

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04748

研究課題名(和文)カルシウムポンプによる組織特異的なカルシウムイオン制御機構の結晶学的解明

研究課題名(英文)Elucidation of tissue-specific calcium ion regulation mechanism by calcium pump by crystallography

研究代表者

小川 治夫(Ogawa, Haruo)

東京大学・定量生命科学研究所・准教授

研究者番号：40292726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内Ca²⁺濃度は、小胞体膜に存在するCa²⁺ポンプであるSERCAにより組織特異的に制御されるが、その制御機構を原子構造に基づいて理解することが本研究の最終目標である。骨格筋特異的なSERCA1aのみならず、心筋特異的なSERCA2a、house-keepingポンプで小胞体での蛋白質品質管理に密接に関連するSERCA2b、近年その機能の重要性が明らかになりつつあるSERCA3といった、生物学的・医学的に重要で疾患とも密接に関連する他アイソフォームまで対象を広げ、その結晶解析を手がかりに、組織特異的な細胞内Ca²⁺制御機構の理解へ向けた構造的研究を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究対象は、生物学的・医学的に重要で疾患とも密接に関連するにも拘らず、生体内に極少量しか存在しないことから、これまで手の施しようの無かったものである。従ってその解析自体が細胞におけるCa²⁺制御機構の理解に大きく貢献するものであり、学術的に大きな意義を持つ。また、心筋細胞のみならず、皮膚異常角化症や糖尿病患者の細胞におけるCa²⁺制御機構の理解に飛躍的な進歩をもたらす可能性を秘めている。得られた結果は、直接的に創薬に結びつくものであり、社会貢献も大いに可能である。

研究成果の概要(英文)：The intracellular Ca²⁺ concentration is tissue-specifically regulated by SERCA, the Ca²⁺ pump located at the sarco/endoplasmic reticulum membrane. The ultimate goal of this study is to understand the mechanism of the regulation of intracellular Ca²⁺ concentration mediated by SERCA based on the atomic structures. We have expanded our research target from skeletal muscle-specific SERCA1a to other isoforms which are biologically and medically important and closely related to diseases, such as SERCA2a, SERCA2b and SERCA3. Based on the crystal structures of these isoforms in the various states, we aimed to understand the tissue-specific intracellular Ca²⁺ control mechanism.

研究分野：構造生物学

キーワード：膜蛋白質 イオンポンプ蛋白質 X線結晶解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Sarco/Endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA)は小胞体膜に存在し、ATPの加水分解に伴い Ca^{2+} を数千倍の濃度勾配に逆らい小胞体内腔へ能動輸送する Ca^{2+} ポンプである。SERCAは Na^+, K^+ -ATPase や胃の H^+, K^+ -ATPase と同族の P 型 ATPase ファミリーに属し、細胞質の Ca^{2+} 濃度を細胞休止状態の極めて低い濃度に保つという、言わば生命維持に必須な役割を担う。代表例として、骨格筋に局在する SERCA1a や心筋に局在する SERCA2a が挙げられるがその重要性は明らかである。例えば、筋肉は筋小胞体から細胞質への Ca^{2+} 放出が引き金となり収縮するが、弛緩のためには速やかに細胞質の Ca^{2+} が小胞体へ回収される必要がある。この際に中心的な役割を果たすのが、SERCA1a である。一方、心筋に局在する SERCA2a は心筋細胞の収縮力と直接関係している。活性が増大すれば、筋小胞体中に取り込まれる Ca^{2+} 濃度が上昇し、放出される Ca^{2+} も増大する結果、収縮力は増大する。また、SERCA2a の活性は少なくとも心室においては 51 残基からなる 1 回膜貫通蛋白質のフォスフォランパン (PLN) によって制御されており、PLN は アドレナリンシグナルの最も重要な mediator として機能する。複数のリン酸化サイトを持ち、PLN がリン酸化されていない状態では、PLN は SERCA2a の阻害剤として働くが、アドレナリン刺激の下流にあってリン酸化 (PKA, CaMKII による) を受けると SERCA2a を抑制する作用は消失し、SERCA2a は活性化される。PLN に変異を持つ家系は重篤な心臓病を持つことが報告されている。

