

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19770079
研究課題名 (和文) 膜結合型 ATP 依存性メタロプロテアーゼ FtsH の X 線結晶構造解析
研究課題名 (英文) X-ray crystallographic study of membrane-bound ATP-dependent protease FtsH
研究代表者
寿野 良二 (SUNO RYOJI)
東京工業大学・資源化学研究所・資源化学研究所特別研究員
研究者番号：60447521

研究成果の概要：

FtsH やプロテアソームなどの ATP 依存性プロテアーゼの共通した分子メカニズムにおいて未解決で本質的な疑問は、「ATP 依存性プロテアーゼはいったいどのようにして基質を連続的に内部に送り込んでいるのだろうか？」ということである。この問題を理解するためにはその酵素の構造を決定することが有効な手段である。これまで申請者らのグループでは FtsH の「形」に着目し、FtsH の ATPase ドメインや六量体プロテアーゼドメイン、六量体細胞質ドメインの構造を決定してきた。本研究では FtsH の「動き」に着目する。具体的には (1) 様々なヌクレオチド結合状態の FtsH 細胞質ドメインの X 線結晶構造解析、及び (2) FtsH の全体構造の X 線結晶構造解析を行う。これらの構造情報を元に FtsH の基質をとりこむ動きや基質の通り道を明らかにし、上述の疑問の答えを導き出したい。

(1) 全長 FtsH や FtsH の細胞質ドメインにおいて、様々な条件から結晶が得られた。これらの結晶の条件をさらに詰めて良質な結晶の作成を試みた。特に全長 FtsH は膜タンパク質であるので、界面活性剤の条件検討や抗体を用いた結晶化などを行って良質な結晶作成を試みた。現在までのところ、それらの結晶を放射光施設で X 線回折実験を行ったが、構造解析可能な分解能データには至っていない。引き続き、結晶の質の向上を目指して条件検討を行う。

(2) FtsH の基質とりこみ機構に関する変異体解析

申請者が決定した FtsH 構造によって基質の通る径路が予測でき、基質の結合部位やとりこみに重要と考えられるループ構造の存在が確認された。一昨年度はそれらの領域付近での様々な変異体を作成し、活性の変化から基質送り込みや ATP 依存的な基質分解における重要性を検討し、興味深い知見を得た。昨年度からそれらの結果をまとめ、論文投稿準備中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：タンパク質、酵素、X 線結晶構造解析、プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

FtsHやプロテアソームなどのATP依存性プロテアーゼの共通した分子メカニズムにおいて未解決で本質的な疑問は、「ATP依存性プロテアーゼはいったいどのようにして基質を連続的に内部に送り込んでいるのだろうか？」ということである。この問題を理解するためにはその酵素の構造を決定することが有効な手段である。これまで申請者らのグループではFtsHの「形」に着目し、FtsHのATPaseドメイン(Niwa, H et al., *Structure*, 2002)や六量体プロテアーゼドメイン、六量体細胞質ドメインの構造を決定してきた(Suno, R et al., *Mol. Cell*, 2006)(図1)。しかし、それでも大きな構造変化を起こすATP依存性プロテアーゼの一つの側面を見いだしたに過ぎない。反応中間体などの新たな構造を決定することやそれに伴う生化学的解析を詳細に行うことがATP依存性プロテアーゼFtsHの本質的な分子メカニズム解明につながると申請者は考えている。

2. 研究の目的

本研究ではFtsHの「動き」に着目する。具体的には(1)様々なヌクレオチド結合状態のFtsH細胞質ドメインのX線結晶構造解析、及び(2)FtsHの全体構造のX線結晶構造解析を行う。これらの構造情報を元にFtsHの基質をとりこむ動きや基質の通り道を明らかにし、上述の疑問の答えを導き出したい。

(1) 様々なヌクレオチド結合状態のFtsH細胞質ドメインのX線結晶構造解析

申請者の六量体FtsHの細胞質ドメインの構造解析の研究から、FtsHはATPを加水分解しながらダイナミックな構造変化を起こし、それに伴って基質を送り込むと考えられた。しかし、現段階ではFtsHの六量体構造はADP結合状態が解かれたのみで、他の反応状態の構造は不明である(Suno, R et al., *Mol. Cell*, 2006, Bieniossek, C et al., *PNAS*, 2006)。

