

審査の結果の要旨

氏名 小澤 新一郎

本学位論文は、NMR の手法により、電位依存性カリウムイオンチャネル (K_v) とそれを阻害する生物毒である **gating modifier toxin** の相互作用を解析し、複合体モデル構造を構築した研究に関するものである。

K_v は膜にかかる電位勾配に応じてイオン透過路を開閉させ、特定のイオンを選択的に透過させる膜タンパク質であり、慢性疼痛や神経変性疾患、自己免疫疾患などに対する治療薬の標的としても注目されている。 K_v の立体構造上には4本の膜貫通ヘリックス(S1-S4) からなる電位センサードメイン (VSD) が高度に保存されており、VSD の膜電位依存的な構造変化によってイオン透過路の開閉がアロステリックに制御されると考えられている。また、 K_v を介したカリウムイオンの透過を阻害する生物毒として、**gating modifier toxin** が知られている。**Gating modifier toxin** は脂質二重膜中で VSD と結合し、その膜電位依存的な構造変化を阻害することで K_v の機能をアロステリックに阻害する。**Gating modifier toxin** の脂質二重膜中への分配と VSD との結合の両者には、分子表面に保存された **hydrophobic patch** と呼ばれる疎水性領域が重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、**gating modifier toxin** 上に共通して存在する **hydrophobic patch** を用いて、どのようにして標的となる K_v を特異的に認識しているのかは明らかとなっていない。このような問題に対して、本論文では **gating modifier toxin**-VSD 複合体の立体構造を明らかとし、**gating modifier toxin** による特定の VSD 選択的な分子認識様式、および VSD の膜電位依存的な構造変化の阻害様式を解明している。

解析には、真核生物由来 K_v と同等の立体構造および電気生理学的性質を有する古細菌 *A. pernix* 由来 K_vAP の VSD と、 K_vAP を阻害する **gating modifier toxin** である VSTx1 を、それぞれ大腸菌にて大量発現して用いている。はじめに、蛍光修飾した VSD をリポソームに再構成し、膜電位を形成した際の蛍光スペクトル変化を指標として VSD の膜電位依存的な構造変化を解析している。その結果、VSD 単独では膜電位形成に伴う蛍光消光が観測されたことから、調製した VSD が膜電位依存的に構造変化することを示している。一方、VSTx1 存在下では蛍光スペクトル変化が顕著に抑制されたことから、VSTx1 が膜電位のない脂質二重膜中で脱分極状態の VSD と結合し、その構造を安定化することを示している。

次に、VSD が脱分極状態の構造を形成することが明らかとなっている界面活性剤 decylmaltoside (DM) ミセル中で、VSTx1 と VSD の相互作用解析を行っている。解析には、高分子量タンパク質複合体においても分子間の結合界面および近接残基対を残基レベルの分解能で同定可能な NMR 手法である交差飽和 (CS) 法およびアミノ酸選択的 CS (ASCS) 法を用いている。

はじめに、CS 法によって VSTx1 上の DM 結合残基として F5, M6, W7, K8, C9, D18, W27 および V29 を、VSTx1 上の VSD 結合残基として V20, S22, W25, S32 および F34 をそれぞれ同定している。これにより、VSTx1 は hydrophobic patch 周辺残基を用いて DM と相互作用する一方で、hydrophobic patch 裏側の C 末端 (F34) 周辺残基を用いて VSD と相互作用することを明らかとしている。

また、ASCS 法により、VSTx1-VSD 間で 5 Å 以内に近接する残基対として V20-I127, S22-F124, W25-L121, S32-L128 および F34-L128 の 5 組の残基対を同定し、これら残基対を距離拘束条件としたドッキング計算により、VSTx1-VSD 複合体モデルを構築している。複合体モデル上では、VSTx1 の C 末端周辺残基が VSD の S4 と相互作用する一方で、hydrophobic patch は DM が存在すると想定される領域に露出していた。

本研究は、従来の知見とは異なり、VSTx1 が hydrophobic patch の分子裏側に位置する C 末端周辺残基を用いて VSD と相互作用することを明らかとした初めての知見である。Gating modifier toxin は hydrophobic patch 周辺残基の性質がよく保存されている一方で C 末端周辺残基の保存性は低いため、得られた結果は gating modifier toxin が保存性の低い C 末端周辺残基を用いて標的となる VSD を特異的に認識していることを示唆している。また、得られた複合体モデルは、細胞膜中では VSTx1 の hydrophobic patch がリン脂質のアシル鎖と相互作用する一方で、荷電性残基は細胞外側に露出することを示唆している。これらの知見は、C 末端周辺残基を用いて特定の VSD 選択的に結合した VSTx1 が、hydrophobic patch を介して細胞膜外側に留まることで VSD の S4 の膜電位依存的な構造変化を阻害し、K_vAP の機能を阻害することを示している。

本論文で得られた VSTx1-VSD 複合体モデル構造は、これまで gating modifier toxin を用いた電気生理実験等によって解析されてきた K_v の機能を立体構造の観点から説明する上で重要な知見を与えると同時に、内因性リガンドがほとんど報告されていない K_v 上の pharmacophore を同定し、立体構造情報をもとにした薬物の設計を可能とした点でも意義が大きいことから、本研究は博士 (薬学) の学位授与に値すると判断した。