

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440017

研究課題名(和文)小胞体Ca²⁺ポンプの触媒部位から輸送部位への構造変化の伝達機構研究課題名(英文)Transmission of structural changes from catalytic site to transport sites in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase

研究代表者

大保 貴嗣 (DAIHO, TAKASHI)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90207267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Caポンプは細胞質ドメインの触媒部位でATPを加水分解し、膜ドメインの輸送部位にてCaを輸送する。本研究では、これらのドメインをつなぐM2ヘリックスの構造的役割について部位特異的変異を用いて調べた。結果は、M2の細胞質部分M2m、膜部分M2c、M2c-細胞質ドメイン間のループの各々が、特異的反応段階にて機能を持ち、細胞質ドメイン-膜ドメイン間の構造変化の伝達を可能にすることを示した。またM2m-M2c連結部分のGly105は、リン酸化中間体から内腔へのCa放出段階にて、細胞質ドメインの大きな動きに伴うM2の歪みを吸収することによって正常なCa-gatingを起こさせることを示した。

研究成果の概要(英文)：Ca²⁺ pump transports Ca²⁺ at transport sites of membrane domain coupled to ATP hydrolysis at catalytic site of cytoplasmic domain. The structural roles of M2 helix connecting these domains were investigated by use of site-directed mutagenesis. The results indicated that cytoplasmic region (M2c) and membrane region (M2m) of M2 and junctional loop to cytoplasmic domain have specific functions at specific reaction steps, which enable transmission of structural changes between these domains. The functional roles of Gly105 at connecting region of M2c-M2m were investigated by site-directed substitutions. The results indicated that in the phosphorylated-intermediate isomerization Gly105 with its flexibility absorbs distortion of M2 caused by large structural changes at cytoplasmic domain, and that this enables proper Ca²⁺-gating and coupled transport.

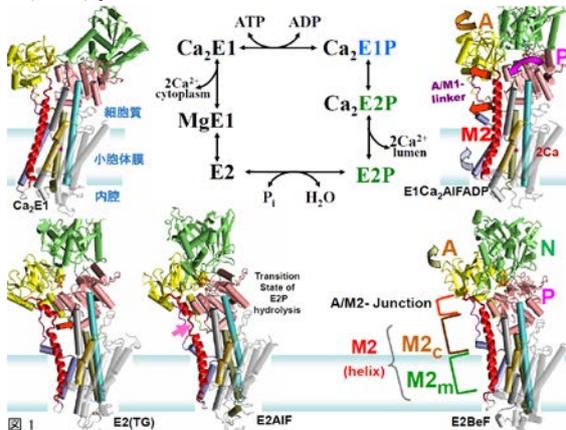
研究分野：生物化学

キーワード：カルシウムポンプ 筋小胞体 ATPアーゼ リン酸化中間体 能動輸送 グリシン 異性化 gating

1. 研究開始当初の背景

(1) Ca^{2+} ポンプは ATP 加水分解に共役して Ca^{2+} を輸送する。 Ca^{2+} 輸送サイクルはリン酸化中間体(EP)の形成、異性化、加水分解を経由する。触媒部位を含む細胞質領域は、アクチユーターの A ドメイン、リン酸化される P ドメイン、ヌクレオチドを結合する N ドメインの 3 ドメインが構成し、 Ca^{2+} 輸送部位は膜ドメイン (膜貫通ヘリックス M1~M10) に含まれる。これら細胞質領域と膜ドメインはヘリックスや loop で繋がり、触媒-輸送部位は 50Å も離れている。 Ca^{2+} 輸送の反応段階に応じて、細胞質領域では 3 ドメインの配置変化が起こり、膜ドメインでは Ca^{2+} -gate の開閉と Ca^{2+} 親和性変化が起こる。即ち、構造変化がこれらの触媒-輸送部位間で伝達されて相互応答することにより、エネルギー共役が起こる。

(2) Ca^{2+} 輸送サイクルの鍵となる反応段階は輸送部位に Ca^{2+} を閉塞した E1PCa₂ (ADP 感受性 EP) から Ca^{2+} 非結合 E2P (ADP 非感受性 EP) への異性化であり、小胞体内腔への Ca^{2+} 放出がおこる。その異性化過程で細胞質領域の A ドメインが大きく回転して P ドメインと結合し、その構造変化が膜ドメインに伝わって内腔側の Ca^{2+} -gate が開き Ca^{2+} の親和性が低下して Ca^{2+} 放出がおこる。このとき A ドメインと膜貫通ヘリックス M1, M2, および M3 の連結部分が重要な役割を果たす。筆者は既に、A ドメイン/M1-linker (Glu⁴⁰-Ser⁴⁸)の長さが適切であることが EP の異性化から加水分解までの各段階に重要であることを示した[引用文献①,②]。特に、この linker に 2 個以上の Gly を挿入して伸長すると内腔への Ca^{2+} 脱閉塞がブロックされ、 Ca^{2+} を閉塞した ADP 非感受性 EP (E2PCa₂) が蓄積する[引用文献②]。これより、1 段階 (E1PCa₂→E2P) で記述されていた ADP 感受性の消失/ Ca^{2+} 脱閉塞が 2 段階で起こる (E1PCa₂→E2PCa₂→E2P) ことが示された (図 1)。



