トピックス

AAA ATPase の構造とタンパク質リモデリングの分子機構

熊本大学発生医学研究センター
奥野貴士, 山田・稲川知子, 小椋 光

1. はじめに

すべての生物はATPをはじめとするNTP（ヌクレオチド三リン酸）のエネルギーを利用し、さまざまな生命活動を維持している。一般に、NTPase とよばれる酵素は、NTPの加水分解によって放出される化学エネルギーを運動エネルギーなどに変換して仕事を行う。なかでも共通のヌクレオチド結合モチーフ（GXXXXGKT/S）を有するWalker型NTPaseは、最も多数のメンバーを抱えるスーパーファミリーで、F1-ATPase、ミオシンやキネシンモーター、あるいはABCトランスポーターなどよく知られたATPaseがこれに属する。

ここで紹介するAAAファミリーATPaseもこのWalker型NTPaseに属する。近年、数多くのAAA ATPaseが見つかり、そのメンバーの多彩な機能に注目が集まっている。実は、それがAAA（ATPases associated with diverse cellular activities）の名前の由来になっている。各々のAAA ATPaseの機能は一見共通性がないが、これまでにわかった例では、作用する基質タンパク質またはタンパク質複合体の高次構造を壊すという共通の分子機構が見えてくる。このような作用が、AAA ATPaseを際立たせている。AAA ATPaseがほかのWalker型NTPaseと区別される構造的特徴は、ATPaseドメイン内にSRH（second region of homology）とよばれる約20アミノ酸残基のモチーフが存在することである¹⁾。また、リング状のホモオリゴマーを形成することもAAA ATPaseの共通の性質である。そこで、本稿では、最近明らかになったAAA ATPaseの構造と分子機構について紹介し、残された問題点を整理する。

なお、最近、多くの類縁のATPaseが報告され、SRHの

保存性は低いがATPaseドメインの構造が類似する近縁のATPaseも含めたファミリーとしてAAA⁺が提唱されている。定義や分類の詳細については最近の総説²⁾を参照していただくことにし、本稿ではAAAを中心に解説する。

2. AAA ATPase ドメインの結晶構造とリング構造

初めて結晶構造が明らかにされたAAA ATPaseはNSF（N-ethylmaleimide-sensitive factor）のD2ドメイン（AAAタンパク質のなかには、2つのAAA ATPaseドメインをもつものがあり、N末端側からD1、D2とよんでいる）である^{3),4)}。その後p97のD1ドメイン⁵⁾、そして、大腸菌⁶⁾と好熱菌⁷⁾の膜結合型プロテアーゼFtsH

Fig.1 Crystal structure of the ATPase domain of *E. coli* FtsH and a hexameric model. (A) The AAA ATPase. (B) Top view of the hexameric ring⁶⁾.

The AAA ATPase : Structure and Mechanisms of Remodeling of Protein Substrates

Takashi OKUNO, Tomoko YAMADA-INAGAWA and Teru OGURA

Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University

のATPaseドメインの結晶構造が相次いで解かれた。

これらすべてのAAA ATPaseに共通する基本的特徴は、 α/β 鎖からなる典型的なWalker型のATPaseドメインと、C末端側に付属する4本の α ヘリックスを含む球状ドメインの2つのドメインから構成されることである (Fig.1A)。ATP結合ポケットは両ドメイン間のヒンジ部分に位置する。

AAA ATPaseの機能的構造は、リング状6量体である (Fig.1B)。6量体構造は、くさび型のATPaseドメインがちょうど6等分したピザの一切れのようにバックされ、C末端側の球状ドメインはそのピザからはり出して隣のサブユニットにおいかぶさるように位置する。ATP結合ポケットはサブユニットの境界面にあり、オリゴマー形成がATPの加水分解に必要である。これは、隣のサブユニットの保存されたアルギニン残基がATPの γ 位のリン酸と相互作用してATPの加水分解に働くからであり、分子間触媒モデルとよばれている⁸⁾。AAA ATPase 6量体リングの大きさは外径が100-120 Å、内径が15-20 Å、リングの厚さは約30-40 Åである。異なるヌクレオチドが結合した構造の比較から、C末端の球状ドメインがヒンジの部分で回転することが予測された。さらにp97のクライオ電顕観察から、ヌクレオチドの種類によってリングの外径や孔のサイズが大きく変わる

