

## 審査結果の要旨

氏名 今井 駿輔

放線菌由来カリウムチャネル KcsA のゲーティング機構の構造生物学的解析と題する本論文は、放線菌由来のカリウムチャネルである KcsA の動作機構を溶液 NMR 法を用いて解析した成果を述べたものである。本論文は全 6 章から構成されており、第 1 章に序論、第 2 章に実験材料および手法が記されている。第 3 章に実験結果がまとめられ、第 4 章でその結果に対する考察が述べられている。第 5 章では全体の総括と今後の展望について記述されている。第 6 章は補遺であり、メチル基の帰属結果が化学シフト値の表として示されている。

第 3 章においては、まず KcsA の精製を行っている。KcsA は、界面活性剤ドデシルマルトシド(DDM)のミセル中に再構成した状態として、先行報告に基づいて均一に精製されている。KcsA は細胞内 pH が中性のときには閉状態、酸性のときには開状態を取る pH 感受性のカリウムチャネルである。そこで、精製された KcsA のメチル TROSY スペクトルが pH に応答して可逆的に変化することを示し、精製された KcsA が pH 依存的に構造変化することを確認している。さらに、pH 3.2 において KcsA が 2 つの構造の間の平衡にあることを見出し、これらが活性化状態と不活性化状態に対応することを変異体との比較によって明らかとしている。また、活性化状態と不活性化状態の存在比が温度に依存して変化することを見出し、pH 3.2, 120 mM の K<sup>+</sup>存在下においては、45°C で活性化状態が、25°C で不活性化状態が、それぞれ選択的に観測されることを明らかとしている。以上から、120 mM の K<sup>+</sup>存在下において pH と温度を調節することによって KcsA の状態を制御し、閉状態、活性化状態、不活性化状態に対応する NMR スペクトルを観測することに成功している。

次に、メチル基の化学シフトが閉状態と活性化状態の間で変化する領域を解析し、両状態の間で膜貫通領域の構造が全体的に変化することを示している。また同様の解析によって、活性

化状態と不活性化状態の間では、 $K^+$ を選択的に認識する **selectivity filter** 近傍の細胞外側領域の構造が変化することを示している。この構造変化は、**selectivity filter** に存在する Y78 と V76 の側鎖間に観測される NOE シグナルのパターンが、活性化状態と不活性化状態で異なることとしても確認されている。

最後に、**selectivity filter** と  $K^+$ および水分子との相互作用についての解析結果がまとめられている。**Selectivity filter** に存在する V76 のメチル基のシグナル強度の  $K^+$ 濃度依存性から、**selectivity filter** と  $K^+$ との相互作用の見かけの解離定数が pH 6.7, 45°C において 6 mM, pH 3.2, 45°C において 50 mM であり、酸性では中性と比較して約 8 倍増大することを示している。さらに、メチル TROSY スペクトルの比較から、活性化状態と不活性化状態がそれぞれ **selectivity filter** に  $K^+$ が結合した状態と解離した状態に対応することを見出している。水分子との相互作用については、V76 のメチル基と水分子の間の NOE が不活性化状態においてのみ観測されることを明らかとし、この水分子が不活性化状態において  $K^+$ の透過を阻害している可能性を提唱している。

第 4 章では、以上の結果に基づいて KcsA のゲーティング機構および巨視的電流プロファイルの分子機構について考察している。その内容は従来の電気生理解析の結果を矛盾なく説明する上、**selectivity filter** の  $K^+$ 親和性および水分子親和性が変化することによる透過活性の制御という新しい概念を提唱するものである。

以上の成果は、これまで不明であったカリウムチャネルの動作機構を立体構造の見地から明らかとしたものであり、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。