

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06988

研究課題名(和文) ナノディスクに組み込んだカルシウムポンプを用いた脂質タンパク相互作用の解析

研究課題名(英文) Exploration into the effects of lipid environment on the functions of sarcoplasmic reticulum calcium pump

研究代表者

山崎 和生 (YAMASAKI, Kazuo)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：60241428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質である筋小胞体Ca²⁺-ATPaseの機能が周りの脂質環境にどのような影響を受けるか評価するため、Ca²⁺-ATPaseを直径10nm程度の小さな脂質2重膜であるナノディスクに組み込んだ標品(CND)を作成した。作成した標品を用いた解析により、Ca²⁺-ATPaseは周りの脂質環境との間の立体的及び静電的な相互作用によって、様々な影響を受けることを定量的に示すことができた。また、Ca²⁺-ATPaseの機能に膜の表面電荷自体の影響があることを示唆する結果が得られた。これは他の膜タンパクの機能、あるいはその制御について理解する上で非常に重大な知見である。

研究成果の概要(英文)：To explore the effects of lipid environment on the function of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, I tried to embed the Ca²⁺-ATPase into small lipid-bilayer (nanodiscs) with various lipid components. The Ca²⁺-ATPase was successfully embedded into the nanodisc without loss of its activities and the Ca²⁺-ATPase-embedded nanodiscs were utilized for various analyses. Subsequently, the contributions of lipid environments on the enzymatic activities were estimated quantitatively by systematic analyses and could be distinguished between components of electrostatic- and steric-interactions. Furthermore, the results indicated that surface charges, but not particular lipid-head group, directly modulate the functions of Ca²⁺-ATPase. This finding is possibly important for not only Ca²⁺-ATPase but also for other functional membrane proteins.

研究分野：機能生物化学

キーワード：カルシウムポンプ タンパク-脂質相互作用 ナノディスク 静電的相互作用 リン脂質 膜タンパク質
表面電荷

1. 研究開始当初の背景

(1) 筋小胞体カルシウムポンプ(SERCA1a, SR Ca^{2+} -ATPase)の Ca^{2+} 輸送機構について、長年にわたる反応速度論的解析、及び部位特異的変異体の解析結果の蓄積と、さまざまな反応中間体及びそのアナログの結晶構造を合わせることで、ATP 加水分解反応と Ca^{2+} 輸送反応の共役を分子レベルの動きで記述出来るようになり、 Ca^{2+} -ATPase のタンパク質としての機能や動きは深く理解が進んできていた。

(2) しかしながらタンパク質と脂質の関係についてはいまだ知見に乏しく、以下のようなことが知られているのみであった。

①以前から Ca^{2+} -ATPase の活性発現において特定のリン脂質が必須であること、また、リン脂質のアルキル鎖の長さにより Ca^{2+} -ATPase の活性が強く影響を受けることが知られていたが、その詳細については不明。

②結晶構造において、結晶形成のため加えたリン脂質以外の脂質（おそらく筋小胞体由来）が結合しているものがいくつか発表されているが、これらの脂質が直接活性に関係するか否かは定かではなく、実際これらの脂質を置き換えて結晶を作ることは可能であり、その場合 Ca^{2+} -ATPase 自体の構造はほとんど変化しない。

(3) タンパク質-脂質間の相互作用の重要性を調べるためには、まず脂質環境を変化させた上で、詳細な反応速度論的解析を行い、どのステップにどのような影響が出るかを調べる必要がある。筋小胞体カルシウムポンプはウサギ骨格筋から大量に均一な標品が得られ、反応速度論的解析に用いる場合非常に有用である。しかしながら Ca^{2+} -ATPase の脂質環境を変えて測定をしようとする場合、一度可溶化して脂質の入れ替えを行う必要がある、その後再び膜へ組み込まなければならない。これまでは可溶化して脂質を加えたのち、バイオビーズ等で界面活性剤を除き再構成リポソームの中にカルシウムポンプを組み込んで、その後の分析に用いる方法が一般的であったが得られた再構成膜中でカルシウムポンプはランダムな向きを向いており、逆を向いたタンパク質同士の相互作用などの影響を考慮しなければならないなど、均一な標品として扱うことが難しくなるため、これに代わる膜タンパク-脂質相互作用の評価系を確立する必要があった。

