

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18500

研究課題名(和文)パリトキシンによるナトリウムポンプのチャネル化機構の構造生物学

研究課題名(英文) structural basis of channelization of Na⁺-pump by palytoxin

研究代表者

金井 隆太 (Kanai, Ryuta)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：50598472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：海産毒物パリトキシンはナトリウムポンプを標的として毒性を示す。ナトリウムポンプは本来、ナトリウムイオンとカリウムイオンを細胞内外へ能動輸送する膜蛋白質だが、パリトキシンと結合するとそのポンプ機能が失われて、チャネル化することが分かっていた。では、どのようにしてパリトキシンはナトリウムポンプをチャネル化するのか、その仕組みを明らかにするために、パリトキシンと結合したナトリウムポンプの立体構造解析を行った。その結果、パリトキシンはナトリウムポンプのイオン輸送経路の細胞外側に結合し、そのゲートをこじ開けていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は根本的治療法がないパリトキシン中毒に対する薬剤デザインに大きく役立つものです。また、本研究成果は、本来、ポンプとして機能するはずのナトリウムポンプはなぜ、パリトキシンの結合によってチャネル化するのか、言い換えれば、ポンプとして機能するためには何が大事か、というイオン能動輸送に対する基本的な理解に役立ちました。

研究成果の概要(英文)：Palytoxin, a marine toxin, targets a sodium pump that transports sodium ions to external and potassium ions to cytoplasm. Palytoxin interferes with the pumping of a sodium pump and forces it to become an ion channel. Here, in order to elucidate the mechanism of a sodium pump inhibition induced by palytoxin, I performed a crystallographic analysis of palytoxin-bound sodium pump. The result showed that palytoxin is bound to the extracellular side of the ion pathway of the sodium pump and makes the extracellular gate opened.

研究分野：構造生物学

キーワード：Na⁺,K⁺-ATPase パリトキシン X線結晶構造解析 イオン能動輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Na^+, K^+ -ATPase は全ての動物細胞に発現し、ATP の加水分解エネルギーを利用して ATP 1 分子あたり 3 個の Na^+ を細胞外へ、2 個の K^+ を細胞内に輸送し、細胞内外のイオン濃度差を形成するイオンポンプである。こうして形成されたイオン濃度勾配は電気信号や浸透圧調節、物質輸送のための駆動力などに利用される。イオンに対する親和性の変化と細胞質、細胞外側の 2 つのゲート開閉の制御が能動輸送の本質であり、その仕組みの理解のためには様々な中間状態の立体構造解析が不可欠である (Fig.1)。これまでに 2 つの中間状態の結晶構造のほか、薬剤と結合した結晶構造が複数明らかになってはいるが、反応サイクルにおける中間状態は 9 個以上あることから想像できるように、 Na^+, K^+ -ATPase の作動機構は複雑で、その理解にはまだ遠い。

パリトキシン (PTX) はアオブダイやハコフグに含まれる海産毒物で、フグ毒テトロドトキシンよりも 10 倍以上強い毒性を持つ (Fig. 2)。PTX を摂取すると、主に横紋筋融解症、痙攣・麻痺、呼吸困難、不整脈、腎不全を引き起こし、重篤な場合は数時間から数日で死に至る。ここ数年において中毒件数は減っているものの、年平均で数名の中毒患者 (そのうち 5% 程度が死亡) がおり、有効な根本的治療法はない。PTX の標的蛋白質は Na^+, K^+ -ATPase で、興味深いことに PTX は一般的な阻害剤とは異なり、 Na^+, K^+ -ATPase を陽イオンチャンネルに変えてしまう。すなわち、「イオンポンプの 2 つの膜内ゲートが同時に開くことはない」というのがイオンの濃度勾配に打ち勝つ基本戦略であるが、PTX はそれを壊すことができる。したがって、PTX との複合体構造は治療・創薬のための毒性機構の理解のみならず、2 つの膜内ゲートの開閉制御といったイオンポンプの本質の理解に役立つものである。

