

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20770078
 研究課題名 (和文) 酵母 Asna-1 ATPase の立体構造解析

研究課題名 (英文) Structural analyses for yeast Asna-1 ATPase (Get3)

研究代表者

山形 敦史 (ATSUSHI YAMAGATA)
 東京大学・放射光連携研究機構・助教
 研究者番号：20463903

研究成果の概要 (和文)：

Asna1 ATPase は ATP 加水分解活性を伴って C 末端一回膜貫通タンパク質 (tail anchored protein) を膜挿入する。本研究では X 線結晶解析によって ADP 結合型とヌクレオチド非結合型の酵母 Asna1 ATPase (Get3) の立体構造を決定した。さらに立体構造に基づく生化学的実験により Get3 の TA protein 結合部位の同定と ATP 加水分解依存的な構造変化を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Asna1 ATPase can insert the membrane protein containing a single transmembrane domain at the C-terminus, so called as tail anchored protein, dependent on its ATP hydrolysis. In this study, we determined the crystal structures of yeast Asna1 ATPase (Get3) in both ADP bound and nucleotide free forms. In addition, structure based biochemical studies revealed the TA protein binding site in Get3, and its conformational transition upon ATP hydrolysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

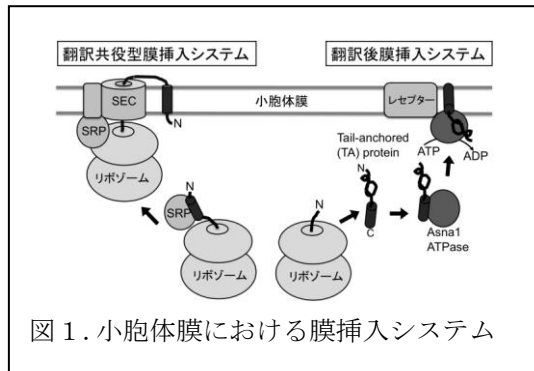
キーワード：蛋白質、構造生物学、ATP 加水分解酵素、膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質が機能するためには生体膜内に正しく埋め込まれる必要がある。この膜挿入は一般に複数のタンパク質因子からなる複雑なメカニズムを必要とし、さらに真核細胞内においてはオルガネラ毎に異なる膜挿入システムを持つことが知られている。

その中でも特に良く知られている例とし

て、Sec トランスロコンによる翻訳共役型膜挿入システムが挙げられる (図 1 左)。この系では、新生ポリペプチド鎖としてリボソームで合成された膜タンパク質の N 末端の膜貫通部位がシグナル認識因子 (SRP) に認識された後、Sec トランスロコンに運ばれ、リボソームのペプチド鎖伸長を伴って膜に挿入される。



一方、細胞内には C 末端に一回膜貫通部位を持つ膜タンパク質 (tail-anchored protein; TA protein) が存在し、膜タンパク質全体の約 5% を占める。TA protein はシグナルとなるべき膜貫通部位が合成される同時に翻訳が終了するため、ペプチド鎖伸長と共役して膜挿入させることができない。このため翻訳共役型の膜挿入とは別の膜挿入システムの存在が考えられてきた。この TA protein 特異的な膜挿入システムの実体は不明のままであったが、本研究開始一年前の 2007 年にヒト細胞から ATP 依存的に TA protein を膜に挿入する因子として Asna1 ATPase が同定された。その一年後には酵母 Asna1 ATPase (別名 Get3) も同様の活性を持つことが示された。ヒトと酵母のデータから、1) Asna1 (Get3) による TA protein の特異的に認識、2) 膜内在型レセプターとの相互作用による Asna1:TA protein 複合体の膜への移行、3) ATP 加水分解を伴った TA protein の膜への挿入の 3つのステップが考えられた (図 1 右)。しかし、その詳細なメカニズムは不明であり、特に立体構造に基づいた原始レベルでのメカニズムの解明が期待された。

2. 研究の目的

本研究では、酵母 Asna1 (Get3) を材料として、1) X線結晶構造解析法による Get3 の立体構造の決定、2) 立体構造に基づいた生化学的実験による Get3 の TA protein 結合部位の同定、3) Get3 の ATP 依存的な構造変化の解明、の 3つの研究を柱として、Asna1 による膜挿入メカニズムの構造学的基盤の解明を試みた。