SERCA は刺激に応じた小胞体から細胞質への Ca^{2+} 放出を行うことから、筋組織以外にも様々な働きを担う。SERCA が細胞質や小胞体内の Ca^{2+} 濃度を適切にコントロールすることにより、小胞体内での新規合成蛋白質のフォールディング等が可能になるし、SERCA の異常は、細胞接着異常による皮膚異常角化症、発がん、糖尿病、アルツハイマー病など、様々な重篤な病態と密接に関連している。このように、SERCA は細胞の生存と Ca^{2+} による機能調節に必須の機能を果たす重要な膜蛋白質である。SERCA アイソフォームとして前述の SERCA1/2 を含めて SERCA1/2/3 の 3 種類が知られている。それぞれ、C 末端で組織特異的な選択的スプライシングが起こり、SERCA2 では a/b の 2 種類、ヒトの SERCA3 では a-f の 6 種類のスプライシングバリエーションが存在する。その一方で、アイソフォーム間のアミノ酸一致度は 75-85%と高いにもかかわらず、アイソフォーム/スプライシングバリエーション間での Ca^{2+} 親和性や輸送速度には大きな違いがある。このような性質の違いが、組織依存的な Ca^{2+} 制御機構の本質であると考えられる。

SERCA の中で、研究開始時点で機能と原子構造に基づき研究が最も進んでいたものは、我々も長年研究を行ってきた骨格筋に局在する SERCA1a であった。994 残基の 1 本鎖のアミノ酸から構成され、10 回の膜貫通部位、細胞質に 3 つの大きなドメイン (A, N, P) から構成される。SERCA の中で最も単純な構造をとり、ウサギ骨格筋からの大量精製が可能であることから、最も研究が最も進んでいる。しかしながら、生物学的・医学的に重要で疾患とも密接に関連する他アイソフォームの構造研究に関しては、生体内に極少量しか存在しないことから手の下しようが無く、アイソフォーム/スプライシングバリエーション依存的な Ca^{2+} 親和性や輸送速度の違いが生じるメカニズムといった本質的な問題については、研究開始当初には一切不明であった。これは、SERCA1a に比べて、SERCA2a/b や SERCA3 の研究は蛋白質調製の困難さから、培養細胞を用いて一過的に発現させた極少量のサンプルを用いた研究が殆どであり、精製標品が大量に要求される生化学実験や、立体構造解析は事実上不可能であったためでもある。また、最も研究の進んでいる SERCA1a にしても、その構造はウサギ骨格筋から調整された精製標品を用いているため、機能理解に不可欠な変異体構造の報告は皆無であった。

このような状況の中、我々は独自のアデノウィルス/哺乳類培養細胞発現・精製系を立ち上げることに成功し、SERCA1a や SERCA2a 等の大量発現・精製系の構築に成功した。その結果、アイソフォーム/スプライシングバリエーション依存的な Ca^{2+} 制御機構の理解へ向けた取り組みが十分可能になった。そこで本研究では、骨格筋特異的な SERCA1a やその変異体、心筋特異的な SERCA2a やその変異体、house-keeping ポンプで小胞体での蛋白質品質管理に密接に関連する SERCA2b、近年その機能の重要性が明らかになりつつある SERCA3 の結晶解析を手がかりに、組織特異的な細胞内 Ca^{2+} 制御機構の理解へ向けた構造的な研究に取り組むこととした。

2. 研究の目的

細胞内 Ca^{2+} が小胞体膜に存在し細胞の生存と機能に必須な Ca^{2+} ポンプである SERCA により組織特異的に制御される機構を原子構造に基づいて理解することが本研究の目的である。骨格筋制御に関わりウサギから大量精製可能な SERCA1a の構造解析が特に進んでいるが、生物学的・医学的に重要で疾患とも密接に関連する他アイソフォームの構造研究に関しては、生体内に極少量しか存在しないことから手の下しようがなかった。最も研究の進んでいる SERCA1a にしても、その構造はウサギ骨格筋から調整された精製標品を用いているため、機能理解に不可欠な変異体構造の報告は皆無であった。だが、我々の研究の進展の結果、こうした研究の遂行が十分実現可能なものになった。そこで、本研究では、骨格筋特異的な SERCA1a やその変異体、心筋特異的な SERCA2a やその変異体、house-keeping ポンプで小胞体での蛋白質品質管理に密接に関連する SERCA2b、近年その機能の重要性が明らかになりつつある SERCA3 の結晶解析を手がかりに、組織

