

V 型 ATPase の回転分子機構を目指した X 線結晶構造解析 ：変異体 A_3B_3 複合体の構造解析

The rotary mechanism of V-ATPase

鈴木花野¹, 丸山慎太郎¹, 村田武士^{1,*}

¹ 千葉大学大学院理学研究院, 〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33

Kano Suzuki¹, Shintaro Maruyama¹, Takeshi Murata^{1,*}

¹Graduate School of Science, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba, 263-8522, Japan

1 はじめに

V 型 ATPase は ATP の加水分解エネルギーを利用して膜を介したイオンの輸送を行う巨大な超分子複合体である。V-ATPase の A, B サブユニットは N 末端が会合することで非対称構造の六量体リング (A_3B_3 複合体) を形成し, 3 カ所の活性部位で ATP 加水分解が順番に起こる。我々はこれまでに V 型 ATPase を構成する各サブユニットや $V_1 \cdot A_3B_3 \cdot$ 中心軸などの部分複合体の構造解析を進め, 加水分解メカニズムを提案してきた[1]-[3]。しかし詳細な加水分解メカニズムは明らかになっていない。

本研究では腸球菌 V 型 ATPase の A_3B_3 複合体が会合して N 末リングを形成する部分に変異を加えて X 線結晶構造解析を行い, この N 末リングの影響を調べた。

2 実験

変異体 A_3B_3 複合体の結晶化用サンプルは大腸菌無細胞合成系を用いて発現した。X 線回折実験はヌクレオチド非存在下の変異体 A_3B_3 複合体は波長 0.98 Å, AMP-PNP 存在下の変異体 A_3B_3 複合体は波長 1.1 Å で行った。得られた回折データは XDS で指数付け・積分・スケール処理した。

3 結果および考察

ヌクレオチド非存在下の変異体 A_3B_3 複合体の結晶は空間群 $P2_1$ に属しており, 格子定数は $a=180.8$ Å, $b=107.8$ Å, $c=193.4$ Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=99.4^\circ$, $\gamma=90^\circ$ で分解能 3.4 Å の回折データセットを取得し, 構造決定を行った。

一方 AMP-PNP 非存在下の変異体 A_3B_3 複合体の結晶は空間群 $P2_12_12_1$ に属しており, 格子定数は $a=105.8$ Å, $b=151.4$ Å, $c=235.5$ Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ で分解能 2.1 Å の回折データセットを取得し, 構造決定を行った。

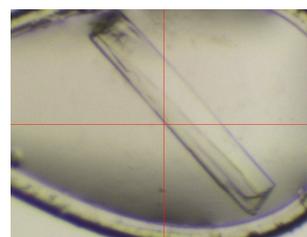


図 1 : 変異体 A_3B_3 複合体結晶

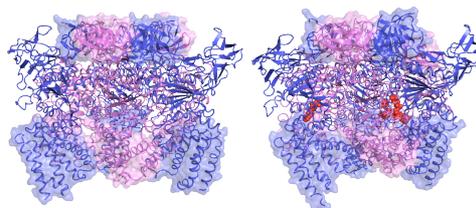


図 2 : 変異体 A_3B_3 複合体構造
(左 : ヌクレオチド非存在下, 右 : AMP-PNP 存在下)

4 まとめ

AMP-PNP 存在下の野生型 A_3B_3 複合体には 2 分子の AMP-PNP が結合していたが, 変異体 A_3B_3 複合体には 3 分子の AMP-PNP が結合し, 会合していた N 末リングが崩壊していた。一方ヌクレオチド非結合型変異体 A_3B_3 複合体の結晶構造は対称性が高く, 非対称構造であった野生型 A_3B_3 複合体の結晶構造と異なっていた。このことから N 末リングが複合体の非対称構造の形成に重要であると示唆された。

これらの構造は現在論文準備中である。

謝辞

X 線回折実験を行うにあたり, Photon Factory のビームラインスタッフにみなさまに大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。

参考文献

- [1] S. Saijo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 19955-19960 (2011)
- [2] S. Arai *et al.*, *Nature*. **493**, 703-707 (2013).
- [3] K. Suzuki, *et al.*, *Nat. Commun.* **7**, 13235 (2016).

* t.murata@faculty.chiba-u.jp