

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成29年 5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：特別推進研究

研究期間：2011～2015

課題番号：23000014

研究課題名（和文）薬剤開発を視野に入れた膜輸送体の構造研究

研究課題名（英文）Structural biology of membrane transporters with a view to drug development

研究代表者

豊島 近 (TOYOSHIMA, Chikashi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：70172210

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）405,600,000円

研究成果の概要（和文）：

本研究は、イオン能動輸送機構の完全な理解を第一の目標とし、Ca<sup>2+</sup>ポンプと医学的にはより重要ともいえる Na<sup>+</sup>ポンプの結晶構造解析によって、イオンポンプは「どうしてそういう構造をとる必要があるのか」を追求した。その結果、長く待たれていた Ca<sup>2+</sup>ポンプの E1 状態の結晶化に成功し、調節蛋白質サルコリピンによるポンプ制御機構の解明にも成功した。また、Na<sup>+</sup>ポンプの Na<sup>+</sup>結合状態の初の構造決定に成功し、精緻なイオン選択機構を解明するとともに、強心ステロイドとの複合体の構造決定を行い、組織特異的薬剤開発への道を開いた。さらに、4 状態の Ca<sup>2+</sup>ポンプ結晶中の脂質二重膜の可視化に成功し、磷脂質との相互作用の詳細を解明した。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we aimed at complete understanding of the mechanism of active transport and pursued “why the structures of ion pumps have to be so” by carrying out crystal structure analyses of Ca<sup>2+</sup>- and Na<sup>+</sup>-pumps. With the Ca<sup>2+</sup>-pump, we succeeded in elucidating the long-awaited E1 crystal structure and showed the regulatory mechanism of sarcolipin, an associated regulatory protein. With the Na<sup>+</sup> pump, we succeeded in determining the crystal structure of a Na<sup>+</sup>-bound form for the first time, resulting in the elucidation of an intricate mechanism for selecting Na<sup>+</sup>. We also determined the crystal structures of the Na<sup>+</sup>-pump with various cardiotonic steroids and thereby opened a way towards developing a tissue specific compound. Furthermore, we succeeded in visualising lipid bilayers in the crystals of Ca<sup>2+</sup>-ATPase in four states and described detailed interactions with phospholipids.

研究分野：

キーワード：イオンポンプ、膜蛋白質、結晶解析、エネルギー変換

### 1. 研究開始当初の背景

私達はP型イオン輸送ATPase(ポンプ)を代表するCa<sup>2+</sup>ポンプ(Ca<sup>2+</sup>-ATPase, SERCA1a)と、医学的にはより重要ともいえるNa<sup>+</sup>ポンプ(Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase)の原子構造に基づく能動輸送機構の理解を目指し、研究を続けてきた。いずれも生体の恒常性の維持に極めて重要な役割を持つ膜蛋白質である。従って、心臓病や癌、感染症の治療などの観点からもイオンポンプは注目を集めてきた。

P型ATPaseの結晶構造解析には、私達が2000年に筋小胞体Ca<sup>2+</sup>ポンプの最初の結晶構造(2Ca<sup>2+</sup>を結合した状態)を発表して以来、多くのグループが取り組むようになった。この2000年の論文は、20年以上誰も出来なかった初のイオンポンプの結晶化であり、それまでの常識に反し外から燐脂質を加えて結晶化するという新手法を導入したものであった。Ca<sup>2+</sup>研究のランドマークであり真の飛躍をもたらしたものと評価されている。また、一連の研究によって明らかにされた構造変化の大きさと、ありえないと考えられていた膜貫通ヘリックスの再配置は大きな驚きをもって迎えられた。

2003年迄は独走していたが2004年からはデンマーク・フランスグループと熾烈な競争になった。構造解析の中心はNa<sup>+</sup>ポンプに移りつつあったが、ここでも私達は初の高分解能構造(2009)と強心配糖体との複合体の構造(2009)の決定に成功した。この結果、定説が誤っていたことが判明し、大きなインパクトを与えた。

