

学 位 審 査 報 告 書

(ふりがな)	なぐら　ひとし
氏　　　　　名	名　倉　　　仁
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)	
変異体解析による電位依存性イオンチャネルの電位センサーの研究	
論　文　調　査　委　員	(主査)　藤吉　好則　教授 平野　丈夫　教授 七田　芳則　教授

理　学　研　究　科

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	名 倉 仁
論文題目	変異体解析による電位依存性イオンチャネルの電位センサーの研究		
(論文内容の要旨) 電位依存性イオンチャネルは生体のほぼ全ての細胞に発現し、膜電位の変化に応じてイオンの膜透過を制御するタンパク質である。これらのチャネルは広範な細胞応答に関わる重要なタンパク質であり、近年解析されたタンパク質結晶構造等によってその基本的な構造や選択的イオン透過機構の一端が明らかになりつつある。しかしながら、これらのチャネルを真に理解するためには、脂質二重膜中でチャネルがどのような構造を取り、構造変化するのかという知識が不可欠である。その重要性にもかかわらず、電位依存性イオンチャネルを特徴づける膜電位依存的な開閉機構を始めとした、脂質二重膜中でのタンパク質の動態に関する知識は現在までほとんど得られていない。そこで、電位依存性イオンチャネルの中でも単純な構造を持つバクテリア由来の Na チャネルである NaChBac に着目し、野生型及びいくつかの変異体チャネルの活性を電気生理学の手法を用いて解析することで、このチャネルの脂質二重膜中での挙動の研究が行われた。これまでに、哺乳類の電位依存性イオンチャネルにおいてシステインの二重変異を導入することで、ポアドメインと電位センサーとの間にジスルフィド結合を形成させ得る事が示されている。 申請者らは、NaChBac の電位センサーに位置すると考えられる T110 及びポアドメインに位置すると考えられる M164 にシステインを導入することで、ポアドメインと電位センサーとの間にジスルフィド結合を形成させた。申請者らは二重変異体 T110C/M164C の活性を測定した。NaChBac を HEK 細胞に発現させてホールセル電流を記録したところ、大きな Na 電流を示す野生型と違い、T110C/M164C 変異体はチャネル活性を示さないことを確認した。しかし、細胞外から DTT を作用させることでその活性は回復した。更にシステインの変異体ではなくヒスチジン変異体 T110H/M164H を作製し、この変異体は亜鉛イオンをキレートして、チャネルを閉じることを確認した。以上の結果は T110 と M164 が脂質二重膜中で機能的な構造において近傍に位置することを示している。また、これらの解析を行っている過程で、申請者らは電位センサーに位置する T110 のみにシステインを導入した変異体に電流の減衰が見られる事を発見した。この現象は、NaChBac をサブドメインとして 4 つタンデムに繋げたタンパク質の中で、特定の 2 つの電位センサーに対して T110C を導入することで再現できたが、そのうち 1 つずつの変異を導入しても再現されなかった。これらの結果は、四量体の隣り合う電位センサー間でジスルフィド結合が形成されうる事を示している。 以上の結果から、NaChBac の電位センサーは従来考えられていたように脂質二重膜に対して鉛直方向の可動性を有するだけでなく、脂質二重膜に対して水平方向にも大きく動き、その場合にチャネルを閉じる事を明確に示した。			

(論文審査の結果の要旨)

電位依存性イオンチャネルは生体のほぼ全ての細胞に発現し、膜電位の変化に応じてイオンの膜透過を制御する重要なチャネルである。なかでも、近年 K チャネルの構造が解析され、基本的な構造や選択的イオン透過機構の一端が明らかになりつつある。しかしながら、ゲーティング機構については混乱した状態にあり、電位依存性イオンチャネルの膜内での機能を理解する研究の重要性が増してきている。しかし、その重要性にもかかわらず、電位依存性イオンチャネルを特徴づける膜電位依存的な開閉機構をはじめとしたチャネルの動態に関する知識は、現在までほとんど得られていない。

そこで申請者らは、電位依存性イオンチャネルの中でも単純な構造を持つバクテリア由来の Na チャネルである NaChBac に着目し、野生型及びいくつかの変異体チャネルの活性を電気生理学の手法を用いて解析することで、このチャネルの脂質二重膜中での挙動の研究を進めた。申請者らは、NaChBac の電位センサーに位置すると考えられる T110 及びポアドメインに位置すると考えられる M164 にシステインを導入することで、ポアドメインと電位センサーとの間にジスルフィド結合を形成させることに成功し、二重変異体 T110C/M164C の活性測定から、ジスルフィド結合によりチャネルが閉じること、DTT により活性が回復することを明らかにした。さらに、システインの変異体と同じ残基をヒスチジンにする変異体 T110H/M164H を作製した。そして、この変異体が亜鉛イオンをキレートして、チャネルを閉じ、亜鉛イオンを除くと活性が戻ることを確認した。以上の結果から、T110 と M164 が脂質二重膜中で機能的な構造において近傍に位置することを明確に示した。ところが、これらの解析を行っている過程で、申請者らは電位センサーに位置する T110 のみにシステインを導入した変異体に電流の減衰が見られることを発見した。この現象は、NaChBac をサブドメインとして 4 つタンデムに繋げたタンパク質の中で、特定の 2 つの電位センサーに対して T110C を導入することで再現できたが、そのうち 1 つずつの変異を導入しても再現されないことを解明した。これらの結果は、四量体の隣り合う電位センサー間でジスルフィド結合が形成されうることを明確に示している。以上の結果から、NaChBac の電位センサーは従来考えられていたように脂質二重膜に対して鉛直方向の可動性を有するだけでなく、脂質二重膜に対して水平方向にも大きく動き、その場合にチャネルを閉じる事を明確に示した。この生理的意味については、さらに検討が必要であるが、動きやすい電位センサードメインが、細胞膜の変形などで動いたときに、チャネルを閉じて、所定の位置にあるときにのみ、電位感受性のゲーティングを行うような防御機構を初めて明らかにした可能性がある。

以上のように、本論文は博士(理学)の学位論文として充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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降