2. 研究の目的

(1) 以上の経緯を踏まえ、私はカルシウムポンプをナノスケールの可溶性脂質二重膜であるナノディスク (nanodiscs) に組み込み脂質の影響を解析することを試みた。ナノディスクは 2 つの MSP (membrane scaffold protein) によって周囲を囲まれたディスク状の脂質二重膜である。その大きさは MSP の種類によって決まり、直径 10-17nm のナノディスクが作成可能である。すでに様々な膜タ

ンパク質がナノディスクに活性を保った状態で組み込み可能であることが報告されており、膜タンパクの機能や、可溶性調節因子との相互作用の解析に用いられている。また、P-type ATPase ではシロイヌナズナの細胞膜の H^{+} -ATPase がナノディスクに組み込んだ報告がある。今回この系に Ca^{2+} -ATPase を組み込む方法の確立を目指した。この系が確立できれば膜タンパク-脂質相互作用の詳細な解析が可能となる。

(2) Ca^{2+} -ATPase をナノディスクへの組み込む方法が確立すれば、その標品を用いて次のような解析を進めていくことができる。

①EP 転換速度：ATP から形成したリン酸化中間体 E1P が ADP 感受性を喪失して E2P に転換する速度を見積もる。このステップは反応サイクル中の律速段階であり Ca^{2+} -ATPase に対してリガンドの結合やリン酸化などの過程がなく、ここでの変化は酵素の構造変化に帰属できるため、解析が容易であることが期待できる。このステップに脂質がどのような影響を与えるかを明らかにする。

②E2 から E1Ca₂ への転換：このステップは細胞質側からの Ca^{2+} 結合によって酵素が活性化されるステップであり、膜貫通領域の大幅な組み換えを伴う。従って脂質環境の大きな影響を受けることが期待される。

③活量 vs 反応速度プロットを用いた解析：各種の CND 標品に対して反応サイクル各ステップの速度を測定し、その塩濃度依存性から、静電的相互作用およびそれ以外の影響の寄与が脂質環境によってどのように変化するかを見積もる。

3. 研究の方法

(1) 解析に用いる SERCA1a 標品の調製

本研究では、SR 膜標品を用いて一連の解析を行った。ウサギ骨格筋から調製した筋小胞体膜 (SRV) は SERCA1a の比率が全 SRV タンパクの 70% を超え容易に大量に野生型 Ca^{2+} -ATPase を得られる。予備実験では特に精製しなくても CND 作成に用いることができることを確認していたが、詳細な解析には、SRV からの持ち込み脂質の影響が問題となったため、Red agarose カラムにより Ca^{2+} -ATPase の精製と持ち込みリン脂質の除去を行った。

(2) ナノディスク作成のための MSP の発現と精製

MSP1D1 遺伝子を大腸菌 (BL21go1d(DE3)株) に導入し培養後 IPTG による誘導をかけ MSP を発現させた。大腸菌を遠心により集菌後、TritonX-100 存在下で超音波をかけることにより菌体を破砕する。遠心により残渣を除き MSP を Ni-キレートカラム用いて精製した。また必要によっては MSP についている His-tag を TEV プロテアーゼで切り取ることも考えていたが特に除去する必要は無かつ

