

V 型 ATPase のエネルギー変換メカニズムの解明: B サブユニットの X 線結晶構造解析

The enzymatic mechanism of V-ATPase: Crystal structure of NtpB

水谷健二^{1,*}, ヤクシジ ファビアナ リカ¹, 村田武士¹

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

Kenji Mizutani^{1,*}, Fabiana Lica Yakushiji¹, Takeshi Murata¹

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。ATP の加水分解は V_1 部分に 3 カ所ある活性部位で順番に起こり、その反応の進行に従って V_1 の中心に位置するサブユニットが回転する仕組みになっている。

ここでいう V_1 部分は、サブユニット構成から別名 A_3B_3DF 複合体とも表現でき、8 本のポリペプチド鎖から成り立っている。V-ATPase はその機能メカニズムのみならず、このような複雑な複合体がどのように形成されるのかについても不明な点が多い、我々はこれまでに、V-ATPase を構成する各サブユニットや V_1 ・ローターリング・DF 回転軸などの部分複合体の構造解析を進めてきた、本研究では腸球菌 V-ATPase の B サブユニット(NtpB)単独での構造解析を行い、得られた構造から機能発現や複合体形成のメカニズムについて議論することを目指している。

2 実験

B サブユニット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 線回折実験は波長 1.1Å で行った。得られた回折データは HKL2000 または XDS で指数付け・積分・スケール処理した後、Phaser または Molrep で分子置換法により位相決定を行った。分子モデリングには Coot を用いた。構造精密化には Phenix refine または Refmac5 用いた。

3 結果および考察

得られた B サブユニットの結晶は空間群 $P1$ に属しており、格子定数は $a=46.49\text{\AA}$, $b=135.94\text{\AA}$, $c=166.56\text{\AA}$, $\alpha=103.68^\circ$, $\beta=97.57^\circ$, $\gamma=90.69^\circ$ であった。この結晶について分解能 3.5 Å 程度の回折データセットを取得した。

位相決定は複合体中の B サブユニットの PDB ファイルを用いた分子置換法により行った。現在のところ $R_{\text{work}}=0.23$, $R_{\text{free}}=0.36$ まで構造精密化が進んでいるが、 V_1 複合体中では隣のサブユニットと共同して β バレル構造をとる N 末端ドメインの電子密度が貧弱でモデリングが出来ていない。

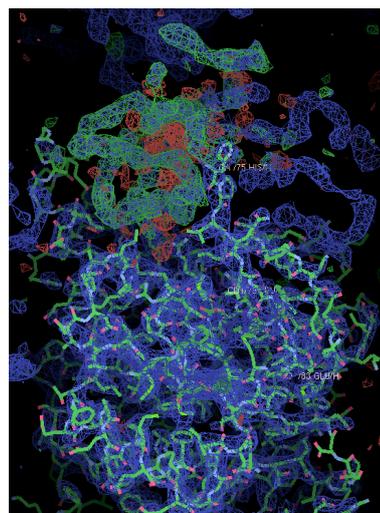


図 1 : B サブユニットの電子密度

4 まとめ

現在腸球菌 V-ATPase のサブユニットの一つである B サブユニットの結晶から得られたデータセットを用いて構造解析を進めている。

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大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。

* k.mizutani@chiba-u.jp