また原子構造に基づく変異体の研究をInesi教授グループと行うことにより、個々の残基の役割を明らかにしてきた。さらに、分子動力学計算をも取り入れた新しい研究を行い、他のイオンポンプの解析を通じて、「どうしてそういう構造でなければならないのか」という問いにもアプローチしてきた。

変異体の構造解析には効率の良い発現系が必要であるが、私達の研究室でも高等動物培養細胞による発現系(アデノウィルス・COS細胞系)が稼動しだし、構造研究の対象は大幅に広がった。この結果、第二の目標に掲げる「人類の脅威となっている生物の膜輸送体の構造研究」への道筋がついた。

### 2. 研究の目的

本研究の目指すところは大きくは2つあった。第一に、イオン能動輸送機構の完全な理解であり、「どうしてそういう構造でなければならないのか」を理解することである。第二に、ようやく申請者の研究室でも稼動するようになった高等動物細胞を含む大量発現系を用いて、変異体の構造研究を行うとともに、マラリア原虫や結核菌など、人類の脅威となっている生物の膜輸送体を大量生産してその構造を決定し、薬剤開発への道をつけることである。

### 3. 研究の方法

「構造はどうしてそうでなければならないのか」を理解するためには、イオン輸送サイクルの反応中間体のすべてを結晶化し、X線結晶解析によって構造決定し、得られた原子モデルを分子動力学計算・量子化学計算によって検討する必要がある。さらに、特定のアミノ酸残基の役割を理解するためには変異体の構造決定を同様にこなす必要がある。構造解析の出発点は高度に精製された蛋白質標品であり、このような研究には莫大な量の蛋白質が必要となる。イオンポンプは大型の膜蛋白質であり、主としてアデノウィルス・COS細胞系を用いて蛋白質生産を行なう。第一段階の精製にはHaloタグを用いる。

### 4. 研究成果

(1) 筋小胞体Ca<sup>2+</sup>-ATPaseの残された中間状態と変異体の高分解能構造決定: Ca<sup>2+</sup>ポンプに関しては、その反応過程のほぼ全体をカバーする9つの状態の結晶構造を決定し、能動輸送のメカニズムの大略を原子構造に基づいて明らかにすることができたが、Ca<sup>2+</sup>結合に伴う構造変化は非常に大きく、2個ある結合部位の1個にCa<sup>2+</sup>が結合することで何が起こるかも依然不明であった。また、最近になって、Ca<sup>2+</sup>非結合時には、pH7以上であれば、Ca<sup>2+</sup>に対し低親和性のE2ではなく高親和性のE1状態にあり、mMのMg<sup>2+</sup>が存在するため、多くはCa<sup>2+</sup>の結合が促進されるE1·Mg<sup>2+</sup>構造をとることが判明した。従って、研究の主眼はE2 → E1·Mg<sup>2+</sup> → E1·Ca<sup>2+</sup> → E1·2Ca<sup>2+</sup>の構造変化を解明することにあり、3つの中間体構造を決定し発表した(論文11; 図1)。

E1·Mg<sup>2+</sup>状態結晶構造では、予想に反しMg<sup>2+</sup>は側鎖のみからなるCa<sup>2+</sup>サイトIではなくIとIIの間に結合していた。Ca<sup>2+</sup>結合に伴う大きな構造変化の大半は既に起こっており、Mg<sup>2+</sup>はCa<sup>2+</sup>の結合を加速することが良く説明された。この状態でサイトIIは完全に破壊され、サイトIはほぼ形成され開放されていた。これは、Mg<sup>2+</sup>では小さすぎてCa<sup>2+</sup>サイトには結合できないためと考え、Ca<sup>2+</sup>とMg<sup>2+</sup>との中間の大きさのMn<sup>2+</sup>を含む溶液に結晶を浸漬し構造を決定し、構造変化を確認

