

氏 名	クリストフ ゲーレ Christoph Gerle
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 3063 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	Two-dimensional Crystallization of Intact <i>Thermus Thermophilus</i> V-ATPase (<i>Thermus thermophilus</i> V-ATPase 全長の二次元結晶化)
論文調査委員	(主 査) 教授 藤吉好則 教授 七田芳則 教授 森 和俊

論 文 内 容 の 要 旨

H⁺-ATPase/synthases は膜結合型のナノモーターであり、ほとんどすべての生物におけるエネルギー変換に不可欠な分子である。液胞 (vacuolar) 由来の V 型 ATPases の構造解析を目指して検討された結果、タンパク質の安定性が高いと期待される高度好熱菌 (*Thermus thermophilus*) 由来の V 型 ATPases が選択された。V 型 ATPases は水溶性の V₁ ドメインと膜貫通構造を有する V₀ ドメインとからなっている。V 型 ATPases は多くの器官において発現されており、破骨細胞や癌細胞のような特殊な細胞にも存在して、骨の分解や再吸収、癌細胞の浸潤や細胞の pH 調節などに関わっている。

8 個のヒスチジン配列を付加した V 型 ATPase は高度好熱菌で発現され、ニッケルカラムで精製された。陰イオン交換カラムを用いてさらに精製度を向上させた V 型 ATPase を用いて 2 次元結晶化が行われた。この分子は V₀ ドメインと V₁ ドメインが容易に解離してしまうので、通常の結晶化の方法では V 型 ATPase の分子全体を結晶化することができない。この問題を解決するために、V₀ ドメインと V₁ ドメインを解離させることなく 2 次元結晶化する新しい方法が開発された。すなわち、V 型 ATPase を脂質分子とともにまず酸性条件で透析を行った。この条件では、この分子は V₀ ドメインと V₁ ドメインが解離しないが、不定形の凝集体を形成してしまい、シートは形成されていない。しかし、まず V₀ と V₁ ドメイン複合体が安定化される酸性条件で透析する。引き続きアルカリ性の条件で透析すると、シートが上記の不定形の凝集体から成長してくる。pH9.5 の条件でシートの形成が促進され、塩素イオンをリン酸イオンに交換して pH8.7 の条件にすると結晶性の向上が見られた。また、温度を変化させて試料のインキュベーションを行うと、結晶性の向上がみられた。V 型 ATPase は可溶性の V₁ ドメインが大きいので、脂質とタンパク質の割合 (LPR) を精密に調整することが重要である。マイクロシリンジを用いて精密な測定を行うことで初めて、再現性のよい結晶化が可能になる。このように、新しい結晶化の方法を用いることによって、1.5 μ m 程度の大きさの 2 次元結晶が作製された。

以上のように、結晶化方法の改良によって、界面活性剤で可溶化した V 型 ATPase 分子全体の 2 次元結晶化に成功した。V 型 ATPase の 2 次元結晶の電子顕微鏡像をネガティブ染色法で撮影し、23Å 分解能での解析を行った。その結果、格子定数は、 $a=232\text{\AA}$, $b=132\text{\AA}$, $\gamma=90^\circ$ で、 $p22_12_1$ 対称であることが明らかになった。電子顕微鏡像を解析して、11枚の像をマージすることによって投影構造が計算された。その結果に基づいて、結晶内のパッキングモデルの提案を行い、V₁ ドメイン間で 2 量体を形成するような相互作用を形成しているなど、V 型 ATPase 分子の構造についての知見を得た。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

いろいろな種類のプロトンポンプが、原核生物から真核生物にわたる広い範囲で見出され、重要な機能を担っている事が知られている。その様なプロトンポンプの代表例として、液胞 (vacuole) から精製された V (液胞) 型 ATPase は液胞膜に存在するだけでなく、破骨細胞や癌細胞などのような特殊な細胞にも存在して、骨の分解や再吸収、癌細胞の浸潤や細胞

の pH 調節などに関わっている。V₀ と V₁ と呼ばれるドメインからなり、ATP を分解する化学エネルギーを使ってプロトンを輸送する膜タンパク質複合体である。しかし、V₀ ドメインと V₁ ドメインの結合と解離は、生理的条件でも行われており、2つのドメインは容易に解離してしまう。そのために、V 型 ATPase の全体構造はその機能を理解する上で重要であるにもかかわらず、これまでの研究で得られている全体構造の情報は極めて限られたものとなっている。

申請者は、V 型 ATPase の全体構造を電子線結晶学で解析する事を目指して、V₀ と V₁ ドメイン複合体の結晶化を行った。このタイプの分子において安定性が高いと期待される高度好熱菌 (*Thermus thermophilus*) 由来の V 型 ATPase を用いた 2 次元結晶作製条件の検討を系統的に行った。8 個のヒスチジン配列を付加した V 型 ATPase をニッケルカラムで精製し、さらなる精製度の向上を目指して、陰イオン交換カラムで V₀ と V₁ ドメインを別々に精製し、複合体を形成させた。次に 2 次元結晶作製のために、界面活性剤で可溶化・精製した V 型 ATPase を脂質膜の中へ再構成するのであるが、まず酸性条件で透析を行った。この条件では、シート状の膜は形成されず、不定形の凝集体となる。他の条件では V₀ と V₁ ドメインが解離してしまうが、この条件ではこの複合体が安定化される。この後、アルカリ性の条件でシートが上記の不定形の凝集体から成長してくる。pH9.5 の条件でシートの形成が促進され、塩素イオンをリン酸イオンに交換して pH8.7 の条件で結晶性の向上が見られることを発見した。また、温度変化を最適化することによって、結晶性を向上させることにも成功した。

申請者は 2 つのドメインが解離しやすい場合には、まずドメインの解離が起こらない条件で凝集体を形成させて、そこから 2 次元結晶を形成するという新しい方法を開発した。しかも、この分子の様に可溶性ドメインが大きいときには、脂質とタンパク質の割合 (LPR) を精密に調整することが重要であることも発見して、界面活性剤で可溶化した V 型 ATPase 分子全体の 2 次元結晶化に初めて成功した。V 型 ATPase の 2 次元結晶の電子顕微鏡像をネガティブ染色法で撮影し、23Å 分解能の解析を行った。11 枚の像をマージすることによって投影構造を計算して、結晶内のパッキングモデルと V 型 ATPase 分子の構造についての知見を得た。

以上の実験を通して、申請者は、非常に解離しやすい不安定なドメイン構造を有する場合にでも結晶化できる新しい方法を開発して、これまで結晶化が困難であった V 型 ATPase の構造解析への道を開いた。本研究は、V 型 ATPase 分子の構造の新たな知見を与えたにとどまらず、不安定な複合体の結晶化のための新しい手法の開発という重要な部分を解明した注目すべき成果である。以上の審査結果を総合して、本論文が博士 (理学) の学位論文として十分な内容を持ち価値あるものと認め、論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。