

機関番号：34304

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770106

研究課題名 (和文) 膜結合型AAA+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 analysis of membrane-bound AAA+ protease FtsH

研究代表者

寿野 良二 (SUNO RYOJI)

京都産業大学・総合生命科学部・特定研究員 (PD)

研究者番号：60447521

研究成果の概要 (和文)：膜結合型 AAA+プロテアーゼ FtsH の ATP 依存的な基質分解機構を詳細に知るために X 線結晶構造解析を行った。FtsH の細胞質領域について様々な ATP アナログを含む新規な結晶化条件で結晶が得られ、3.5 Å 程度の分解能データを収集できた。これらのデータを分子置換法によって解を得、現在解析中である。これらの構造を決定することにより、FtsH の詳細な分子メカニズムが解明できることが期待される。

研究成果の概要 (英文)：It is the purpose of this research that ATP-dependent substrate degradation mechanism of membrane bound AAA+ protease FtsH is revealed by X-ray crystallographic analysis. During this study period, crystals of the functional cytosolic rection of FtsH were obtained in several new crystallization conditions including a few kinds of ATP analogues. These crystals difftacted to a resolution of about 3.5 Å, and now we are analyzing these data to determine new crystal structures of sFtsH bound several ATP analogues. It is expected that these structures show the detailed molecular mechanism of FtsH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1050,000	4,550,000

研究分野：構造生物学、生化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物科学

キーワード：X線結晶構造解析、AAA+タンパク質、ATP依存性プロテアーゼ、超分子複合体

1. 研究開始当初の背景

FtsH やプロテアソームなどの AAA+プロテア

ーゼの分子メカニズムを理解する上で共通する未解決な疑問は、「AAA+プロテアーゼは

ATP加水分解に伴って、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。この問題に対するアプローチとして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 AAA<sup>+</sup>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(sFtsH)の構造を決定してきた(Suno, R et al., *Mol. Cell*, 2006) (図1)。

## 2. 研究の目的

上述の問いに答えることが本研究の目的である。具体的には FtsH の「動き」に着目して様々な反応状態の構造を決定することにより、FtsH の ATP 依存性タンパク質分解の分子メカニズムを解明することである。

### 様々な反応状態の FtsH の X 線結晶構造解析

これまでの申請者らの構造解析研究によって、FtsH は ATP 加水分解とともにダイナミックな構造変化を起こし、その動きによって基質タンパク質を内部に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)。したがって、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によって FtsH の ATP 加水分解に伴う構造変化を解明することを目的とする。現在までに FtsH の全長及び sFtsH を用いて様々なヌクレオチド存在下での結晶を得ている(図2)。研究期間内には条件の最適化を行いながら放射光施設の 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。

### 構造安定化変異体のスクリーニング

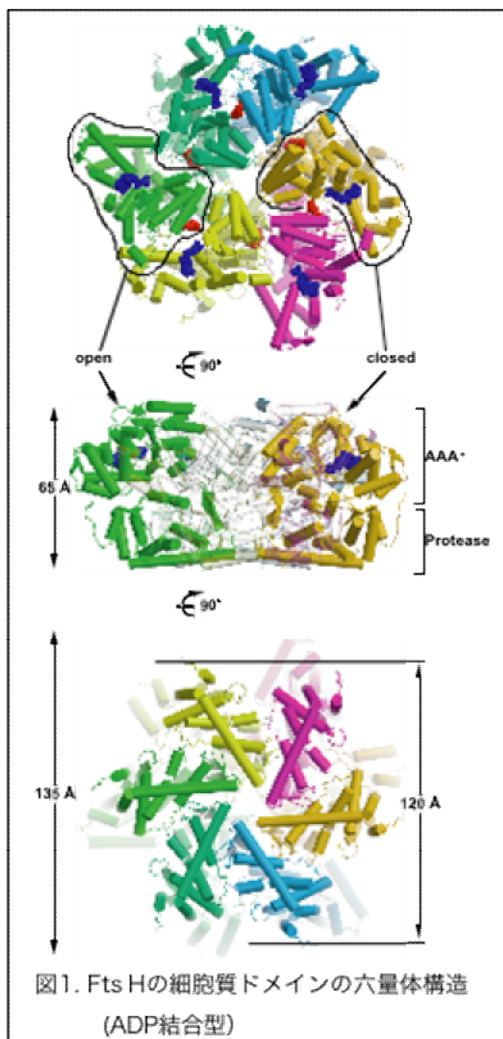
FtsH は ATP 加水分解に伴って大きく構造変化する。良質な結晶を得るためにはその動きを抑制して均一な構造に近づけることが分解能向上の重要課題となる。(1)、(2)をの成功を支えるプロジェクトとして良質な結晶作成を目指した FtsH 構造安定化変異体の作製を行う。申請者らは変異体によって分解能を向上させて構造解析に成功している(Suno, R et al., *Mol. Cell*, 2006)。

近年、膜タンパク質の構造決定は増加傾向にあるが依然として難易度は高く、FtsH の全体構造を決定することはタンパク質科学的にも構造生物学的にも高い意義がある。膜からタンパク質を引きずり出す酵素は FtsH の他にない。また、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ので、構造変化と ATP 加水分解、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。このような特性を持つタンパク質は AAA<sup>+</sup>ファミリーの中でも珍しい。FtsH は構造情報が未熟であったことから詳細な分子メカニズムにせまる研究は行われていないこなかったが、本研究のような一連の X 線結晶構造解析によって FtsH の「動き」を様々な反応状態の「形」から推定できる。また、細胞内にはプロテアーゼ以外にも SecA のような膜透過装置や Hsp104 などの脱凝集酵素のように ATP 加水分解に伴って、ポリペプチド鎖をとりこむシステムの存在が知られている。FtsH の分子機構の詳細が明らかになることで、ATP 加水分解を伴う基質とりこみ機構の共通原理が明らかになることも期待される。プロテアソームのような複雑で多くのサブユニットからなる酵素に比べて、FtsH はシンプルな構造であるので実験結果が解釈しやすく研究ツールとしても有用で

ある。また、パラプレジン<sup>®</sup>はヒトの FtsH ホモログで神経変性疾患の原因遺伝子であるため、FtsH の詳細な構造は薬剤ターゲットとしても注目されている。

### 抗体を用いた完全長 FtsH の X 線結晶構造解析

FtsH の細胞内での主な役割は複合体形成に失敗して機能を失った膜タンパク質を膜から引きずり出して分解することである。しかし、膜貫通領域を含めた FtsH 全体の構造は未知なままで膜タンパク質をどのように引きずり出すのか不明である。FtsH の N 末端にある 125 残基の膜貫通領域は膜局在と 6 量体構造の安定化に寄与していることが知られている。一方、FtsH の膜貫通領域と AAA<sup>+</sup>ドメイン<sup>+</sup>間の領域(126~145 残基)は基質をとりこむ入り口近傍であり、基質の選別を行



う重要な領域であると考えられるが本質的な役割は未知なままである。本研究では完全長 FtsH 構造の決定により、これらの領域の本質的な役割を明らかにするとともに基質通過経路や基質膜タンパク質とりこみ(膜からの引きずり出し)メカニズムの解明を目指す。しかし、FtsH のような膜タンパク質でかつ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予想される。大きな問題点は膜タンパク質の結晶は界面活性剤のミセルによる溶媒領域が多く、分解能の向上を妨げることである。本研究ではその問題を解決する手法として、膜タンパク質の X 線結晶構造解析で実績のある抗体を用いた結晶化技術を選択し、高分解能構造決定を目指す (Iwata, S., et al, *Nature*, 1995)。申請者は現在までにいくつかの条件で結晶を得ており、抗体技術を用いることでさらなる結晶の質の向上が期待される (図2)。もし低分解能の結晶であっても、これまで申請者が決定した構造情報を用いて構造解析が可能である。したがって、研究期間内には全長 FtsH の構造決定により基質通過経路や構造変化を明らかにできると考えている。

### 3. 研究の方法

本研究では膜結合型 AAA<sup>+</sup>プロテアーゼ FtsH の全体構造と新規な反応中間体構造の決定を目指す。得られた様々な ATP アナログ結合状態の構造から FtsH の詳細な基質とりこみサイクルモデルを構築する。この研究は、申請者らがこれまで行ってきた FtsH の構造解析の実績とその過程で得た情報を基盤として改良し、さらに抗体技術や変異体作製などの新たな工夫によって遂行する。