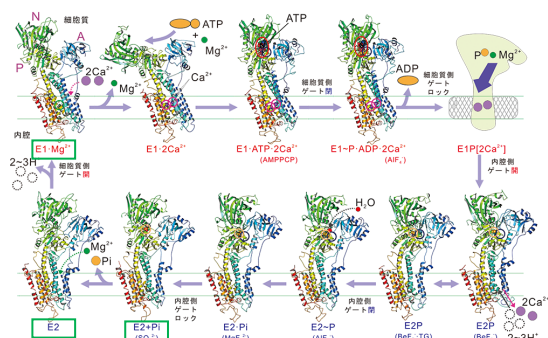


図1. 筋小胞体Ca<sup>2+</sup>ポンプ(SERCA1a)の反応サイクルと構造変化。□は本研究で新たに追加された3つの中間体。

した(未発表)。一方で  $Mn^{2+}$  が  $Ca^{2+}$  と同じメカニズムで輸送されることを確認するため、 $Ca^{2+}$  との競合実験を行い、協働性や結合定数等を決定した(論文 2)。

変異体に関する重要な進歩は **Glu309** 変異体の複数の状態の構造決定である(未発表)。この残基は膜内イオン通路のゲートであり、2 個目の  $Ca^{2+}$  に蓋をする形で配位し、 $Ca^{2+}$  結合が完了したことを燐酸化サイトに伝える重要な役割を持つと考えられている。特に **Gln** 変異体は E2 状態で極めて大きな構造変化を起こしており、膜貫通ヘリックスの配置は M1, M2 を除き E2 様であるが、細胞質領域は三つのドメインが集まって閉じた E2 様ではなく、開いており、A ドメインは  $E1 \cdot Mg^{2+}$  における位置とほぼ同一であった。このことは、これまでの考えとは異なり、閉じた細胞質領域は E2 状態の本質ではなく、 $Ca^{2+}$  に配位する **Glu771-Asn796** 間の水素結合(つまり **Glu771** のプロトン化)が E2 状態の本質であること、E2 状態は M5 が大きく湾曲して歪がかかった状態であることが理解された。一方で、このような大規模な構造変化がプロトン化された **Glu** を **Gln** に置換すること、つまり一つのプロトン化カルボキシル基のアミド基への置換でおこることは驚きであった。そこで量子化学計算を行なってその違いを調べたところ、アミド-カルボニル間の水素結合距離は 3.2 Å であり、プロトン化カルボキシル-カルボニル間は 2.8 Å と異なることがわかった。つまり、M4 ヘリックスのヒンジにおける僅か 0.4 Å の差を大きく拡大する機構が  $Ca^{2+}$  ポンプには備わっているのである。 $Na^+$  ポンプサイト III における  $Na^+$  と  $K^+$  の選別機構(後述)との類似が注目される。

医学的側面からはポンプの生理的制御機構の解明が重要である。この点に関する大きな進歩は、制御蛋白質サルコリピン(SLN)との複合体の構造決定である(論文 11)。SLN は骨格筋(速筋)と心房に存在し、筋肉由来の熱発生と脂肪の燃焼に重要な働きがあり、肥満に関係するとの報告もある。また、心筋における  $Ca^{2+}$  ポンプの制御蛋白質でありアドレナリンシグナルの直接の受け手であるフォスフォランパン(PLN)の同族である。驚いたことに、 $E1 \cdot Mg^{2+}$  状態の結晶構造では、SLN が膜貫通ヘリックス M2, M9 間に結合していた(図 2)。通常の方法では SLN を SERCA1a 標品から除去できなかったため、野生型蛋白を発現させ結晶化した結果、SLN/PLN は  $E1 \cdot Mg^{2+}$  状態の構造を安定化することで、 $Ca^{2+}$

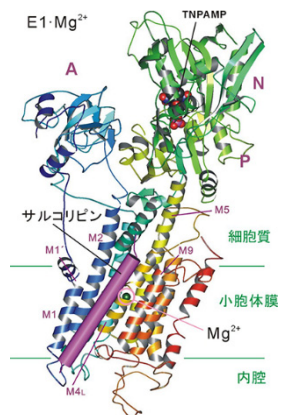


図 2.  $Ca^{2+}$  ポンプの  $E1 \cdot Mg^{2+}$  状態の構造とサルコリピン

結合に伴う M2 の運動を妨害することが明らかになった。これはイオンポンプの生理的制御機構の最初の構造的解明である。一方、薬剤開発の点からは、ある海産動物由来天然物が  $Ca^{2+}$  ポンプの強力阻害剤であることを見出し、その作用機序を  $Ca^{2+}$  ポンプとの共結晶を作製して解明した(論文 6)。また、心筋の  $Ca^{2+}$  ポンプ SERCA2A の結晶構造等、未発表のデータが多数あり論文を準備中である。

