

## NMR で H<sup>+</sup>-ATPase モーター回転の駆動力を調べる

阿久津秀雄 ( 大阪大学・蛋白質研究所 )

オーガナイザー 横井紀彦 ( 名大院理化 )

今回の生物物理夏の学校はメインシンポジウムが「タンパク万博—蛋白質の構造から機能へ」であり、多くの結晶、顕微鏡の先生にお見えています。しかし！蛋白質の構造解析で、とてつもなく重要な手法が一つ欠けていると思いませんか？ そう「NMR」です。

NMRとは核磁気共鳴(nuclear magnetic resonance)の略です。NMR法を用いることで、それぞれの原子の位置関係とその原子周辺の磁場環境から個別に見いだすことが可能となります。有機小分子の同定に必要不可欠であり、1991年に測定理論構築に尽力したErnst教授がノーベル化学賞を単独受賞されました。蛋白質のような巨大分子には、データの煩雑さから実用化へ高い壁がありましたが、近年MMRによる蛋白質構造決定が盛んに報告されるようになり、理研の蛋白質構造プロジェクトでも中心的役割を果たしました。そうした中、蛋白質へのNMR法適用に中心的役割を果たした、Scripps研究所のK. Wüthrich教授に2002年ノーベル化学賞が受賞され、ますます今後のNMRによる蛋白質構造解析への期待が高まっています。

では、NMR法の利点とは何でしょうか？ 1) まず結晶構造解析と比べ、結晶化する必要がなく溶液状態で測定ができることです。シトクロムcオキシダーゼの結晶化に15年も要されたのは有名な話です。またどんなに頑張っても結晶化できない蛋白質もあるでしょう。しかし、NMRにはそのような心配はありません。そして、2)溶液中の蛋白質の原子レベルの構造変化を見ることができます。溶液中のリアルな構造を見ることができるのはNMRだけです。原子レベルの分解能は現在の顕微鏡では得られません。

しかし、このような多くの利点のあるNMR法ですが欠点も残されています。それは原子レベルの情報が得られるため、データ量が膨大となり分子量3万以上の蛋白質の構造決定が極めて困難なことです。

本日、御講演していただく大阪大学蛋白質研究所の阿久津秀雄先生はこの蛋白質NMR構造解析の大家であり、分子量の壁を突き破るために新たな有用な解析法を幾つも御提案されています。そして、その手法により、電子伝達蛋白質、ATP合成酵素やG蛋白質の構造変化と機能の解明について、いくつもの重要な知見を発表されています。

さあ、みなさん、一緒にすばらしいNMRの力を感じてみませんか？

## NMR で H<sup>+</sup>-ATPase モーター回転の駆動力を調べる

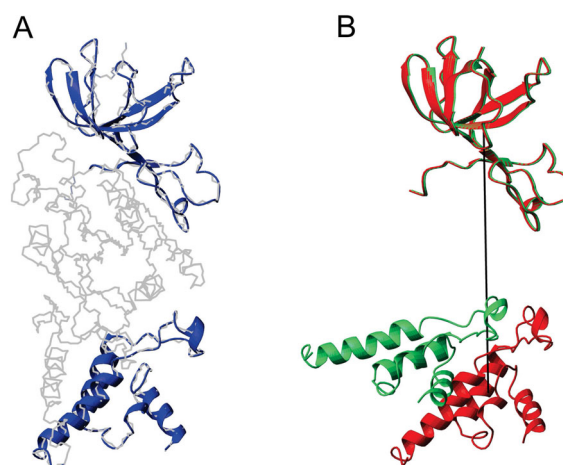
阿久津秀雄(大阪大学・蛋白質研究所)

H<sup>+</sup>-ATPase は ATP の加水分解を触媒する酵素である。細胞内において本酵素は F<sub>1</sub> と呼ばれ、生体膜に埋まっている F<sub>0</sub> 部分と結合して ATP 合成酵素として機能している。F<sub>1</sub> と F<sub>0</sub> のそれぞれのサブユニット組成は  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ ,  $ab_2c_{10-14}$  であり、分子量約 50 万の巨大膜タンパク質である。膜内外に形成される電気化学ポテンシャルを利用して水素イオンの流れに共役して ATP 合成を行う。Walker らが報告した F<sub>1</sub> 中の  $\alpha_3\beta_3\gamma$  の結晶構造によると触媒サブユニットである  $\beta$  はヌクレオチド結合型では open 構造をとり非結合型では closed 構造をとっていた。また ATP の加水分解に伴って  $\alpha_3\beta_3$  を貫く軸となっている  $\gamma$  が回転することを吉田、木下らが報告した。この回転のメカニズムはヌクレオチド結合時におこる  $\beta$  サブユニットの構造変化が  $\gamma$  サブユニットとの相互作用を順次変化させることによるものと考えられている。その駆動力が何であるかは回転のメカニズムを解明する上で重要な問題である。そこでわれわれはこの open から closed への構造変化が  $\beta$  サブユニットモノマー単位でも起こりうるかを検証するため溶液 NMR を用いて解析を行った (1-3)。 $\beta$  サブユニットモノマーは分子量が 5 万を越えるため区分標識体を作成することで、NMR スペクトルを簡略化し、構造変化の評価を行った。