2. 研究の目的

では、PTX は Na^+, K^+ -ATPase を一体、どのようにして陽イオンチャンネル化するのだろうか? これまでの生化学的解析によると、PTX は反応中間体の 1 つでリン酸化状態 E2P 状態に結合し、脱リン酸化の過程で細胞外側ゲートは本来なら閉じるはずが、PTX 結合によって開いたままとなる (Fig. 1)。そこへ ATP が細胞質ドメインに結合すると、細胞質側ゲートも開いた状態となる。こうして形成されるチャンネル経路は直径 7 Å の有機陽イオンをも透過でき、ポンプとして正常に機能するときのイオン輸送経路と変わらないことが生化学的に示唆されている。また、PTX は、 Na^+, K^+ -ATPase の細胞外側ゲートに結合して阻害する強心配糖体ステロイドと競合することから、少なくとも PTX の一部は細胞外側ゲート付近に結合すると推測される。しかし、これまで PTX が結合した Na^+, K^+ -ATPase の結晶構造は報告されておらず、PTX がどのようにチャンネル化するのが、その具体的な仕組みはよく分かっていない。

PTX の結合からチャンネル化への間には Fig.1 に示すように複数の中間状態がある。したがって、PTX による Na^+, K^+ -ATPase のチャンネル化の仕組みの解明にはそれぞれの中間状態の立体構造を知るのが望ましい。既にリン酸アナログ BeF_3^- を使用して、反応サイクルの逆反応 ($\text{E}_2 \rightarrow \text{E}_2\text{P}$) から得た E2P 状態 (ここでは E_2P_i と呼ぶ。) を結晶化し、予備的構造を得ることに成功していた。そこで、本課題では PTX を結合した E_2P_i 状態の Na^+, K^+ -ATPase の高分解能で構造決定し、PTX の結合構造を明らかにすることを目的とした (1)。また、チャンネル化機構を明らかにすべく、PTX と結合した様々な中間状態の結晶化、および構造決定することを目的として研究を行った (2)。

3. 研究の方法

(1) PTX と結合した E2_i 状態の結晶構造解析

PTX と結合した Na^+, K^+ -ATPase の結晶化に成功し (Fig. 3)、予備的な構造も得ていた。ここでは高分解能での構造決定を目指して、結晶化条件、および得られた結晶の脱水条件の最適化を行った。

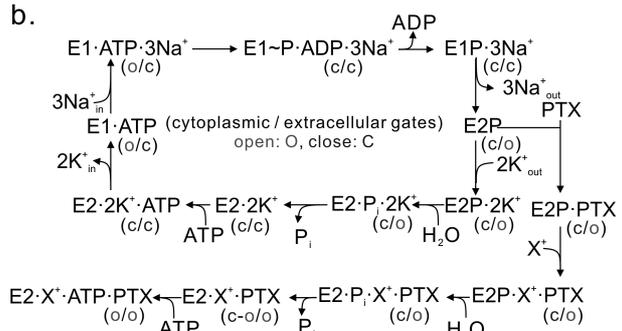


Fig.1. Na^+, K^+ -ATPase の反応サイクルと PTX 結合からチャンネル化までの反応過程。X⁺は 1 価の陽イオン。

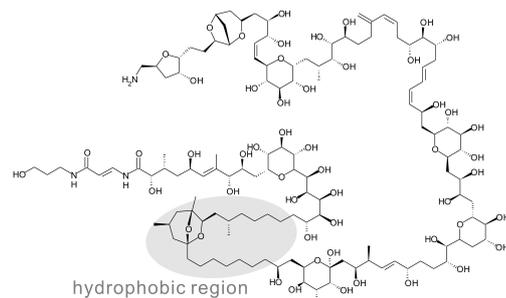


Fig. 2. PTX の化学構造。直鎖として一番長く迎れる部分をポリペプチドに例えると、34 アミノ酸の長さに相当。一部疎水的だが (灰色)、多くの水酸基を持ち、全体としては親水的である。