## (2) $Na^+K^+$ -ATPase の反応中間体の構造決定、薬剤や他の蛋白質・ペプチドとの複合体の構造決定: $K^+$ と結合した状態 ( $E2 \cdot Pi \cdot 2K^+$ ) の構造

を 2009 年に決定したが、 $Na^+K^+$ -ATPase は正方向には  $Na^+$  を厳密に選択して運搬するので、本質的に  $Na^+$  ポンプである。従って  $Na^+$  結合状態の方がはるかに重要である。ここでの問いは「 $Na^+K^+$ -ATPase の  $Na^+$  の親和性は  $K^+$  よりも低いのに、且つ対向輸送される  $K^+$  は一価の陽イオンならほぼ何でも良いのに、如何にして  $Na^+$  のみを厳密に選択し、しかも  $Ca^{2+}$  ポンプが  $Ca^{2+}$  を運搬するよりも速く  $Na^+$  を運搬できるのか」ということであった。Vilsen 教授提供の標品から  $E1 \sim P \cdot 3Na^+ \cdot ADP$  状態の構造を 2.8 Å 分解能で決定したところ、 $Na^+$  の選別と効率的な輸送のために、 $Na^+$  ポンプは幾つもの手段を用いていることが明らかになった(図 3)。その一つは 3 個の  $Na^+$  を段階的(III  $\rightarrow$  I  $\rightarrow$  II の順; 図 3b) 且つ協同的に結合することである。個々の  $Na^+$  結合部位は狭く、また非常に近接して配置されている。そのため  $K^+$  や  $Ca^{2+}$  は結合できない。つまり、3 個の  $Na^+$  を輸送するのは、効率のためだけではなく、選択性のためでもある。もう一つはサイト III の位置である。サイト III は 2 つに分かれた M5 ヘリックスのヒンジ部分に位置し、陽イオンの結合が細胞質側半分(M5c)の傾きを決定する。この傾きが正しい時にだけ、3 つある細胞質側ドメインは、N ドメインに結合した ATP によって P ドメインの Asp 残基が燐酸化可能な配置をとれる。つまり適切な大きさを持つイオン、すなわち  $Na^+$  だけが反応を進めることができるのであり、 $Na^+$  はアロステリックナリガンドとして機能するのである。また、抗生物質であるオリゴマイシンの結合様式を解明し、親和性を高める方策をも提示できた。以上の結果を *Nature* 誌に発表し大きな反響を得た(論文 8)。

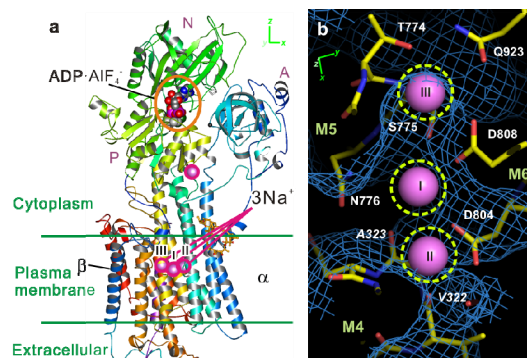


図 3. a.  $Na^+$  ポンプの  $E1 \cdot P \cdot 3Na^+$  状態の構造。b.  $Na^+$  結合部位を細胞質側から見たところ。紫の球:  $Na^+$ , 黄色の破線:  $K^+$  (仮想的)



