

論文審査の結果の要旨

氏名 竹田 弘法

本論文は、細胞内におけるマグネシウムイオン (Mg^{2+}) の恒常性に寄与する Mg^{2+} チャネル MgtE のイオン認識・選択メカニズムを、X 線結晶構造解析及び輸送解析に基づいて明らかにしたものである。

第 1 章ではまず、金属イオンのやり取りにおけるイオンチャネルの重要性を説いている。特に、 Mg^{2+} はゲノム情報の転写翻訳並びに複製などで機能する酵素の触媒反応、生体膜や核酸の安定化に寄与する、重要な金属イオンである。この Mg^{2+} の細胞内への取り込みを担うのが Mg^{2+} チャネル MgtE である。MgtE の結晶構造はすでに解明されており、イオン透過孔に位置する保存された Asp432 と Mg^{2+} が相互作用していたが、両者の距離は離れていることから、 Mg^{2+} に配位する水和水がイオン認識に寄与すると考えられていた。しかし分解能が不十分 ($\sim 3.0 \text{ \AA}$) であったため、MgtE がどのように Mg^{2+} を認識し、 Mg^{2+} 選択性的な輸送活性を示すのかは不明であった。

第 2 章では、X 線結晶構造解析を用いて MgtE の高分解能構造を決定し、MgtE が完全水和状態にある Mg^{2+} を認識することを明らかにした。本研究では MgtE の膜貫通ドメイン (MgtE-TMD) のみを脂質二重膜中で結晶化させるという、これまでにない手法で、様々な二価金属イオン存在下において MgtE-TMD の高分解能の決定を試みている。その結果、 Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} 結合型 MgtE-TMD の構造を分解能 $2.4, 2.2, 3.2 \text{ \AA}$ で決定することに成功している。本構造では、イオン透過孔に存在する Asp432 に完全水和状態の Mg^{2+} 及び Mn^{2+} がそれぞれ結合しており、Asp432 の側鎖カルボニル酸素と Mg^{2+} に配位する水和水が水素結合を形成していた。また、 Mn^{2+} は Mg^{2+} と同様な様式で Asp432 と水素結合していたが、 Ca^{2+} の認識機構を解明するには至らなかった。しかし、 Ca^{2+} もまた Mg^{2+} や Mn^{2+} と同様に水和状態で認識されると考えられた。これは、MgtE が完全水和状態の Mg^{2+} を認識することを示す結果であり、MgtE のみならず、二価金属イオンチャネルにおいて詳細なイオン認識を解明する最初の報告である。

第3章では、MgtEのイオン選択性がAsp432のみならず、別の金属イオン結合部位で規定されることを明らかにした。Mn²⁺結合型MgtE-TMDの結晶構造において、細胞外側のイオン透過孔の入り口(M2 site)と、イオン透過孔から離れた二量体の境界(M3 site)にMn²⁺が結合していた。M2, M3 siteを構成するアミノ酸残基を変異させたMgtE変異体(それぞれM2A, M3A)を用いてMn²⁺輸送解析を行ったところ、MgtEによるMn²⁺の輸送活性が著しく上昇した。これは、M2, M3 siteにMn²⁺が結合し、MgtEを閉状態に安定化することにより、Mn²⁺の輸送を妨げていることを示している。すなわち、MgtEのMg²⁺及びMn²⁺に対する選択性の違いは、これらM2, M3 siteが関与するためであることを明らかにした。このように基質結合部位に競合基質が結合することでイオン選択性が規定されるイオンチャネルはこれまでに報告例がない。そのため、この結果はこれまで選択フィルターのみで決定されると考えられていたイオン選択性に新たな概念を付与する重要な知見である。

Mg²⁺のみならず、様々な金属イオンや有機物質などが生体膜を行き来することで、細胞の生命維持が果たされる。それゆえ、細胞内外の物質輸送メカニズムについての理解は非常に重要である。本研究は、X線結晶構造解析及びリポソームを用いた機能解析により、Mg²⁺チャネルMgtEの詳細なイオン認識・選択メカニズムを明らかにした。MgtEは、Asp432により水和二価金属イオンを認識するとともに、M2, M3 siteを含めたイオン認識・選択メカニズムを有する。これまで活発に研究してきたK⁺チャネルKcsAは、主鎖のペプチド酸素でK⁺を脱水することで認識し、イオンサイズで識別する機構が明らかとなっている。一方で、MgtEのイオン認識・選択メカニズムはK⁺チャネルのそれとは全く異なるものである。それゆえ、本研究はMgtEの分子メカニズムのみならず、細胞内外における物質輸送の理解に大きく貢献したと考えられる。

本研究における全ての化学的知見は、申請者が主体となって分析及び検証を行ったのもで、論文提出者の寄与が十分であると判断する。従って、博士(理学)の学位を授与できると認めるものとする。