

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06148

研究課題名(和文) Na<sup>+</sup>ポンプによるNa<sup>+</sup>の選択機構の構造生物学的研究研究課題名(英文) Structural basis for Na<sup>+</sup>-selectivity of the sodium pump

研究代表者

金井 隆太 (Kanai, Ryuta)

東京大学・定量生命科学研究所・特任助教

研究者番号：50598472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseは全ての動物細胞の細胞膜に局在し、ATP 1分子の加水分解エネルギーを利用して3個のNa<sup>+</sup>を細胞外へ、2個のK<sup>+</sup>を細胞内へ濃度勾配に逆らって輸送する膜蛋白質である。Na<sup>+</sup>の選択的輸送の理解に向けてNa<sup>+</sup>を結合した直後の状態、すなわちE1・3Na<sup>+</sup>状態の構造解析を行った。また、E1・3Na<sup>+</sup>状態の結晶を用いて、E1・Mn<sup>2+</sup>状態の構造、ATPアナログと結合したE1・3Na<sup>+</sup>状態およびE1・Mn<sup>2+</sup>状態の構造も明らかにした。これらの構造解析から、Na<sup>+</sup>ポンプはNa<sup>+</sup>を結合した時のみ磷酸化状態に進める、言わば安全装置のような仕掛けがあることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseは生体内ATPの60%以上を消費するとも言われ、それによって形成されるイオン濃度勾配は様々な生命活動の基盤を成している。Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseの異常は神経変性など多くの疾患の原因となるだけでなく、癌などに対する薬剤標的としてもNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseは有用であることが多く示されている。したがって、その能動輸送の詳細な理解は学術的にも産業的にも重要である。本研究はなぜ、Na<sup>+</sup>だけを選択的に輸送できるのか、その仕組みを原子レベルで明らかにした。その巧妙な仕組みは学術的に興味深いだけでなく、遺伝性疾患におけるNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseの異常の理解にも役立つものである。

研究成果の概要(英文)：Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, which is localized in plasma membrane of all mammalian cells, actively transports three Na<sup>+</sup> into extracellular medium and two K<sup>+</sup> into cytoplasm with one ATP molecule hydrolyzing. In order to evaluate the mechanism of Na<sup>+</sup>-selective transport by Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, we determined its crystal structure in E1.3Na<sup>+</sup>. In addition, the crystal structures of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in E1.Mn<sup>2+</sup> and both states bound a ATP analogue were also determined using E1.3Na<sup>+</sup> crystals. These structures showed a safety mechanism of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase to forward phosphorylation only when three Na<sup>+</sup> ions are bound at the transmembrane sites.

研究分野：構造生物学

キーワード：Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase イオン能動輸送 膜蛋白質 X線結晶構造解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase ( $\text{Na}^+$ ポンプ)は全ての動物細胞の細胞膜に局在し、ATP 1 分子の加水分解エネルギーを利用して 3 個の  $\text{Na}^+$ を細胞外へ、2 個の  $\text{K}^+$ を細胞内へ濃度勾配に逆らって輸送する膜蛋白質である。こうして形成されるイオン濃度勾配は神経の電気信号、浸透圧、物質輸送などに用いられ、生命活動に必須である。 $\text{Na}^+$ ポンプのイオン輸送機構は  $\text{Na}^+$ に高親和性な状態(E1 状態)と低親和性な状態(E2 状態。相対的に  $\text{K}^+$ に対して高親和性。)の 2 つの状態、細胞質側および細胞外側のゲートの開閉より説明される。非磷酸化状態(E1)では細胞質側ゲートが開いており、細胞質内の  $\text{Na}^+$ を結合する。ATP と結合し、 $\text{Na}^+$ ポンプが磷酸化する過程で、細胞質側ゲートが閉じる (E1  $\cdot$  P-ADP $\cdot$ 3 $\text{Na}^+$ )。ADP が遊離すると、ただちに磷酸化 E1 から磷酸化 E2 へ状態変化 (E1P  $\rightarrow$  E2P)し、細胞外側ゲートが開く。こうして  $\text{Na}^+$ を細胞外側へ排出し、細胞外側の  $\text{K}^+$ を結合すると同時に細胞外側ゲートを閉じ、脱磷酸化反応が生じる (E2 $\cdot$  P $_i$  $\cdot$ 2 $\text{K}^+$ )。そして、磷酸基の遊離と同時に E2 から E1 へ変化し、細胞質側ゲートを開く。こうして  $\text{K}^+$ は細胞質内へ放出される。このように磷酸化・脱磷酸化反応、イオンに対する親和性の変化、ゲートの開閉、これら 3 つのイベントは精緻に連動している。その実体とはどのようなものであろうか。