一方、プロトンを対向輸送する  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプと異なり、 $\text{Na}^{+}$ ポンプは  $\text{K}^{+}$ を輸送するため、細胞外側イオン通路の研究には  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプにはない利点がある。そこで、 $\text{E2}\cdot\text{MgF}_4\cdot 2\text{K}^{+}$ 結晶を  $\text{Ti}^{+}$ を含む溶液に浸漬することにより、結合した  $\text{K}^{+}$ と  $\text{Ti}^{+}$ との置換実験を行った。ここで用いた  $\text{Ti}^{+}$ は  $\text{K}^{+}$ の代わりに輸送されるが、 $\text{K}^{+}$ よりも結合は強く、且つ重原子であるので、その X 線異常分散を置換率の指標にできることを利用した。生理学実験からは、ほぼサイト II に結合した  $\text{K}^{+}$ のみが時定数 17 秒で置換することがわかっていたが、結晶化溶液にはグリセロールや PEG が含まれるために粘性が高いことを反映し、この実験ではサイト I に結合した  $\text{K}^{+}$ も遅れて置換されたが、置換の時定数(サイト I で 105 秒、II で 41 秒)を決定でき、 $\text{K}^{+}$ の置換過程を時間と空間の両方の分解能を持って可視化できることを示すことができた(図 4)。また、結晶中の蛋白質の原子温度因子は、集団運動の成分と個々の原子のランダムな熱運動の成分にわけることができることを利用し、細胞外側ゲートの開閉とは M1-M4 ヘリックスの膜に対する傾斜の変化という集団運動であることを示し、サイト II の直下(細胞外側)にある Ile 側鎖の回転が開閉の鍵となること、また、阻害剤となる強心ステロイドはその回転を阻止することを示した(論文 4)。

$\text{Na}^{+}$ ポンプが作るナトリウム濃度勾配は多くの二次輸送体の駆動力ともなる。そのため、このポンプは多くの疾病と関係し、最近ではアルツハイマー病に深く関わることも判明している。その  $\alpha$  サブユニットには 4 種あり、薬剤には臓器特異性を持たす必要がある。実際、ジギタリスは 3 世紀にもわたって心不全に処方されてきたがリスクが高いのは、臓器特異性がないためである。臓器特異性を与える手段として糖部分の改変が考えられており、結合様式の詳細が求められている。そこで、ウアバイン、ジギトキシンに加え、制癌剤として注目されてきたブファリン、高血圧治療薬として臨床試験中のロスタフロキシム、新世代心不全治療薬と期待されるイスタロキシム等との共結晶化を E2P 条件下で行い構造を決定した。その結果、ステロイド骨格の僅かな修飾の違いによって糖鎖部分の配置が変わることが判明し、臓器特異性を与える可能性を開くことができた(未発表)。

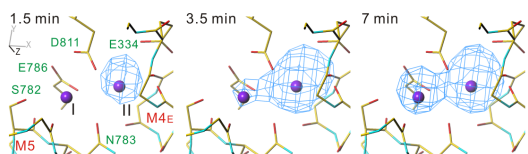


図 4.  $\text{Na}^{+}$ ポンプの  $\text{E2}\cdot\text{MgF}_4\cdot 2\text{K}^{+}$ 結晶を用いた  $\text{K}^{+}$ と  $\text{Ti}^{+}$ の置換実験。上に示した時間は置換開始後の時間を、網は置換後と置換前の電子密度の差のマップ(2.9 Å 分解能)。

(3) 植物液胞のプロトンポンプである  $\text{H}^{+}$ -PPase の高分解能構造決定:  $\text{H}^{+}$ -PPase は ATP ではなくピロリン酸(PPi)をエネルギー源とするプロトンポンプであり、他のポンプと

はまったく相同性がない。分子量 8 万、16 本の膜貫通ヘリックスから成り二量体を作る。高等動物には存在しないが、マラリア原虫等には存在し、栄養素取り込みに関わる輸送体へ駆動力を提供するので、抗マラリア薬の標的となる可能性もある。ピロリン酸アナログである PNP との複合体、産物である無機リン酸との複合体の結晶化に成功した。結晶を生理的条件下の溶液に浸漬したところ、基質なしの状態では細胞質側ゲートは閉じているが、ピロリン酸結合によってゲートが開いた状態から再び閉じた状態までの構造をとること、ピロリン酸の加水分解によって閉じた構造が安定化されることがわかった。この点は、 $\text{Ca}^{2+}$ ポンプにおける ATP 結合状態と共通である。だが、基質結合部位にある 5 個の  $\text{Mg}^{2+}$ が基質の結合と加水分解を制御しており、P 型 ATPase とは本質的に異なったメカニズムを持つことがわかった。現在、論文を執筆中である。