しかもそれは3.9Åという低分解能のFtsH構造であり、側鎖などの詳細な議論ができない。従って、現状ではFtsHの基質とりこみ機構の構造的基盤を完全に明らかにしたとは言い難い。本研究では様々なヌクレオチド結合状態でのFtsHの構造を決定し、その反応状態のスナップショットをつなぎ合わせることでFtsHのヌクレオチド依存的な構造変化を解明することが目的である。申請者は既に様々なヌクレオチド存在下の結晶化条件を得ており、研究期間内にはそれらの条件の最適化を行いながら放射光施設でのX線回折実験によるデータ収集及び構造解析段階まで進展させることが可能であると考えている。

(2) 完全長FtsHのX線結晶構造解析

FtsHはN末端側に膜貫通領域を持ち、C末端側はAAA+ドメインと呼ばれるATPaseドメインとプロテアーゼドメインを含んだ大きな領域からなっている。しかし、膜貫通領域を含んだFtsHの全体構造は未だ決定されていない。FtsHの膜貫通領域とAAA+ドメインの間の領域は基質が送り込まれる入り口と考えられている領域であり、その構造情報は極めて乏しい。従って、完全長FtsHの構造情報を得ることは基質の通り道や新規な基質認識部位の同定など基質とりこみ機構に重要な知見が得られることが期待される。膜蛋白質と超分子複合体の結晶構造解析は非常に困難であることが知られているが、FtsHの膜貫通領域は全体の20%程度であるので、これまで申請者が行ってきた未発表の細胞質ドメインの結晶化条件は全長FtsHの結晶化にとって大きなアドバンテージとなる。仮に低分解能の結晶しか得られなかった場合でも、これまで申請者らのグループで決定したドメインの構造情報を用いた構造解析が可能である。従って、ある程度の精度で基質の通り道を明らかにできると期待される。

FtsH は ATPase ドメインとプロテアーゼドメインが一本のポリペプチド鎖上に存在する膜蛋白質である。ATP 加水分解と構造変化、プロテアーゼ活性がすべて連動していると考えられている。このような形状のタンパク質は AAA+ファミリーの中でも珍しい。そんな FtsH はこれまでオリゴマー状態の立体構造が不明であったことから FtsH の詳細な分子機構に関する研究は未熟であった。従って、基質のとりこみ機構の本質に迫る研究はほとんど無い。しかし構造情報を得た今、FtsH は ATPase 活性とプロテアーゼ活性が連動する仕組みや、それに伴う基質のとりこみ機構を知るための格好の研究ツールとなった。特に上述のような X 線結晶構造解析の研究によって、「蛋白質の動き」を様々な反応状態の「形」から推定できる。細胞内にはプロテアーゼ以外にも Sec などの膜透過装置や Hsp104 などの脱凝集酵素のように ATP 加水分解をともなってポリペプチドをとりこむシステムを持つ現象が知られている。FtsH の基質とりこみ機構の詳細が明らかになることによって、ATP 加水分解を伴う基質取り込み機構の共通原理が明らかになることも期待される。また、この FtsH の構造は、ヒトの FtsH ホモログであるパラプレジンが神経変性疾患の原因遺伝子であるので薬剤ターゲットとしても注目されている。FtsH はプロテアソームなどのように複雑なサブユニットもなく、ホモオリゴマーというシンプルな形状をしていて、実験結果も解釈しやすい。このように様々な角度から FtsH は多くのリング状 ATPase タンパク質に重要な知見を与える事が期待される。

3. 研究の方法

平成 19 年

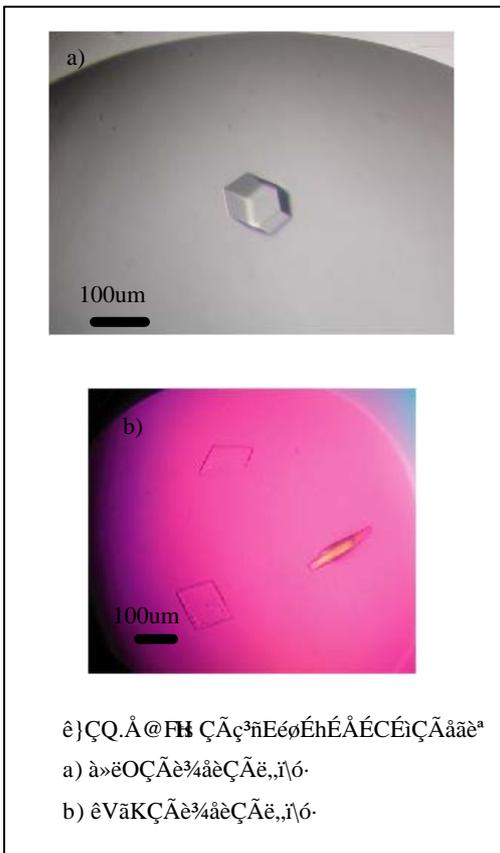
FtsH の細胞質ドメインの X 線結晶構造解析

これまで決定されてきた様々な ATPase の結晶構造では ATP 結合型 (AMP-PNP)、加水分解中間体 (ADP・AlFx)、ADP 結合型といった状態の構造を決定し、ATP 加水分解サイクルモデルを構築した例がある。例えば、同じ AAA

