

V 型 ATPase の回転分子機構を目指した X 線結晶構造解析 : AIF₄ 結合型 V₁-ATPase の構造解析 The rotary mechanism of V-ATPase

鈴木花野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, 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 型 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 (A₃B₃ 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 V₁・A₃B₃・中心軸などの部分複合体の構造解析を進め、V₁ の ATP 加水分解待ちの構造、ATP 結合待ちの構造、ADP 解離待ちの構造を明らかにし、これらの構造から加水分解メカニズムを提案してきた[1]-[3]。しかし P_i 解離待ちの構造は未だに明らかになっていない。

本研究では腸球菌 V 型 ATPase の ATP 駆動モーター一部 V₁ (V₁-ATPase) にリン酸アナログ AIF₄ を結合させ加水分解直後の構造を明らかにした。

2 実験

A₃B₃、DF 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それぞれ発現し、各々のサンプルと ADP・AIF₄ を加えて V₁ (A₃B₃DF 複合体) に再構成させ精製を行った。精製したサンプルをシッティングドロップ蒸気拡散法で結晶化し、得られた結晶を波長 0.98 Å で回折実験を行った。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、Phaser-MR を用いて分子置換、COOT、Phenix refinement で精密化を行なった。

3 結果および考察

結晶は空間群 P2₁2₁2₁ に属しており、格子定数は a=127.7 Å, b=128.9 Å, c=231.6 Å, α=90°, β=90°, γ=90° で分解能 3.82 Å の回折データセットを取得し、ヌクレオチドが結合していない V₁ 構造をモデルにして構造決定を行った。

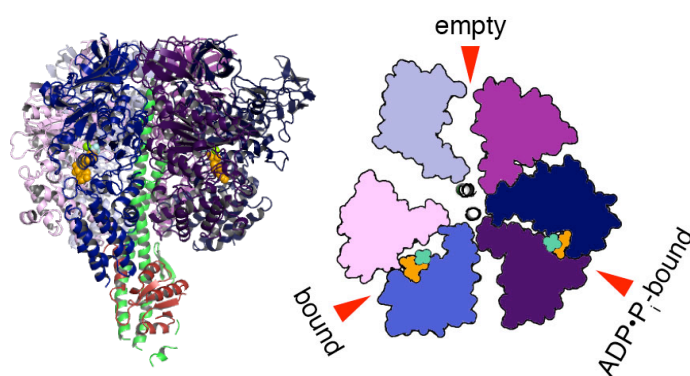


図 1 : ADP・AIF₄ 結合型 V₁ 複合体構造
(左 : 側面図、右 : 俯瞰図、
オレンジ色が ADP、水色が AIF₄)

4 まとめ

AIF₄ 結合型 V₁-ATPase の全体構造 (図 1) は AMP-PNP 結合型 V₁-ATPase と似ていたが、ATP の加水分解が起こると考えられる AB ペアの外側がやや開いており、これはヌクレオチド結合部位に AIF₄ が結合したことによる影響であると考えられる。また AIF₄ の Al-F 結合距離は P_i の P-O 結合距離よりも長いいため、ATP 加水分解直後の構造が得られると考えられており、これらのことから得られた構造は P_i 解離待ちの構造であると示唆された。一方中心軸側のインターフェイスには大きな変化は確認されなかったため P_i は中心軸側からではなく外側から解離すると考えられる。

こ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).

*kano_s_1127@chiba-u.jp