



E. hirae 由来 V 型 ATPase クロスリンク変異体の X 線結晶構造解析 V1-ATPase およびキチナーゼ変異体の X 線結晶構造解析

中村 彰彦^{1,2}, 河合 文啓¹, 飯野 亮太^{1,2,3}

1 自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター

2 総合研究大学院大学, 3 自然科学研究機構 分子科学研究所

1. 背景と研究目的

腸内連鎖球菌 *Enterococcus hirae* 由来 V 型 ATPase は回転型分子モーターである。A サブユニットと B サブユニットのヘテロダイマー(A1B1)3 つからなるリング(A3B3)と軸である D サブユニットと F サブユニットが組合わさった複合体(A3B3DF)を構成している。回転メカニズムを明らかにする為に B サブユニットに存在する触媒残基(アルギニン)をリシンに変えた変異体 B(R350K)の一分子観察を行っているが、観察に用いている変異体の軸有りの構造が得られていない。またリング安定化クロスリンク変異体の評価のため構造解析を行う。キチン加水分解酵素はキチンを分解しながら運動するリニアモータータンパク質であり、その機能改善の為に理論デザインとサチュレーションミュータジェネシスにより変異体の作成を行っている。作成した酵素の構造を検証する為に解析を行う。

2. 実験内容

腸内連鎖球菌 *E. hirae* 由来 V 型 ATPase 低活性変異体(EhA3B(R350K)3DF), *E. hirae* 由来 V 型 ATPase クロスリンク変異体(EhA3B(R350K)3(4Cys))及び 霊菌 *Serratia marcescens* 由来キチン加水分解酵素(SmChiA)に対してサチュレーションミュータジェネシスを行い作成した変異体(SmChiABX-7, SmChiA-YS, SmChiAB-YYSKL)の単結晶に対して温度 95-100 K において波長 1.12 Å の X 線を照射し検出器 ADSC Q315r を用いて回折像を測定した。得られたイメージは XDS を用いて解析し、CCP4 と Phenix suite 及び Coot を用いて構造モデルの作成と精密化を行った。

3. 結果および考察

EhA3B3(4Cys)は最高分解能 3.2 Å の回折像を得る事ができ、天然型酵素¹を鋳型とした分子置換法とモデル構造のモーフィングにより構造を決定する事ができた。天然型構造ではリング構造が非対称であり A1B1 ダイマー間の ATP 結合面が 3 種の異なった状態を取っている。しかし今回決定したクロスリンク変異体ではリングの構造が対称であり、全ての ATP 結合面が離れた構造を取っていた。この結果からクロスリンク変異によりリングの安定度は増すが、運動機能に影響が有る可能性が想定された。EhA3B(R350K)3DF の結晶では最高分解能 8 Å の回折像しか得る事ができなかった。そこで現在酵素の精製条件及び結晶化条件の検討を行っている。SmChiA-YS, SmChiAB-YYSKL の結晶ではそれぞれ 2.1 Å 及び 2.0 Å の回折像を得る事ができ、SmChiA の構造²を鋳型とした分子置換法と主鎖構造の修正により構造モデルを構築する事ができた。しかしどちらの構造も想定していた構造と異なり、ヘリックスが半周ずれた構造を取っていた。SmChiABX-7 については最高分解能 2.6 Å の回折像を得る事ができ、導入した変異が αヘリックス構造をとることで安定化されている事が判明した。しかし吸着ドメインと触媒ドメインを繋ぐリンカー領域が揺らいでおり構造を決定する事ができなかった。そこでリンカー領域の安定化とループ構造の追加を行う為の変異体のスクリーニングを行っている。

4. 参考文献

1. Arai S. et al., *Nature*, 493, 703-707 (2013).
2. Papanikolaou, Y. et al, *Biochemistry* 40: 11338-11343 (2001).