

学 位 審 査 報 告 書

(ふりがな)	しもむら たくし
氏 名	下 村 拓 史
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理学研究科 生物科学 専攻
(学位論文題目) 原核生物由来電位感受性ナトリウムチャネルにおける 電位センサードメインの配置と可動性についての研究	
論 文 調 査 委 員	(主査) 藤吉 好則 教授 七田 芳則 教授 高田 彰二 准教授

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	下村 拓史
論文題目	原核生物由来電位感受性ナトリウムチャネルにおける電位センサードメインの配置と可動性についての研究		
(論文内容の要旨) 原核生物由来の電位感受性ナトリウムチャネル (Nav) は、6 本の膜貫通ヘリックス (S1-S6) を 1 つのサブユニットとし、ホモ四量体として機能する。S5 ヘリックスから S6 ヘリックスまでは Na イオンの選択的透過を担うポアドメインを形成し、S1 ヘリックスから S4 ヘリックスまでは膜電位の変化を感知する電位センサードメインとして機能する。特に S4 ヘリックスは電位依存的なチャネル開閉に不可欠な部位と考えられている。同じく四量体を形成する電位感受性 K チャネル (Kv) については近年結晶構造が報告され、電位センサードメインは隣接するサブユニット由来のポアドメインと近接するという特徴的なドメイン配置が明らかにされた。しかしながら、Nav の立体構造についての情報は限られているのが現状である。 本研究では、初めて発見された原核生物由来の Nav である NaChBac において、そのドメイン配置と電位依存的な活性化の機能が Kv と類似していることを示した。様々なシステイン変異の導入実験から、四量体を安定化させる変異体を系統的に探索した。その結果発見された S4 ヘリックスへの 3 つのシステイン変異導入 (Q107C、T110C、R113C) は、隣接するサブユニットの S5 ヘリックス上に導入したシステイン残基 (M164C) とサブユニット間ジスルフィド結合による架橋が形成されることを明らかにした。さらに、電位センサードメイン上の 2 つの酸性残基のリジン置換 (E43K、D60K) を行うことによって、チャネルの活性化に必要な膜電位をより正電位側へシフトさせることを解明した。前述のシステイン二重変異体へのこの 2 つの付加的な変異導入は、最大の架橋形成効率を示す変異体を T110C/M164C から Q107C/M164C へと変化させた。Gln107 は Thr110 と比べて S4 ヘリックスのより細胞外側にあると考えられることから、この結果により、活性化の電位依存性が脂質二重膜における S4 ヘリックスの位置と関係していることを明確に示した。NaChBac の Kv と類似したドメイン配置と S4 ヘリックスの垂直方向の可動性は、原核生物由来の Nav における構造と電位依存的な活性化メカニズムが古典的な Kv のそれと類似していることを示している。さらに、これらの架橋による電位センサードメインの安定化を行うことによって、NaChBac タンパク質の二次元結晶化にも成功した。			

(論文審査の結果の要旨)

最近発見された原核生物由来の電位感受性ナトリウムチャネル (Nav) は、6 本の膜貫通ヘリックス (S1-S6) を 1 つのサブユニットとし、ホモ四量体を形成している。Na イオンの選択的透過を担うポアドメインは、S5 から S6 ヘリックスまでで形成され、膜電位の変化を感知する電位センサードメインは、S1 から S4 ヘリックスまでで形成されている。原核生物由来の Nav と同じように四量体を形成する電位感受性 K チャネル (Kv) については近年結晶構造が報告され、電位センサードメインが隣接するサブユニット由来のポアドメインと近接しているという特徴的なドメイン配置が明らかにされた。しかしながら、Nav の立体構造については、情報が極めて限られている。

申請者らは、初めて発見された原核生物由来の Nav である NaChBac を用いて、様々なシステイン変異の導入実験を行い、四量体を安定化させる変異体を系統的に探索した。その系統的实验によって発見された S4 ヘリックスへの 3 つのシステイン変異導入 (Q107C、T110C、R113C) は、隣接するサブユニットの S5 ヘリックス上に導入したシステイン残基 (M164C) とサブユニット間ジスルフィド結合を形成して架橋することを明らかにした。また、このジスルフィド結合はチャネルを閉じるが、還元剤 (DTT) によってチャネルの活性が戻ることを確認した。さらに申請者らは、電位センサードメイン上の 2 つのヘリックス (S1 と S2) 上の酸性残基のリジンへの置換 (E43K、D60K) を行うことによって、チャネルの活性化に必要な膜電位をより正電位側へシフトさせることを解明した。サブユニット間を繋ぐシステイン二重変異体へのこの 2 つの付加的な変異導入は、最大の架橋形成効率を示す変異体を T110C/M164C から Q107C/M164C へと変化させることを発見した。Gln107 は Thr110 と比べて S4 ヘリックスのより細胞外側にあると考えられることから、この発見は、活性化の電位依存性が脂質二重膜における S4 ヘリックスの上下位置と関係していることを明確に示す結果である。NaChBac が Kv と類似したドメイン配置と S4 ヘリックスの垂直方向の可動性を有することを解明した。すなわち、原核生物由来の Nav における構造と電位依存的な活性化メカニズムは典型的な Kv の構造と電位依存性に類似していることを示した。さらに、これらの架橋するシステイン変異を発見することによって、電位センサードメインの安定化に成功した。このような安定化によって、NaChBac タンパク質の二次元結晶化にも成功した。

以上のように、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分に価値あるものと認める。また、平成 23 年 1 月 25 日論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。