また、比較的大きな分子量(2680)である PTX は分子置換法のみでは構造決定が不十分である可能性が考えられたため、重原子同型置換法による構造決定を検討した。さらに、PTX 結合による E2P_i 状態の構造変化を知るために、E2P_i 単独状態の結晶化、および構造決定を試みた。

(2) PTX と結合した様々な中間状態の結晶化と構造決定

既に結晶化条件が決まっている中間状態(E1~P·ADP·3Na⁺, E2·P_i·2K⁺)と PTX との共結晶化を試したほか、単独で得られた結晶を PTX 入りの結晶化溶液に浸けるソーキング実験を行った。

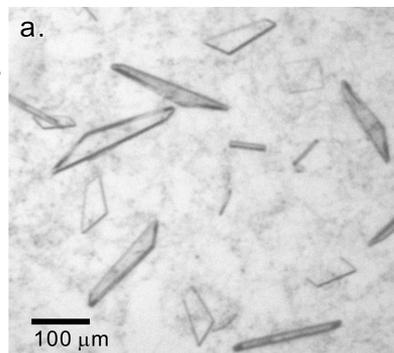


Fig.3. PTX と結合した E2P_i 状態の結晶

また、海外研究協力者 Aarhus 大学 Flemming Cornelius 教授によると、同じ E2P 状態でも PTX 存在下で、正反応(E1ATP→E2P)、すなわち ATP を使って得た E2P 状態(以降、E2P_f とする。)は E2P_i 状態と比べて構造が異なる可能性を生化学的に示した。そこで、ATP を用いて正方向から得た E2P_f 状態を調製し、その結晶化を検討した。

さらに、結晶化条件は決まっていなかったものの、細胞質側ゲートが開いた状態である中間状態 E1 状態について、PTX との共結晶化を検討した。

いずれの実験においても天然のブタ腎臓およびサメ直腸腺 Na⁺,K⁺-ATPase を用いた。これらは海外研究協力者デンマーク Aarhus 大学 Bente Vilsen 教授、Flemming Cornelius 教授らにより、シヨ糖密度勾配遠心で調製した精製膜画分として提供された。私はその画分から Na⁺,K⁺-ATPase を界面活性剤で可溶化し、結晶化に使用した。得られた結晶の回折測定は高輝度放射光施設 SPring-8 のビームライン BL41XU、および高エネルギー加速器研究機構 KEK の放射光施設 Photon Factory のビームライン BL17A にて行った。

4. 研究成果

(1) PTX を結合した E2P_i 状態の結晶構造解析について

高分解能データの収集のために結晶化条件、および結晶の脱水処理の最適化を行ったところ、沈殿剤に用いる PEG の種類、濃度の最適化、および界面活性剤の種類、濃度の最適化により 4 Å を超える分解能の回折データが得られた。脱水処理については既に構造決定されている中間状態(E1~P·ADP·3Na⁺, E2·P_i·2K⁺)の結晶改良で高濃度の PEG 溶液に結晶をソークすることが非常に有効だったことから、それに倣って色々試したものの、なかなか効果は得られなかった。しかし、最近、エチレングリコールを用いた 2 段階の脱水処理で結晶性が改良される兆候が得られたことから、今後、この方法を最適化すれば、さらに分解能の向上が期待できる。また、PTX と結合していない E2P_i 状態についても同様の条件で結晶が得られ、4 Å を超える回折データを得た。

