

## X-ray Crystal Structural Analysis of ATP-dependent Membrane Supramolecular Complex

寿野 良二  
Ryoji Suno

京都大学 医学研究科  
Department of Cell Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University

AAA+プロテアーゼはリング構造を形成し、中心の孔に基質ポリペプチド鎖を通して内部のプロテアーゼ活性部位に送り込むと考えられている。これには ATP 加水分解に伴う構造変化が重要であることが知られている。我々は膜結合型 AAA+プロテアーゼ FtsH の構造変化に着目してその可溶性ドメインの構造決定を目指している。現在までに、AMP-PNP 存在下で作製した結晶から、3.45 Å 分解能の X 線回折データを得、分子置換法で解を得た。

**キーワード：** AAA+プロテアーゼ、ATP 加水分解、タンパク質の品質管理

### 背景と研究目的：

プロテアソームに代表される ATP 依存性プロテアーゼ (AAA+プロテアーゼ) はリング構造を形成し、その中心の孔に基質ポリペプチド鎖を通して内部のプロテアーゼ活性部位に送り込むと考えられている。その際、構造を保った状態の基質タンパク質でも ATP 依存的に変性させて、プロテアーゼ活性部位に届ける機能があることも考えられている。この機能は、基質を一度も離すことなく連続的に分解することが知られており、特に膜タンパク質である AAA+プロテアーゼの一つの FtsH は、主に複合体形成に失敗して機能を失った不要な膜タンパク質を膜から引きずり出して連続的に分解する。この時もやはり ATP 加水分解を伴っており、FtsH の ATP 依存的な構造変化がこの現象を実現させていると考えられている。したがって、この反応過程の構造を決定することは FtsH の機能発現の分子メカニズムを知る上で非常に重要である。FtsH の様々な反応状態の構造情報は、他の AAA+プロテアーゼの機能についても有力な情報となると考えられる。これまでに膜貫通領域を欠損させた可溶性の FtsH の構造は *Thermus thermophilus* HB8 由来で ADP 結合型が、*Thermotoga Maritima* 由来で ADP 結合型、apo 型、*Aquifex aeolicus* 由来で ADP 結合型の構造が決定されている[1-4]。現在までに ATP およびそのアナログの結合状態の FtsH の X 線結晶構造は得られていない。我々は ATP および ATP アナログ結合状態の FtsH の可溶性ドメインの X 線結晶構造解析を行い、FtsH の ATP 加水分解依存的な構造変化を明らかにすることを目的とした。

### 実験：

N 末端にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を融合させた膜貫通領域を欠損させた FtsH に G399L という変異を導入したコンストラクトを作製し、グルタチオンカラムを用いて精製した。ATP の代わりに ATP の非分解性の類似体 AMP-PNP を含んだリザーバー溶液を調製し、蒸気拡散法により結晶化スクリーニングを行い、数種の条件から結晶を得た。各結晶化条件から得られ結晶を Spring-8 の BL32XU において結晶の質の確認およびデータ収集を行った。最終的には 3.45 Å 分解能の回折データを収集した(表 1)。XDS によって処理したデータを用いて Molrep によって分子置換法で初期位相を得た。その際、すでに得られている好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の ADP 結合型 FtsH 可溶性ドメインをモデルとして用いた (PDB ID:4E1W)。さらに、Refmac5 や Phenix を用いて現在モデルの修正および精密化を行っているところである。

### 結果および考察：

FtsH は 6 量体のリング構造で機能するが、分子置換法で得られたモデルは非対称単位中に 4 つの FtsH 可溶性ドメインが入っていてリング構造ではなかった (図 1)。この 4 つの FtsH 可溶性ド

メインのうち3つには ATP 結合部位に AMP-PNP と考えられる電子密度が観察され、AMP-PNP 結合状態構造であると考えられた (図2)。4つのうちひとつには AMP-PNP と考えられる電子密度よりは小さい電子密度が見られた。FtsH 可溶性ドメインは螺旋状に並んでいたが、この現象は ClpB など他の AAA+ファミリーでも観測されている[5]。今回の AMP-PNP 結合状態の構造がリング構造を形成しなかったことは、6量体 FtsH のすべてのサブユニットに同時に ATP が結合しない可能性を示唆している。最近、FtsH のミトコンドリアホモログである YME1 の基質ポリペプチド結合状態の6量体構造がクライオ電子顕微鏡の単粒子解析によって 3.4 Å 分解能で決定された[6]。この構造を見てみると、6量体中に ATP 結合状態は4つ、ADP 結合状態は1つ、のこりはアポ状態であった。4つの ATP 結合状態構造はすべてコンフォメーションが異なっており、6量体内でダイナミックに構造変化していることがわかった。この YME1 の構造を踏まえて考えると、我々の AMP-PNP 結合状態の FtsH 可溶性ドメインがリング構造を形成しなかった原因が、すべてのサブユニットに同じヌクレオチドが結合し、同じ構造を形成したからであると考えられた。