先行する  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプの詳細な構造研究からイオンポンプにおける磷酸化・脱磷酸化反応とゲートの開閉の連動機構はかなりよく分かってきた。このような機構は  $\text{Na}^+$ ポンプでもおそらく同一である。一方、イオンに対する結合親和性の制御は  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプと  $\text{Na}^+$ ポンプの間で大きく異なるだろう。 $\text{Ca}^{2+}$ ポンプは  $\text{Ca}^{2+}$ に対して  $\mu\text{M}$  オーダーの親和性を持ち、およそ 1 万倍の濃度差に逆らって輸送するのに対し、 $\text{Na}^+$ ポンプは  $\text{Na}^+$ に対して mM オーダーの親和性しかなく、10 倍程度の濃度差に逆らって輸送するだけで、 $\text{Na}^+$ 結合は”ゆるい”ように見える。しかし、 $\text{Na}^+$ ポンプによる ATP からの磷酸化反応は  $\text{Na}^+$ 依存性であり、高い  $\text{Na}^+$ 選択性を併せ持っている。代表者らは  $\text{Na}^+$ 結合状態(E1  $\cdot$  P-ADP $\cdot$ 3 $\text{Na}^+$ )の高分解能の結晶構造解析から 3 個の  $\text{Na}^+$ 結合の構造を世界で初めて明らかにした。その構造から 3 個の  $\text{Na}^+$ の段階的結合機構を提案し、Nature 誌に掲載されるなど高い評価を受けた。

### 2. 研究の目的

一方で、E1  $\cdot$  P-ADP $\cdot$ 3 $\text{Na}^+$ 状態の  $\text{Na}^+$ 結合構造は理想的な配位構造からかけ離れているだけでなく、結晶中の非対称単位にある 2 分子の  $\text{Na}^+$ ポンプ間で  $\text{Na}^+$ 結合構造は異なっていた。さらに結合部位 I, II では  $\text{K}^+$ でも結合しうる構造であるなど、 $\text{Na}^+$ 選択的輸送について、いくつかの疑問が残った。E1  $\cdot$  P-ADP $\cdot$ 3 $\text{Na}^+$ 状態は既に両側ゲートを閉じているため、 $\text{Na}^+$ を逆流させる心配はない。したがって、その状態では必ずしも  $\text{Na}^+$ 選択的である必要はなく、むしろ、 $\text{Na}^+$ の遊離に向けた遷移状態かもしれない。そこで、 $\text{Na}^+$ の選択的輸送の理解に向けて  $\text{Na}^+$ を結合した直後の状態、すなわち E1 $\cdot$ 3 $\text{Na}^+$ 状態の構造決定に取り組むことにした。E1 $\cdot$ 3 $\text{Na}^+$ 状態では細胞質側ゲートが開いていることから、E1  $\cdot$  P-ADP $\cdot$ 3 $\text{Na}^+$ 状態との構造比較により ATP 結合・磷酸化に伴う細胞質側ゲートの閉塞の仕組みも明らかにできるだろう。

### 3. 研究の方法

#### 実験(1) E1 $\cdot$ 3 $\text{Na}^+$ 状態の構造解析

既に我々は E1 $\cdot$ 3 $\text{Na}^+$ 状態と考えられる結晶を得ており、約 4 Å 分解能で構造決定に成功してい

た。しかし、結合した  $\text{Na}^+$  の解像のためには  $3 \text{ \AA}$  を超える分解能が欲しい。そこで、得られた結晶の分解能の向上を目指して、結晶の脱水処理、結晶化における界面活性剤、脂質の種類の検討、カラム精製による試料純度の向上、脱糖鎖処理などを試し、回折測定・構造決定を行った。

#### 実験(2) $\text{E1} \cdot n\text{X}$ 状態の構造解析

そもそも  $\text{E1}$  状態では  $\text{Na}^+$  以外のイオンは結合できないのだろうか。もし、結合できるならば、 $\text{E1} \cdot 3\text{Na}^+$  状態の構造と何が異なるのだろうか。これらの問いに答えるために、得られた  $\text{E1} \cdot 3\text{Na}^+$  状態の結晶を、 $\text{Na}^+$  の代わりに異なる陽イオンを含む結晶化溶液にソークし、回折測定・構造決定を行った。また、 $4 \text{ mM}$   $\text{Mg}^{2+}$  存在下でのクライオ電顕解析も行った。

#### 実験(3) ATP アナログと結合した $\text{E1}$ 状態の構造解析

$\text{Na}^+$  あるいは異なるイオンが結合した状態で ATP が結合した時、 $\text{Na}^+$  が結合した場合のみ磷酸化状態へと進行できるはずである。磷酸化状態への移行を決めているものは何かを明らかにするために、 $\text{E1} \cdot 3\text{Na}^+$  状態および  $\text{E1} \cdot \text{Mn}^{2+}$  状態の結晶を ATP アナログにソークし、それらの回折測定と構造決定を行った。

#### 実験(4) $\text{E1} \cdot 3\text{Na}^+$ 状態の形成過程の構造解析

3 個の  $\text{Na}^+$  の段階的、協同的結合の過程を明らかにするために、得られた  $\text{E1} \cdot 3\text{Na}^+$  結晶を用いて段階的に低濃度  $\text{Na}^+$  存在下の結晶化溶液にソークし、それらの回折測定、構造決定を行った。

#### 実験(5) $\text{E1} \cdot 3\text{Na}^+$ 結晶内の脂質二重膜の可視化

当初、想定していなかったが、課題(1)にて  $\text{E1} \cdot 3\text{Na}^+$  結晶の分解能を改善できたので、急遽、追加した実験である。イオン能動輸送機構の理解には脂質二重膜を含めた構造解析が不可欠であるが、これまで脂質二重膜の可視化に適した  $\text{Na}^+$  ポンプ結晶を得ることができなかった。そこで、 $\text{E1} \cdot 3\text{Na}^+$  結晶を用いて、膜の可視化を目的としたコントラスト変調法および重原子同型置換法のための結晶調製と回折実験を行った。

## 4. 研究成果

### 実験(1)

様々な試行錯誤の結果、出来た結晶を 30% PEG2000MME を含み、かつ、結晶化溶液に含まれていた  $\text{MgCl}_2$  を  $\text{MnCl}_2$  に置換した溶液に結晶をソークしたところ、 $3 \text{ \AA}$  を超える回折点を得ることができた。その結果、3 個の  $\text{Na}^+$  が結合した構造を  $2.8 \text{ \AA}$  分解能で構造決定することができた(図 1)。得られた  $\text{Na}^+$  配位構造は  $\text{E1} \cdot \text{P} \cdot \text{ADP} \cdot 3\text{Na}^+$  状態の配位構造と本質的には変わらなかった。一方で、site III の  $\text{Na}^+$  は Asp926 側鎖に寄って強く結合し、M5 ヒンジの傾きが変化していることが分かった。 $\text{E1} \cdot \text{P} \cdot \text{ADP} \cdot 3\text{Na}^+$  状態に至った時に P ドメインの磷酸化に伴う M5 の僅かな構造変化で site III  $\text{Na}^+$  の結合親和性が弱められるのかもしれない。また、 $\text{E1} \cdot 3\text{Na}^+$  状態では細胞質側ゲートが開き、site I, II は  $\text{K}^+$  ですら外部からアクセスできるほど開いた構造である一方、site III は M5-M6 によって遮蔽されている。site III への  $\text{Na}^+$  結合は正反応を進める大事なステップであり、M5-M6 による遮蔽は逆反応を起こしにくくするためのロックと考えられる。一方で、M5-M6 による遮蔽は site I, II への  $\text{Na}^+$  結合と連動して起きており、site I, II が外部からアクセスできる状況では他の陽イオンが入り込み、結合した  $\text{Na}^+$  と置換することで容易にそのロックが解除されるかもしれない。