た。

(3) Ca^{2+} -ATPase のナノディスクへの組み込み

SRV を C_{12}E_8 で可溶化後、Red agarose で精製した Ca^{2+} -ATPase 標品を MSP 及びさまざまな組成の脂質と混ぜたのち、バイオビーズによって C_{12}E_8 を除きナノディスクの形成と Ca^{2+} -ATPase の組み込みを行った。この際、塩濃度、 Ca^{2+} 濃度、温度、 Ca^{2+} -ATPase/MSP/脂質比などを検討し、 Ca^{2+} -ATPase が活性を保ったまま効率よくナノディスクに組み込まれる条件を探した。 Ca^{2+} -ATPase を組み込んだナノディスク (CND) が出来ているかはゲル濾過カラムの溶出パターンから判断し、ピーク画分のリン酸化中間体形成能から活性が保持されているかを判断した。

(4) Ca^{2+} -ATPase 諸活性に対する脂質の影響
各種の CND 標品に対して Ca^{2+} -ATPase 活性、 Ca^{2+} 親和性、 Ca^{2+} 結合解離速度、EP 転換速度を測定し、脂質環境によってどの様に変化するかを見積もった。

4. 研究成果

(1) 単一種リン脂質を持つナノディスクへ組み込んだ Ca^{2+} -ATPase 性質。

①SRV から Red agarose カラムを用いて精製と脂質の除去を行った Ca^{2+} -ATPase をナノディスクに組み込むため、 C_{12}E_8 存在下で MSP 及びリン脂質 (POPC、POPE、POPS、POPG) と混合しバイオビーズで C_{12}E_8 を除去した。こうして得られた標品を、ゲルろ過カラムに通すことにより、正しく Ca^{2+} -ATPase が組み込まれたナノディスクのピークを分取した (Ca^{2+} -ATPase 含有ナノディスク、CND)。この際目的の分画 (ストークス直径 10.8-11.8nm) に Ca^{2+} -ATPase 由来のリン酸化中間体 (EP) 形成能があることを確認できた (図1)。

また、形成した CND の純度は Native-PAGE で確認し、同時に電顕像の粒子径解析を行うことにより確かに Ca^{2+} -ATPase を組み込んだナノディスクが形成していることを確認した。この結果図2のような構造体が形成していることが予想された。

②POPC を持つナノディスクに組み込んだ Ca^{2+} -ATPase は SRV に匹敵する Ca^{2+} -ATPase 活性を示した。これに対して POPE、POPG、POPS では Ca^{2+} -ATPase 活性は顕著に低下し、これらの脂質が Ca^{2+} -ATPase 活性に対し阻害的に働くことが明らかとなった。また SRV 由来の脂質を持つナノディスクでも SRV の半分程度の活性しか示さなかった。これは、ナノディスクに組み込むだけで Ca^{2+} -ATPase 活性に対して何らかの影響がある可能性を示している。しかしながら、これら活性の低下した標品も C_{12}E_8 で可溶化し過剰量の POPC を添加す

