

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23370058

研究課題名(和文) P型イオンポンプ作動機序特性の分子基盤とその異常による病態

研究課題名(英文) Molecular basis of P-type ion pumps and diseases caused by pump defects.

研究代表者

鈴木 裕 (SUZUKI, Hiroshi)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：50183421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円

研究成果の概要(和文)：P型カチオンポンプは共通のドメイン構造を持ち、共通のATP加水分解機構に共役して其々特異的カチオンを輸送する。本研究ではCa-ATPaseの部位特異的変異と速度論により、第二膜貫通ヘリックスの動きと二次構造変化が、細胞質ドメインの動きを膜内輸送部位に伝達して輸送を可能にすることを解明した。またメタルフッ素を利用して開発したリン酸化中間体の基底状態、遷移状態、生成物複合体の安定アナログを用い、各状態が有する特異的構造揺らぎの実態と役割を解明した。これらによりP型カチオンポンプ機構の包括的理解とポンプ分子異常による病態発症機構解明のための分子基盤確立に貢献した。

研究成果の概要(英文)：P-type ATPases possess common domain-structure and couple the ATP hydrolysis with the specific cation-transport. In this study, we first revealed by extensive mutations and kinetic analyses of Ca-ATPase that the second transmembrane helix plays critical roles via its motions and changes in its secondary structure for transferring the motions of cytoplasmic domains to the transmembrane cation transport sites there by for the energy coupling. We also revealed that unique structural fluctuation is equipped in each of the phosphoenzyme intermediates, and the fluctuation functions to accomplish the proper forward transport reaction. Thus we contributed to the comprehensive understanding of the P-type ATPase mechanism and an establishment of molecular basis for diseases developed by the pump defects.

研究分野：生化学

キーワード：P型カチオン輸送ATPase Ca-ATPase リン酸化反応中間体 反応中間体構造アナログ 筋小胞体 能動輸送 エネルギー共役 反応機構

1. 研究開始当初の背景

(1) P 型イオンポンプは筋小胞体 Ca^{2+} ポンプを中心とした速度論的研究、部位特異的変異体解析、反応中間体の生化学的構造、反応中間体の安定アナログ開発とその生化学的および結晶学的構造解析などにより、輸送のメカニズム理解が格段に進んできた(引用文献①)。その結果、ATP 分解の各反応素過程で細胞質の3つのドメインがどのように動き、それに伴い Ca^{2+} 輸送部位の構造がどのように変化するか、など、構造変化を介した触媒部位と輸送部位(すなわち細胞質ドメインと膜貫通ドメイン)の相互応答の仕組み、そして ATP 分解による Ca^{2+} 輸送のエネルギー共役機構の詳細がかなり明らかになっている。

(2) ① 我々のこれまでの研究成果で、リン酸化中間体の構造異性化とそれによる伴う Ca^{2+} 放出路開口、ならびにその加水分解に伴う放出路開口においては、細胞質の Actuator (A)ドメインの動きが本質的役割を果たしているであろうことが予想され、結晶構造でもその実態が明確に示されている。しかし、A ドメインの動きがどのように膜貫通領域の輸送部位に伝達され、上記の開閉(ゲーティング)に機能するか、その仕組み不明であった。特に A ドメインに連結した第二膜貫通ヘリックス(M2)の構造的役割は解明されなければならない重要課題として残されていた。② 我々のこれまでの研究成果により、リン酸化中間体の構造異性化の本質は A ドメインが90度以上も回転しPドメインと固く結合することであること、これによって生み出される構造的エネルギーが膜貫通ヘリックスの配向性を変化させて Ca^{2+} 放出路を開口し Ca^{2+} を放出することであることを示した。しかし、A ドメインがPドメインに集合し相互作用を形成するには、Nドメインが大きく動き、AドメインがPドメインとNドメインが形成するスペースに入り込む必要がある。従ってリン酸化中間体の構造異性化におけるPおよびNドメインの動きとそれを可能にするP-Nドメイン間相互作用の実態と意義を解明することが重要課題として浮き彫りになっていた。ただし、P-Nドメインは二本のループにより連結されているのみで近接しているわけではない。そこでP-Nドメイン間相互作用があるとすれば、long range 相互作用である可能性が高い。従って、この問題を解決するためには、生理的塩溶液中におけるドメイン間の long range 相互作用の解析方法を先ず開発する必要があった。

