

論文審査の結果の要旨

氏名 富田 篤弘

本論文は全4章からなる。第1章は序章、第4章は総合考察である。論文提出者の研究内容は、第2章と第3章に記述されている。

第1章には、本研究の背景と目的が述べられている。まず、膜輸送体を介した細胞内の恒常性の維持機構および、膜輸送体に対して ATP が調節因子・輸送の駆動力の2種類の作用を示すことが詳述されている。ATP を調節因子として利用する膜輸送体と ATP を駆動力として利用する膜輸送体について、それぞれについて機能・構造解析を行うことでその分子機構を解明して、ATP を利用した膜輸送体による細胞内恒常性の維持機構の理解を深めるという本研究の目的が明確に示してある。

第2章には、ATP を調節因子として利用することで Mg^{2+} 恒常性を維持する Mg^{2+} チャンネル MgtE の X 線結晶構造解析および機能解析について述べてある。論文提出者は、まず生化学解析によって ATP が MgtE の調節因子として作用することを解明した。続いて、MgtE に対する ATP の調節作用の分子機構を解明するために、X 線結晶構造解析を用いて好熱性細菌由来の MgtE と ATP の複合体の結晶構造を全長および細胞質ドメインの立体構造を決定した。得られた構造から、ATP は MgtE の細胞質ドメインに結合しており、リン酸基を Mg^{2+} に向ける形で配向していることが明らかになった。さらに、ATP の認識に関わるアミノ酸残基について変異体を作成して、生化学解析を行った結果 ATP のアデニン環をスタッキング相互作用で認識するフェニルアラニン残基が ATP の結合に必須であることが明らかになった。さらに、ATP のリン酸基を認識するアルギニン残基の電荷を反転させたグルタミン酸への変異体では、ATP 非存在下でも ATP 結合状態と同程度のチャンネル活性を示した。以上から、論文提出者は ATP がリン酸基に由来する負電荷を細胞質ドメインに導入することで MgtE の Mg^{2+} に対する親和性を生理学的な条件にチューニングするという分子機構を提唱した。

第3章には、ATP の加水分解のエネルギーを利用してポリアミンを輸送する P 型 ATPase である ATP13A2 のクライオ電子顕微鏡構造解析と分子動力

学シミュレーションおよび生化学解析について述べてある。論文提出者は、まずヒト由来の ATP13A2 について発現および精製条件の検討を行い、活性を有した ATP13A2 を精製することに成功した。得られた ATP13A2 を用いて凍結試料を作成して、クライオ電子顕微鏡による撮影を行って画像解析を行うことで構造決定に成功した。論文提出者は、複数の条件で構造解析を行うことで、ポリアミン輸送サイクルの 4 状態の構造決定に成功した。ポリアミン結合状態の立体構造から、ATP13A2 は長いトンネル状のポケットをつくりだし、ポリアミンはその細長い分子の形状に合わせて広く認識されるというポリアミン認識機構を解明した。さらに、輸送中間体の構造比較から、ATP13A2 はリン酸化に伴って M1 および M2 ヘリックスが大きく細胞質側へスライドすることでポリアミン結合ポケットを形成して、そこにポリアミンが結合することが解明された。中間体の構造比較と分子動力学シミュレーションから、ポリアミンが結合することで、脱リン酸化を促進する構造に ATP13A2 を固定するというポリアミン依存的な脱リン化機構を提唱した。

第 4 章には、本研究で得られた結果と、近年の他の研究成果との比較検討が詳述されており、今後明らかにすべき課題について広く議論されている。

なお、本論文第 2 章、第 3 章は、Mingfeng Zhang, Fei Jin, Wenhui Zhuang, Hironori Takeda, Tatsuro Maruyama, Masanori Osawa, Ken-ichi Hashimoto, Hisashi Kawasaki, Koichi Ito, Naoshi Dohmae, Ryuichiro Ishitani, Ichio Shimada, Zhiqiang Yan, Motoyuki Hattori, Takashi Daiho, Tsukasa Kusakizako, Keitaro Yamashita, Satoshi Ogasawara, Takeshi Murata, Tomohiro Nishizawa, Osamu Nureki らとの共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験および解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できるものと認める。