

## 審査の結果の要旨

氏名 丸山 達朗

Mg<sup>2+</sup>チャネル MgtE の開閉機構の解明と題する本論文は、MgtE が細胞内 Mg<sup>2+</sup>濃度依存的にイオン透過路の開閉を制御する構造機構に関して、NMR にて解析した成果を述べたものである。本論文は、全 4 章から構成されており、第 1 章に序論、第 2 章に実験材料および実験方法が記されている。第 3 章に実験結果がまとめられ、第 4 章では実験結果に対する考察について述べている。

第 3 章においては、まず調製した全長 MgtE が Mg<sup>2+</sup>結合能を有し、Mg<sup>2+</sup>依存的に構造変化することを確認している。また、MgtE 細胞質領域のみのコンストラクトを用いた常磁性緩和促進効果解析により、Mg<sup>2+</sup>非存在下における細胞質領域の構造を明らかにしている。次に、全長 MgtE の Mg<sup>2+</sup>依存的な NMR シグナルの変化の解析により、チャネルの開閉に伴う構造変化部位を同定している。最後に、各 Mg<sup>2+</sup>結合部位(Mg1～Mg7)の変異体解析により、構造変化に対する各 Mg<sup>2+</sup>結合部位の寄与を明らかにしている。

これまでに行われた電気生理学的解析から、MgtE が完全に閉口するのに、細胞質領域に位置する Mg<sup>2+</sup>結合部位 Mg2～Mg7 の全てに Mg<sup>2+</sup>が結合することが必須であり、これらの部位に Mg<sup>2+</sup>は段階的に結合することが示唆されていた。しかしながら、MgtE の完全な閉状態への移行に伴う構造変化部位、すなわち最も高い Mg<sup>2+</sup>濃度にて構造変化する部位と、その構造変化を引き起こす Mg<sup>2+</sup>結合部位は不明であった。これらを明らかにするため、本論文では NMR 解析のプローブとして Ileδ1 メチル基を選択し、全長 MgtE の Mg<sup>2+</sup>依存的な構造変化の情報を部位特異的に取得することに成功していた。まず調製した MgtE に Mg<sup>2+</sup>を滴定し、NMR スペクトルの変化が 5 mM にて飽和したことから、調製した MgtE が Mg<sup>2+</sup>結合能を有し、Mg<sup>2+</sup>依存的に構造変化することを確認していた。MgtE の開閉機構の解明の最初のステップである、Mg<sup>2+</sup>依存的な構造変化を明らかにするため、細胞質領域のみのコンストラクトを用いた常磁性緩和促進効果解析を行っていた。その結果から、溶液中の N ドメインは CBS ドメインの周辺に広く分布していることを明らかにしていた。次に、最も高い Mg<sup>2+</sup>濃度にて構造変化する部位を調べるため、Mg<sup>2+</sup>滴定に伴う Ileδ1 メチルシグナルの変化を解析していた。その結果、変化が飽和する Mg<sup>2+</sup>濃度は、膜貫通領域の Ile では 2～3 mM、細胞質領域の Ile では 3～5 mM であった。この結果から、高濃度域にて構造変化する細胞質領域の部位が、チャネルの開閉に伴う構造変化部位であることを明らかにしていた。このようなチャネルの開閉に伴う細胞質領域の部位の構造変化を引き起こす Mg<sup>2+</sup>結合部位を同定するため、変異により Mg<sup>2+</sup>結合能を欠失させた変異体を結合部位毎に作製し、それら変異体の Mg<sup>2+</sup>滴定に伴う Ileδ1 メチルシグナルの変化を野生型と比較していた。その結果から、膜貫通領域の Mg<sup>2+</sup>依存的な構造変化は Mg1, Mg2, Mg3, Mg6 により制御されていること、細胞質領域の Mg<sup>2+</sup>依存的な構造変化を制御するのは Mg1, Mg2, Mg3,

Mg6 に加えて、N ドメインでは Mg4, Mg5, Mg7, CBS ドメインでは Mg4, Mg5, plug helix では Mg5 であることを明らかにしていた。

第 4 章においては、まず全長 MgtE の  $Mg^{2+}$  非結合型から結合型への  $Mg^{2+}$  依存的な構造変化について議論している。次に、チャネルの開閉に伴う細胞質領域の部位の構造変化を引き起こす  $Mg^{2+}$  結合部位について議論している。膜貫通領域の  $Mg^{2+}$  依存的な構造変化は 2~3 mM にて飽和することから、Mg1, Mg2, Mg3, Mg6 への  $Mg^{2+}$  結合は 2~3 mM で飽和することが示唆された。一方、Mg4, Mg5, Mg7 への  $Mg^{2+}$  結合は、膜貫通領域の構造変化を引き起こさず、細胞質領域の構造変化を引き起こすことから、3~5 mM で飽和することが示唆された。これらから、高濃度域にて  $Mg^{2+}$  が結合する Mg4, Mg5, Mg7 がチャネルの開閉を担う  $Mg^{2+}$  結合部位であることが示唆された。最後に、チャネルの開閉における、Mg4, Mg5, Mg7 の役割を議論している。Mg4, Mg5, Mg7 の中で、Mg5 のみがイオン透過路の開閉を担う plug helix の構造変化を引き起こすことから、Mg5 と plug helix の間の共役を通じてイオン透過路が完全に閉口することが示唆された。

本研究では、MgtE の  $Mg^{2+}$  非結合型と結合型の両極端の構造情報だけでなく、それらの間の構造情報を部位特異的に取得することにより、チャネルの開閉に伴う構造変化部位および、その構造変化を引き起こす  $Mg^{2+}$  結合部位を同定することに成功している。

以上、本研究の成果は、MgtE の細胞内  $Mg^{2+}$  濃度依存的な開閉制御機構に対して新たな知見を与えるものであり、これを行った学位申請者は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。