主鎖シグナルの帰属は標識部位が異なる

4 種の区分標識体を作成して行った。帰属した C $\alpha$ , C $\beta$ , C', N の化学シフト値から二面角予測ソフト TALOS を用いて 2 次構造を推定した。さらに ADP を加えた状態で測定し、化学シフト値の変化からおおよその構造変化領域を特定した。N 末端と C 末端の相対配置を決定するため、磁場中でタンパク質中を部分的に配向させて残余双極子相互作用を測定する手法 (Residual Dipolar Couplings) を N 末端および C 末端のみを標

識した区分標識体に適応した。それぞれについて ADP 存在下と非存在下での Residual Dipolar Couplings (RDCs) を測定して、N 末端、C 末端のドメインの相対配置を決定した。主鎖連鎖帰属は定法に従って行い 90% 程度の帰属を完了した。ADP を加えた時に起こる化学シフト値の変化から構造変化領域はヌクレオチド結合ドメイン周辺であると特定した。今回 RDCs 測定に用いた N 末端、C 末端ドメインはどちらも 2 次構造予測、ヌクレオチド結合に対する化学シフト値変化の結果から安定な構造をとっていて、かつヌクレオチドに対する影響も部分的である。よって各々のドメインは独立に配向方向 (配向テンソル) を決定することが出来る。測定スペクトルからは、N 末端で 65 個、C 末端で 40 個の RDCs を決定できた。 $\beta$  モノマーのみの結晶および溶液構造は報告されていないため  $a_3b_3$  の結晶構造から  $\beta$  サブユニット部分を取り



出して配向角および配向テンソルを求める計算に使った。観測された RDCs を全て使って実測値と計算値をフィットさせた場合両者に良い一致が見られなかった。これは計算値に正確なモノマー $\beta$ の構造を使っていないことによるものと考えられる。よって2次構造をとっている領域のみでフィットを行った。その結果、比較的良い一致がみられ、それから求めた N 末端と C 末端の相対配置は ADP がある場合では open (右図 赤)、ない場合では closed に近い結果が得られた (右図 緑)。以上より $\beta$ サブユニットはモノマーのみでも $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体で見られたような open から closed への構造変化を起こすことが示唆された。つまりこの構造変化は $\beta$ サブユニット固有の性質であり、F<sub>1</sub>部分の回転を引き起こす駆動力になりうることを示唆するものである。

次に c サブユニットの構造を調べてみた。好熱菌の c サブユニットは大腸菌の c サブユニットと同様に、ヘリックス-ループ-ヘリックスのヘアピン構造をとっていた。しかし、好熱菌と大腸菌では、プロトン輸送に必須な残基(好熱菌では Glu56、大腸菌では Asp61)の側鎖の向きが大きく異なっていた。order parameters, S<sup>2</sup>, {<sup>1</sup>H}-<sup>15</sup>N heteronuclear NOE, <sup>15</sup>N transverse relaxation rates, R<sub>2</sub>の緩和解析より両末端とループ部分は、その他の部分より、ピコ秒からナノ秒の時間スケールで、flexible であることが明らかになったが、マイクロ秒からミリ秒の時間スケールで起こるドメインの回転を示唆するような結果は得られなかった。また、我々は Glu56 の側鎖の pK<sub>a</sub> を 7.3 と決定することに成功し、今回の実験で用いた有機溶媒中で確かにカルボキシル基側鎖のプロトン脱着が起こっていることを明らかにした。そして、pH2 から pH8.5 の範囲で <sup>15</sup>N-HSQC スペクトルのケミカルシフトの変化を比較したが、構造変化に伴うような変化は観測されなかった。さらに、pH 2 と pH 8 において 2D-NOESY スペクトルの NOE を比較したが、pH 2 で観測された大部分の NOE は pH 8 でも同様に観測された。これらの結果は Glu56 の側鎖のプロトンの脱着に依存した好熱菌 c サブユニットの構造変化は起こらないことを示唆している。この結果は、c-ring の回転機構を考える上で、新しい見方を与えることになる。

文献

1. H. Yagi, K. Tozawa, N. Sekino, T. Iwabuchi, M. Yoshida, and H. Akutsu., Functional conformational changes in the TF<sub>1</sub> ATPase  $\beta$  subunit probed by twelve tyrosine residues. *Biophys. J.*, **77**, 2175-2183 (1999)
2. K. Tozawa, H. Yagi, K. Hisamatsu, K. Ozawa, M. Yoshida, and H. Akutsu, Functions and ATP-binding responses of the twelve histidine residues in the TF<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  subunit. *J. Biochem.*, **130**, 527 - 533 (2001).
3. H. Yagi, T. Tsujimoto, T. Yamazaki, M. Yoshida, and H. Akutsu, A conformational change of H<sup>+</sup>-ATPase  $\beta$  monomer revealed on segmental isotope labeling NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 16632-16638 (2004).