

高度好熱菌由来液胞型 ATPase の構造研究 Towards the structural studies on Vacuolar ATPase from *T. thermophilus*

岩田茂美^{1,*}, 横山謙²

¹宇宙航空研究開発機構きぼう利用センター, 〒305-0801 つくば市大穂 1-1

²京都産業大学, 〒〒603-8555 京都市北区上賀茂本山

Momi Iwata^{1,*} and Ken Yokoyama²

¹JEM Utilization Center, Japan Aerospace Exploration Agency,
1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan

²Kyoto Sangyo University, Motoyama, Kamigamo, Kita-ku, Kyoto, 603-8555

1 はじめに

本研究は、プロトン輸送体である Vacuolar type ATPase (V-ATPase) 全体の結晶構造を明らかにし、機能解明や V-ATPase を標的とした創薬に資する構造情報を得ることを目的とする。V-ATPase は十数種類のサブユニットから構成され分子量 600 kDa を超える超分子複合体であり、生物界に広く分布する。真核生物の空胞系の酸性化を担うことにより、タンパク質の品質管理やオートファジー等の生理現象を支える。V-ATPase 全体構造の解明に繋げるため、可溶性の触媒複合体 A₃B₃, 中心軸サブユニット、膜内在性のリング構造が原子分解能で解明されてきた。これらの部分構造を利用して、現在得られているホロ酵素の結晶から全体構造を明らかにするのが研究の骨子になる。最大で 5 Å 程度の回折データが得られているものの、分子置換で位相をつけ信頼性のあるモデルを構築するには十分でなく、原子分解能で信頼性のある全体構造モデルを構築するのに必要な分解能の回折データを得ることが最大の課題である。V-ATPase の全体構造が原子分解能で明らかになれば、空胞系 pH 調節の仕組みや、V-ATPase を標的とした創薬（骨粗しょう症治療薬、がん細胞増殖抑制など）につながる阻害剤の探索が期待される。

2 実験

これまで、ESRF,SLS,DLS など各地の放射光施設で回折データの取得を試みてきた。培養ロット間で、精製標品の品質が大きくばらつき、結晶の再現性が悪いため、単一の結晶からは 6 Å 程度のデータを収集するのがやっとというところであった。結晶化条件を最適化し、回折実験を繰り返すことで、マクロシーディングで結晶が大きくなること、デハイドレーションで分解能が若干改善することを見出し、複数のネイティブ結晶のデータを収集し、CCP4 の BLEND プログラムにより複数データを合わせた解析では 5 Å 程度まで分解能が改善した。この結果を再現し、分解能をさらに向上させるため、PF の NW12A や BL1A でのデータ測定を実施した。

また、国際宇宙ステーションの「きぼう」での微重力環境を利用した結晶性実験での結晶のデータも測定した。

3 結果および考察

データ収集では、用意した結晶をスナップショットで評価し、その中で分解能が良好なものを選んで回折データを収集した。非常に異方性が強く、また X 線照射による損傷が大きいため、大きい結晶を選び照射位置を移動させながら回折実験を実施した。個々の結晶では、微重力環境で成長したものも含めて分解能が画期的に向上したものはなかった。何らかの方法でさらに結晶の品質向上と品質の安定化が必要と考えられた。

4 まとめ

単独では、既存のデータを上回る回折データを得ることはできなかったが、継続して少しでも良いデータを集めて、多結晶からのデータを合わせることで分解能の向上したデータセットを得て、これまでに構造決定した部分構造を用いた分子置換で全体構造を決定したい。

参考文献

- [1] Maher M. J., Akimoto S., Iwata M., Nagata K., Hori Y., Yoshida M., Yokoyama S., Iwata S., *Yokoyama K. (2009) Crystal structure of A₃B₃ complex of V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.* 28: 3771-3779
- [2] Structure of a central stalk subunit F of Prokaryotic V-type ATPase /synthase from *Thermus thermophilus*. Makyio H., Iino R., Chiyo Ikeda, Imamura, H., Tamakoshi, M., Iwata, M., Stoch, D., Bernal, A. B., Yoshida, M., *Yokoyama K., and *Iwata, S. *EMBO J.* 24 3974-3983 (2005).
- [3] Crystal structure of a central stalk subunit C and reversible association/dissociation of vacuole-type ATPase. Iwata M, Imamura H, Stambouli E, Ikeda C, Tamakoshi M, Nagata K, Makyio H, Hankamer B, Barber J, Yoshida M, *Yokoyama K, *Iwata S. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(1) 59-64. (2004)

連絡先 Email : iwata.momi@jaxa.jp