(4) 結晶中の脂質二重膜の可視化の新技术の開発: 脂質二重膜の可視化のために X 線コントラスト変調を利用することを考え、方法的開発とデータ収集を行ってきた。研究は 15 年かけて完成し、 $\text{Ca}^{2+}$ ポンプの 4 つの状態に関し、脂質二重膜を可視化することができた。状態によっては一分子も解像できなかった  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプを取り巻く個々の磷脂質をすべて(蛋白質一分子あたり約 40 個)解像することに成功し、磷脂質頭部の原子モデルを置くことができた。さらに、低角の位相はコントラスト変調から、高角の位相は原子モデルからとなるように位相を結合することで、通常の結晶学的精密化にも成功した。その結果、膜蛋白質と磷脂質の間には緊密でダイナミックな相互作用があること、特に、ともに膜の厚さに影響を与えることがわかっていた Lys/Arg と Trp とは明確に異なった役割を持ち協働していることなど、脂質二重膜はポンプ機能を果たすためのメカニズムの一部として組み込まれていることが判明した。

たとえば、膜の厚さは決して均一ではなく(図 5)、蛋白質を取り囲む磷脂質の数も変化することが判明した。それに伴って力が働くはずで、その力は構造変化の駆動力として使われる可能性がある。実際、膜内から側鎖を伸ばしている塩基性残基 Lys/Arg(「錨」)と結合している脂質は、膜貫通ヘリックスの運動に追従し、垂直な運動時には膜に局所的

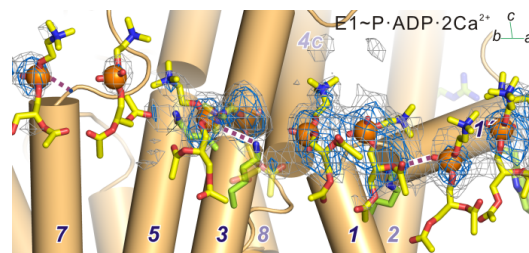


図 5.  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプの膜貫通ヘリックスを取り囲む磷脂質。磷脂質頭部の原子モデル(棒; オレンジ色の球は磷原子)と 3.2 Å 分解能での電子密度図(網; 灰色は  $0.7\sigma$  青色は  $1.0\sigma$ )。脂質二重膜に並行に見ている。

歪を生じさせ、元に戻す力を生み出す。一方、膜外(細胞質側)から磷脂質と結合する Arg は相手となる磷脂質を変え、その磷脂質を特定の状態を安定化するための「錨」として使っていた。

膜貫通ヘリックスの運動に伴って、ヘリックスの疎水性残基が溶媒に露出しないように、また親水性残基が脂質二重膜の疎水性部分に露出しないように、蛋白質側は種々の変化をしていた。特に、膜貫通ヘリックスの大きな運動を許すために、分子全体の傾きが変化すること(図 6)は驚きであった。このとき、4 つの Trp 残基が帯状に並び、溶媒と脂質の界面に存在する「浮き」となって、膜面と平行になっていた。Trp は磷脂質と結合する必要は無いので、膜貫通ヘリックスの大きな(~20 Å)膜面に沿った動きにも適している。

このように、本研究によって、磷脂質と膜蛋白質の相互作用の詳細が初めて明らかになり、膜蛋白質の構造研究に革新的な進展をもたらすことができた。この研究は *Nature* 誌の表紙にもなり、*News & Views* でも単独紹介された(論文 1)。

