

論文審査の結果の要旨

氏名 福田 昌弘

本論文は、第1章「General Introduction」、第2章「X-ray crystallographic analysis of NarK, a bacterial nitrate transporter from *Escherichia coli*」、第3章「Crystal structures of NarK」、第4章「Functional analysis of NarK」、第5章「Expression, purification, and X-ray crystallographic analysis of plant NRT2-NAR2 complex」、第6章「General Discussion」の計6章から構成されている。

第1章は、本論文の序章であり、窒素サイクルおよび硝酸トランスポーター、特に原核生物から真核生物まで広く保存されている硝酸輸送体 NNP family に関する先行研究について記述されている。本論文では特に細菌由来と植物由来の NNP family に関して論じている。細菌由来 NNP family に関しては、さまざまな基質輸送機構が提唱されて論争となっていたものの構造情報及び適切な機能解析系の欠如からその分子レベルの理解が遅れていた点に関して記されている。また、植物由来 NNP family に関しては、輸送体とは別にアクセサリタンパク質が直接相互作用して活性を制御していることが知られていること、その輸送機構は硝酸イオンとプロトンの共輸送であることが示唆されている点、しかし植物由来 NNP family による硝酸イオン輸送の分子基盤はまったく未知であること、に関して記されている。以上の内容を踏まえて、本章では NNP family タンパク質による基質輸送の構造基盤の解明という本研究の最終目的を提起している。

第2章では、*Escherichia coli* に由来する NNP family である NarK の精製、結晶化、X線結晶構造解析について詳細に記述されている。論文提出者は、精製タンパクを脂質二重膜に再構成して結晶化する手法である Lipidic cubic phase (LCP) 法を用いて、異なる3つの結晶からそれぞれ高分解能構造を決定した。

第3章では、決定した結晶構造に基づいて、NarK の基質輸送に伴う構造変化について記述されている。決定した NarK の結晶構造は、12本の膜貫通ヘリックス (TM) からなり、これまでに報告された二次性能動輸送体スーパーファミリー-MFS タンパク質の構造と同様のフォールドをとっていたが、3つの構造の比較から TM7, TM10, TM11 の保存性の高い Gly 残基群を起点とした折れ曲がりが見られた。また、基質認識部位の残基群のうち、特に Tyr263 と Arg305 の2つの残基に構造変化が見られたほか、硝酸イオンの配向や水素結合による認識様式にも違いが見られた。これらの構造変化から、特定の TM ヘリックスと基質認識残基の構造変化が連動することで、基質の認識と輸送サイクルが共役していることが示唆されて

いる。

第4章では、NarKによる輸送機構を詳細に解明するために行われたさまざまな機能解析に関して論じられている。まず遺伝学的な解析から、第3章で論じたTMの折れ曲がりの起点となっているGly残基群、および基質認識残基の基質輸送における重要性が支持されている。また、新規に開発された人工脂質二重膜リポソームを用いたアッセイ系を用いて、NarKが硝酸イオンと亜硝酸イオンの対向輸送体として機能することが示されている。さらにMDシミュレーションによる解析からNarKが厳密な対向輸送体として働き、その構造変換は特定のアニオンが基質認識部位に存在する完全保存性の2つのArg残基の間にはまり込み静電的な反発が和らげられることではじめて可能となることが示唆されている。以上の構造および機能解析の結果を総合して、NarKによる硝酸イオンと亜硝酸イオンの対向輸送モデルを提唱している。

第5章では、植物由来NNP familyタンパク質であるNRT2に関してアクセサリタンパク質NAR2との共発現系および精製系の構築に関して詳細に記されており、さらに予備的な回折実験の結果から分子置換法により初期解を得られていることを報告している。

第6章では、論文全体を通じた総括と、これまでに報告された他のNNP familyタンパク質の構造との比較、NNP familyにとどまらず二次性能動輸送体MFS一般の基質輸送メカニズムについても考察が述べられている。

本論文では、*Escherichia coli*に由来するNNP familyであるNarKの異なる3つの結晶構造が決定され、さらに*in vivo*, *in vitro*, *in silico*の多岐にわたる機能解析がおこなわれており、細菌由来NNP familyトランスポーターによる基質輸送の分子メカニズムの理解を大きく進展させるものである。また調製難度が高い真核生物由来の硝酸イオン輸送体-アクセサリタンパク質ヘテロ複合体に関する発現、精製、結晶化に関して重要な知見が数多く報告され、これは今後の植物の硝酸輸送体の研究を大きく推し進めるものであると推定される。なお、本論文の第2章、第3章、第4章は、竹田弘法博士、加藤英明博士、道喜慎太郎博士、伊藤耕一博士、マツラナ アンドレス D. 博士、石谷隆一郎博士、濡木理博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となり研究が遂行されており、その寄与は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と認める。