(3) Pドメインの特異的 K^+ 結合の役割、ポンプタンパクと脂質相互作用の実態と機能的意義、一分子動的解析、各中間体の構造揺らぎの実態と意義、など、P型ポンプの包括的理解にとって必須な重要問題を解決するための手法開発と実施、そしてこれらの集積により、ポンプ異常による病態発症のメカニ

ム理解を可能にすることが必要であった。

2. 研究の目的

(1) Aドメインに連結した第二膜貫通ヘリックス(M2)の構造的機能の解明; M2はAドメインの動きを輸送部位に伝達して適切なゲーティングを引き起こし、その結果、ATP分解とカチオン輸送のエネルギー共役に必須な機能を果たすと予想した。そこで、 Ca^{2+} ポンプを素材にして、 Ca^{2+} 結合による ATPase 活性化、ATPによるリン酸化中間体の形成、リン酸化中間体の構造異性化と加水分解(図

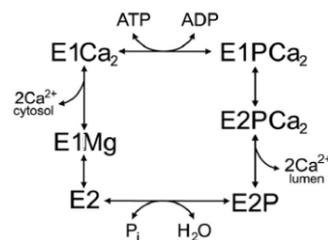


図1. ポンプ反応サイクル

1)の各反応素過程でM2の構造的機能、特に二次構造変化(ヘリックス脱形成・再形成とそれらに伴う長さや他構造領域との相互作用の変化)の意義を解明する。

(2) ① 細胞質PおよびNドメイン間の相互作用実態とその機能的意義の解明; Aドメインの大きな回転とPドメインへの結合が必須の構造変化として生起するリン酸化中間体構造異性化と Ca^{2+} 放出過程について、P-Nドメイン間相互作用の実態とその機能的意義を明らかにする。またそのため、ドメイン間の long-range 静電的相互作用の解析法の原理と実験方法を考案し実施する。

② 一分子動的解析のための生化学的システム開発; ポンプタンパク一分子動的観察やタンパク分子と膜脂質の相互作用の実態と機能的意義を明らかにするため、タンパク分子を膜に固定するシステムをナノディスクの利用により開発し応用する。

③ P型ポンプタンパクと膜脂質相互作用の実態と意義の解明; 各反応素過程における脂質との特異的相互作用の機能的意義を、上記で開発した一分子解析システムの利用により解明する。

(3) リン酸化中間体安定アナログの開発とそれをを用いた構造解析、特に構造揺らぎの意義の解明; Ca^{2+} 放出型リン酸化中間体の加水分解過程の安定構造アナログとして開発した E2·BeF₃⁻(基底状態)、E2·AlF₄⁻(遷移状態)、および E2·MgF₄²⁻(生成物複合体)の構造特性とその揺らぎを解明し、他のP型ポンプにおける安定アナログ開発と特性解明の基盤とする。

3. 研究の方法

(1) Aドメインに連結した第二膜貫通ヘリックス(M2)の構造的機能の解明; M2を4つの領域(すなわちAドメイン連結部、M2先

端部、細胞質領域、膜貫通領域；図2)に分け、各領域にグリシン挿入による α ヘリックス脱形成と伸長、残基削除による短縮、残基特異的置換など、一連の部位特異的変異を導入し、各反応素過程について速度論的解析および Ca^{2+} 結合・放出解析を実施し、構造変化の機能的意義を明らかにする。

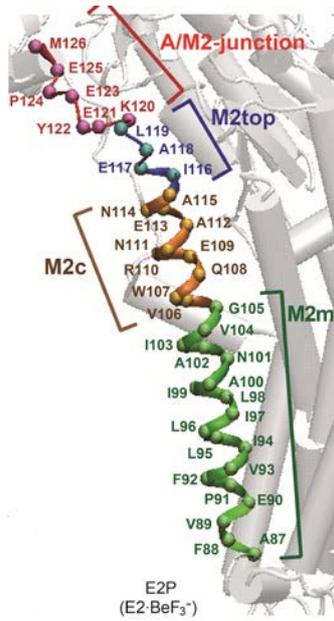


図2. M2の構造領域

(2) P-N ドメイン間 long-range 静電相互作用のシミュレーション；結晶構造を用いて、生理的塩溶液中における電気力線解析により、P-N ドメイン間の long-range 静電相互作用の実態を推定する。そして、塩濃度変化がリン酸化中間体構造異性化に与える影響を解析し、静電的相互作用の機能的意義を理解する。さらに、コンピューターシミュレーションにより long-range 静電相互作用に関与すると推定されたPおよびNドメイン上の極性残基に部位特異的変異を導入し速度論的解析を実施して、これらの残基によるP-Nドメイン間相互作用の実態と役割を明確にする。

