

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 羽 鳥 勇 太

P型ATPaseはATPを消費して特定のイオンを生体膜の反対側へと輸送する膜蛋白質であり、細胞内イオン濃度の恒常性を維持するのに最重要の役割を担う。P型ATPaseは一次配列の相同性からI-V型に分類される。II型に属す筋小胞体Ca²⁺-ATPase(SERCA)では反応サイクルをほぼ網羅する様々な中間体の結晶構造が解明されており、能動輸送の構造学的基盤に関して詳細な知見が得られている。一方I型の内、重金属イオンを輸送するサブグループのIB型は、II型とは大きく異なるトポロジーを持つことからイオン輸送機構も違う可能性がある。本論文ではPIB型ATPaseのイオン輸送機構の本質に迫るために、Cu⁺-ATPaseの1つであるCopAを材料とし、主として蛋白質限定分解の手法を用いることにより構造変化を研究している。また、従来PIB型ATPaseのN末端に共通して存在する金属結合ドメイン(NMBD)の生理的意義は不明であったが、その解明の為、NMBD欠損変異体(Δ NMBD)の解析を行っている。

本論文は4章から構成される。第1章は序論であり、PIB型ATPaseに関するこれ迄の研究を総括するとともに、最も研究の進んでいるSERCAとの構造上の差異について説明している。第2章は材料と方法に関する記述である。第3章は本研究で得られた結果の記述であり、以下にその内容の要点をまとめる。

第1節では、PIB型の一つである*Thermotoga maritima*由来CopAの大量発現・精製と生化学的解析を記述している。1lの培養液から約3mgの高純度精製蛋白質を調製する系を構築し、脂質の添加や適切な界面活性剤の選択によって活性が安定に保持される条件を確立した。またフッ化アルミニウムが安定なリン酸アナログとして機能し、リン酸化中間体の研究に有用であることを見出した。

第2節では、CopAの5種類の中間体アナログを作製し、蛋白質限定分解によるCopAのドメイン運動の検出を行った。4つの切断部位があり、中間体ごとに切断の容易さが異なること、またその位置と切断の容易さの変化がSERCAに極めて良く似ていることから、CopAでのイオン輸送は同様のドメイン運動を伴うとの結論に至っている。またNMBDと膜貫通ヘリックスの間のリンクはATPase活性に必須であり、その切断速度は中間体ごとに異なることを見出している。

第3節では、NMBDを欠損したコンストラクト(Δ NMBD)を作製し解析を行っている。 Δ NMBDではCu⁺依存性ATPase活性が失われている一方、フッ化アルミニウムを用いた中間体アナログを形成できることを蛋白質限定分解によって示している。このことから

Δ NMBD ではイオン放出に伴う構造変化が阻害されている可能性を提示し、この仮説を磷酸化実験によって直接的に検証している。また野生型では Cu^+ の添加によって脱磷酸化速度が上昇すること、 Δ NMBD では Cu^+ の影響が見られないことから、脱磷酸化反応は Cu^+ によって調節を受け、NMBD がその調節の中心的な役割を果たすとの結論を得ている。

第4節では、PIB型 ATPase で普遍的に保存される His を Gln に置換した変異体 (H479Q) の解析を行っている。相同の置換はウィルソン病患者で高頻度で見つかっている。文献的にはこの His は ATP 結合に関与することが知られていたが、本研究ではさらに *p*-ニトロフェニル磷酸分解活性と蛋白質限定分解を用い、この変異体は ATP に対する結合能以外は野生型とほぼ同じ性質を持つことを示している。

第4章は考察である。PIB型と PII型では一次構造が大きく異なるがドメイン運動は類似であるとの結論を踏まえ、CopA の NMBD が SERCA の A ドメインの一部と相同の役割を持つ可能性を論じている。また NMBD と Cu^+ による脱磷酸化反応の調節が持つ生理学的な意義を考察するとともにその調節機構の構造学的な解釈を試みている。

以上、本研究は P 型 ATPase のイオン輸送に伴うドメイン運動が、PIB型と PII型で極めて類似しているとの新たな知見を与えた。またこれまで機能未知であった NMBD が、PIB型 ATPase のイオン輸送サイクルを調節すると共に、PII型 ATPase の A ドメインの一部に相当する重要な役割を持つことを明らかにしたものである。これらは、PIB型 ATPase のイオン輸送機構の理解に大きな進歩をもたらす知見であると判断される。よって審査委員一同は、本研究を博士（理学）の学位論文として価値あるものと認めた。