この linker への strain 発生がこの Ca^{2+} 脱閉塞に重要であると推測される。さらに最近、野生型および上記変異ポンプにリン酸アナログ BeF_3^- を結合させ、E1PCa₂、E2PCa₂の構

造アナログ E1Ca₂·BeF₃⁻ [引用文献③]、E2Ca₂·BeF₃⁻ [引用文献④]を開発した。また、M2 の先端部、P ドメイン、A ドメインとの間に形成する Tyr¹²²を中心とした疎水結合クラスターが E2PCa₂ からの Ca^{2+} 放出と E2P 加水分解に重要であることを報告した[引用文献⑤, ⑥]。

2. 研究の目的

(1) 長いヘリックス M2 は膜貫通部分 (M2m) と細胞質部分 (M2c) に概ね区別され、M2c の先端は junction ループを介して A ドメインに繋がっている。M2 は、EP 異性化で大きく傾き、また EP 加水分解でヘリックスの一部が解け、E2→E1Ca₂で巻き戻ることが結晶構造から予測されるが (図 1) それらの意義は不明である。そこでその解明を目的とした。

(2) また、EP 異性化における脂質-タンパク質相互作用にも着目してその意義を解明することも試みた。

3. 研究の方法

(1) これら M2m、M2c、junction ループの領域に、置換、削除、または 5 個の Gly 挿入 (5Gi; 伸長とヘリックスの局所的破壊) の変異を導入してその影響を調べた[引用文献⑦]。

(2) 本研究ではさらに、M2m と M2c の連結部分にある Gly¹⁰⁵の構造的役割を調べるため、Gly¹⁰⁵ およびその周辺の残基を部位特異的置換した変異体の機能解析を行った[引用文献⑧]。

(3) Tyr¹²²を中心とした疎水結合クラスターに関連する残基に部位特異的置換を施して機能解析を行った[引用文献⑨]。

(4) EP 異性化における脂質-タンパク質相互作用を調べるために、可溶化しない濃度の非イオン性界面活性剤 C₁₂E₈ (octaethylene glycol monododecyl ether) を用いて効果を解析した。

4. 研究成果

(1) M2m、M2c、junction ループの領域に 5 個の Gly を挿入すると、殆どの 5Gi 変異体で Ca^{2+} -ATPase 活性が、強く阻害された[引用文献⑦]。他方 Ca^{2+} 輸送活性は、M2m および junction への 5Gi によりほぼ完全に阻害され、脱共役を示した (図 2)。M2m への 5Gi では E1PCa₂ への Ca^{2+} 閉塞が強く障害されていたことから、これが脱共役を生じたと考えられる。E2P 加水分解は M2m、M2c の先端部、または junction への 5Gi により強く阻害されたが、M2c 中央部への 5Gi では逆に強く促進された。この促進は内腔の高濃度 Ca^{2+} によって影響されず、この E2P では内腔側の Ca^{2+} -gate が堅く閉じていると考えられる。

E2→E1 速度は、M2 の殆どすべての領域への 5Gi により強く低下した。以上の結果は、反応段階に応じて M2 の各部分 (M2m, M2c) および junction ループの 2 次構造や長さが増加することが、細胞質領域と膜ドメイン間の構造変化を介した相互応答によるエネルギー共役に必須であり、EP の異性化ならびに加水分解と Ca²⁺-gating に重要であることを示している。

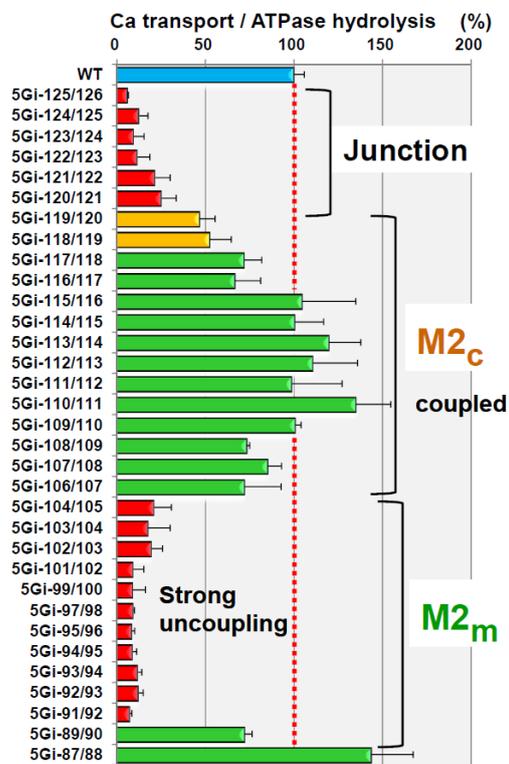


図 2

(2) M2m と M2c の連結部分にある Gly¹⁰⁵ を Ala に置換して柔軟性を下げると、ATP 分解に共役した Ca²⁺輸送が消失し [引用文献⑧]、脱共役が起こった (図 3A,B)。このとき E1PCa₂ または E2PCa₂ への Ca²⁺閉塞が障害された。また、G105A は EP 異性化を強く抑え、逆に E2→E1 を促進したが、E2P 加水分解速度には影響しなかった。次に、Gly が M2 上で正常な機能を果たす位置を調べるため、

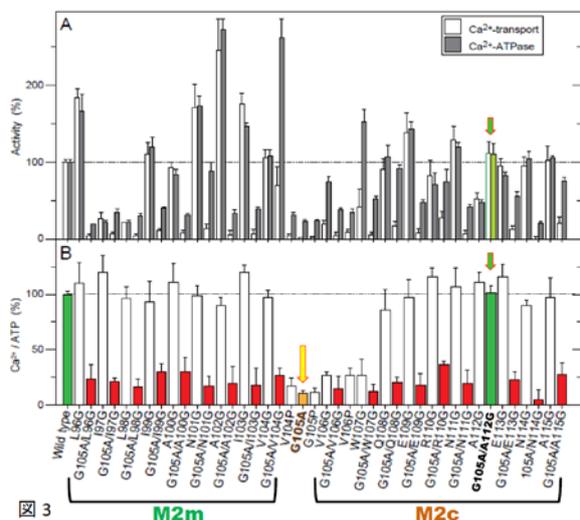
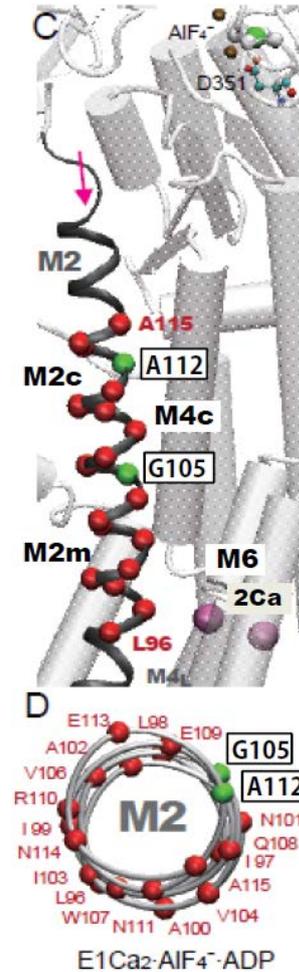


図 3

G105A/(他の残基→Gly)のダブル置換体を多数作成した (図 3A,B)。これらのうち、G105A/A112G のみが、Ca²⁺輸送/ATP 分解の



共役、E1PCa₂ と E2PCa₂ への Ca²⁺閉塞、EP 異性化と E2→E1 の速度を野生型と同じレベルまで回復した。M2 上で、Ala¹¹² は Gly¹⁰⁵ から 2 巻上であり、Gly¹⁰⁵ とほぼ同じ M4c 方向に向いている (図 3C,D)。従って、細胞質領域と膜ドメイン間の構造変化の伝達では、M2 が特異的反應段階で特定方向へ屈曲・伸長し、また別の段階でその歪みが解消することが必要であると考えられる。Gly¹⁰⁵ は M2c-M2m 連結部分に柔軟性を与え、EP 異性化/Ca²⁺放出において、A の大きな動きに伴う M2

への歪みを、特異的方向へ屈曲・伸長することで吸収し、これが正常な Ca²⁺-gating と Ca²⁺輸送/ATP 分解の共役に重要であると考えられる。

(3) 以前、M2 上の Tyr¹²² を含む 5 残基が E2P に疎水性クラスター (Y¹²²-HC) を形成し、これが E2P 加水分解、および Ca²⁺遊離した E2P の構造を安定化することを報告した [引用文献⑤, ⑥]。今回、EP 転換の中間的 EP である E2PCa₂ からの Ca²⁺遊離過程を調べた。Y¹²²-HC 変異体では、低濃度 Ca²⁺存在下で Ca²⁺遊離が EP 異性化に遅れて起こるが、Ca²⁺無しでは遅れないことから、非閉塞の Ca²⁺結合 E2P が検出された。これより Y¹²²-HC が Ca²⁺親和性低下に働くこと、Y¹²²-HC の集合が EP 異性化と Ca²⁺放出の共役に段階的に対応することが示唆された [引用文献⑨]。これより、M2 が細胞質ドメインと Ca²⁺遊離の共役に重要な役割を果たすことが示唆された。