(3) ① ナノディスク形成タンパク MSP を大量発現し、可溶化した筋小胞体 Ca^{2+} ポンプとともに種々の脂質分子存在下でナノディスクを形成する。
② 上記ナノディスクを利用して、異なる脂質が各反応素過程に与える影響を速度論的に解析する。

(4) リン酸化中間体の構造アナログの構造安定性と揺らぎ：各アナログに対する Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , pH、さらに界面活性化剤などの影響を、種々のタンパク質分解酵素に対する抵抗性の変化、分光学的変化、そして安定性の変化などを総合的に解析して、ポンプ分子のどの部分が揺らぐか、不安定化するかを理解する。

4. 研究成果

(1) ① M2の構造的機能の解明；M2の各領域(図2)に“3. 研究の方法”で述べた一連の部位特異的変異を導入し、各反応素過程について速度論的解析と Ca^{2+} 結合・放出の解析を実施した。その結果、M2の各領域は各反応

素過程特異的に構造機能を果たすこと、そして、触媒部位の構造変化とそれに伴うAドメインの動きを輸送部位に伝達することにより、適切なタイミングで Ca^{2+} の輸送部位への閉塞、放出路の開口、そして閉口を可能にすることを明らかにした。まず、ATP分解と Ca^{2+} 輸送の共役には、M2m領域のヘリックス構造およびA/M-junctionの構造が必須であり、これらの構造を改変すると脱共役してしまうことが明らかとなった(図3)。各反応素過程におけるM2の役割についての研究成果の具体は、図1の Ca^{2+} ポンプ反応スキームに基づき②~⑤に記述した。

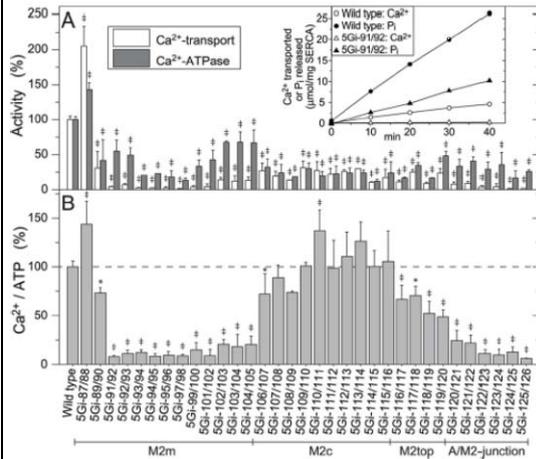


図3. Ca 輸送と ATP 分解の共役

5Gi ; 5つのグリシン挿入

② Ca^{2+} 結合による活性化 ($\text{E2} \rightarrow \text{E1Ca}_2$) : E2構造ではM2全領域に渡りヘリックスが形成することが迅速な活性化に必須であることが分かった(図4)。

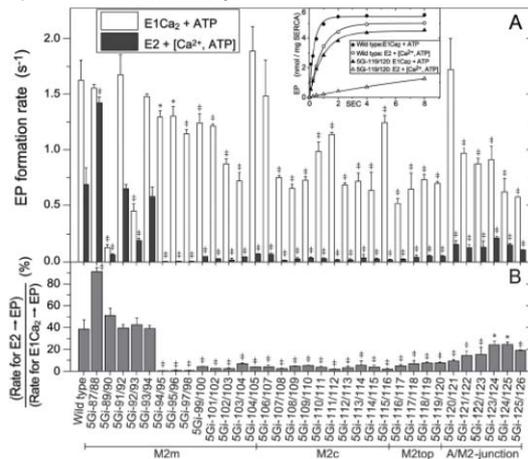


図4. E2 → E1Ca₂の活性化速度 (B)

③ $\text{E1Ca}_2 \rightarrow \text{E1PCa}_2$ およびそれに伴う輸送部位への Ca^{2+} 閉塞：M2m部分のヘリックス構造およびA/M2-junction構造の改変により、閉塞機能が消失し、ATP分解と Ca^{2+} 輸送が脱共役することを観察し、これらの領域の構造が輸送部位への Ca^{2+} 閉塞と輸送に必須であ