ことが示されている^{9),10)}。

すべてのAAA ATPaseドメインはほとんど同じ構造をしているので、AAA ATPaseがATPを加水分解する仕組みやATPのエネルギーを仕事に変換する機構は共通性が高いと推定される。おそらくATP加水分解機構についてはそのように考えてよからう。しかし基質タンパク質への作用の仕方は、まだ不明の点が多いが、大きく2つのタイプが考えられている (Fig.2) このうち、糸通しタイプはATP依存性プロテアーゼの調節ATPaseなどの作用様式であり、解析が進んでいるので、まずこれからみることにする。

3. プロテアーゼに関連するAAA ATPaseによる基質タンパク質のアンフォールディングとトランスロケーション

これまでに見つかっているATP依存性プロテアーゼのATPaseドメインは、すべてAAAまたは近縁のAAA+ファミリーに属する。基質タンパク質は、ATPaseによって認識され、リングの孔を通過して、チャンバーの内部にあるプロテアーゼ活性部位で分解される。上に述べたようにAAA ATPaseリングの内径はおよそ15-20 Åで、ペプチド鎖2-3本が限界と言うほどの大きさしかない。そのため、AAA ATPaseは、基質タンパク質をアンフォールドし、ATPaseリングを通過させなければならない (Fig.3)。このとき、ATPの加水分解によるエネルギーはどのステップに必要で、何に使われているのか？この問いに対して、最近の研究は、ATPaseリングの表面での基質のアンフォールディングとATPaseリング内を移行させるトランスロケーションにATPの加水分解が必要であることを明らかにした。

真核生物の26Sプロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を基質として認識し、分解する。26Sプロテアソームはプロテアーゼ活性をもつ20S触媒複合体と約20種類のサブユニットから構成される19S調節複合体とからなる。19S複合体は、20S複合体の両端に結

Fig.2 Modes of substrate-remodeling by AAA proteins.

Fig.3 Schematic diagram of ATP-dependent protease-mediated proteolysis with special emphasis on ATP-dependent steps¹³⁾.

合し、制御ATPaseである6つのAAA ATPaseを含んでいる。この19S調節複合体のAAA ATPaseの古細菌ホモログがPAN (proteasome-activating nucleotidase) であり、PANはホモ6量体を形成し、20Sプロテアソームによる基質タンパク質の分解を促進する。このPANが基質タンパク質をアンフォールドする活性をもち、しかもその反応がPANの表面で起こることが、NavonとGoldbergの巧妙な実験により示された¹¹⁾。彼らは、基質タンパク質としてC末端にSsrAとよばれる認識タグをつけた緑色蛍光タンパク質 (GFP : タンパク質のフォールド状態を蛍光でモニターできるのが利点) を用いた。GFP-SsrAはPAN + 20Sプロテアソームの良い基質となり、ATP存在下で分解される。このとき、SsrAタグの直後を修飾し、PANリングを通過できないようにした基質を使って、基質のアンフォールディングが起こるかどうかを検証した。その結果、リングを通過できない基質でもアンフォールディングが起こり、GFPの蛍光の減少が認められた。このことは、アンフォールディングはトランスロケーションにかかわらず、PANの表面で起こることを示唆している。このアンフォールディングは、ATPの加水分解を必要とする。