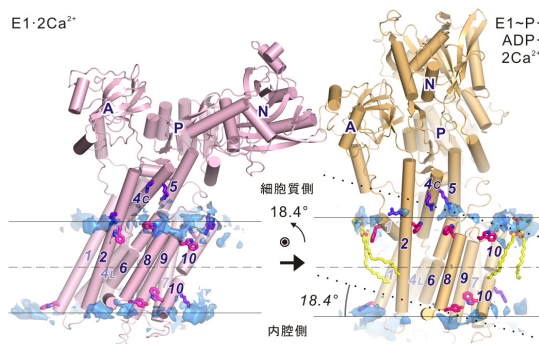


図 6.  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプの反応サイクルにおける分子全体の傾斜と脂質二重膜。E1- $2\text{Ca}^{2+}$  → E1~P~ADP- $2\text{Ca}^{2+}$  (結合した  $\text{Ca}^{2+}$ を膜内に閉じ込める過程)では分子全体が  $18.4^\circ$  傾斜する。Trp 残基を赤い棒で、水平線は磷脂質頭部(水色の塊)の位置を示す。

(5) 大型膜蛋白質大量生産系の確立: アデノウイルス・COS 細胞系による大量発現システムの最適化に成功し、分子量 10 万を超える高等動物膜蛋白質であるにもかかわらず、15cm 培養皿 40 枚(培養液 1L)から 2 mg の高度に精製された蛋白質を得ることができるようになった。また、マラリア原虫の  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプである PfATP6 の大量生産にも成功した。従って、ほぼ自由に結晶解析に十分な量のイオンポンプ蛋白質を得ることができるようになったと言える。

(6) 電子線結晶構造解析技術の開発: 電子線は X 線よりも 4-5 桁強く物質と相互作用するため、X 線回折にはかかからない微小(超薄)結晶でも構造決定が可能になると期待される。また、X 線の散乱振幅が電子密度を反映しているのに対し、電子線はクーロンポテンシャルを反映する。従って、酸性残基 (Asp や Glu) はよく解像されないという特徴があるが、プロトン化すれば見えるようになるため、プロ

トン化状態の実験的決定手段となる。本研究では、私達が 20 年以上かけて開発してきた電子線回折計を用いて  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプの超薄結晶から電子線回折データを収集し、僅か数層からなる結晶でもプロトン化状態を決定可能であることを証明した(論文 7)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

- ① Y. Norimatsu, K. Hasegawa, N. Shimizu and C. Toyoshima: Protein-phospholipid interplay revealed with crystals of a calcium pump. *Nature* 545, 193-198 (2017) doi: 10.1038/nature22357 査読有
- ② S. Yonekura, C. Toyoshima:  $\text{Mn}^{2+}$  transport by  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 590, 2086-2095 (2016) doi:10.1002/1873-3468.12244 査読有
- ③ C. Toyoshima, The road to understanding an ion pump, *Physica Scripta* 91, 042501 (2016) doi: 10.1088/0031-8949/91/4/042501 査読有
- ④ H. Ogawa, F. Cornelius, A. Hirata and C. Toyoshima: Sequential substitution of  $\text{K}^+$  bound to  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase visualised by X-ray crystallography. *Nature Commun.* 6, 8004 (2015) doi:10.1038/ncomms9004 査読有
- ⑤ Y. Zhao, H. Ogawa, C. Toyoshima, et al., Functional analysis of SERCA1b, a highly expressed SERCA1 variant in myotonic dystrophy type 1 muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 2042-2047 (2015) doi: 10.1016/j.bbadis.2015.07.006 査読有
- ⑥ M. Morita, H. Ogawa, O. Ohno, T. Yamori, K. Suenaga, C. Toyoshima: Biselyngbyasides, cytotoxic macrolides, are novel and potent inhibitors of the  $\text{Ca}^{2+}$  pumps with a unique mode of binding. *FEBS Lett.* 589, 1406-1411 (2015) doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.056 査読有
- ⑦ K. Yonekura, K. Kato, M. Ogasawara, M. Tomita and C. Toyoshima: Electron crystallography of ultrathin 3D protein crystals: Atomic models with charges. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 112, 3368-3373 (2015) doi: 10.1073/pnas.1500724112 査読有
- ⑧ R. Kanai, H. Ogawa, B. Vilsen, F. Cornelius and C. Toyoshima: Crystal structure of a  $\text{Na}^+$ -bound  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase preceding the E1P state. *Nature* 502, 201-206 (2013) doi: 10.1038/nature12578 査読有
- ⑨ C. Toyoshima, F. Cornelius: New crystal structures of PII-type ATPases: excitement continues. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 507-514 (2013) doi: 10.1016/j.sbi.2013.06.005 査読有
- ⑩ H. Haviv, M. Habeck, R. Kanai, C.

