

## [別紙 2]

### 審査の結果の要旨

氏名 豊永 翔

電位依存性プロトンチャネル Hv1 の *N*-arachidonoyl ethanolamine による活性化機構の構造生物学的解析と題する本論文は、Hv1 が *N*-arachidonoyl ethanolamine (AEA) と直接相互作用し、活性化する機構を溶液 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 5 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実験方法が記されている。第 3 章に実験結果がまとめられ、第 4 章では実験結果に対する考察が述べられ、第 5 章に実験結果と考察のまとめと今後の展望が総括として述べられている。

第 3 章においては、まず、解析対象とした Hv1 の調製法を確立している。次に、調製した Hv1 の膜電位依存的な H<sup>+</sup>透過活性を確認するとともに、この膜電位依存的な H<sup>+</sup>透過に対する AEA や Zn<sup>2+</sup>の影響を解析している。最後に、溶液 NMR 法を用いて Hv1 上の AEA 結合部位を同定するとともに、AEA との相互作用に伴う Hv1 上の構造変化部位を同定している。

Hv1 は、膜電位依存的な H<sup>+</sup>透過を担う 4 回膜貫通型蛋白質である。近年、ヒト精子鞭毛運動の超活性化には、Hv1 を介した H<sup>+</sup>流出に伴う精子細胞内のアルカリ化が必要であり、この Hv1 の活性化は内因性カンナビノイドの一種である AEA が Hv1 の活性化電位を低下させることによるという機構が提唱されていた。しかしながら、この AEA による Hv1 の活性化が AEA と Hv1 の直接の相互作用によるものであるかは不明であった。これに対し、本論文では、まず Hv1 の大腸菌を用いた発現法、および界面活性剤を用いた可溶化・精製法を確立し、調製した Hv1 をリポソームに再構成することで、その電位依存的 H<sup>+</sup>透過活性を確認していた。さらに、このように調製した Hv1 を用いて、Hv1 と AEA 以外の分子の影響を排除した条件にて Hv1 の電位依存的 H<sup>+</sup>透過活性に対する AEA の影響を解析できる評価系を構築している。このような評価系を用いた結果、20-100 μM の AEA を添加した場合に AEA 濃度依存的な Hv1 の H<sup>+</sup>透過速度の増大を観測し、Hv1 と AEA の直接の相互作用の存在を強く示唆する結果を得ていた。以上のような解析の結果を受け、次に、Hv1 と AEA の相互作用を溶液 NMR 法を用いて部位特異的に解析している。Hv1 と AEA が直接相互作用する場合、脂質メディエーターの一種である AEA と Hv1 の相互作用は脂質二重膜中で起こることが想定されるため、本論文では、Hv1 を reconstituted high density lipoprotein (rHDL) として直径 10 nm 程度の脂質二重膜中に再構成する方法を確立していた。また、rHDL として再構成された Hv1 のような巨大分子複合体の NMR 解析にメチル TROSY 法を適用することを着想し、観測対象となる Ile, Ala のメチル基のシグナル(計 24 個)のうち、変異導入により 22 個のシグナルの帰属を得た上で、他のシグナルと分離して観測された 16 個のシグナルを解析対象としていた。調製した Hv1-rHDL 上の Hv1 の立体構造の妥当性に関しては、Hv1-rHDL に対して Zn<sup>2+</sup>を滴定した際の Hv1 の NMR スペクトル変化と、リポソームに再構成された Hv1 の Zn<sup>2+</sup>による阻害実験の結果が対応していたことから、rHDL 中の Hv1 がリポソーム上と同様に適切な構造を保持していることを確認している。次に、Hv1-rHDL に対して AEA を滴定したところ、I101, I102, I150, I154, I168, A206 の NMR シグナルが化学シフト変化を示していた。さらに、Hv1 上の AEA 結合部位を同定することを目的として、Hv1-rHDL に対し AEA を添加した上で、AEA の <sup>1</sup>H の磁化

を選択的に飽和した際の Hv1 の  $^1\text{H}$  の磁化に対する飽和移動を観測していた。AEA 非添加時のコントロール実験に比べて有意なシグナル強度減少の観測された Hv1 上の残基は、Hv1 の S1 と S4 の細胞内側と細胞外側に限局されていたことから、Hv1 はこの領域を介して AEA と直接相互作用することが示されていた。

第4章では、第3章にて得られた結果から、AEA による Hv1 の活性化機構を議論している。AEA を添加した際に Hv1 上で化学シフト変化を示した残基は、膜貫通領域の細胞内側に位置し、Hv1 の静止状態の安定化に寄与することが報告されている残基の近傍に位置していたことから、Hv1 に対して AEA が直接結合し、Hv1 の静止状態が不安定化されることが示唆された。また、AEA は脂質二重膜中において、エタノールアミン基をリン脂質のグリセロール基と同程度の位置に配し、22 Å 程度の長さを有する伸びた構造にて存在していることが報告されている。したがって、飽和移動の実験において飽和した AEA のオレフィンプロトンの領域は 10 Å 程度の長さを有していると推定できる。一方で、Hv1 上にて飽和移動の観測された I198 と I212 は S4 ヘリックス上で 20 Å 以上離れているため、これらの残基はそれぞれ別の AEA からの飽和を受けたことが想定される。したがって、Hv1 上に観測された飽和は inner leaflet と outer leaflet の 2 分子の AEA に由来することが示唆された。このことは、Hv1 は 2 分子の AEA と結合することを示唆している。

第5章では、以上の結果と考察を総括し、AEA が Hv1 の活性化電位を低下させる機構として、S1 と S4 に 2 分子の AEA が結合し、Hv1 の静止状態の安定化に寄与する膜貫通領域の細胞内側に構造変化を誘起することで Hv1 の静止状態を不安定化するという機構を提唱している。

従来の構造生物学的解析では、膜蛋白質は界面活性剤により可溶化された状態にて解析されてきたが、このような状態では脂質二重膜中における分子間相互作用を解析することは困難であった。本研究では rHDL に膜蛋白質と脂質様リガンドをともに再構成することで、脂質二重膜中における分子間相互作用の構造生物学的解析に成功した上で、AEA による Hv1 の活性化機構を提唱している。

以上、本研究の成果は、AEA による Hv1 の活性化機構を構造生物学的に説明することで、精子鞭毛運動の超活性化機構に関して新たな知見を加えるものであり、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。