

審査の結果の要旨

氏名 湊 雄一

P2X₄ 受容体の開閉制御機構の解明と題する本論文は、リガンド開口型イオンチャネルである P2X₄ 受容体の、リガンド結合状態における動的構造を、溶液 NMR 法を用いて解析した成果について述べたものである。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ならびに今後の展望について述べられている。

第 3 章においては、まず解析対象である P2X₄ 受容体の調製と、リガンド結合能の評価を行っている。次に、P2X₄ 受容体の安定同位体標識法の確立を行った上で、NMR スペクトルを取得している。最後に、各リガンド結合状態において NMR スペクトルを取得し、その温度依存的な変化を解析することで、各リガンド結合状態における動的平衡状態について解析を行っている。

本論文では、P2X₄ 受容体を、昆虫細胞発現系を用いて、1L 培養あたり 0.4 mg の収量にて調製していた。次に、調製した P2X₄ 受容体に対し、ATP および α,β -methyleneATP を用いたリガンド結合アッセイを行い、ATP の結合が半分飽和する濃度を 51 nM、 α,β -methyleneATP の阻害定数を 0.35 μ M とそれぞれ算出していた。次いで、メチオニン側鎖メチル基選択的に ¹H, ¹³C 標識を施し、NMR シグナルの検出を試みていた。しかしながら、DDM にて可溶化した P2X₄ 受容体 3 量体の分子量は 15 万程度と極めて大きく、分解能および感度が不十分であった。これに対し、重水素標識法を用いることで、従来のメチオニン選択標識体に比べて 3-5 倍程度の感度増大に成功した。これにより、各メチオニン残基について、詳細な NMR 解析を行うことを可能としていた。

細胞外領域のメチオニン残基を対象とした NMR 解析では、apo 状態と ATP 結合状態において全てのメチオニン残基の化学シフトが異なっていたことから、ATP 結合に伴って細胞外領域全体が構造変化することを明らかとした。加えて、膜貫通領域の L351 にメチオニン変異を導入することで、M351 のシグナルを解析していた。apo 状態と ATP 結合状態の M351 のシグナルの化学シフトが約 0.1 ppm 異なっていたことから、ATP 結合に伴い、膜貫通領域の構造も変化することを示していた。

次に、 α,β -methylene ATP 結合状態のスペクトルを取得しており、細胞外領域の M256 と、膜貫通領域の M351 の化学シフトが、ATP 結合状態とは異なることを見出した。特に、 α,β -methylene ATP 結合状態の M351 の化学シフトは、apo 状態と ATP 結合状態の中間の値となっていた。さらに、各状態における NMR シグナルの温度依存的変化の解析を行い、ATP 結合状態ならびに α,β -methyleneATP 結合状態では、M351 のシグナルの化学シフトが温度依存的に変化することを見出した。一方、apo 状態においては、M351 に温度依存的な変化

を認めなかった。また、ATP 結合状態において、細胞外領域の M256 や M325 のシグナルに、温度依存的な化学シフト変化を認めなかった。

第 4 章では、各リガンド結合状態における、P2X₄ 受容体の動的構造について議論している。ATP 結合状態では、細胞外領域には温度依存性が見られなかったことから、単一の状態に固定されているのに対し、膜貫通領域には温度依存性が見られたことから、ポアが開いた状態と閉じた状態の平衡状態にあると考察していた。したがって、ATP が結合すると、細胞外領域の構造変化と共役して、膜貫通領域にポアが開いた状態と閉じた状態の構造平衡が誘起されるという機構を提唱していた。

また、 α,β -methyleneATP 結合状態においても、膜貫通領域に温度依存性が見られたことから、ポアが開いた状態と閉じた状態の間の構造平衡にあるが、 α,β -methyleneATP 結合状態の M351 のシグナルが、apo 状態と ATP 結合状態の中間の値であったことから、膜貫通領域の構造平衡が、ポアが閉じた状態に偏っていると考察していた。したがって、 α,β -methylene ATP が P2X₄ を部分的に活性化するのは、M256 近傍の細胞外領域の構造が ATP 結合状態とは異なることによって、膜貫通領域のポアが開いた状態が相対的に不安定になるためであるという機構を提唱していた。

本論文では、メチオニン側鎖メチル基選択的標識法ならびに重水素標識法の適用により、これまでに前例のない、P2X₄ 受容体の NMR 解析を可能にした。その結果、P2X₄ 受容体のリガンド結合状態における膜貫通領域の動的構造平衡、ならびに部分的活性化の機構について新たな知見を与えた。したがって、本研究を行った学位申請者を、博士（薬学）の学位を得るにふさわしいと判断する。