

論文審査の結果の要旨

氏名 道喜慎太郎

本論文は 3 章からなる。序章はイントロダクションにあたり、本論文中で扱う輸送体膜タンパク質についての概略および二次能動輸送体で最大のファミリーである MFS 輸送体の概要が記述されている。

第 1 章はジペプチドやトリペプチドをプロトンの濃度勾配を利用して輸送する二次能動性輸送体である POT の結晶構造解析について述べられている。POT はタンパク質の主要な消化産物であるジペプチドやトリペプチドの取り込みに関与する輸送体として発見され、原核生物から真核生物まで広く保存されている。POT はアミノ酸の種類に関係なくほとんど全てのジペプチドやトリペプチドを輸送し、ペプチドに似た構造をもつ化合物も輸送する特徴的な基質選択性を持つ。ヒトでは、POT は小腸や腎臓などに発現しており、経口摂取した薬剤の取り込みに関与している事から POT の基質選択性は注目されている。これまでに POT の結晶構造は分解能 3.6-3.3 Å で報告されていたが、全て POT 単体の結晶構造であった為に基質選択性や輸送制御は不明なままであった。本研究で論文提出者らは、好熱性細菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来の POT (GkPOT) を大腸菌組み換えタンパク質として発現・精製を行い、脂質中に再構成して結晶化を行う LCP 法を用いることで構造解析可能な良質な結晶を得ることに成功した。さらに、セレノメチオニン置換体 GkPOT の結晶を作製し、単波長異常分散法 (SAD) 法による位相決定を行うことで、分解能 1.9-2.0 Å の結晶構造を決定した。明らかにした GkPOT の結晶構造により、基質結合部位を形成している残基にプロトンが結合する可能性を初めて明らかにした。さらに、様々な基質ペプチドや基質アナログとの共結晶化を行うことで、基質アナログである *alafosfalin* との複合体構造を分解能 2.4 Å で明らかにした。得られた複合体構造により、基質ジペプチドの結合様式が初めて明らかになり、基質ジペプチドの認識に重要だと予測される箇所に変異を導入した変異体を作製し、大腸菌を用いた輸送活性及びプロテオリポソームを用いた輸送活性測定、基質交換活性測定を行った。機能解析の結果、基質認識に重要な残基を特定し、トリペプチドの結合様式モデルを提唱した。プロトンの結合部位の特定や基質アナログとの複合体構造の解明は新しい発見であり、これまで不明であった基質認識機構を解明する上でとても重要な知見をもたらすものであると評価できる。

第 2 章では、第 1 章で明らかにした結晶構造を基に、プロトンや基質ペプチドの結合と GkPOT の構造変化の相関について述べられている。POT など、プロトンの濃度勾配を利用して基質を輸送する共輸送体は、プロトンと基質が共に結合した場合かどちらも結合していない場合においてのみ構造を変化させ、プロトンや基質が片方だけ結合した状態では構造変化が起きないように厳密に制御されている。しかしながら、この輸送制御のメカニズムは不明のままであった。本研究で論文提出者らは、第 1 章で明らかにした GkPOT の結

晶構造を基に、プロトンや基質の結合が GkPOT の構造変化にどのような影響を与えるかを調べる為に MD シミュレーションや ATR-FTIR を行った。その結果、GkPOT にプロトンだけが結合した状態では構造変化が起こらないのに対して、何も結合していない状態やプロトンと基質が結合している状態では構造変化が可能なことを示した。さらに、プロトン・基質の結合と POT の構造変化が共役した輸送メカニズムを提唱した。この研究は、プロトンや基質の結合が構造変化をどのように制御しているかを初めて示したものであり、POT の輸送制御メカニズムを理解する上で非常に重要な知見を与えると評価できる。

なお、本論文第 1 章は、オックスフォード大学の Nicolae Solcan・Simon Newstead との共同研究であり、本論文第 2 章は、濡木研究室の光山倫央・石谷隆一郎、理化学研究所の杉田有治・名古屋工業大学の岩城雅代・神取秀樹との共同研究であるが、論文提出者が主体となって、GkPOT の構造解析及び機能解析、データの解釈を行なったもので、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。