

銅イオン輸送性 P-type ATPase の機能解析と新規相互作用因子の同定  
**Functional characterization of copper pumping P-type ATPase from *Thermus thermophilus* HB8**

桑原直之, 小田隆, 橋本博, 佐藤衛, 清水敏之

Naoyuki Kuwabara, Takashi Oda, Hiroshi Hashimoto, Mamoru Sato, Toshiyuki Shimizu.

(横浜市大院・生命ナノ)

(Grad. Sch. of Nanobio., Yokohama City Univ.)

e-mail: kuwanao@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

細胞は細胞膜を介して栄養物の取り込み、有害物質の排出を行うことで、細胞内の環境を一定に保ち、恒常性の維持を行っている。この恒常性の維持には細胞膜によって細胞内外を隔てるとともに膜タンパクが膜内外へ選択的に基質の輸送を行うことが重要である。

銅イオンはシトクローム *c* オキシダーゼやスーパーオキシドディスムターゼなどの補因子として働き、あらゆる生物にとって必須な金属イオンである。しかし銅イオンが細胞内に過剰量存在すると、細胞にとって有害である。そのため細胞は細胞内銅イオン濃度を厳密に制御しなければならない。その細胞内銅イオン恒常性機構に重要な働きをしているのが、P-type ATPase ファミリーの中の金属イオン輸送性の  $P_{1B}$ -type ATPase と呼ばれる膜蛋白質である。この  $P_{1B}$ -type ATPase は細菌から高等動植物にいたるまで広く存在し、ヒトにおいては先天性銅代謝異常疾患である Wilson 病、Menkes 病の原因遺伝子であることが知られている。  $P_{1B}$ -type ATPase はその基質認識に金属シャペロンなどの細胞質タンパクを介する点と、細胞質側の基質結合ドメインが自身の活性を制御するという点で  $Ca^{2+}$ -ATPase や  $Na^+/K^+$ -ATPase などの他の P-type ATPase とは異なる特徴を持つ。我々は *Thermus thermophilus* HB8 由来銅イオン輸送性  $P_{1B}$ -type ATPase (TTHA1733, TtCopB) の構造機能相関に注目し、研究を行っている。

TtCopB を大腸菌内で発現し、精製を行い、その生化学的性質を調べた結果、これまでに報告されているホモログの活性と比較して  $Cu^{2+}$  に対する ATPase 活性が同等かそれ以上の高いことを明らかにした。またそれらホモログでは  $Cu^{2+}$  のほかに  $Cu^+$  や  $Ag^+$  に対する活性を持つことが報告されているが、TtCopB ではそれらに対する活性はほとんど見られなかった。このことから TtCopB は  $Cu^{2+}$  のみに対して高い活性を持つ  $P_{1B}$ -type ATPase であることが明らかになった。また、精製した TtCopB は多量体を形成していることがゲルろ過カラムクロマトグラフィーの結果から示唆された。このマクロ構造を明らかにするために精製溶液の X 線溶液散乱法による解析を行った。その結果 TtCopB は DDM に可溶化状態では二量体を形成していることが明らかになった。この二量体が機能単位であるかどうかは不明であるが、X 線小角散乱法 (SAXS) により低分解能構造をあきらかにすることで明らかにできると考えられ、コントラストバリエーション法による低分解能溶液構造を解析し、界面活性剤の存在様式を明らかにするために現在解析中である。

またさらに、その機能未知の一回膜貫通タンパクである TTHA1734 と TtCopB が相互作用することが明らかにした。TtCopB と TTHA1734 を共発現させ、TtCopB に付加した His タグを用いて精製を行った結果、TtCopB と TTHA1734 が複合体を形成したまま精製することができた。この複合体の ATPase 活性測定を行ったが、TtCopB 単独と活性の違いは見られなかった。しかし TTHA1734 存在下では TtCopB の大腸菌内での発現量が上昇することから TtCopB の膜内での安定化に寄与していると予想される。

