メカニズムの発見と、新規の「Li チャンネル」である LivAb の作製は、様々な神経疾患を標的とした創薬の方向性となり、リチウムが関連する様々な生物学的影響の解明につながると期待される。

## 5. 今後の課題

今回の研究結果から、Met181 と Gln172 がイオン透過経路の裏側から作用しイオン選択性に影響を与えることが示された。これまでの研究では、イオン透過経路に面していない残基についてはその役割が実験的に評価されることはほとんどなかった。Li<sup>+</sup>選択性の分子基盤をよりよく理解するためには、特にイオン透過経路とポアヘリックス間のこれらの広範な相互作用とイオン選択性についての詳細な解析が今後必要になるだろう。

## 6. 文献

1. Hille, B. Ion Channels of Excitable Membranes, Third Edition (Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc). (2001).
2. Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N. & Catterall, W. A. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **475**, 353–359 (2011).
3. Irie, K., Oda, Y., Sumikama, T., Oshima, A. & Fujiyoshi, Y. The structural basis of divalent cation block in a tetrameric prokaryotic sodium channel. *Nat. Commun.* **14**, 4236 (2023).
4. Irie, K., Haga, Y., Shimomura, T. & Fujiyoshi, Y. Optimized expression and purification of NavAb provide the structural insight into the voltage dependence. *FEBS Lett.* **592**, 274–283 (2018).

5. DeCaen, P. G., Takahashi, Y., Krulwich, T. a, Ito, M. & Clapham, D. E. Ionic selectivity and thermal adaptations within the voltage-gated sodium channel family of alkaliphilic Bacillus. *eLife* **3**, 1–15 (2014).
6. Naylor, C. E. *et al.* Molecular basis of ion permeability in a voltage-gated sodium channel. *EMBO J.* **35**, 820–830 (2016).
7. Ahern, C. A., Payandeh, J., Bosmans, F. & Chanda, B. The hitchhiker’s guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *J. Gen. Physiol.* **147**, 1–24 (2016).
8. Corry, B. & Thomas, M. Mechanism of ion permeation and selectivity in a voltage gated sodium channel. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 1840–1846 (2012).
9. Tang, L. *et al.* Structural basis for Ca<sup>2+</sup>-selectivity of a voltage-gated calcium channel. *Nature* **505**, 56–61 (2014).
10. Shimomura, T. *et al.* A native prokaryotic voltage-dependent calcium channel with a novel selectivity filter sequence. *eLife* (2020) doi:10.7554/eLife.52828.

## Creation of Novel Ion Channels with Lithium Selectivity

Katsumasa Irie

Department of Biophysical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Wakayama Medical University

### Summary

Selective permeation of  $\text{Na}^+$  is crucial for neural activity since voltage-gated sodium channels (Navs) contribute to a rapid increase in action potentials in neuronal signaling.  $\text{Li}^+$  is known to permeate Navs with about 70% efficiency of  $\text{Na}^+$ , and  $\text{Li}^+$  has been used for a long time as a treatment for bipolar disorder. However, the difference between the permeation mechanism of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Li}^+$  in Navs remained unclear.

To elucidate the mechanism of  $\text{Li}^+$  permeation, we searched for a mutant that increases  $\text{Li}^+$  selectivity in NavAb, a prokaryotic Nav whose structure is most analyzed. NavAb forms a tetramer, with an ion pathway at the center of the tetramer. The five most important residues (TLESW) are named the selectivity filter (SF). We found that  $\text{Li}^+$  selectivity increases when the serine residue in the SF is mutated to several small side chain residues by electrophysiological measurement. We determined the crystal structure of these mutants. The mutated SF residue is located at the outer entrance of the ion pathway. In smaller-side-chain mutants, this entrance was found to be widened. In the glycine mutant, additional water molecules are located in the space created by the mutation. The position of this water molecule corresponds to that of the hydroxyl group of the serine residue in the wild-type channel. Considering the glycine mutant's increased  $\text{Li}^+$  selectivity, the hydroxyl group of the entrance of the ion pathway disturbs  $\text{Li}^+$  permeation. Because  $\text{Li}^+$  has a smaller ionic radius than  $\text{Na}^+$ , it exchanges hydrated waters more slowly than  $\text{Na}^+$ . Due to this property, in the wild-type channel,  $\text{Li}^+$  takes a longer time to pass through the hydroxyl group of serine residue compared to  $\text{Na}^+$ . The lack of hydroxy group in the glycine mutant may facilitate  $\text{Li}^+$  passage, enhancing  $\text{Li}^+$  selectivity.

These results provide the first insight into the molecular mechanism increasing  $\text{Li}^+$  selectivity and may aid in the development of novel ion channels with enhanced  $\text{Li}^+$  permeability