#### 今後の課題：

我々の目的である FtsH の ATP 依存的な構造変化を構造生物学的に理解し、基質タンパク質の分解メカニズムを解明するという目的は、ホモログではあるが YME1 のクライオ電子顕微鏡の単粒子解析でほぼ達成されてしまった。ただ、FtsH と YME1 が同じメカニズムで基質タンパク質を分解しているのかは今後検討するべき課題である。また、これまでの研究では膜タンパク質である FtsH や YME1 の可溶性ドメインを用いてきたので、生体内の主な基質タンパク質である基質膜タンパク質をどのように認識しているのかについては、今後検討するべき課題であると考えている。今後は膜貫通領域を含んだ構造解析を行っていきたい。

#### 参考文献：

- [1] R. Suno et al., *Mol Cell* **22**, 575-85 (2006).
- [2] C. Bieniossek et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **103**, 3066-3071 (2006).
- [3] C. Bieniossek, B. Niederhauser, U. Baumann, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **106**, 21579-84 (2009).
- [4] M. Vostrukhina et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **71**, 1307-18 (2015)
- [5] S. Lee et al., *Cell* **115**(2), 229-40 (2003)
- [6] C. Puchades et al., *Science* **358** (6363), eaa0464 (2017)

#### 公的研究資金：

1. 日本学術振興会科学研究費補助金・若手研究 B、代表、課題番号 19770079 (平成 19, 20 年度) 計 330 万円
2. 文部科学省科学研究費補助金 特定領域研究、代表、「タンパク質分解による細胞・個体機能の制御」公募班課題番号 19044015 (平成 19, 20 年度) 計 660 万円
3. 日本学術振興会科学研究費補助金・若手研究 B、代表、課題番号 21770106 (平成 21, 22 年度) 計 404 万円
4. 文部科学省科学研究費補助金 特定領域研究、代表、「革新的ナノバイオ」公募班課題番号 21023008 (平成 21, 22 年度) 計 640 万円

表 1 X線回折データ測定

	Soluble region of FtsH/AMP-PNP
<b>Data collection</b>	
Space group	$P2_12_12_1$
Cell dimensions	
$a, b, c$ (Å)	104.2, 136.0, 225.3
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90, 90, 90
Resolution (Å)	50.0–3.45 (3.66–3.45)*
$R_{\text{meas}}$	0.16 (2.15)
$CC_{1/2}$	0.99 (0.56)
$I / \sigma I$	12.68 (1.37)
Completeness (%)	99.8 (99.2)
Redundancy	14.5 (14.8)
<b>Refinement</b>	
Resolution (Å)	49.55–3.45 (3.67–3.45)
No. of unique reflections	42,819
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ (%)	22.8/24.0 (37.4/46.8)
No. atoms	
Protein	12473
Ligand/ion	93/4
$B$ -factors	
Protein	141.9
Ligand	152.8
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.004
Bond angles (°)	0.797

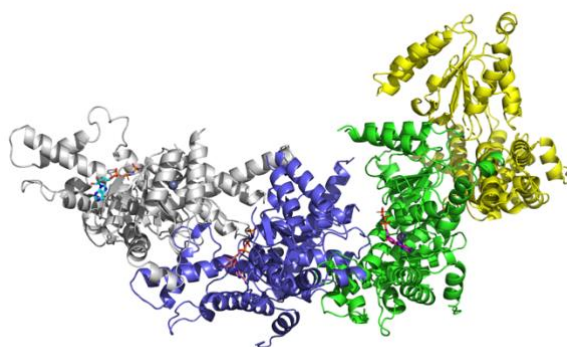


図 1. 非対称単位中の AMP-PNP 結合型 FtsH 可溶性ドメインの構造。

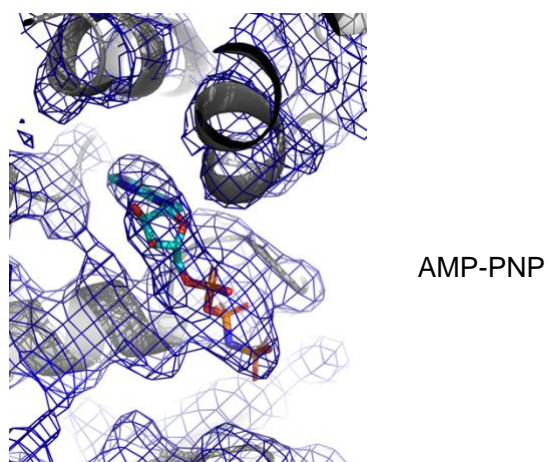


図 2. AMP-PNP 結合型 FtsH 可溶性ドメイン構造の Composite omit map (1.0  $\sigma$ )。

©JASRI

(Received: March 23, 2018; Accepted: July 3, 2018; Published: August 16, 2018)