### 実験(2)



図 1 構造決定した  $\text{E1} \cdot 3\text{Na}^+$  の状態の結晶構造。ピンクの球は  $\text{Na}^+$  を示す。

E1.3Na<sup>+</sup>状態の結晶を Na<sup>+</sup>の代わりに異なる陽イオンを含む溶液にソークしたところ、多くの場合において結晶は劣化、崩壊してしまいましたが、Mg<sup>2+</sup>あるいは Mn<sup>2+</sup>を含む溶液では高分解能で構造決定することができた。それらの構造はほぼ同一であり、site I と site III の間の位置 site M に Mg<sup>2+</sup>もしくは Mn<sup>2+</sup>が 1 個結合していた(図 2)。全体構造は E1.3Na<sup>+</sup>状態とよく似ているが、M4 ヘリックスはわずかに細胞外側にシフトし、M6 ヘリックスの途中は E2 状態の構造のようにヘリックス構造が大きくほどけ、M2、M4 側にせり出した格好であった。E1 P·ADP·3Na<sup>+</sup>状態の構造になるためには E1.3Na<sup>+</sup>状態の M4 ヘリックスが細胞質側に持ち上がることが必須だが、E1.Mn<sup>2+</sup>、E1.Mg<sup>2+</sup>状態におけるこうした違いは M4 ヘリックスの細胞質側へのシフトが起こせないようにしていると考えられた。すなわち、磷酸化状態になるためには 3 個の Na<sup>+</sup>が正しい場所に結合して、M6 ヘリックスのほどけを正しいヘリックス構造に巻き戻すことが必要であると示唆された。これらの結晶構造解析では 40 mM 以上の高濃度 Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>を含み、およそ生理的条件とは言えないが、4 mM Mg<sup>2+</sup>存在下の E1.Mg<sup>2+</sup>状態のクライオ電顕構造はそれらの結晶構造と類似しており、生理的条件でもとりうる構造であることが確認できた。

### 実験(3)

磷酸化反応に向けて生じる構造変化を見積もるために、E1.3Na<sup>+</sup>および E1.Mn<sup>2+</sup>結晶を ATP アナログである AMP-PCP(ACP)をソークした。その結果、両状態とも明瞭に ACP の結合を確認できた。現在、構造精密化中で、全体構造の変化はさほどないものの、細胞質ドメインはわずかに、ACP の結合に伴って閉じた構造であることが分かった。

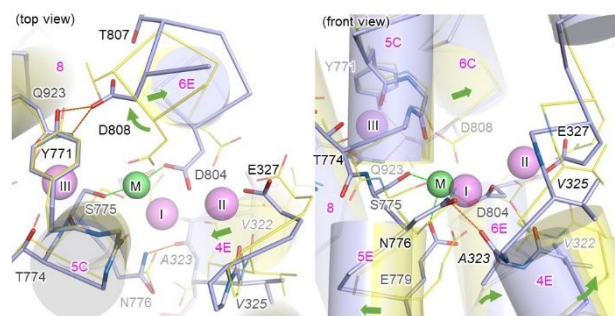


図 2 E1.3Na<sup>+</sup>(黄)と E1.Mn<sup>2+</sup>(紫)の膜貫通領域内イオン結合サイトの比較。ピンクの球は Na<sup>+</sup>を、緑の球は Mn<sup>2+</sup>を示す。

### 実験(4)

1 個の Mn から 3 個の Na に置き換わる過程を明らかにするために、E1.3Na<sup>+</sup>結晶を用いて様々な濃度の Na/Mn の組み合わせの溶液条件にソークし、中間構造の決定を試みた。その結果、濃度依存的に E1.Mn<sup>2+</sup>状態と E1.3Na<sup>+</sup>状態の分布が変わる様子は確認できたが、変化は連続的であり、残念ながら具体的な中間構造の決定までには至らなかった。

