

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 横 川 真 梨 子

G タンパク質によるカリウムチャネル開閉機構の構造生物学的解析と題する本論文は、NMR 法を用いて、GIRK 細胞内領域と  $G\beta\gamma$  の相互作用を解析した研究成果を述べたものである。本論文は 5 つの章からなり、第 1 章において序論を述べ、第 2 章において実験材料および方法を記述している。第 3 章において実験の結果をまとめ、第 4 章において実験結果に対する考察と、 $G\beta\gamma$  による GIRK 開閉の分子機構に関して考察を加え、第 5 章にて総括を述べている。

第 3 章においては、GIRK 細胞内領域と  $G\beta\gamma$  の相互作用について解析した研究成果を述べている。まず GIRK 細胞内領域と  $G\beta\gamma$  の試料調製と性状解析を行うことにより、相互作用解析に適したサンプルとして、GIRK 細胞内領域 1 本鎖 (以下 GIRK-single) と  $G\beta_{1\gamma_2}$  (His-C68S) 変異体 (以下  $G\beta\gamma$ ) を決定している。GIRK-single 上の  $G\beta\gamma$  結合界面および  $G\beta\gamma$  結合に伴う構造変化部位を同定する NMR 実験を行い、GIRK-single について帰属した主鎖 NMR シグナルに基づき結果を解析している。

GIRK 細胞内領域は、X 線結晶構造解析を行った先行論文において、N 末端領域と C 末端領域を直接連結して発現させた GIRK-single が全長構造と同様の細胞内領域 4 量体を形成することが示されていた。本研究においては、N 末端領域と C 末端領域の連結による高次構造への影響を考察するため、GIRK-single に加えて、N 末端領域のみ (GIRK-N) および C 末端領域のみ (GIRK-C) も調製し、すべて大腸菌にて発現・精製を行っている。性状解析の結果、GIRK-single は 4 量体として安定に存在するが、N 末端領域を欠失させた GIRK-C は単独では 4 量体を安定に形成できず、GIRK-N との結合により 4 量体を形成することを明らかとしている。この GIRK-C と GIRK-N の結合により形成された 4 量体を GIRK-complex と名付けている。GIRK-complex 中の GIRK-C 由来の NMR スペクトルと GIRK-single の NMR スペクトルがよく一致したことから、GIRK-complex と GIRK-single が同様の高次構造を形成していることを明らかとしている。そのうえで、GIRK-single と  $G\beta\gamma$  の相互作用解析を行っている。

まず、表面プラズモン共鳴法による GIRK-single と  $G\beta\gamma$  の相互作用解析を行った結果、解離定数を 100  $\mu\text{M}$  以上と算出している。続いて NMR 法による相互作用解析を行っている。転移交差飽和 (TCS) 法より  $G\beta\gamma$  が相互作用する界面を同定し、化学シフト摂動 (CSP) 実験と TCS 実験結果の比較より  $G\beta\gamma$  の結合に伴い構造変化を生じる領域を検出している。 $G\beta\gamma$  の相互作用界面は、GIRK-single 4 量体中の隣接するサブユニットにわたっている一方、構造変化を生じる領域はサブユニットの境界面に多く存在し、特に N 末端領域と G ループと呼ばれるループ部位に構造変化の

影響が大きく及ぶことを示している。

第4章においては、TCS実験とCSP実験の結果に基づき、 $G\beta\gamma$ によるGIRK開閉の分子機構を考察している。すなわち、 $G\beta\gamma$ はGIRK細胞内領域のサブユニット境界面に結合し、サブユニットの相対配置を変化させる構造変化を引き起こすと結論している。GIRKのN末端領域は、C末端領域からなるサブユニット間にわたって配置していることから、サブユニット間の相対配置変化の影響を受けやすく、構造変化の影響を大きく受けたのは妥当と考えている。さらに、GIRK細胞内領域を用いたNMR実験結果をGIRKの全長構造上にて検討することにより、生体内における $G\beta\gamma$ によるGIRK開閉の分子機構について考察を加えている。GIRKの全長構造中において、N末端領域は、イオン透過路に垂直に配置しチャンネル開閉に関与することが想定されているスライドヘリックスと1次構造上連結し、Gループは、ゲートを有する膜貫通領域のインナーヘリックスに近接している。したがって、 $G\beta\gamma$ の結合がGIRKのN末端領域やGループに誘起する構造変化は、GIRKの全長構造中において、N末端領域の構造変化がスライドヘリックスを介して、あるいはGループにおける構造変化が直接またはスライドヘリックスを介してゲートを有するインナーヘリックスに伝播することにより、ゲートの開口を引き起こすと推測している。

以上、本研究の成果は、 $G\beta\gamma$ によるGIRK開閉機構の解明に大きく貢献するものであり、これを行った学位申請者は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。