サブファミリーの p97 の構造解析では ADP とフッ化アルミニウムを加えて、ある特定の反応中間体状態の構造を得ている。先に述べたように申請者は ADP 結合状態で 3.9 Å 分解能の構造決定に成功している。この結晶化条件、クライオ条件を検討することで分解能の向上が期待される。また、同様の条件で様々なヌクレオチド存在下で結晶化することによって様々な反応中間体構造の結晶が得られることが期待される。申請者は現段階でも既に新規条件での結晶を得ている (図 2)。この条件にはリン酸アナログが含まれており、ATP 加水分解中間体 (ATP・Pi 状態) の FtsH の構造が得られることが期待される。結晶の形状が大きく変化したことから、これまで決定した構造とは異なる構造が得られると考えられる。以上のように、平成 19 年度は新しい結晶条件の検討と既に得ている結晶の X 線回折実験を行う。この研究は現在、研究協力者である東工大・濡木 理教授の研究施設を借りて行う。20°C に設定された実験室や結晶化ロボットなどを使用する。

完全長 FtsH の X 線結晶構造解析

平成 19 年度は完全長 FtsH の結晶化条件の検討を中心に行う。様々なスクリーニングキットを用いて野生型 FtsH の結晶化条件の検討を行う。それとともに結晶化を容易にする変異体を作成し、その結晶化条件を検討する。申請者が決定した FtsH の細胞質ドメインの結晶構造は比較的柔軟性の高いリンカーの一部を疎水残基に換えた変異体を作成し、六量体構造を安定化させることで成功した。完全長でも同様の変異体やフレキシブルな領域の柔軟性を低下させる変異体を作成し結晶化する。また、細胞質ドメインの構造を決定した結晶化条件を元にして界面活性剤を検討し、完全長 FtsH の結晶化条件の検討も行う。



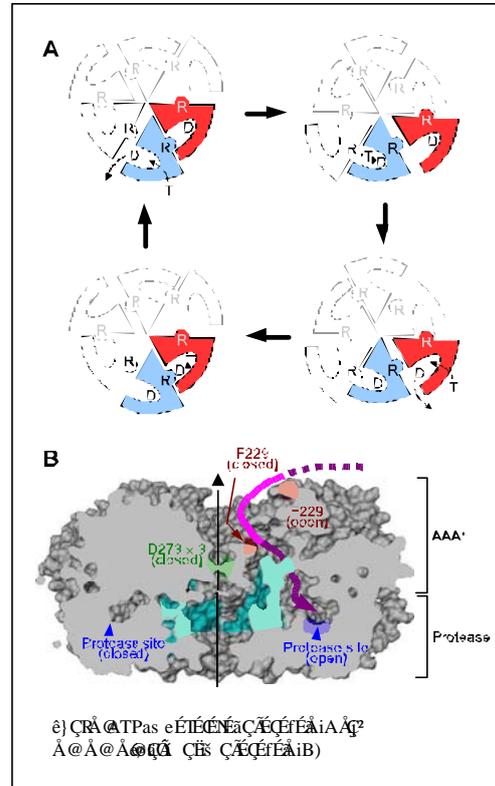
平成20年度

FtsHの細胞質ドメインのX線結晶構造解析

前年度検討した結晶化条件で得た結晶を放射光施設でX線回折実験を行い、データを収集する。良好なデータが得られ次第、既に決定しているADP結合型の構造情報を元に分子置換法によって位相決定を行う。得られた電子密度からモデリングを行い、構造を決定する。正確な位相が決定できなかった場合はセレンメチオニンや水銀を用いた重原子置換体も作成し、多重波長異常分散法もしくは多重同型置換法を行うことで位相を改善する。たとえ、低分解能のデータしか得ることができなくても既に解けているADP結合型の構造を元に分子置換法による解析を行い、スクレオチド依存的なドメインの構造変化のようすからこれまでのモデルを修正する(図3、D: ADP、T: ATP、R: アルギニンフィンガー、ピンク、紫: 基質)。