3. 研究の方法

1) X線結晶構造解析法による Get3 の立体構造の決定

Get3 の調整に関しては大腸菌発現系を用いた。酵母ゲノムからクローニングした Get3 遺伝子を発現ベクターに組みこみ、ヒスチジンタグ融合タンパク質として発現させた。これを Ni アフィニティーカラム、陰

イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを用いて精製した。次に精製した Get3 を各種ヌクレオチドアナログ存在下で、蒸気拡散法を用いて結晶化を行った。得られた結晶の回折データは、大型放射光施設 SPring-8 (播磨) と Photon Factor (つくば) を用いて測定した。位相決定には、セレノメチオニン置換蛋白質を用いた多波長異常分散 (MAD) 法を用いた。セレノメチオニン位置の同定と、MAD 法による位相決定にはプログラム auto SHARP を用い、溶媒平滑化による位相の改善には SOLOMON を用いた。モデル構築は Coot を用い、モデルの精密化は CNS を用いた。

得られたモデルから Get3 に金属が結合していることが分かった。この金属種の同定には ICP-AES と異常分散効果を用いた結晶構造解析を用いた。

2) 立体構造に基づく生化学的実験による Get3 の TA protein 認識部位の同定

Get3 と TA protein の結合の測定法として、*in vitro* 翻訳を用いて合成した TA protein を用いた方法と、酵母 two-hybrid 法の二つが行われてきたが、両手法とも定量性や擬陽性の問題があった。そこで研究代表者は、新たに共発現法を用いた簡便で且つ定量性に優れた結合実験法を開発した。さらに 1) で得られた立体構造を基に TA protein 結合部位を予測し、その部位を欠損させた変異 Get3 と Sec22 との結合を調べることにより、TA protein 結合部位の同定を行った。

3) Get3 の ATP 依存的な構造変化の解明

立体構造を基に人為的にシステイン残基を導入した変異 Get3 を用い、酸化によるシステイン残基間の架橋を利用して Get3 の構造変化を調べた。さらに各種ヌクレオチド存在化における架橋のかかり具合の違いから ATP 加水分解と構造変化との関連を調べた。

4. 研究成果

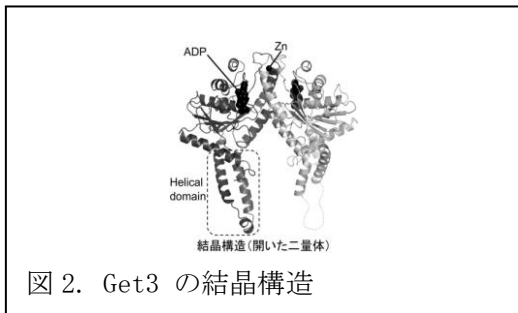
1) X線結晶構造解析法による Get3 の立体構造の決定

大腸菌を用いた発現系により、Get3 を高純度に精製することができた。ゲルろ過クロマトグラフィーの結果から Get3 が二量体を形成することが分かった。また、精製された Get3 は ATP 加水分解活性を保持していた。

精製した Get3 を用いて結晶化を行ったところ、ADP 結合型とヌクレオチド非結合型の結晶化に成功し、それぞれ 3.0 Å と 2.8 Å の分解能で回折データを測定した。両者とも同じ空間群 ($P2_12_12$) に属し、ほぼ同じ格子定数であった。決定した結晶構造では、非対称単位中の二分子が二量体を形成して

おり、二量体間に一個の金属イオンが含まれていた。この金属イオンは保存されたシステイン残基 (Cys285, Cys288) と結合しており、その結合様式から亜鉛イオンと予測された。そこで、ICP-AES を用いて亜鉛イオンが 50% の占有率 (Get3 二量体に対して一個の亜鉛イオン) で含まれていることを確認した。また X 線結晶解析において、亜鉛の吸収端よりやや高エネルギー側の波長では金属イオンのピークを示すのに対し、低エネルギー側ではピークが消滅することからも結合金属が亜鉛であることが示された。さらに亜鉛イオンに結合しているシステイン残基に変異 (C285S) をいれると、ゲルろ過クロマトグラフィーにおいて二量体が維持されないことと、亜鉛イオンと結合できないことを ICP-AES を用いて確認した。

ADP 結合型とヌクレオチド非結合型の両者ともほぼ同じ構造であった。全体構造は開いた二量体構造を示していた (図 2)。

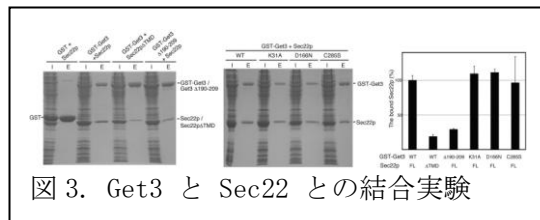


Get3 一分子の構造をみると、ヌクレオチド結合部位を含むコアダメインと、ヘリックス構造からなる Helical ドメインの二つのドメインに分けられる。Helical ドメインの一部はディスオーダーしており、コアダメインに比べて柔軟な構造であることが示唆されるとともに、TA protein との結合によって安定化される可能性も考えられた。また ADP 結合部位では Get3 も他の ATPase と同様に P-loop と呼ばれる部位によってヌクレオチドと結合していることが分かった。今回の ADP 結合型の構造からは加水分解に必要なマグネシウムイオンが見られなかったが、ADP 結合部位近傍に良く保存された二つのアスパラギン酸残基 (Asp57, Asp166) が存在し、マグネシウムイオン結合部位として予想された。このアスパラギン酸残基への変異体を作製し、ATP 加水分解活性を調べたところ、活性が完全に失われていたことからマグネシウムイオン結合部位であると考えられた。

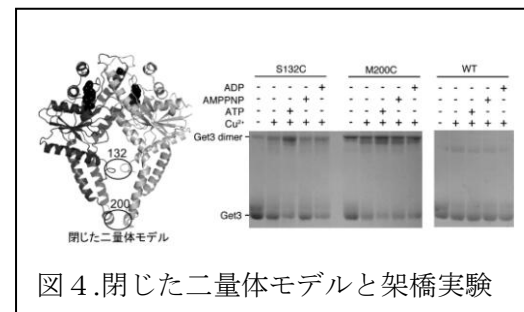
2) 立体構造に基づく生化学的実験による Get3 の TA protein 認識部位の同定

共発現法を用いて、Get3 と Sec22 との結合を簡便に測定する系を開発した。グルタチ

オン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合 Get3 とモデル TA protein である Sec22 を大腸菌内で共発現させると、両者は可溶性複合体を形成した。この複合体をグルタチオンカラムを用いて共精製したのち (図 3 左)、Sec22 の定量を行うことにより両者の結合を簡便且つ定量的に調べることが出来た (図 3 右)。膜貫通ヘリックスを除いた Sec22 (Sec22 Δ TMD) を用いると Get3 との結合が見られなくなることから (図 3 左)、Get3 が膜貫通ヘリックスを特異的に認識していることが示された。次に、Helical ドメインを除いた Get3 (Get3 Δ 190-209) と Sec22 の結合を調べると、両者の結合が著しく弱まったことから Helical ドメインが結合部位であると考えられた (図 3 左)。さらに ATP 結合部位変異体 (K31A)、マグネシウムイオン結合部位変異体 (D166A)、亜鉛イオン結合部位変異体 (C285S) を用いても正常型と変わらない Sec22 への結合が見られたことから (図 3 中央、右)、TA protein への結合そのものには、ATP 結合や加水分解、さらには二量体構造も必要ではないことが示された。



3) Get3 の ATP 依存的な構造変化の解明
他の二量体型 ATPase の例から、Get3 の ATP 依存的な二量体構造の開閉の可能性が示唆された。亜鉛イオン結合部位をピボットポイントとして閉じた二量体モデルを構築したところ (図 4 左)、二つの残基 Ser132 と Met200 が 6 Å 程度の距離まで接近する。そこでこれら 2 つの残基をシステイン残基に置換し、酸化剤として銅イオンを加えて、システイン残基間を架橋することにより、閉じた二量体構造の検出を試みた。