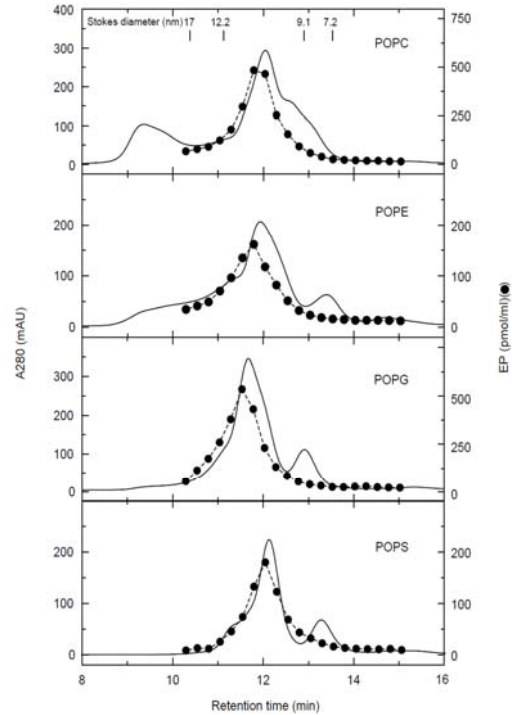


図1 形成した CND のゲルろ過による精製

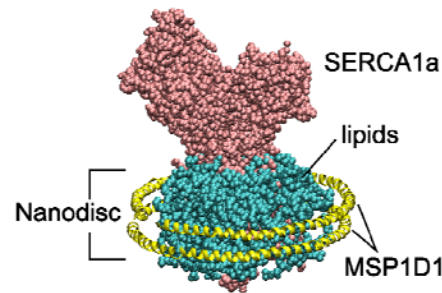


図2 形成した CND の模式図

ることにより、POPC と同程度まで活性が回復し、これら結果が組み込みの際 Ca^{2+} -ATPase が不可逆的に失活した結果ではないことが示された。

③CND の Ca^{2+} に対する親和性は、POPC では SRV とほぼ同等であったのに対し、POPG は少し親和性が高く、また POPE では少し低くなり、POPS では大きく低下していた ($0.26\mu\text{M} \Rightarrow 0.92\mu\text{M}$)。さらに POPS では親和性が低下するだけでなく、 Ca^{2+} の解離、結合の速度がそれぞれ SRV と比較して 20 倍及び 100 も遅くなっていた。脂質ヘッドグループの違いによりここまで速度定数が変化することは大きな驚きであり、 Ca^{2+} -ATPase の Ca^{2+} 結合及びそれに伴う活性化機構について知る上で、大きな情報を得ることができた。

(2) EP 転換速度に対する脂質ヘッドグループの影響

イオン強度変化させて反応速度を測定することで、溶液の活量係数と反応速度の関係から、その反応過程における影響を静電的相互作用の寄与とそれ以外とに切り分けることができる(引用文献①)。この方法により脂質ヘッドグループの影響を見積もった。その結果図3に示すように、ヘッドグループの違いによる影響が、静電相互作用、立体的相互作用とも様々であることが示された。

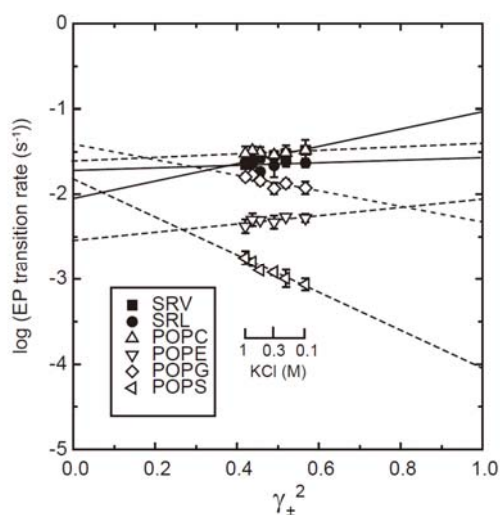


図3 CNDの活量係数 vs 速度定数プロット

この解析によると、POPGやPOPSのように正電荷を持つヘッドグループは静電的相互作用が阻害的に働くのに対してPOPCやPOPEのような電的に中性なものではやや促進的に働くことが分かる。また、POPEはPOPCに対して阻害的に働く立体的な相互作用が大きいためEP転換ステップが遅くなっていることが示され、Ca²⁺-ATPaseにPEが特異的に結合している可能性を示している。

(3) 混合脂質をもつナノディスクに組み込んだCa²⁺-ATPaseの性質。

①POPCとPOPG及びPOPCとPOPSの混合脂質でそれぞれの脂質の量比を変えてナノディスクを作成した。作成したナノディスクをNative-PAGEに掛けると、混合比に応じて脂質の持つ電荷が変化し、どちらもPOPCの量が多くなるほど、移動度が小さくなった。このときに作成時のPOPG/POPC比及びPOPS/POPC比と移動度は直線関係を示し、最初に加えた比率で脂質が組み込まれたことが確認された。

②POPG/POPC混合系では、活量 vs 反応速度プロットの傾き(静電的相互作用の寄与)がPOPGの量が増えるに従って小さくなっていったが、その変化は移動度の変化と、直線関係を示した(図4)。この結果は特定の脂質とタンパクの残基による静電的相互作用では無く、バルクの膜表面電荷が膜タンパクの活性に影響を及ぼしている可能性を示す結果で、非常に興味深い知見である。

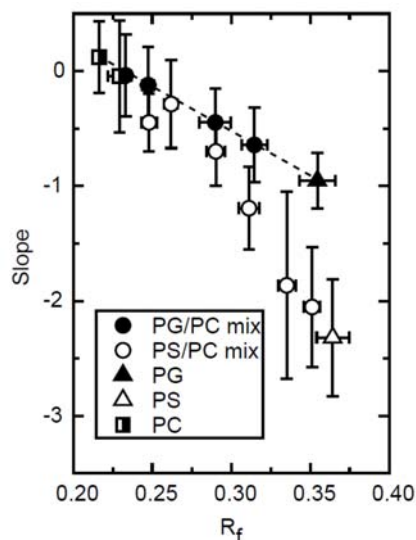


図4 活量係数 vs 速度定数プロットの傾きと移動度の関係

③POPS/POPC混合系ではPOPSの含量が少ない領域ではPOPG/POPCとほぼ同じ傾向を示したが、POPSの含量が上がると直線関係を離れ、より阻害的に働く静電的相互作用が大きくなった。これはPOPGと違いPOPSにはCa²⁺-ATPaseと直接相互作用している成分の存在を示唆している。

(4) 特殊な脂質を含むナノディスクに組み込んだCa²⁺-ATPase。

より大きく膜の特性を変えるために、ヘッドグループを持たないフォスファチジン酸

(PA)、正電荷を持つエチルフォスファチジルコリン(ePC)を含むナノディスクにCa²⁺-ATPaseを組み込んだ標品の作成を試みた。その結果これらの脂質単独ではナノディスクが形成されず、Ca²⁺-ATPaseを組み込むことはできなかったが、それぞれPC(PC/PA)及びPG(PG/ePC)の混合脂質系にCa²⁺-ATPaseを組み込むことができた。PG/ePCの混合系では、ePCの含量が上がるほど、Ca²⁺-ATPaseの部分反応のリン酸化中間体転換ステップで、反応を促進する静電的相互作用が増大した。これはPG/PC混合系でも見られるが、PG/ePC混合系の方が電荷の変化量に対してより大きな変化が観測された。これは局所的な電場の違いが、酵素活性に対する影響の違いを生み出していることを示唆している。また、PG/PA混合系では、それまで一相性であったリン酸化中間体の転換ステップが複雑に変化し、非常に早く分解するリン酸化中間体と、以上に分解の遅いリン酸化中間体に分かれることが示された。

(5) 以上、本研究により以下の成果が得られた。

①筋細胞内のCa²⁺調節及び熱産生における重要な膜タンパクである、筋小胞体Ca²⁺-ATPase

を、活性を保ったまま色々な脂質組成をもつナノディスクに組み込むことに成功した。

②得られた Ca^{2+} -ATPase 組み込みナノディスク (CND) は各種の反応速度論的解析に適用可能で、脂質の違いによる Ca^{2+} -ATPase 諸活性の変化を明確に示すことができた。

③CND を Native-PAGE に掛けることにより、組み込んだ膜環境の電荷の違いについて、定量的に扱うことが可能となった。

④得られた CND を用いて、活量係数 vs 速度定数プロット解析を行うことにより、脂質ヘッドグループの活性への影響を、静電相互作用によるものと立体的相互作用によるものに明確に切り分け解析することができた。その結果、PE による立体障害、PS、PG などの負電荷が EP 転換ステップに対して阻害的に働くことなどが明らかとなった。

⑤ POPG/POPC の混合系の CND に対して Native-PAGE と活量係数 vs 速度定数プロット解析を組み合わせたことにより、膜の表面電荷が Ca^{2+} -ATPase の EP 転換に直接影響を及ぼしていることが示唆された。この現象が事実であり他の膜タンパクに広く適応できるものであれば、膜タンパクの機能、あるいはその制御について理解する上で非常に重大な発見である。