ることを明らかとした (図5)。

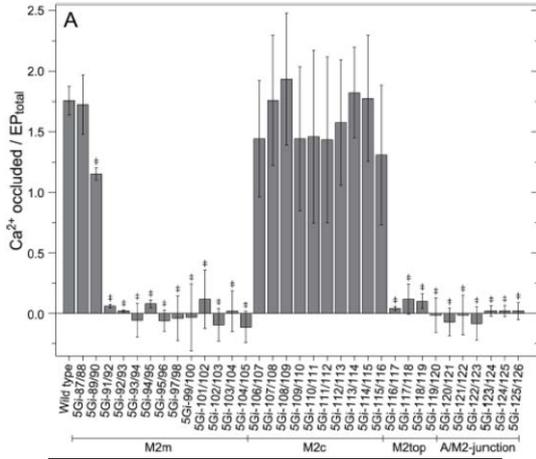


図5. リン酸化中間体 (EP) の Ca²⁺閉塞

④ $E1PCa_2 \rightarrow E2P + 2Ca^{2+}$: M2topヘリックス構造および A/M2-junctionにおける構造がEP異性化とそれによるCa²⁺放出に重要であり、これらの構造を改変するとCa²⁺放出なしに触媒部位におけるEP異性化が著明に促進された。従ってこれらの領域の構造は、Aドメインの動きを輸送部位に伝達し、Ca²⁺放出路を開口させるために必須の共役機能を担うと結論された (図6)。

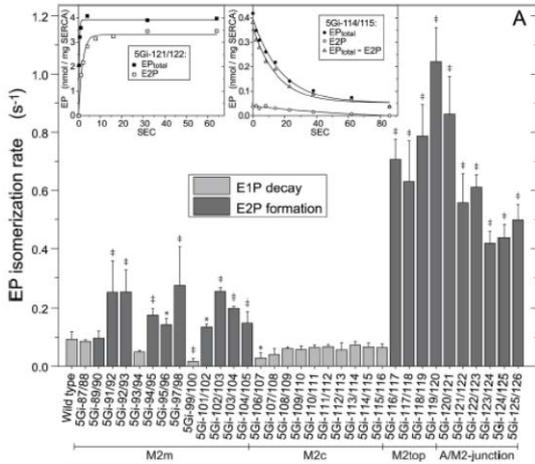


図6. EP構造異性化速度

⑤ $E2P + H_2O \rightarrow E2P + P_i$: M2cのヘリックス構造を改変するとE2P加水分解が著明に促進されると共に放出路が固く閉じて内腔Ca²⁺に強く抵抗性となることが観察された。従って野生型では、M2c領域の限定的ヘリックス脱形成が加水分解反応に共役して適切な放出路開口を引き起こすと結論された (図7)。

(2) ① P-Nドメイン間Long-range静電相互作用とその意義の解明: 結晶構造を利用して生理的塩溶液中における静電相互作用をコンピューターシミュレーションにより解析した (図8)。その結果、P-Nドメイン間にGlu394/Asp399 (Nドメイン) と Lys605 (P

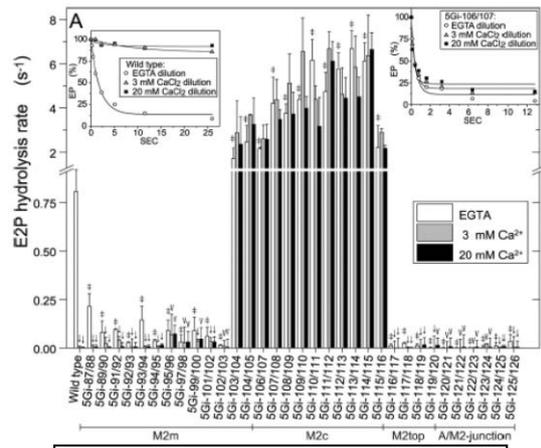


図7. E2P分解速度と内腔Ca²⁺抵抗性

ドメイン)) による long-range 静電相互作用が存在することが推定された。そこで、塩濃度を変化させてEP異性化 ($E1PCa_2 \rightarrow E2P + 2Ca^{2+}$) の速度を解析した。そして速度定数と γ (平均イオン活動度係数) を図9のようにプロットすると直線関係が得られることを見出した。直線の傾きは本反応における構造変化に対する静電エネルギーの関与を、また外挿値 ($\gamma^2=0$) は立体因子の寄与を示すと解釈される (下記②参照)。

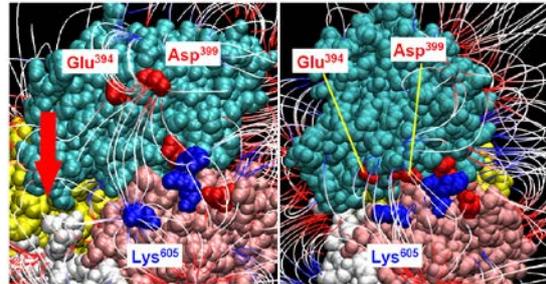


図8. N(blue)-P(pink)ドメイン間静電相互作用
 $E1PCa_2 \rightarrow E2P + 2Ca^{2+}$ (左 → 右) で表示残基間の距離は28Åから13Åに変化する (赤矢印)

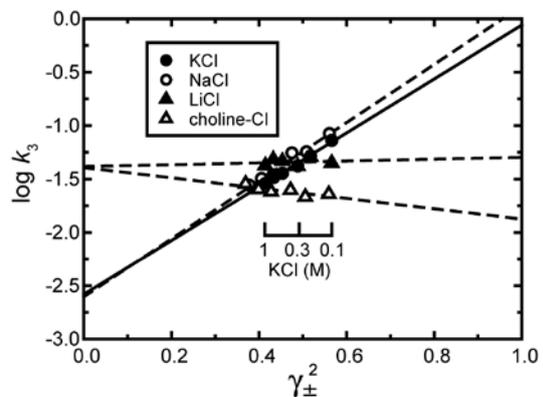


図9. 平均イオン活動度係数と速度定数の関係

② 各種カチオンの濃度を変化させて速度論的に解析した結果 (図9)、K⁺ は特別な効果を有し、PドメインへK⁺が特異的結合に結合したCa²⁺ポンプでは、静電的エネルギーが

$E1PCa_2 \rightarrow E2P$ 構造異性化を促進すること、一方、この構造変化は立体的には障害があり生起しにくいこと、生理的 K^+ 濃度 (約 0.1M) では結果として K^+ の特異的結合が立体的障害を克服し、この構造変化を促進すること、が明らかとなった。

(3) MSP タンパクと筋小胞体 Ca^{2+} ポンプからナノディスクを形成・精製することに成功し、速度論的解析や一分子動的解析を可能にした。ナノディスク形成時に各種の異なる脂質を用いて Ca^{2+} ポンプの機能解析を行なった結果、脂質の極性頭部の構造に依存して ATP 分解活性が大きく変動することが分かり、脂質とポンプタンパクの間の静電的および疎水的相互作用の実態と意義を解明することが重要であることを示した。

(4) $E2P$ 構造の揺らぎとその意義: Ca^{2+} 放出型のリン酸化中間体の加水分解過程 $E2P + H_2O \rightarrow E2\sim P^{\ddagger} \rightarrow E2\cdot P_i$ の各構造アナログとして開発した $E2\cdot BeF_3^-$, $E2\cdot AlF_4^-$, $E2\cdot MgF_4^{2-}$ の構造揺らぎを生化学的手法により解析した。その結果、 $E2P$ 基底状態では構造がかなり揺らいでいること、加水分解に伴い揺らぎは消失し安定で固定された構造になることが明らかとなった。 $E2P$ 基底状態構造の揺らぎは空の輸送部位でしかも放出路が開口状態にあることに起因しており、この揺らぎには、小胞体内の Ca^{2+} や Mg^{2+} や、pH、 K^+ が大きく影響すること、そしてこの揺らぎは輸送サイクルを正方向に進めるためにポンプタンパクに備わっている構造特性であろうことが示唆された。これらの発見は、他の P 型カチオンポンプにも適応される知見であり、各ポンプ反応中間体の安定構造アナログの開発と結晶化、ならび各ポンプの作動機構理解の観点から極めて重要である。なお、この成果については、現在論文として公表すべく纏め上げているところである。

<引用文献>

- ① Toyoshima, C. Structural aspects of ion pumping by Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* **476**, 2008, 3–11