正常型を銅イオンによって酸化しても、架橋による二量体のバンドは SDS-PAGE では現れない (図 4 右)。一方、S132C、M200C 変

異 Get3 では酸化による架橋の結果、二量体位置にバンドが新たに現れ、この架橋が 132, 200 のシステイン残基間の架橋であり、閉じた二量体構造の結果によるものと考えられた (図 4)。この架橋は ATP 存在化で最も顕著に現れるが (図 4)、ATP 非加水分解性アナログ AMP-PNP や ADP 存在下ではヌクレオチド非存在下の場合と同程度の架橋しか見られないことから、ATP の加水分解中間体において閉じた二量体構造が最も安定化されることが示唆された。

以上の結果を総合して以下のような膜挿入メカニズムを提案した (図 5)。① Get3 は溶液中では開いた二量体構造と閉じた二量体構造の平衡にある。②開いた二量体構造の Get3 の Helical ドメインに TA protein が結合する。③膜内在性のレセプター (酵母の場合 Get1 と Get2) と結合することにより膜に移行する。④ ATP 加水分解を伴って閉じた二量体構造が安定化され、この構造変化により TA protein の解離と膜挿入が起こる。

Get3 による膜挿入メカニズムの完全な解明には TA protein やレセプターと Get3 との複合体の構造解析や、それら複合体の

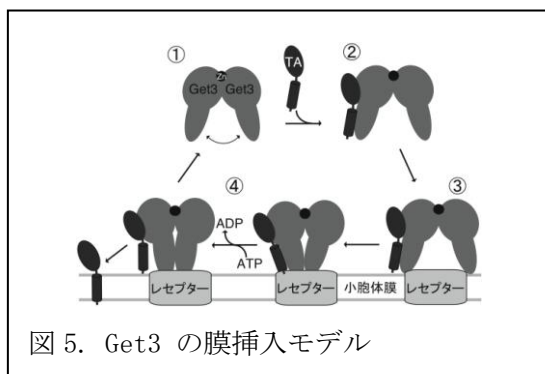


図 5. Get3 の膜挿入モデル

ATP 加水分解を伴った構造変化を知る必要があり、今後の課題となった。

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 6 件)

1. Yamagata A., Mimura H, Sato Y, Yamashita M, Yoshikawa A, Fukai S “Structural insight into the membrane insertion of tail-anchored proteins by Get3” *Genes to Cells* (2010) **15**, pp 29-41 査読有

2. Yamashita M., Kurokawa K., Sato, Y., Yamagata A., Mimura H., Yoshikawa A., Sato K., Nakano A., Fukai S., “Structural basis for the Rho- and phosphoinositide-dependent localization of the exocyst subunit Sec3”, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, (2010) **17**, 180-186 査読有

3. Sato Y., Yoshikawa A., Yamashita M., Yamagata A., Fukai S. “Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by NZF domains of TAB2 and TAB3.” *Embo J.* (2009) **28**, pp 3903-3909 査読有

4. Yoshikawa A., Sato Y., Yamashita M., Mimura H., Yamagata A., Fukai S. “Crystal structure of the NEMO ubiquitin-binding domain in complex with Lys 63-linked di-ubiquitin.” *FEBS Lett.* (2009) **583**, pp 3317-3322 査読有

5. Sato Y, Yoshikawa A, Mimura H, Yamashita M, Yamagata A., Fukai S. “Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by tandem UIMs of Rap80.” *Embo J.* (2009) **28**, 2461-2468 査読有

6. Sato Y, Yoshikawa A, Yamagata A., Mimura H, Yamashita M, Ookata K, Nureki O, Iwai K, Komada M, Fukai S. “Structural basis for specific cleavage of Lys63-linked polyubiquitin chains” *Nature* (2008) **455**, 358-362 査読有

[学会発表] (計 1 件)

1. 山形敦史、三村久敏、佐藤裕介、山下雅美、吉川梓、深井周也

第 32 回日本分子生物学会年会 “Structural insight into the membrane insertion of tail-anchored proteins by the Asn1-family ATPase” 2009 年 12 月 パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/srro/SRRORLifeSciDivJp2/Welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山形 敦史 (YAMAGATA ATSUSHI)

研究者番号: 20463903

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: