

# 膜超分子モーター(V型ATPase)のX線結晶構造解析とその展望

村田 武士

京都大学大学院医学研究科

## Challenges in structural/functional analysis of membrane rotary motor, V-ATPase

Takeshi Murata

Faculty of Medicine, Kyoto University

### <Synopsis>

In eukaryotic cells, vital processes such as protein trafficking, endocytosis, neurotransmitter release and intracellular pH regulation, depend on the movement of ions across membranes by V-ATPases. V-ATPases are also found in prokaryotes. The enzyme in the non-respiring bacterium *Enterococcus hirae* acts as a primary sodium extrusion system. Its subunit composition is simpler than that of its eukaryotic counterparts, and its nine subunits are encoded in an operon. We have established purification and reconstitution system, and have been studying the molecular features of the enzyme. Recently we succeeded to solve the structure of membrane rotor ring of the complex, although crystallization of the whole complex is still under screening.

In my talk, I would like to discuss about the difficulties of crystallization of membrane proteins and whole V-ATPase complex, and about future works of V-ATPase utilizing future light source “ERL”.

タンパク質のメカニズムの本質的な理解のためには、その立体構造情報が不可欠である。しかし、その対象が膜タンパク質である場合には、良質の結晶を得ることが難しく、現在でも原子分解能で構造が解かれた膜タンパク質はまだ少ない。V-ATPaseは複雑なサブユニット構造からなる超分子膜タンパク質である。V-ATPaseは多くの内胞系の膜に存在するほか、破骨細胞や尿細管を形成する細胞の細胞膜にも存在し、回転触媒機構によりATPのエネルギーを使ってプロトンを送る。V-ATPaseによって形成される酸性pHは多くの重要な役割を果たしている。V-ATPaseの機能異常により、大理石病、骨粗鬆症、難聴、尿細管性アシドーシスなどの疾病に関係していることが報告されている。このようにV-ATPaseは生理学・医学的にも重要な酵素であるが、その立体構造解析が難しく、詳細な反応機構は不明な点が多い。

V-ATPaseは一部のバクテリアにも存在し、生化学的・構造生物学的研究が進んでいる。*Thermus thermophilus* の V-ATPaseの研究では、回転軸サブユニットの結晶構造や1分子計測技術による $V_1$ -ATPaseの回転触媒機構が明らかになった。我々は、*Enterococcus hirae*から $\text{Na}^+$ 輸送性のV-ATPaseを初めて発見した。クローニングしたATPaseオペロン全体を用いた増幅生産株から、本酵素の大量精製及びリポソームへの再構成系を確立し、本酵素が $\text{Na}^+$ 輸送性であるという利点を生かして詳細な生化学的酵素学的性質を調べてきた。また、本酵素の立体構造情報を得るために複合体及び各サブユニットでの結晶化を行っている。最近、本酵素の膜タンパク質部分であるローターリングの結晶構造を明らかにし、イオン輸送のメカニズムの議論が可能になってきた。本酵素全体での結晶化も7年間継続しているが、結晶性が悪いため構造解析には未だ至っていない。

本シンポジウムでは、「何故膜タンパク質の結晶化・構造解析が難しいのか」の一般論を概説し、V-ATPaseの結晶化トライアルでの成功例とその構造を紹介しながら、本酵素全体構造を解くための問題点と解決策を議論したい。また、次世代光源を使った、本酵素のダイナミクス研究の未来も想像したい。