### 実験(5)

溶媒コントラスト変調法および重原子クラスターを用いた重原子同型置換法による膜の可視化のために、変調剤もしくは重原子クラスターを含む結晶化溶液に結晶をソークし、回折実験を行った。その結果、E1.3Na<sup>+</sup>結晶はこれまでの Na<sup>+</sup>ポンプ結晶と異なり、変調剤や重原子クラスターの添加による結晶性の低下や変化、また同型性の問題がほとんどなく、本法に適した結晶であることが分かった。そこで、まずは解析方法が確立している溶媒コントラスト変調法による脂質二重膜の可視化を目指した。その結果、70% 変調剤を含む結晶の回折測定まで終了し、予備的解析から脂質二重膜を示す初期電子密度マップを得ることができた。

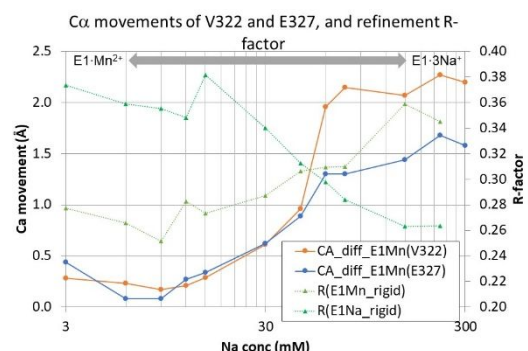


図 3 Na<sup>+</sup>濃度変化と構造変化(実線)および構造精密化 R 因子(点線)の関係。構造変化は M4 ヘリックス上の V322, E327 の C 原子の位置を指標としている。R 因子は E1.3Na<sup>+</sup>構造(緑)、E1.Mn<sup>2+</sup>構造(灰)に対する値。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanai Ryuta, Cornelius Flemming, Ogawa Haruo, Motoyama Kanna, Vilsen Bente, Toyoshima Chikashi	4. 巻 118
2. 論文標題 Binding of cardiotonic steroids to Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase in the E2P state	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2020438118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2020438118	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 該当する

1. 著者名 Xu Xingya, Kanai Ryuta, Nakazawa Norihiko, Wang Li, Toyoshima Chikashi, Yanagida Mitsuhiro	4. 巻 115
2. 論文標題 Suppressor mutation analysis combined with 3D modeling explains cohesin's capacity to hold and release DNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E4833 ~ E4842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1803564115	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 Sakuragi Takaharu, Kanai Ryuta, Tsutsumi Akihisa, Narita Hiroataka, Onishi Eriko, Nishino Kohei, Miyazaki Takuya, Baba Takeshi, Kosako Hidetaka, Nakagawa Atsushi, Kikkawa Masahide, Toyoshima Chikashi, Nagata Shigekazu	4. 巻 28
2. 論文標題 The tertiary structure of the human Xkr8-Basigin complex that scrambles phospholipids at plasma membranes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 825 ~ 834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-021-00665-8	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金井隆太, Bente Vilsen, Flemming Cornelius, 豊島近
2. 発表標題 Crystal structure of Na <sup>+</sup> -bound Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase in an unphosphorylated state
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 恒川直樹、豊島近
2. 発表標題 量子化学計算による蛋白質内水素結合ネットワークの網羅的解析
3. 学会等名 第13回分子化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金井隆太、中路絢美、淡島美香、乗松良行、豊島近
2. 発表標題 BHQ誘導体と結合したカルシウムポンプの結晶構造解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井隆太、Bente Vilsen, Flemming Cornelius, 豊島近
2. 発表標題 Na <sup>+</sup> を結合した、非磷酸化状態のNa <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPaseの結晶構造解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://www.iqb.u-tokyo.ac.jp/StrBioI/index.html">https://www.iqb.u-tokyo.ac.jp/StrBioI/index.html</a>
---

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
研究 分 担 者	恒川 直樹  (Tsunekawa Naoki)  (90638800)	東京大学・定量生命科学研究所・特任研究員    (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関