全長FtsHのX線結晶構造解析

前年度検討した結晶化条件で得た結晶を放射光施設でX線回折実験を行い、データを収集する。分子置換法で良好な結果が得られなければ重原子置換体を作成し、正確な位相を算出して構造を決定する。高い分解能データが得られない事も予想されるが、膜貫通領域



の大まかな形を決定することは可能であるので、FtsHへ基質が入る入り口を予測することができる。

申請者は本研究とは別の職務として FtsH の生化学的機能解析と一分子解析を行う。上述の研究の構造解析に必要な変異体の生化学的解析を行う。一分子解析は FtsH の「基質結合」、「基質とりこみ」、「基質分解」の3つのステップを一分子レベルで観測することでそれらの詳細な反応ステップを解析する。この生化学的解析と上述の構造解析を連携しながら行い、さらに一分子解析を行うことで基質の送り込み機構を詳細に明らかにしたい。

4. 研究成果

細胞質領域及び全長 FtsH の新規条件での結晶化に成功した(図2)。細胞質領域に関しては ATP アナログ (ADP・BeFx) 存在下で新規条件での結晶化に成功した。以前決定したADP結合型と異なった構造が得られることが期待され、FtsHのATP依存的な構造変化及び基質とりこみ機構の解明につながる。また、全長 FtsH の結晶化条件を検討したところ、いくつかの条件から結晶を得た。膜タンパク質の結晶化は比較的困難であり、全長 FtsH の結晶化は技術的にも重要な知見である。膜

タンパク質基質がどこから FtsH 内部に取り込まれるかについて重要な知見を得られることが期待される。これらの条件での結晶は現段階では結晶構造解析レベルの分解能データを得ることはできなかったが、近傍の条件の検討や様々な化学物質を添加していくことで条件を改善していきたい。特に膜タンパク質である全長 FtsH は界面活性剤の選択が重要であるので、検討してより良質なサンプル調製を行うことで結晶の質も向上させたい。

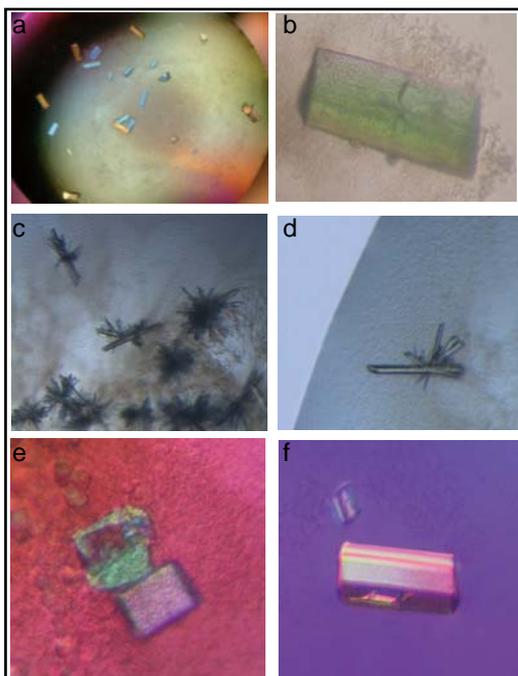


図2 ATPアナログ存在下新規条件の FtsH の結晶

a,b: 細胞質領域の結晶

c,d,e,f: 全長 FtsH の結晶

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3件)

①寿野 良二、吉田 賢右

「AAA⁺プロテアーゼFtsHのタンパク質分解メカニズム」実験医学増刊「細胞内の輪廻転生蛋白質の分解機構」、2008 vol.26 No.2 214-221 査読無

②寿野 良二

「ATP依存性プロテアーゼ」、「トリガー因子」、「FtsH」蛋白質核酸酵素 増刊号 「キーワード：蛋白質の一生」、2008年6月号 Vol.53 No.8, pp.897-1114 査読無

③Ryoji Suno, Masasuke Yoshida, Kosuke Morikawa “The substrate-translocating mechanism of membrane-binding ATP-dependent protease FtsH” SPring 8 research frontier2007 (2007) 査読無

[学会発表] (計 2件)

①中崎 洋介、寿野 良二、吉田 賢右、渡辺 洋平 「好熱菌のClpP結合型ClpB変異体」、日本生化学会、神戸、2008年12月9日～12日 (ポスター発表)

②寿野 良二、下立 夏香、下山真和、吉田 賢右 「ATP依存性プロテアーゼのmobile領域の役割」、日本生物物理学会、横浜、2007年12月21日～23日 (口頭発表・査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寿野 良二 (SUNO RYOJI)

東京工業大学・資源化学研究所・資源化学研究所特別研究員

研究者番号：60447521

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし