

審査の結果の要旨

氏名 間瀬 瑤子

G蛋白質 α サブユニットによるシグナル伝達制御機構の構造基盤の解明と題する本論文は、NMR法を用いて、G α がGDP/GTP交換を行う構造機構ならびにK⁺チャンネルであるGIRKの制御を担う構造基盤を解明したものである。本論文は全5章から構成されており、第1章において序論を述べ、第2章および第3章にて、それぞれG α の動的構造平衡の役割の解明、G α によるGIRK制御機構の解明について、実験結果および結果に対する考察を述べている。第4章にて総括と今後の展望を述べ、第5章には実験材料及び方法を記述している。

第2章においては、GDP/GTP交換におけるG α の動的構造平衡の役割を解析した研究成果を述べている。G α の単独時の緩やかな速度でのGDP/GTP交換は、GDP結合状態のG α が、GDPを強く結合した構造と、GDPの解離に繋がる構造とを交換する構造平衡にあることを示唆している。本章では、GDP結合状態のG α におけるGDP/GTP交換に重要な構造平衡を、NMR法を用いて解析している。まず、野生型G α およびT329A変異体の試料調製とGDP/GTP交換活性測定を行い、調製した野生型G α が適切なGDP/GTP交換活性を有していること、T329A変異体のGDP/GTP交換活性が野生型の約40倍であることを示している。次に、構造平衡の存在を調べるため、NMRスペクトルの温度依存性を調べている。野生型G α のメチルTROSYシグナルが温度依存的に連続した化学シフト変化を示したことから、野生型G α における構造平衡の存在を提示している。さらに、¹H-¹⁵N TROSYシグナルの磁場依存性の解析から、構造平衡が存在する残基を同定している。またT329A変異体の磁場依存性を解析し、野生型よりも磁場依存性が亢進している領域として、GTPaseドメインの α 1ヘリックス、 β シート領域 (β 1, β 2, β 3, β 5ストランド、 β 1/ α 1ループ)、GTPaseドメインとヘリカルドメインの境界面 (α D/ α Eループ、 α Fヘリックス~ α F/ β 2ループ)、および α E/ α Fループを同定している。

以上の結果に基づき、GDP/GTP交換活性が増大したT329A変異体にて磁場依存性が亢進していた領域を、活性に重要な構造平衡を有する領域として、GDP/GTP交換におけるG α の構造平衡の役割を考察している。GDP結合領域 (β 1/ α 1ループ、 α 1ヘリックス、 α Fヘリックス~ α F/ β 2ループ) およびGDP結合領域へ繋がる β 1, β 2, β 5ストランドにおける構造平衡は、GDP解離に必要な構造変化を容易にする、GDP/GTP交換反応における重要な性質であると提唱している。また、 β 1, β 2, β 3ストランドは、GPCR結合部位とGDP結合部位を繋ぐ領域であり、これらの領域における構造平衡は、GPCR結合時に β シートおよび連動したGDP結合領域の構造変化を容易にし、GPCR存在下のGDP/GTP交換に寄与していると考察している。

第3章においては、G α によるGIRK制御機構を解析した研究成果を述べている。GIRK

は細胞内領域へのGβγの結合・解離により開閉が制御されるが、Gα存在下にてチャンネルの閉口が迅速になることが知られている。このGIRK閉口の迅速化の構造機構を、GαとGIRKの相互作用解析から解明している。Gαは、第2章にて調製方法を確立した試料を、GTPの非加水分解アナログ結合状態にて用いている。GIRKとしては、GIRK1のN末端領域とC末端領域を連結した細胞内領域コンストラクト、GIRK_{CP-L}を用いている。なお、本研究は修士課程の研究の継続となっている。

まず、修士課程にて行っていた、Gαを観測対象とし、GIRK_{CP-L}の添加に伴う化学シフト変化を調べた実験結果を、Gαの帰属に基づいて解析し、α2ヘリックス、α3ヘリックスおよびGTP結合領域が、GIRK_{CP-L}結合部位あるいは結合に伴う構造変化部位であることを示している。さらに、転移交差飽和(TCS)実験により、両者の結合部位として、Gα上のα2、α3ヘリックス、GIRK_{CP-L}上のαAヘリックスを含むC末端領域を同定している。

以上の結果に基づき、Gαの結合が迅速なGIRKの閉口を担う構造機構を考察している。まず、TCS実験により得られた両者の結合残基を用いて、GαとGIRK細胞内領域との複合体モデル構造を構築し、GαがGTPaseドメインのα2ヘリックス、α3ヘリックスからなる領域にてGIRKの1つのサブユニットのC末端領域と結合し、このとき、ヘリカルドメインがGIRKの隣のサブユニットのC末端領域に近接する様式にて、両者が結合することを提示している。このモデルは、Gαのヘリカルドメイン上の残基に導入した常磁性物質からGIRKのC末端領域に常磁性緩和促進効果が観測されるという、修士課程にて得られている実験結果を満たすことから、妥当なモデルであると考察している。さらに、学位申請者が所属する研究室における先行研究により提示されているGIRK上のGβγ結合部位を用いて、Gβγ-GIRK-Gα 3者複合体モデルを構築している。Gβγが結合し、活性化されているGIRKに対して、Gαも同時に結合しGβγの近傍に保持されることが、GTPの加水分解に伴う効率的なGβγの回収を可能とし、GIRKチャンネルの閉口を迅速にする構造基盤であると提唱している。

本研究では、溶液中におけるGαの動的な構造平衡を、NMR法を用いてアミノ酸残基レベルにて解析し、GDP/GTP交換反応の構造機構を提唱している。また、Gβγの結合・解離により開閉が制御されるGIRKが、Gαの結合により制御される構造基盤を提示した。

以上、本研究の成果は、GDP/GTP交換、及び、G蛋白質のエフェクター活性化の観点から、Gαがシグナル伝達において担う役割の解明に対して新たな知見を与えるものであり、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。