今回得られた知見、及び確立した解析法は Ca^{2+} -ATPase のみにとどまらず、広く膜タンパク全体に適応できると考えられる。

<引用文献>

- ① Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki, Roles of Long-range Electrostatic Domain Interactions and K^+ in Phosphoenzyme Transition of Ca^{2+} -ATPase, J. Biol. Chem. Vol.288(28)、2013、20646-20657

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① K. Yamasaki, T. Daiho, S. Danko, S. Yasuda, H. Suzuki、Nanodisc-based kinetic assays reveal distinct effects of phospholipid headgroups on the phosphoenzyme transition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase、Journal of Biological Chemistry、査読有、292 巻、2017、20218-20227
DOI: 10.1074/jbc.M117.816702
- ② Danko S., Yamasaki K., Daiho S., and Suzuki H.、Membrane Perturbation of ADP-insensitive Phosphoenzyme of Ca^{2+} -ATPase Modifies Gathering of Transmembrane Helix M2 with

Cytoplasmic Domains and Luminal Gating、Scientific Reports、査読有、7 巻、2017、41172、

DOI:10.1038/srep41172

- ③ Daiho T., Yamasaki K., Danko S., and Suzuki S.、Glycine 105 as Pivot for a Critical Knee-like Joint between Cytoplasmic and Transmembrane Segments of the Second Transmembrane Helix in Ca^{2+} -ATPase、Journal of Biological Chemistry、査読有、291 巻、2016、24688-24701

DOI: 10.1074/jbc.M116.759704

- ④ Yamasaki K., Daiho T., Danko S., and Suzuki H.、Assembly of a Tyr122 Hydrophobic Cluster in Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase Synchronizes Ca^{2+} Affinity Reduction and Release with Phosphoenzyme Isomerization、Journal of Biological Chemistry、査読有、290 巻、2015、27868-27879

[学会発表] (計 18 件)

- ① K. Yamasaki, T. Daiho, S. Danko, S. Yasuda and H. Suzuki、Effects of phospholipid's head groups on the properties of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase embedded in nanodisc、The 15th International Conference on Na,K-ATPase and Related Transport ATPases、2017 年 9 月 24-30 日、大津
- ② Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Stefania Danko and Hiroshi Suzuki、Glycine 105 as Pivot for a Critical Knee-like Joint between Cytoplasmic and Transmembrane Segments of the Second Transmembrane Helix in Ca^{2+} -ATPase、The 15th International Conference on Na,K-ATPase and Related Transport ATPases、2017 年 9 月 24-30 日、大津
- ③ S. Danko, K. Yamasaki, T. Daiho, S. Yasuda and H. Suzuki、Membrane Perturbation of ADP-insensitive Phosphoenzyme of Ca^{2+} -ATPase Modifies Gathering of Transmembrane Helix M2 with Cytoplasmic Domains and Luminal Gating、The 15th International Conference on Na,K-ATPase and Related Transport ATPases、2017 年 9 月 24-30 日、大津
- ④ 山崎和生、大保貴嗣、Danko Stefania、安田 哲、鈴木裕、筋小胞体カルシウムポンプ活性に対する脂質ヘッドグループ及び膜表面電荷の影響の解析、日本生体エネルギー研究会 第 43 回討論会、2017 年 12 月 19-21 日、京都
- ⑤ 大保 貴嗣、山崎 和生、Danko Stefania、安田 哲、鈴木 裕、筋小胞