次に、BenaroudjらはGFP-SsrAとほとんど2次構造をもたないカゼインの分解におけるATP要求性を比較した¹²⁾。その結果、いずれの基質の分解にもATPの加水分解が必要で、PANのATPase活性は、基質のフォールディング状態に関係なく、同程度に促進された。一方、基質の入り口 (ゲート) を人工的に開けた20Sプロテアソームを用いた実験では、PANが存在するときは、いずれの基質の分解にも同様にATPの加水分解が必要であるが、PANが存在しないときは、カゼインのみが分解され、しかもATPは必要ないことが明らかとなった。これらの結果は、PANリングを通過させるトランスロケーションにもATPの加水分解が必要であること、20Sプロテアソームのゲートを通過した基質はプロテアーゼ活性部位まで拡散的に移動し分解されることを示している。また、ゲートの開閉もATPaseによって制御されることを示しているが、これにATPの加水分解が必要かどうかについての決定的な証拠はない¹³⁾。

一方、AAA⁺に属するClp/Hsp100 ATPaseを制御サブユニットとする細菌のATP依存性プロテアーゼは、ClpPあるいはHslV (ClpQ) プロテアーゼサブユニットとの複合体で、構造的に26Sプロテアソームと類似している。これらのプロテアーゼについても基質分解過程において、基質のアンフォールディングとトランスロケーションにATPの加水分解が必要であることが示されている。基質タンパク質がClpAPプロテアーゼ内

を通過していく過程がクライオ電顕で観察されている。詳細は、本誌の石川らの総説¹⁴⁾に譲るが、ATPaseサブユニット表面に凝縮した基質タンパク質は、ATP加水分解によってアンフォールドされ、およそ150 Åの距離を移動し、プロテアーゼチャンバーに至る。

プロテアソームやClpプロテアーゼがGFP-SsrAを分解できるのに対し、FtsHはSsrAタグを認識するが、GFPを分解できない¹⁵⁾。ClpX ATPaseが共存するとFtsHによるGFP-SsrAの分解が起こることや基質の部分的アンフォールディングが起これば容易に分解できることなどから、FtsHのunfoldase活性が低いと結論された。プロテアーゼ活性を不活化したFtsHとカゼインの安定な複合体がATPまたは非加水分解ATPアナログのATP γ S存在下で分離されるという報告がある¹⁶⁾ので、反応中間体の解析も待たれる。

ClpプロテアーゼやFtsHによる生理的基質タンパク質やカゼインの分解にはATPの加水分解が必要であるが、短いペプチド基質はATP γ S存在下で分解可能である¹⁷⁾。この現象は、ATP結合によりリングの孔が開き、基質のプロテアーゼドメインへの拡散が可能になるためと考えられている。

4. その他のAAA ATPaseの作用

以上、プロテアーゼに関連したAAA ATPaseのアンフォールディング活性とトランスロケーション活性について詳しくみてきたが、すべてのAAA ATPaseがプロテアーゼ機能に関連するわけではない。例えば、NSFやp97は膜融合装置SNARE (soluble NSF attachment protein receptor) 複合体を解体するAAA ATPaseとして同定された。Vps4p/SKD1は、エンドソームの膜でタンパク質複合体を解体する。また、kataninには微小管を切断する活性がある。これらのAAA ATPaseの作用の分子機構については、その基質複合体の複雑性からほとんど解析が進んでいないが、一般に、その作用は押し広げタイプと考えられている (Fig.2)。しかし、複合体のどれかのサブユニットがアンフォールドされることにより、複合体の解体が引き起こされるという可能性も十分考えられる。また、p97は、小胞体関連分解において異常タンパク質を小胞体から引きずり出すことが示唆されており、トランスロケーション作用が想定されている。

5. おわりに

AAA ATPaseの構造とAAA ATPaseによる基質タンパク質のリモデリングについて最近の知見を中心に紹介した。一部のAAA ATPaseでは*in vitro*での機能解析が進み、その機能がかなり明らかにされてきているが、