特異的な細胞内 Ca^{2+} 制御機構の理解へ向けた構造的研究を目指した。具体的には、「SERCA1a の変異体」 \downarrow 「SERCA2a よりも C 末端がより長く、しかも 11 番目の膜貫通ヘリックスを持つ SERCA2b」を大量生産・精製し、生化学実験や X 線結晶構造解析を通じ、「SERCA2a/b 間での Ca^{2+} に対する挙動の違い」の本質的理解を目指す。また、更に発展的なこととして、その重要性にもかかわらずこれまで殆ど手を付けられてこなかった SERCA3 の 6 つのスプライシングバリエーション(a-f)の大量生産・精製系を構築し、種々の生化学実験を行うことで、6 つのスプライシングバリエーション間での「 Ca^{2+} に対する挙動の違い」の同定を当面の目的とした。

3. 研究の方法

組織特異的な細胞内 Ca^{2+} 制御機構を原子構造に基づいて理解するために、SERCA の様々なアイソフォーム/スプライシングバリエーションを大量生産・精製し、生化学実験や X 線結晶構造解析を通じ、その本質的理解を目指す。本研究の遂行には大型の高等動物膜蛋白質である SERCA の精製標品が必要とされた。そのために、我々の独自技術であるアデノウイルス/哺乳類培養細胞を用いた大量生産系を用いた。変異アデノウイルスの大量調整は、120 枚の細胞培養ディッシュ (150 mm) で AD293 細胞を培養し、細胞の回収・濃縮することで行った。SERCA の大量生産には、120 枚の細胞培養ディッシュ (150 mm) で COS 細胞を培養し、最適量のウイルスを添加し一定時間後に細胞の回収を行った。発現 SERCA の精製は、細胞破碎後に小胞体を単離後に界面活性剤で可溶化を行い、発現蛋白の N 末端に融合した Halo-Tag を用いることで行った (Halo-Tag と SERCA の間には TEV プロテアーゼ認識部位が入っている)。可溶化蛋白を Halo-Tag レジンへ吸着させ、レジンを洗浄後に必要量の TEV プロテアーゼを洗浄溶液に添加し一定時間後、切断された精製蛋白をその後の結晶化やアッセイに用いた。十分量の精製標品が得られた場合には結晶化を行い、実験室系の X 線回折装置で十分な回折像が得られたものについては、高輝度放射光施設 SPring-8 でデータ収集を行い解析を行った。

4. 研究成果

期間全体を通じ、SERCA の様々なアイソフォーム/スプライシングバリエーションの解析のため、(1)SERCA1a 変異体の結晶化・構造解析、(2)SERCA2a の結晶化・構造解析、(3)SERCA2b の結晶化・構造解析、(4)SERCA の様々なアイソフォーム/スプライシングバリエーションの大量生産・精製系の構築とその解析、に取り組んだ。