### 様々な反応状態の FtsH の X 線結晶構造解析

これまでに報告されている他の ATPase の結晶構造では ATP 結合型 (AMP-PNP)、加水分解中間体 (ADP · AlFx)、ADP 結合型状態の構造を

それぞれ決定し、ATP加水分解サイクルモデルを構築した例がいくつかある (Toyoshima, C., et al, *Nature*, 2004)。申請者は現在、ADP結合状態で3.9Å分解能の6量体 sFtsH 構造決定に成功している。同様に様々なヌクレオチド存在下で結晶化し、様々な反応中間状態構造の結晶をえる作成する。申請者は現段階でいくつか新規条件での結晶を得ているので (図2)、これらの条件検討と放射光施設でのX線回折実験による結晶の質のチェックをしながら結晶化条件を決定していく。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などを用いた重原子置換体も作成し、多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。高分解能構造を決定できない場合でも、全長FtsHでは膜貫通領域の大まかな形やFtsHの大き

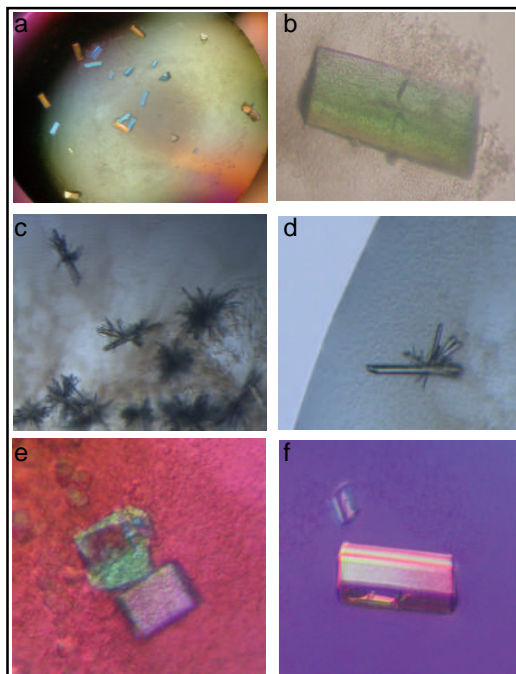


図2 ATPアナログ存在下新規条件のFtsHの結晶  
a,b: 細胞質領域の結晶  
c,d,e,f: 全長 FtsH の結晶

な構造変化を決定することは可能である。FtsHへ基質が入る入り口近傍の構造からFtsHによる膜タンパク質の基質の通過経路を明らかにできる。FtsHの細胞質領域の場合、各ATPアナログ結合状態の構造を比較することで、これまでのモデル(図3、D: ADP、T: ATP、R: アルギニンフィンガー)を修正して詳細な反応サイクルモデルを構築する。

### 構造安定化変異体のスクリーニング

sFtsHの構造決定はFtsHの比較的柔軟性の高いリンカーの一部を疎水残基に置換した変異体を作成し、六量体構造を安定化させることで成功した。この構造情報によって、新たにFtsHのフレキシブルな領域が明確となった。FtsHおよびsFtsHにこれらの領域を安定化させる変異体を作製して、分解能向上を目指して結晶化する。また、sFtsHのオリゴマー構造は全長FtsHより比較的崩れやすいが、現在までに申請者はオリゴマー構造が安定化するsFtsH変異体の作製に成功している。この変異体の結晶化条件を検討することにより高分解能な結晶の作製が期待される。

抗体を用いた完全長FtsHのX線結晶構造解析  
結晶に適したモノクローナル抗体の作製と完全長 FtsH の結晶化条件の改善を行う。抗体は業者に外注して作製し、ELISAによる

