

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 篠田 雄大

P型ATPase(イオンポンプ)はATPの加水分解エネルギーを利用し、能動輸送を行うことで細胞内イオン組成の維持を担う、生命活動にとって最も重要な蛋白質群のひとつである。Na⁺,K⁺-ATPaseは代表的なP型ATPaseのひとつで、 α サブユニット(触媒サブユニット)、 β サブユニットおよびFXFD蛋白質から構成されている膜貫通型膜蛋白質である。Na⁺,K⁺-ATPaseはATP1分子を消費し、細胞内の3つのナトリウムイオンと細胞外の2つのカリウムイオンの対向輸送を行うほか、ジギタリスやウアバインなど心不全治療薬として用いられている強心ステロイドの標的分子でもある。従って、Na⁺,K⁺-ATPaseの原子構造を得ることはイオン輸送機構の解明だけでなく薬剤開発にも有用である。

本論文は全八章から構成されており、第一章の序論と第二章の材料と方法に続き、第三章から第六章に*Squalus acanthias*(和名アブラツノザメ)直腸腺Na⁺,K⁺-ATPase(以下Na⁺,K⁺-ATPaseと略す)の可溶化条件の検討、阻害剤として働く磷酸アナログの検討、Na⁺,K⁺-ATPaseの結晶化、及び回折データ収集について記されている。また、第七章には考察、第八章には結論が記されている。

第三章ではNa⁺,K⁺-ATPaseを含むサメ直腸腺精製膜断片の可溶化条件の検討について記述している。界面活性剤を用いて可溶化した試料について、可溶化遠心上清に回収された蛋白質量とNa⁺,K⁺-ATPase活性を比較し、一般的な界面活性剤四種のうちC₁₂E₈を用いて可溶化すると非常に高い収量が得られることを示した。さらに、C₁₂E₈を用いて可溶化した試料について長期安定性を調べたところ、100 mM KCl存在下4°Cで放置した試料は1ヶ月半後でも60%以上のATPase活性を保持していた。

第四章では結晶化に使用する磷酸アナログについて記述している。Na⁺,K⁺-ATPaseは磷酸アナログMgF₄²⁻が細胞質領域に結合すると、カリウムイオンが膜貫通領域内に結合したE2 \cdot 2K⁺ \cdot Pi状態を模するとされている。100 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 25°C下、2.50 mg/ml Na⁺,K⁺-ATPaseの活性阻害に十分なフッ化カリウム(KF)濃度をNa⁺,K⁺-ATPase残存活性量を指標に検討した結果、8 mM KF添加により反応時間10分で残存活性を1%程度まで減少させ、90分ではほぼ完全に阻害出来ることを示した。

第五章では透析ボタンによる微量透析法を用いたNa⁺,K⁺-ATPaseの結晶化条件の検討を記述している。一般的な還元剤四種についてサメNa⁺,K⁺-ATPaseに対する効果を調べ、

グルタチオンとシステインが Na^+, K^+ -ATPase 活性に影響を与えず、長期安定性を改善することを示した。さらに、結晶化条件にグルタチオン或いはシステインを添加することで、長辺が $300 \mu\text{m}$ を超える四角形の板状結晶が得られることを示し、その添加が透析法によるサメ Na^+, K^+ -ATPase の結晶化において決定的な条件であることを明らかにした。また、 Ca^{2+} -ATPase の結晶化において重要な因子である蛋白質/脂質/界面活性剤比、及び 2-methyl-2, 4-pentanediol や酢酸塩の添加が Na^+, K^+ -ATPase でも同様に重要であることを明らかにした。これらの条件を最適化することで大きく厚みのある結晶を再現性良く得られるようになった。

第六章では、初めに、結晶の脱水和による結晶格子や分解能への影響について記述している。前章までの段階で得られた Na^+, K^+ -ATPase 結晶は 5.0 \AA の分解能しか示さず、原子モデルの構築は不可能なものであった。結晶を透析ボタンごと結晶化条件より高濃度の沈殿剤 (PEG3000) を含む緩衝液に移して透析すると、脱水和が進行し、結晶格子の体積は約 70% まで縮小した。これにより結晶格子中の分子の規則性が改善され、 3.0 \AA を超える高分解能の回折データが得られるようになった。次に、異常散乱多重同型置換法 (MIRAS; multiple isomorphous replacement with anomalous scattering) による位相決定について記述している。MIRAS には六種類の重原子誘導体が用いられており、これより得られた初期位相から描いた電子密度図は、 α サブユニットだけでなく β サブユニットと FXVD 蛋白質についても膜貫通領域と細胞外領域の主鎖を追跡できる電子密度を示した。

以上、本研究ではサメ直腸腺 Na^+, K^+ -ATPase の $\text{E2} \cdot 2\text{K}^+ \cdot \text{MgF}_4^{2-}$ 状態での三次元結晶化を行い、 2.4 \AA という高分解能の回折パターンを与える結晶を得ることに成功した。特に、 β サブユニットと FXVD 蛋白質の細胞外領域について、原子モデル構築可能な電子密度を得たのは本研究が最初である。これにより Na^+, K^+ -ATPase の機能を原子レベルで理解することが可能となるだけでなく、原子構造に基いた薬剤開発も可能となる。従って、本研究の成果は学術面だけでなく医療への応用においても非常に大きい意義がある。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として相応しいものと認めた。