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Daiho T., Yamasaki K., Danko S., and Suzuki H.; Second transmembrane helix (M2) and long range coupling in Ca^{2+} -ATPase, *Journal of Biological Chemistry*, 査読有、289 巻、2014、31241-31252
DOI: 10.1074/jbc.M114.584086
- ② Yamasaki K., Daiho T., Danko S., and Suzuki H.; Roles of Long-range Electrostatic Domain Interactions and K^+ in

Phosphoenzyme Transition of Ca^{2+} -ATPase, *Journal of Biological Chemistry*, 査読有、288 巻、2013、20646-20657
DOI: 10.1074/jbc.M113.482711

[学会発表] (計 24 件)

- ① 山崎 和生, 鈴木 裕, 他、筋小胞体カルシウムポンプ EP 転換とカルシウム放出の共役機構における Tyr122-hydrophobic cluster の役割、第 40 回生体エネルギー研究会、2014 年 12 月 11 日~2014 年 12 月 13 日、愛媛
- ② 大保 貴嗣, 鈴木 裕, 他、筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の第 2 膜貫通ヘリックス (M2) とロングレンジ共役、第 40 回生体エネルギー研究会、2014 年 12 月 11 日~2014 年 12 月 13 日、愛媛
- ③ 小島 知樹, 鈴木 裕, 他、1 分子蛍光観察による Ca^{2+} -ATPase の数と立体構造変化検出の試み、第 40 回生体エネルギー研究会、2014 年 12 月 11 日~2014 年 12 月 13 日、愛媛
- ④ 山崎 和生, 鈴木 裕, 他、ナノディスクに組み込んだ筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の活性に対する脂質ヘッドグループの影響の解析、第 87 回日本生化学会、2014 年 10 月 15 日~2014 年 10 月 18 日、京都
- ⑤ 大保 貴嗣, 鈴木 裕, 他、筋小胞体 Ca^{2+} ポンプの M2 ヘリックス: 膜貫通部分と細胞質部分の連結領域の役割、第 87 回日本生化学会、2014 年 10 月 15 日~2014 年 10 月 18 日、京都
- ⑥ Daiho T., Yamasaki K., Danko S., and Suzuki H.; Ca^{2+} -ATPase の第 2 膜貫通ヘリックス (M2) とロングレンジの共役、第 52 回日本生物物理学会、2014 年 9 月 25 日~2014 年 9 月 27 日、札幌
- ⑦ Yamasaki K., Danko S., Daiho T., and Suzuki H.; A New Method for Ca^{2+} -binding Measurement Applicable to a Small Quantity of Ca^{2+} -ATPase: Transient E2P with Bound Ca^{2+} and Role of Leu119 on M2 in Ca^{2+} -affinity Reduction and Ca^{2+} Release, 14th International Conference on P-type ATPases and Related Cation Pumps, 2014 年 08 月 30 日~2014 年 09 月 04 日、Netherlands
- ⑧ Daiho T., Yamasaki K., Danko S., and Suzuki H.; Long-range Coupling between Catalytic and Transport Sites via Second Transmembrane Helix (M2) in E2P Hydrolysis and E2-E1 Transition of Ca^{2+} -ATPase, 14th International Conference on P-type ATPases and Related Cation Pumps, 2014 年 08 月 30 日~2014 年 09 月 04 日、Netherlands
- ⑨ 大保 貴嗣, 鈴木 裕, 他、筋小胞体 Ca^{2+} ポンプのヘリックス M2 膜貫通部分と細胞質部分、およびその連結領域の役割、日本生体エネルギー研究会第 39 回討論