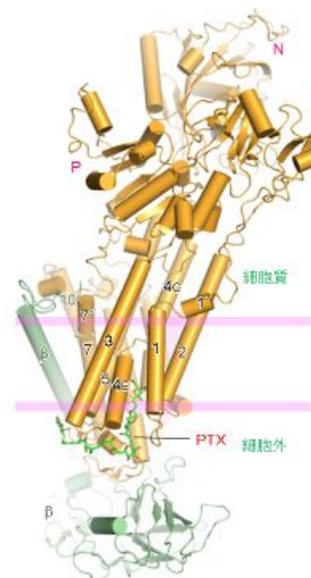


Fig. 4. PTX と結合した E2P_i 状態の構造

現状の回折データを元に分子置換法にて構造精密化を行った結果、PTX 全体のおよそ半分を構造決定できた。結合した PTX は細胞外側ゲートに結合していることが分かった(Fig. 4)。この場所はウアバインなどに代表される強心配糖体の結合部位と同じであり、PTX と強心配糖体の結合が競合するという生化学的事実とよく一致する結果である。PTX はペプチドに例えるとおよそ 34 残基分の長さに相当するが、その片側の末端にあるアミノ基は細胞外側のクレフトに奥深く入り込み、膜貫通領域内のイオン結合部位までおよそ 8 Å の位置に迫っていた。PTX と結合していない E2P_i 状態と構造比較すると、ほとんどの部分は変わらないものの、膜貫通ヘリックス M1-4、6 のバンドルは PTX の結合により細胞外側に向かうほど“開いた”構造になっていることが分かった。

一方、結合した PTX の構造未決定部分について、重原子同型置換法による構造決定を試みた。しかし、結晶化条件に高濃度の塩を含むせいか、ことごとく重原子置換体の調製に失敗し、構造決定できなかった。そこで、得られた結晶を一旦、低濃度の塩を含む溶液に移してから重原子置換体を調製したところ、ようやく鉛や水銀の重原子置換体を得ることができた。現在、重原子同型置換法による位相決定を試みている。

(2) その他の中間状態と PTX の複合体結晶解析について

既に単独の結晶化条件が決まっている中間状態(E1~P·ADP·3Na⁺, E2·P_i·2K⁺)について、共結晶化およびソーキング実験を行ったが、いずれもPTXの結合は見られなかった。また、E2P_i状態についてはATPを添加して結晶化を試みているが、今のところ、良好な結晶は得られていない。さらに、無機リン酸を使用してE2P_i状態の結晶を得た後、ATPをソークしてE2P_i状態が得られるか試したが、得られた結晶構造にはATPもしくはADPは結合しておらず、E2P_i状態の構造と変わらなかった。結晶化条件が不明なE1状態についてはPTX存在下で結晶化スクリーニングから行ったところ、微結晶が得られ、低分解能の回折データを得ることができた。分子置換法により構造精密化したところ、PTXらしきものは確認できなかった。しかし、E1状態の結晶構造は新規であり、Na⁺,K⁺-ATPaseのNa⁺選択性の仕組みを理解する上で非常に重要な構造になるので、本課題から生じた重要な副産物として現在も継続して実験を行っている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Xingya Xu, Ryuta Kanai, Nobuhiko Nakazawa, Li Wang, Chikashi Toyoshima and Mitsuhiro Yanagida*: Suppressor mutation analysis combined with 3D modeling explains cohesin's capacity to hold and release DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* (査読有) vol.115, 2018, pp.E4833-E4842.

doi: 10.1073/pnas.1803564115.

〔学会発表〕(計 3 件)

金井隆太、中路絢美、淡島美香、乗松良行、豊島近、「BHQ 誘導体と結合したカルシウムポンプの結晶構造解析」、第91回日本生化学会大会(京都)、2018

Ryuta Kanai, Bente Vilsen, Flemming Cornelius and Chikashi Toyoshima, “Crystal structures of Na⁺,K⁺-ATPase revisited”, The 15th International Conference on Na,K-ATPase and Related Transport ATPases (大津), 2017

金井隆太、杖田淳子、中路絢美、小川治夫、椋島佳樹、豊島近、「Visualization of the lipid bilayer in crystals of ion pumps」、第90回日本生化学会大会(神戸)、2017

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/StrBiol/index.html>

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名： ベンテ ビールセン

ローマ字氏名： Bente Vilsen

研究協力者氏名： フレミング コルネリウス

ローマ字氏名： Flemming Cornelius

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。