(1)SERCA1a 変異体の結晶化・構造解析

SERCA1a が Ca^{2+} を結合する機構のより深い理解のために、SERCA1a の変異体の結晶構造解析に取り組んだ。SERCA は E1 状態と E2 状態という大きく 2 つの状態を持ち、E1 状態では膜貫通 Ca^{2+} 結合部位は Ca^{2+} に対して高い親和性を持っている。一方、E2 では、結合部位は Ca^{2+} に対する親和性が低くプロトンにより安定化されているが、E2 \rightarrow E1 遷移では低親和性の膜貫通 Ca^{2+} 結合部位が 2 ~ 3 個のプロトンを放出し、 Ca^{2+} 高親和性になる。この移行は生理学的条件下で自然に引き起こされるが、細胞質ドメインと膜貫通ドメインの両方で大きく複雑な構造変化を伴うことが知られている。この構造変化の仕組みと作用機序の理解は SERCA の反応機構の理解に大いに貢献可能である。そこで、膜貫通 M4 ヘリックスの細胞質側と小胞体内口腔の中間でヘリックスが巻き戻った部分 (即ちヒンジ部分) に位置し、ゲーティングに重要な Glu309 に着目し、変異体を作成し、その結晶構造の解析を試みた。Glu309 は、2 個結合する Ca^{2+} のうちのサイト II に結合した Ca^{2+} をキャップし、M4 の細胞質側のパス (角度と仰角) を動かすことにより、 Ca^{2+} 結合シグナルをリン酸化部位に伝達すると考えられており、Glu309 の置換は SERCA1a の Ca^{2+} 輸送を完全に止めることが知られている。そこで Glu309Gln と Glu309Ala という 2 つの変異体を作成し、大量発現・精製後に結晶化し、両変異体の結晶構造を得た。興味深いことに、Glu309Gln の結晶構造は、これまでに発表されたどの E2 結晶構造とも大きく異なり、一見すると E1 \cdot Mg^{2+} 状態の結晶構造に近かった。しかし、細胞質ドメインは E1 のような配置をとる一方、膜貫通ドメインは E2 状態の構造に近いという大変ユニークな構造をとっていた。従って、この Glu309Gln 置換は細胞質ドメインと膜貫通ドメインの両方での大幅な再配置を引き起こし、明らかに両ドメインの連動を切り離していた。そこでこの変異体構造を更に量子化学計算と組み合わせることで、SERCA1a が E2 状態を確立するための構造的特徴が明らかになり、E2 \rightarrow E1 遷移がどのように進行するかについての理解が深まった。以上の結果は投稿論文として報告した。

(2)SERCA2a の結晶化・構造解析

SERCA2a に関しては、もともと得ていた状態の結晶に加え、 Ca^{2+} 非存在下で ATP が結合した状態の結晶化にも成功した。本状態の構造は SERCA1a からでは得ることができなかったものであり、SERCA の構造としては全く新規のものである。また、SERCA の反応機構を結晶構造から補完することが可能な成果でもある。現在解析を進めると同時に論文を執筆中である。

(3)SERCA2b の結晶化・構造解析

研究開始当初に得ていた結晶は、大きさも極小さく、また良質の回折点も得ることができず、

解析が困難であった。だが、本研究遂行中に、精誠条件や結晶化条件の検討を繰り返し行うことにより、解析に耐えうる大きさのものを得ることに成功した。結晶が十分大きく成長するようになったこともあり、複数の結晶からのデータのマージにより、フルデータの取得も可能になった。また、全般的な分解能も大幅に向上した。その一方で、SERCA2a/2bの機能の違いに直接的に関与すると考えられるC末端領域の電子密度の解釈が依然として困難であり、完全なモデリングには至っていない。この未解像の領域はSERCA反応機構の詳細な理解にも必須であると考えられるため、今後も引き続き解析を進めて、完全なモデリングを目指す予定である。

