

審査の結果の要旨

氏名 加納 花穂

G タンパク質によるファミリー選択的な G タンパク質共役型内向き整流性カリウムイオンチャンネル活性制御機構の解明と題する本論文は、G タンパク質共役型内向き整流性カリウムイオンチャンネル GIRK の開口が、G タンパク質の i/o ファミリーによって選択的に誘起される機構を解明したものである。本論文は、全 5 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 章に考察、第 5 章に総括が述べられている。

第 3 章においては、まず GIRK の開口の選択性を決定するタンパク質間相互作用を同定した研究成果を述べている。G タンパク質の活性化量で規格化して GIRK 開口能を定量的に評価する系を確立し、複数の種類の G タンパク質ならびに G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を比較している。その結果、GIRK の直接の開口因子である G タンパク質 $\beta\gamma$ サブユニット ($G\beta\gamma$) あるいは GPCR よりも、G タンパク質 α サブユニット ($G\alpha$) が GIRK の開口の選択性を決定する主要な因子であることを明らかとしている。

続いて、i/o ファミリーの G タンパク質三量体 ($G\alpha\beta\gamma$) と GIRK の直接の相互作用を、NMR 法を用いて解析している。本解析においては、脂質二重膜を再現した可溶性粒子であるナノディスクに GIRK を再構成し、生理的な膜環境を模倣している。G タンパク質のファミリー間の違いを担う $G\alpha$ を NMR の観測対象とし、アミノ酸側鎖メチル基シグナルの ^1H - ^{13}C HMQC スペクトルを測定することで、高分子量の $G\alpha\beta\gamma$ の NMR 観測に成功している。GIRK の添加に伴う $G\alpha\beta\gamma$ の NMR シグナルの変化から、両者が直接の相互作用を生じることを明らかとしている。前項の結果と合わせて、不活性状態において $G\alpha\beta\gamma$ が GIRK と直接結合し共局在するか否かが、GIRK の開口の選択性を決定していることを示している。

さらに、複合体の構造を解明するため、 $G\alpha\beta\gamma$ と GIRK の残基間の距離情報を常磁性緩和促進の解析により取得し、それらを用いた構造計算によって、複数の構造のアンサンブルからなる複合体モデルを構築している。複合体中の主な結合部位は GIRK の C 末端ヘリックスと $G\alpha$ のヘリカルドメインの αA ヘリックスであったこと、ならびに $G\alpha$ の αA ヘリックスを変異させると GIRK 開口能が減弱したことから、 αA ヘリックスが選択性を決定していると結論している。

以上の結果に基づき、i/o ファミリーの G タンパク質によって GIRK が選択的かつ迅速に開口する機構について考察している。 $G\alpha$ のヘリカルドメインは全体的に $G\alpha$ ファミリー間でのアミノ酸配列の保存性が低く、ファミリー選択性を担う部位はこれまで明らかとなっていなかった。

本研究の結果は、 $G\alpha$ のヘリカルドメインの中でも αA ヘリックスが、**GIRK** と直接結合し共役を決定する構造的要因であることを示している。そして、*i/o* ファミリー選択的な **GIRK** の開口は、不活性状態において *i/o* ファミリーの $G\alpha\beta\gamma$ と **GIRK** が選択的に複合体を形成し、その複体内で活性化が起こることで説明可能であると提唱している。また、不活性状態では $G\alpha\beta\gamma$ が **GIRK** の C 末端ヘリックスと結合するのに対して、活性化状態では解離した $G\beta\gamma$ は **GIRK** の β ストランド領域上に結合するため、**GIRK** 上の $G\alpha\beta\gamma$ 結合部位は $G\beta\gamma$ 結合部位と重複しない。このことにより、不活性状態において形成される $G\alpha\beta\gamma$ と **GIRK** の複合体の状態から、 $G\beta\gamma$ と **GIRK** が結合した活性化状態に迅速に移行することが可能であると考察している。以上の機構により、選択的かつ迅速な **GIRK** の活性制御が可能となっており、心臓や神経系での適切なシグナル伝達に貢献していると提唱している。

本論文は、膜上で形成される $G\alpha\beta\gamma$ と **GIRK** との複合体が、シグナル伝達経路を決定するうえで重要な役割を果たしていることを明らかとしたものである。さらに、不活性状態における **G** タンパク質とエフェクター分子との相互作用様式を明らかとした初めての例として、**G** タンパク質シグナリングの理解において重要な知見を与えるものである。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。