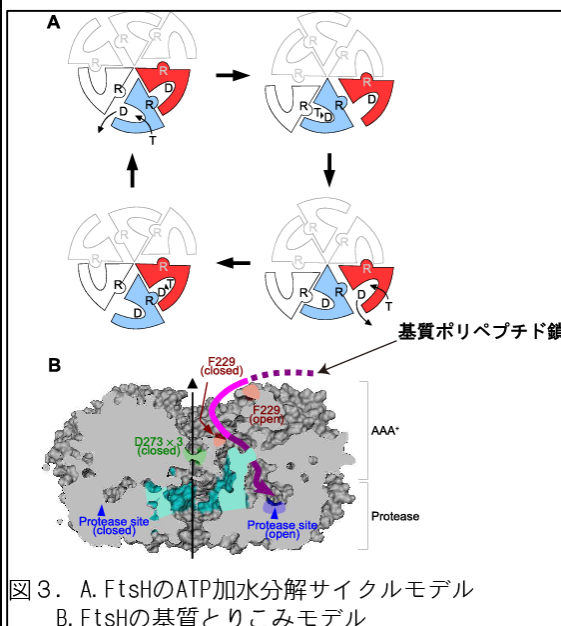


図3. A. FtsHのATP加水分解サイクルモデル  
B. FtsHの基質とりこみモデル

スクリーニングの後、適切なプロテアーゼによりフラグメント化する。抗体フラグメントと FtsH の複合体を精製し、様々なスクリーニングキットを用いて結晶化条件を検討する。また、作製した変異体とヌクレオチドの条件を適宜組み合わせることで結晶化条件の改善を行う。放射光施設における X 線回折実験を行い、得られた結晶の質を確認しながら良好な結晶化条件を詰めていく。並行してすでに得られている結晶条件を改良する (図 2)。

#### 4. 研究成果

##### 様々な反応状態の FtsH の X 線結晶構造解析

FtsH の細胞質領域を用いて種々の条件検討により、様々な ATP アナログ (ADP・AlFx, ADP・BeFx, AMPPNP, ADP) 存在下で結晶を得た (図 4)。2 種の空間群での結晶が得られ、現在のところ p212121 の結晶では 3.5~3.7 Å 分解能データを、C2 の結晶では ADP・BeFx では 4.3 Å 分解能データを収集した (図 5)。それぞれ分子置換法により解を得た。すべて現在解析中であるが p212121 の場合、たとえば ADP・AlFx 存在下での結晶データについて主鎖を検討してみると現段階ではこれまでに報告されている他の構造と比較してプロテアーゼドメインと ATPase ドメインが相対的に変化した構造を形成していた。これまで報告されている FtsH の構造はプロテアーゼドメインと ATPase ドメインが相対的に開いた構造と閉じた構造が得られているが、今回解析中の構造はその間の構造である可能性があり、既知の構造と比較することにより FtsH の詳細な構造変化が明らかになることが期待される。また、プロテアーゼドメインには 2 つの可動領域があるが、特に  $\beta$  ヘアピンと呼んでいる FtsH の中心孔付近に存在する領域はこれまで 3.9 Å 分解能の構造であった。今回解析中の構造を決定するとこれまで最高の分解能データの構造となり、基質通過経路を形成していると考えられている  $\beta$  ヘアピンの役割が明らかとなることが期待される。C2 の結晶データは非対称単位中に 6 量体リングが 2 つ存在していた。前回我々が

決定した構造は ADP 結合型 6 量体リング構造であったが、今回は ADP・BeFx 存在下であるので新規な反応状態での構造であることが期待される。ADP・BeFx は比較的 ATP に近い構造であると考えられているのでこの構造を決定し、前回の構造と比較することで詳細な 6 量体リングの基質分解サイクルモデルを提案することができる。

##### 構造安定化変異体のスクリーニング

結晶化サンプルは全長 FtsH と膜貫通領域を欠損させた sFtsH を用いてきた。sFtsH は ATPase ドメインとプロテアーゼドメインを含んでおり FtsH の ATP 依存性プロテアーゼ活性を示す機能発現領域であるが、その ATPase 活性は全長 FtsH の約 10 倍程度低かった。これは sFtsH が全長 FtsH よりオリゴマー構造が不安定であるためと考えられた。構造解析のサンプルとして sFtsH の安定を調べるため、sFtsH を 1~2 週間 4°C で保存しておくとも N 末端が 13 残基分解されていることが判明した。N 末端の 13 残基を欠損させた sFtsH を構築し、その活性を測定したところこれまで用いてきた sFtsH の約 10 倍の ATP 加水分解活性を示した。これらの領域は全長 FtsH と同等の ATPase 活性を示したので、オリゴマー構造が sFtsH よりも向上したと推測され、結晶化サンプルとしても有望であると考えられた。