Toyoshima, and S.J.D. Karlish: Neutral phospholipids stimulate Na,K-ATPase activity: a specific lipid-protein interaction J. Biol. Chem. 288, 10073- 10081 (2013) doi: 10.1074/jbc.M112.446997 査読有

- ⑪ C. Toyoshima, S. Iwasawa, H. Ogawa, A. Hirata, J. Tsueda and G. Inesi: Crystal structures of the calcium pump and sarcolipin in the-Mg<sup>2+</sup>-bound E1 state. Nature 495, 260-264 (2013) doi: 10.1038/nature11899 査読有
- ⑫ F. Cornelius, R. Kanai, and C. Toyoshima: A structural view on the functional importance of the sugar moiety and steroid hydroxyls of cardiotonic steroids in binding to Na,K-ATPase. J. Biol. Chem. 288, 6602-6616 (2013) doi: 10.1074/jbc.M112.442137 査読有
- ⑬ N. Okamoto, H. Ogawa, C. Toyoshima, A new method for establishing stable cell lines and its use for large-scale production of human guanylyl cyclase-B receptor and of the extracellular domain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 426, 260-265 (2012) doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.077 査読有
- ⑭ C. Toyoshima, R. Kanai and F. Cornelius: First crystal structures of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: New light on the oldest ion pump. Structure 19, 1732-1738 (2011) doi: 10.1016/j.str.2011.10.016 査読有
- ⑮ F. Cornelius, Y.A. Mahmmoud and C. Toyoshima: Metal fluoride complexes of Na, K-ATPase. J. Biol. Chem. 286, 29882-29892 (2011) doi:10.1074/jbc.M111.259663 査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ① C. Toyoshima: “Structural biology of P-type ion translocating ATPase: towards complete understanding of the mechanism” Aminoff Prize Symposium2016, 2016.3.30, Gothenburg (Sweden)
- ② C. Toyoshima: “How Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase select and pumps sodium across the membrane”, “Visualization of lipid bilayers in the crystals of calcium pump”, 2nd NTU Protein Weeks, 2015.5.23,25,Taipei (Taiwan)
- ③ C. Toyoshima: “New crystal structures of Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase” Barcelona BioMed Conference Transporters and other molecular machines, 2014.11.17-19, Barcelona (Spain)
- ④ C. Toyoshima: “New crystal structures of Ca<sup>2+</sup>-and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPases”, Na, K-ATPase and Related Transport ATPases, 2014.8.30 -9.5, Lunteren (The Netherlands)
- ⑤ C. Toyoshima: “Structural Understanding of ion Pumping by P-type ATPases”, Benzon Symposium No.59, Structure, Function and

Dynamics, 2013.8.19-22, Copenhagen (Denmark)

- ⑥ C. Toyoshima: “Structural study on the calcium ATPase: ion pumping mechanism and its regulation”, The 1st NRPB International Symposium and Workshop for Membrane Proteins: From Structure to Drug Discovery, 2012.6.4, Taipei (Taiwan)
- ⑦ C. Toyoshima, Y. Norimatsu: “Do lipid bilayers follow movements of transmembrane helices? If so, to what extent?”, The EMBO Meeting 2011, 2011.9.12, Vienna (Austria)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

豊島 近 (TOYOSHIMA, Chikashi)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授  
研究者番号：70172210

### (2) 研究分担者

小川 治夫 (OGAWA, Haruo)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授  
研究者番号：40292726

三村 久敏 (MIMURA, Hisatoshi)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
研究者番号：30463904

金井 隆太 (KANAI, Ryuta)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
研究者番号：50598472

椛島 佳樹 (KABASHIMA, Yoshiki)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
研究者番号：00580573

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

Giuseppe Inesi  
カリフォルニアパシフィック医学センター  
研究所・教授

Bente Vilsen  
オルフス大学・教授

Flemming Cornelius  
オルフス大学・教授

Steven Karlish  
ワイズマン研究所・教授