「基質タンパク質をどのようにしてリモデリングするか？」という本質的な問いに対する明確な答えはまだない。特に、基質の結合部位、アンフォールディングの場と機構、トランスロケーションの機構など、構造と機能を対応させる基本的な部分が未解決のまま残っている。これらを解明し、「AAA ATPaseの共通の分子機構を理解する」日が、近い将来必ずくると信じている。

文 献

- 1) Ogura, T. and Wilkinson, A. J. (2001) *Genes Cells* **6**, 575-597.
- 2) Lupas, A. N. and Martin, J. (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 746-753.
- 3) Lenzen, C. U., Steinmann, D., Whiteheart, S. W. and Weis, W. I. (1998) *Cell* **94**, 525-536.
- 4) Yu, R. C., Hanson, P. I., Jahn, R. and Brunger, A. T. (1998) *Nat. Struct. Biol.* **5**, 803-811.
- 5) Zhang, X., Shaw, A., Bates, P. A., Newman, R. H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M. A., Kondo, H., Dokurno, P., Lally, J., Leonard, G., Meyer, H., van Heel, M. and Freemont, P. S. (2002) *Mol. Cell* **6**, 1473-1484.
- 6) Krzywdka, S., Brzozowski, M. A., Verma, C., Karata, K., Ogura, T. and Wilkinson, A. J. (2002) *Structure* **10**, 1073-1083.
- 7) Niwa, H., Tsuchiya, D., Makyio, H., Yoshida, M. and Morikawa, K. (2002) *Structure* **10**, 1415-1423.
- 8) Karata, K., Inagawa, T., Wilkinson, A. J., Tatsuta, T. and Ogura, T. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 26225-26232.
- 9) Rouiller, I., DeLaBarre, B., May, A. P., Weis, W. I., Brunger, A. T., Milligan, R. A. and Wilson-Kubalek, E. M. (2002) *Nat. Struct. Biol.* **9**, 950-957.
- 10) Beuron, F., Flynn, T. C., Ma, J., Kondo, H., Zhang, X. and Freemont, P. S. (2003) *J. Mol. Biol.* **327**, 619-629.
- 11) Navon, A. and Goldberg, A. L. (2001) *Mol. Cell* **8**, 1339-1349.
- 12) Benaroudj, N., Zwickl, P., Seemüller, E., Baumeister, W. and Goldberg, A. L. (2003) *Mol. Cell* **11**, 69-78.
- 13) Ogura, T. and Tanaka, K. (2003) *Mol. Cell* **11**, 3-5.
- 14) 石川 尚, Steven, A. C. and Maurizi, M. R. (2002) *生物物理* **42**, 212-217.
- 15) Herman, C., Prakash, S., Lu, C. Z., Matouschek, A. and Gross, C. A. (2003) *Mol. Cell* **11**, 659-669.
- 16) Makyio, H., Niwa, H., Motohashi, K., Taguchi, H. and Yoshida, M. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **296**, 8-12.
- 17) Karata, K., Verma, C. S., Wilkinson, A. J. and Ogura, T. (2001) *Mol. Microbiol.* **39**, 890-903.

奥野貴士（おくの たかし）

熊本大学発生活学研究センター胚形成部門細胞複製分野 非常勤研究員

連絡先：〒862-0976 熊本市九品寺4-24-1

E-mail: t_okuno@gpo.kumamoto-u.ac.jp

山田・稲川知子（やまだ・いながわ ともこ）

熊本大学発生活学研究センター胚形成部門細胞複製分野 学振特別研究員

連絡先：〒862-0976 熊本市九品寺4-24-1

E-mail: tyamada@kaiju.medic.kumamoto-u.ac.jp

小椋 光（おぐら てる）

熊本大学発生活学研究センター胚形成部門細胞複製分野 教授

連絡先：〒862-0976 熊本市九品寺4-24-1

E-mail: ogura@gpo.kumamoto-u.ac.jp

URL : <http://mukb.medic.kumamoto-u.ac.jp/AAA/aaainfo.html>

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/12ho.htm>