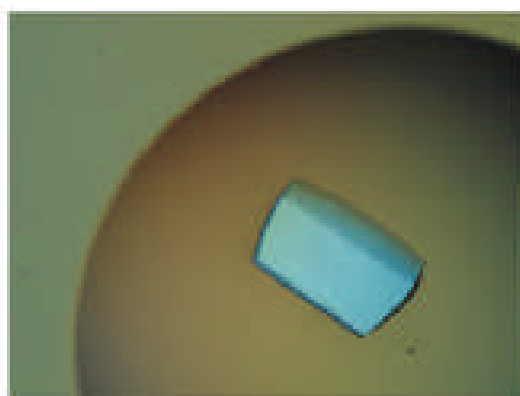


図 4 AMPPNP 存在下での sFtsH 結晶

#### 抗体を用いた完全長FtsHのX線結晶構造解析

より結晶化に有効な抗体を得るために、現在膜貫通領域とその近傍の配列のコンストラクトを構築している。これらについてモノクローナル抗体を作成する予定である。平行してFtsH全長の結晶化条件の検討およびFtsHのサンプル調整法の検討も行った。ゲル濾過HPLC解析によりFtsHの界面活性剤を含んだ複合体の状態が温度によって変化することや種々の界面活性剤の影響を検討し、単分散性を示す条件を決定した。今後は、これらの条件で精製したサンプルを用いて結晶化スクリーニングおよびこれまでに得られた結晶化条件近傍の条件で結晶化を行い、より良質な結

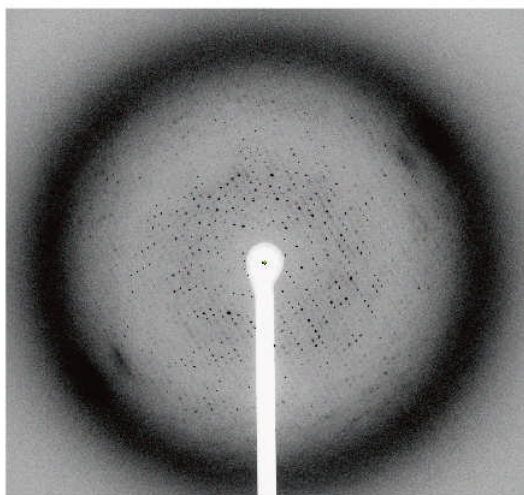


図5 ADP・BeFx存在下でのsFtsH結晶のX線回折像

晶作成を目指す。

#### 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1件)

①Yo-hei Watanabe, Yosuke Nakazaki, Ryoji Suno, and Masasuke Yoshida, “Stability of the two wings of the coiled coil domain of ClpB chaperone is critical for its disaggregation activity.” *Biochemical J.*, 421(1), 71-7, 2009, 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

①寿野 良二、下山真和、下立 夏香、阿部明子、秋山 芳展、吉田 賢右 「膜結合型

ATP依存性プロテアーゼFtsHの構造と機能」、日本生体エネルギー研究会、大阪大学、2010年11月18日

②Ryoji Suno, Masakazu Shimoyama, Natsuka Shimodate, Akiko Abe, Yoshinori Akiyama, Masasuke Yoshida. “The role of the mobile regions in the ATP-dependent protease activity of FtsH” The 3rd International Symposium on Protein Community, Sep. 13-16 (2010), Nara, Japan

③寿野 良二、下立 夏香、下山真和、秋山芳展、吉田 賢右 「膜結合型ATP依存性プロテアーゼFtsHの基質分解モデルの生化学的検討」、日本生化学会、神戸、2009年10月22日

④北村 朗、寿野 良二、秋山 芳展、吉田賢右、金城 政孝 「原核生物における蛍光相関分光法測定-原核細胞内タンパク質品質管理機構の解明に向けて」蛍光相関分光で見る生体系の情報伝達(6)、独立行政法人理化学研究所 仁科ホール、2009年3月27日

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

寿野 良二 (SUNO RYOJI)

京都産業大学・総合生命科学部・特定研究員 (PD)

研究者番号：60447521

##### (3)連携研究者

秋山 芳展 (AKIYAMA YOSHINORI)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：10192460

岩田 想 (IWATA SO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60452330