

審査の結果の要旨

氏名 外山 侑樹

NMR 多量子遷移の緩和速度を用いたカリウムイオンチャネルの開閉機構の解明と題する本論文は、高分子量タンパク質のマイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換を解析する NMR 手法の開発を行い、開発した手法を用いて放線菌由来カリウムイオンカリウムイオン (K^+) チャネル KcsA のサブミリ秒オーダーの開閉の構造機構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 章では、高分子量タンパク質のマイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換を解析する NMR 手法の開発について、第 3 章では KcsA のサブミリ秒オーダーの開閉の構造機構について、実験結果および得られた結果に対する考察を述べている。第 4 章にて全体の結論を述べ、第 5 章には実験材料及び方法を記述している。

第 2 章においては、高分子量タンパク質のマイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換を解析する NMR 手法を開発した研究成果を述べている。高分子量タンパク質の側鎖メチル基 1H - ^{13}C スピン系の二量子遷移と零量子遷移の緩和速度の差 ΔR_{MQ} を算出することにより、マイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換を高い精度と定量性をもって解析可能であることを、理論式の計算と数値シミュレーションにより示している。これらの理論的考察に基づき、側鎖メチル基の ΔR_{MQ} から化学交換の寄与を抽出して評価する一連の解析法、メチル- ΔR_{MQ} 解析法を考案している。メチル- ΔR_{MQ} 解析法のコントロール実験として、顕著な化学交換が存在しないマルトース結合タンパク質、ならびにフォールディング中間体との間の化学交換が存在する FF ドメインを用いた実験を行い、メチル- ΔR_{MQ} 解析法を確立することに成功している。

第 3 章においては、KcsA の開閉の構造機構を解析した研究成果を述べている。KcsA は電気生理解析より、酸性条件において交換速度 $3,000 s^{-1}$ 程度のサブミリ秒のタイムスケールで K^+ を透過しない状態と、 K^+ を透過する状態を遷移していることが知られている。こ

のサブミリ秒オーダーの開閉が、KcsA のどの部位の構造変化に起因するのかを解明している。界面活性剤ミセルに可溶化した野生型 KcsA の Leu、Val の側鎖メチル基に確立したメチル- ΔR_{MQ} 解析法を適用し、KcsA においてサブミリ秒オーダーの化学交換が存在する部位を明らかにしている。膜貫通ヘリックスが組み合わさることで形成される helix bundle crossing (HBC) ゲートに位置する Leu40 や Leu110、細胞外側で K^+ の選択的透過を担う selectivity filter (SF) ゲートに位置する Val76 をはじめとするメチル基に顕著な ΔR_{MQ} の磁場依存性が観測されていたことから、これら部位にサブミリ秒オーダーの化学交換が存在することを示している。

さらに、サブミリ秒オーダーの開閉の性質が異なる E71Q 変異体と比較することで、ゲート開閉を反映した化学交換を同定している。E71Q 変異体では野生型と比べて Leu35, Leu41, Val84, Val91, Val93 のメチル基により顕著な ΔR_{MQ} の磁場依存性が観測されたことから、これらの部位がサブミリ秒オーダーの開閉に関連した化学交換が存在する部位であることを示している。E71Q 変異体において野生型より顕著な ΔR_{MQ} の磁場依存性が観測されたメチル基は、SF ゲートには位置しておらず、膜貫通領域のヘリックス間の相互作用部位 や HBC ゲート近傍に位置していたことから、KcsA のサブミリ秒オーダーの開閉は、HBC ゲートの構造変化に起因するという機構を提唱している。

本研究で確立したメチル- ΔR_{MQ} 解析法は、これまでに解析することが困難であった高分子量タンパク質複合体や膜タンパク質などの機能的運動性の解明につながるものである。そして、メチル- ΔR_{MQ} 解析法を適用することで明らかとなった KcsA のサブミリ秒オーダーの開閉の構造機構は、チャネル分子の動的な構造平衡の観点から K^+ 透過活性の変化を説明するものであり、 K^+ チャネルの開閉の構造基盤の解明に対し重要な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。