- 体カルシウムポンプの反応に及ぼす界面活性剤の効果、日本生体エネルギー研究会 第 43 回討論会、2017 年 12 月 19-21 日、京都
- ⑥ 安田 哲、山崎和生、大保貴嗣、高津 宏之、申 惠媛、Danko Stefania、鈴木裕、フリッパーゼの反応機構解析、日本生体エネルギー研究会 第 43 回討論会、2017 年 12 月 19-21 日、京都
- ⑦ 山崎和生、大保貴嗣、Danko Stefania、安田 哲、鈴木裕、ナノディスクに組み込んだ筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の活性に対する膜表面電荷の影響、生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017 年 12 月 6-9 日、神戸
- ⑧ 大保 貴嗣、山崎和生、Danko Stefania、安田 哲、鈴木 裕、筋小胞体カルシウムポンプの活性に対する界面活性剤の影響、生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017 年 12 月 6-9 日、神戸
- ⑨ 安田 哲、山崎和生、大保貴嗣、高津 宏之、申 惠媛、Danko Stefania、鈴木裕、フリッパーゼの生化学的反応機構の解析、生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017 年 12 月 6-9 日、神戸
- ⑩ 大保 貴嗣、山崎和生、Stefania Danko、鈴木 裕、Ca ポンプのエネルギー共役；M2-helix 膜貫通部分 (M2m) と細胞質部分 (M2c) をつなぐ Gly105 の柔軟性の機能、日本生体エネルギー研究会 第 42 回討論会、2016 年 12 月 19-21 日、名古屋
- ⑪ 山崎和生、大保貴嗣、Danko Stefania、鈴木裕、脂質ヘッドグループが筋小胞体カルシウムポンプ活性に及ぼす影響—ナノディスク組み込み標品を用いて—、日本生体エネルギー研究会 第 42 回討論会、2016 年 12 月 19-21 日、名古屋
- ⑫ Stefania Danko, Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, and Hiroshi Suzuki、Membrane Perturbation of ADP-insensitive Phosphoenzyme of Ca^{2+} -ATPase Modifies Gathering of Transmembrane Helix M2 with Cytoplasmic Domains and Luminal Gating、日本生体エネルギー研究会 第 42 回討論会、2016 年 12 月 19-21 日、名古屋
- ⑬ 山崎和生、大保貴嗣、Danko Stefania、鈴木裕、ナノディスクに組み込んだ標品を用いた筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の EP 転換ステップに及ぼす脂質組成及び A23187 の影響の解析、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25-27 日、仙台
- ⑭ 大保 貴嗣、山崎和生、Stefania Danko、鈴木 裕、筋小胞体 Ca^{2+} ポンプ M2 ヘリックスの膜貫通部分と細胞質部分の連結領域：エネルギー共役における役割、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25-27 日、仙台
- ⑮ 山崎和生、大保貴嗣、Danko Stefania、鈴木裕、筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の EP 転換ステップにおける Tyr122-Hydrophobic cluster の集合過程とエネルギー共役、第 88 回日本生化学会第 38 回日本分子生物学会合同年会、2015 年 12 月 1-4 日、神戸
- ⑯ 大保 貴嗣、山崎和生、Stefania Danko、鈴木 裕、筋小胞体 Ca^{2+} ポンプのエネルギー共役における M2 ヘリックス膜貫通部分 (M2m) と細胞質部分 (M2cyt) の連結領域の役割、第 88 回日本生化学会第 38 回日本分子生物学会合同年会、2015 年 12 月 1-4 日、神戸
- ⑰ 山崎和生、大保貴嗣、Danko Stefania、鈴木裕、ナノディスクへ組み込んだ筋小胞体カルシウムポンプを用いたタンパク質—脂質相互作用の解析、日本生体エネルギー研究会 第 41 回討論会、12 月 21-23 日、東京
- ⑱ 大保 貴嗣、山崎和生、Stefania Danko、鈴木 裕、筋小胞体 Ca^{2+} ポンプのエネルギー共役における M2 ヘリックス膜貫通部分 (M2m) と細胞質部分 (M2cyt) の連結領域の役割、日本生体エネルギー研究会 第 41 回討論会、12 月 21-23 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 和生 (YAMASAKI, Kazuo)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：60241428