(4)SERCA3のサプライシングバリエーションの大量生産・精製系の構築とその解析

6種類の全てのサプライシングバリエーション (SERCA3a-f) を発現する変異アデノウィルスの作成には成功した。Halo-Tagを用いた簡易精製を行い、発現蛋白質はSDS-PAGE/CBB染色で確認することには成功しているものの、まだ発現量と精製のための最適界面活性剤の選択に難がある。そのため、統合的な機能解析実験の推進にはまだ時間がかかる。結晶化スクリーニングについても小スケールでは行うことができたものの、大規模なスクリーニングには至っていない。今後の研究の推進へ向け、より多くの精製評品を得ることができるよう、今後も引き続き発現量の向上を試みると同時に、最適界面活性剤のスクリーニングにも引き続き臨む予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sato, E., Morita, M., Ogawa, H., Iwatsuki, M., Hokari, R., Ishiyama, A., Mura, S., Iwasaki, A., Suenaga, K.	4. 巻 28
2. 論文標題 Design, synthesis and anti-malarial activities of synthetic analogs of biselyngbyolide B, a Ca ²⁺ pump inhibitor from marine cyanobacteria	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem Lett.	6. 最初と最後の頁 298-301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2017.12.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murayama T, Kurebayashi N, Ogawa H, Yamazawa T, Oyamada H, Suzuki J, Kanemaru K, Oguchi K, Iino M, Sakurai T	4. 巻 37
2. 論文標題 Genotype-Phenotype Correlations of Malignant Hyperthermia and Central Core Disease Mutations in the Central Region of the RYR1 Channel	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Hum Mutat.	6. 最初と最後の頁 1231-1241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/humu.23072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsunekawa N, Ogawa H, Tsueda J, Akiba T, Toyoshima C	4. 巻 115
2. 論文標題 Mechanism of the E2 to E1 transition in Ca ²⁺ -pump revealed by crystal structures of gating residue mutants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 12722-12727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1815472115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murayama T, Ogawa H, Kurebayashi N, Ohno S, Horie M, Sakurai T	4. 巻 1
2. 論文標題 A tryptophan residue in the caffeine-binding site of the ryanodine receptor regulates Ca ²⁺ sensitivity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-018-0103-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Murayama T, Kurebayashi N, Ishigami-Yuasa M, Mori S, Suzuki Y, Akima R, Ogawa H, Suzuki J, Kanemaru K, Oyamada H, Kiuchi Y, Iino M, Kagechika H, Sakurai T	4. 巻 94
2. 論文標題 Efficient High-Throughput Screening by Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ Measurement to Identify Inhibitors of Ryanodine Receptor Ca ²⁺ -Release Channels	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Pharmacol	6. 最初と最後の頁 722-730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/mol.117.111468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa H, Kurebayashi N, Yamazawa T, Murayama T	4. 巻 N/A
2. 論文標題 Regulatory mechanisms of ryanodine receptor/Ca ²⁺ release channel revealed by recent advancements in structural studies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Muscle Res Cell Motil	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10974-020-09575-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamazawa T, Ogawa H, Murayama T, Yamaguchi M, Oyamada H, Suzuki J, Kurebayashi N, Kanemaru K, Oguchi K, Sakurai T, Iino M	4. 巻 152
2. 論文標題 Insights into channel modulation mechanism of RYR1 mutants using Ca ²⁺ imaging and molecular dynamics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Gen Physiol	6. 最初と最後の頁 e201812235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1085/jgp.201812235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Ogawa H, Vilsen B, Cornelius F, Toyoshima C
2. 発表標題 Structural analysis of P-type ATPase towards drug discovery
3. 学会等名 ConBio2017 (生命科学系合同年次大会) (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小川治夫、村山尚、呉林なごみ、豊島近
2. 発表標題 高分解能構造解析へ向けた哺乳類由来膜蛋白質の大量生産
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ogawa H, Toyoshima C
2. 発表標題 Large production of mammalian membrane proteins toward determination of high-resolution structure
3. 学会等名 Biophysical Society 61th annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ogawa H
2. 発表標題 Recent advances in structural studies of SR Ca ²⁺ -ATPase
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ogawa H, Toyoshima C
2. 発表標題 Large production of mammalian membrane proteins toward determination of three-dimensional structures
3. 学会等名 19th IUPAB congress and 11th ESBA congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ogawa H, Motoyama K, Vilsen B, Cornelius F, Toyoshima C
2. 発表標題 X-ray crystallographic structures of Na,K-ATPase in complex with cardiotonic steroids
3. 学会等名 The 15th International Conference on Na,K-ATPase and Related Transport ATPases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ogawa H
2. 発表標題 Recent Advances in Structural Studies of P-type ATPases
3. 学会等名 The Protein Society 31st Annual Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小川治夫、椛島佳樹、豊島近
2. 発表標題 SERCA結晶構造の現状
3. 学会等名 2017年生体エネルギー研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ogawa H, Kabashima Y, Nakajima R, Toyoshima C
2. 発表標題 Crystal structures of SERCA2a and SERCA2b
3. 学会等名 Biophysical Society, 62nd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川治夫、椛島佳樹、豊島近
2. 発表標題 SERCA結晶構造の進展
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ogawa H
2. 発表標題 Structural analysis of recombinant ryanodine receptors by cryo-EM
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Muscle: Excitation-Contraction Coupling（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考