- 会、2013年12月18日～2013年12月20日、静岡
- ⑩ 山崎 和生、鈴木 裕、他、筋小胞体カルシウムポンプのナノディスクへの組み込みとその性質、日本生体エネルギー研究会第39回討論会、2013年12月18日～2013年12月20日、静岡
- ⑪ 大保 貴嗣、鈴木 裕、他、筋小胞体Ca²⁺ポンプのヘリックス M2 膜貫通部分 (M2m) と細胞質部分 (M2cyt) およびその連結領域の役割、日本生体エネルギー研究会第39回討論会、2013年12月18日～2013年12月20日、横浜
- ⑫ 山崎 和生、鈴木 裕、他、筋小胞体カルシウムポンプのナノディスクへの組み込みとその性質、第86回日本生化学会大会、2013年09月11日～2013年09月13日、横浜
- ⑬ Hiroshi Suzuki、Stabilization of Ca²⁺-occluded E1PCa₂ and Ca²⁺-released E2P, and acceleration of the EP transition、「招待講演」“Frontiers in P-type ATPase Research” 2013年7月4日、東京大学
- ⑭ 大保 貴嗣、鈴木 裕、他、筋小胞体Ca²⁺ポンプの輸送反応における膜貫通ヘリックス M2 の役割、日本生体エネルギー研究会 第38回討論会、2012年12月22日～2012年12月24日、岡山
- ⑮ 山崎 和生、鈴木 裕、他、筋小胞体Ca²⁺-ATPase の E1P-E2P と Ca²⁺放出の共役機構、日本生体エネルギー研究会 第38回討論会、2012年12月22日～2012年12月24日、岡山
- ⑯ 大保 貴嗣、鈴木 裕、他、筋小胞体Ca²⁺ポンプにおけるエネルギー共役；膜貫通ヘリックス M2 およびその細胞質領域アクチュエータードメインとの連結部分の役割、第85回日本生化学会大会、2012年12月14日～2012、福岡
- ⑰ 山崎 和生、鈴木 裕、他、筋小胞体Ca²⁺-ATPase の E1P-E2P と Ca²⁺放出の共役機構、第85回日本生化学会大会、2012年12月14日～2012年12月16日、福岡
- ⑱ 山崎 和生、鈴木 裕、他、筋小胞体Ca²⁺-ATPase リン酸化中間体転換ステップにおける静電相互作用の効果とその定量化の試み、日本生体エネルギー研究会、2011年12月20日～2011年12月22日、京都
- ⑲ 大保 貴嗣、鈴木 裕、他、筋小胞体Ca²⁺ポンプにおけるエネルギー共役；細胞質領域アクチュエータードメインと膜貫通ヘリックスとの連結部分の役割、日本生体エネルギー研究会、2011年12月20日～2011年12月22日、京都
- ⑳ Hiroshi Suzuki、Ca pump: Functional importance of structural changes in M2, and roles of long-range N-P domain electrostatic interactions and K⁺、「招待講演」“Frontiers in P-type ATPase Research” 2012年10月11日、東京大学
- 21 Hiroshi Suzuki, Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Stefania J. Danko; Mechanism of Ca²⁺-ATPase Revealed by Mutations, Kinetics, and Development of Stable Analogs of Phosphorylated Intermediates、「招待講演」“3rd International Workshop on Expression, Structure and Function of Membrane Proteins” 2012年9月23日～2012年9月27日、Italy
- 22 Suzuki H., Daiho T., Yamasaki K., Danko S.; Mechanism of Ca²⁺-ATPase revealed by mutations, kinetics, and development of stable analogs of phosphorylated intermediates、「招待講演」2011 ASBMB Special Symposia Series 13th Na,K-ATPase and Related P-ATPases: Structure, Biology and Medicine、2011年9月27日～2011年10月2日、Pacific Grove, CA, USA
- 23 Daiho T., Danko S., Yamasaki K., Suzuki H.; Critical importance of helix-loop conversions, length, and Actuator-domain junction structure of M2 in Ca²⁺-ATPase for Ca²⁺ transport、2011 ASBMB Special Symposia Series 13th Na,K-ATPase and Related P-ATPases: Structure, Biology and Medicine、2011年9月27日～2011年10月2日、Pacific Grove, CA, USA
- 24 Yamasaki K., Daiho T., Danko, Suzuki H.; Roles of electrostatic interactions between cytoplasmic domains on the phosphoenzyme transition of Ca²⁺-ATPase and a critical importance of the charged residues at the hinge of the P and N domains、2011 ASBMB Special Symposia Series 13th Na,K-ATPase and Related P-ATPases: Structure, Biology and Medicine、2011年9月27日～2011年10月2日、Pacific Grove, CA, USA
- 〔図書〕 (計1件)
- ① Suzuki H.; Ca²⁺ Pump; Ca²⁺-ATPase and Beryllium Fluoride、Springer, Encyclopedia of Metalloproteins、2013、425-432
ISBN: 978-1-4614-1532-9
6. 研究組織
- (1)研究代表者
鈴木 裕 (SUZUKI, Hiroshi)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：50183421
- (2)研究分担者
山崎 和生 (YAMASAKI, Kazuo)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：60241428
- 大保 貴嗣 (DAIHO, Takashi)
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90207267