

[別紙2]

## 審査の結果の要旨

氏名 野崎 智裕

Gating modifier toxin による電位依存性カリウムイオンチャネル阻害機構の解明と題する本論文は、古細菌由来電位依存性カリウムイオンチャネル (KvAP) の電位センサードメイン (VSD) を解析対象とし、膜電位依存的な VSD の構造変化様式および gating modifier toxin である VSTx1 と VSD との相互作用様式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 章において序論を述べている。第 2 章に実験結果がまとめられ、第 3 章に考察、第 4 章に総括が記されている。第 5 章で実験材料及び方法が記述されている。

第 2 章に記されている実験結果は、主に 2 つの内容から成っている。1 つ目は、膜電位存在下および非存在下において近接する VSD の残基対の同定である。まず、リポソームを調製し、リポソーム内外の  $K^+$  濃度差を利用した膜電位の形成、膜電位感受性色素を利用した膜電位の測定が行われた。次に、蛍光色素によって修飾した VSD を用いて、調製した VSD が膜電位依存的に構造変化する活性を有していることを確認していた。そして、2 残基に Cys 変異を導入した VSD double Cys 変異体を用いて、酸化剤添加による SS 結合形成の有無を検出する disulfide locking 解析が行われた。この手法を多数の VSD double Cys 変異体に適用することで、膜電位存在下および非存在下において近接する残基対を網羅的に探索することに成功している。

第 2 章の 2 つ目の内容は、VSTx1 結合時の VSD の構造情報の取得である。まず、VSD に対して VSTx1 を添加する等温滴定型カロリメトリーが行われ、VSD と VSTx1 の結合が確認された。次に、VSTx1 添加時および非添加時における disulfide locking 解析が行われ、VSTx1 添加時にも SS 結合を形成する変異体および SS 結合を形成しなくなる変異体が同定された。また、Ile 側鎖メチル基を観測プローブとして、遊離の VSD および

VSTx1-VSD 複合体について  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトルの取得およびシグナルの帰属が行われた。その結果、ミセル中の VSD が平衡状態にあること、VSTx1 添加に伴って平衡が抑制され状態が偏ることが示された。さらに、ガドテリウム酸メグルミンを添加した遊離の VSD および VSTx1-VSD 複合体についても  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトルを取得し、溶媒中に存在する  $\text{Gd}^{3+}$  からの常磁性緩和促進効果を観測する solvent PRE 解析により、溶媒露出度の比較が行われた。

第 3 章においては、VSD の膜電位感受機構および gating modifier toxin によるチャネル阻害機構について考察されている。まず、第 2 章の前半の結果をもとに、VSD は up state と down state の 2 状態の平衡にあることが論じられた。また、up state がこれまでに報告されている結晶構造や溶液構造に対応していること、膜電位依存的に両状態のポピュレーションが変化することが考察されていた。さらに、本研究で解析した VSD の構造変化とイオンチャネルの開閉の関係についても考察されていた。次に、第 2 章の後半の結果をもとに、ミセル中の VSD が up state と down state の平衡にあること、VSTx1 の結合によって VSD が up state に固定されることが論じられた。また、VSTx1 の結合により VSD が up state に固定されることで、KvAP の closed state への構造変化の阻害およびポアドメインの不活性化による inactivated state への移行が生じることによって、KvAP のイオン電流が阻害されるというメカニズムを提唱している。

本研究では、これまでに解析することが困難であった、膜電位存在下の VSD や gating modifier toxin 結合時の VSD について構造情報を取得することに成功している。本研究の成果は、電位依存性カリウムイオンチャネルの膜電位感受機構および gating modifier toxin による阻害機構について、重要な構造生物学的知見を与えるものである。したがって、これらを行った学位申請者は、博士 (薬科学) の学位を得るにふさわしいと判断した。