

論文審査の結果の要旨

氏名 乗 松 良 行

本学位論文はコントラスト変調法を用いた筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase 結晶中の脂質二重膜の可視化に関する研究について述べたものである。

燐脂質は多くの場合に膜蛋白質のフォールディングや機能の発現に必須である。しかし、構造の柔軟性の為に、蛋白質と直接相互作用している脂質分子が可視化された例は少ない。

本論文は、申請者が開発した X 線コントラスト変調の新しい解析方法と、その応用例としての Ca^{2+} -ATPase 結晶中の脂質二重膜の可視化・構造変化について記述したものである。

本論文は 5 章から構成される。

第 1 章は序論であり、**第 2 章**は結晶化とデータ測定に関する記述である。**第 3 章**は方法であり、本研究で用いたコントラスト変調法の原理と解析手法を記述している。**第 1 節**では、コントラスト変調法の原理について述べている。**第 2 節**では、コントラスト変調剤濃度が異なる回折データのスケーリングとスケーリング時のパラメーターである溶媒の電子密度の精密化の手法を述べている。**第 3 節**では、膜に垂直な方向のみ電子密度が変化する 1 次元単純モデルから初期位相を得る手順と溶媒と脂質二重膜の初期モデルの構築について述べている。**第 4 節**では、溶媒と脂質二重膜のモデルの精密化方法について述べている。

第 4 章は本研究で得られた**結果と考察**の記述である。得られた溶媒と脂質二重膜のモデルを検証するために R と R_{cullis} を計算した。両値とも精密化の循環数が増えるにつれて顕著に改善しており、得られた構造は確からしいことを示した。 Ca^{2+} -ATPase の 4 つの中間状態の結晶中における脂質二重膜の構造を明らかにし、その構造から脂質二重膜は蛋白質の膜貫通ヘリックスの動きと共に変化することを示した。脂質二重膜と Lys、Arg、Trp との位置関係は、今までの知見からの予想とよく一致していることが分かり、これらのアミノ酸残基と脂質二重膜の相互作用が脂質二重膜の構造の変化に重要な役割を持つことを直接的に示した。E2 状態の結晶では両親媒性ヘリックス M1' の下には、燐脂質頭部に相当する強い電子密度のピークは存在しなかった。すなわち E1 から E2 に移行する過程で M1' ヘリックスが折れ曲がっても、燐脂質のヘッドグループは脂質二重膜の中心に押しこまれるのではなく横に移動することを示した。溶媒置換

率のマップから、コントラスト変調に用いた化合物(Nycodenz)は、E1·2Ca²⁺結晶では膜貫通領域に結合したCa²⁺のごく近傍まで接近できるが、E2結晶では細胞質側と内腔側どちらからも膜貫通領域に入り込めないことを示した。

第5章では**結論**を述べている。

以上、申請者はコントラスト変調法に溶媒置換率という概念を導入し、制限を課すことによって膜蛋白質結晶中の脂質二重膜の可視化に成功した。この結果、脂質二重膜は蛋白質と連動して動く動的なものであることも明らかにした。この方法は、solvent accessibilityの直接的な測定手法を提供するため、膜蛋白質の構造研究に大いに役立つと考えられる。以上の結果は、膜蛋白質と脂質二重膜との相互作用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。

なお、本論文は、杖田淳子、豊島近との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。