(4) 次に Ca²⁺-ATPase 活性を保持した状態で Ca²⁺ポンプを nanodisc に組み込みこむ系を確立した。そこで、この nanodisc 中の脂質の組成を変えて EP 異性化の速度を測定し

た。その結果、負電荷ヘッドグループを持つ POPG, POPS では EP 異性を抑制し、中性のヘッドグループを持つ POPE, POPC では促進することが示された。さらに、イオン強度を変化させることにより、POPS での活性低下は脂質ヘッドグループと Ca^{2+} ポンプ間の電気的相互作用によること、また POPE での活性低下は脂質と Ca^{2+} ポンプ間の非静電的相互作用によることが示された。従って、native 筋小胞体の主な脂質 PC ではヘッドグループに含まれる正電荷が EP 異性化に対して促進的に働くことが示唆された。

(5) EP 異性化では E1PCa_2 から中間状態 E2PCa_2 を経て E2P に至る。 E2PCa_2 は細胞質領域が緩んで M2 の上端にある proteinase K 特異的切断が活性化されるが、 E2P では、細胞質領域の 3 ドメインがコンパクトに集合するためその切断がマスクされる[引用文献②]。ここでは、 Ca^{2+} ポンプを可溶化しない低濃度の非イオン性界面活性剤 C_{12}E_8 を用いて、 E2P 状態の Ca^{2+} ポンプと脂質の相互作用を部分的に障害し、その効果を見た。このとき C_{12}E_8 によって proteinase K 特異的切断が活性化し、細胞質領域が緩んで E2P から E2PCa_2 方向にシフトすることが示された[引用文献⑩]。従って、 $\text{E2PCa}_2 \rightarrow \text{E2P}$ におけるタンパク質-脂質相互作用の重要性が示唆された。

<引用文献>

- ① Daiho T., Yamasaki K., Wang G., Danko S., Iizuka H., Suzuki H. (2003) Deletions of Any Single Residues in Glu⁴⁰-Ser⁴⁸ Loop Connecting A Domain and the First Transmembrane Helix of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase Result in Almost Complete Inhibition of Conformational Transition and Hydrolysis of Phosphoenzyme Intermediate. *J. Biol. Chem.*, 278, 39197-39204.
- ② Daiho T., Yamasaki K., Danko S., Suzuki H. (2007) Critical Role of Glu⁴⁰-Ser⁴⁸ Loop Linking Actuator Domain and First Transmembrane Helix of Ca^{2+} -ATPase in Ca^{2+} Deocclusion and Release from ADP-insensitive Phosphoenzyme. *J. Biol. Chem.*, 282, 34429-34447.
- ③ Danko S., Daiho T., Yamasaki K., Liu X., Suzuki H. (2009) Formation of the stable structural analog of ADP-sensitive phosphoenzyme of Ca^{2+} -ATPase with occluded Ca^{2+} by beryllium fluoride: structural changes during phosphorylation and isomerization. *J. Biol. Chem.*, 284, 22722-35.
- ④ Daiho T., Danko S., Yamasaki K., Suzuki H. (2010) Stable structural analog of Ca^{2+} -ATPase ADP-insensitive phosphoenzyme with occluded Ca^{2+} formed by elongation of A-domain/M1'-linker and beryllium fluoride binding. *J. Biol. Chem.*, 285, 24538-47.
- ⑤ Wang G., Yamasaki K., Daiho T., Suzuki H. (2005) Critical Hydrophobic Interactions between Phosphorylation and Actuator Domains of Ca^{2+} -ATPase for Hydrolysis of Phosphorylated Intermediate. *J. Biol. Chem.*, 280, 26508-26516.
- ⑥ Yamasaki K., Wang G., Daiho T., Danko S., Suzuki H. (2008) Roles of Tyr¹²²-hydrophobic cluster and K^+ binding in Ca^{2+} -releasing process of ADP-insensitive phosphoenzyme of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.*, 283, 29144-55.
- ⑦ Daiho T., Yamasaki K., Danko S., Suzuki H. (2014) Second Transmembrane Helix (M2) and Long Range Coupling in Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.*, 289, 31241-31252.
- ⑧ Daiho T., Yamasaki K., Danko S., Suzuki H. (2016) Glycine 105 as Pivot for a Critical Knee-like Joint between Cytoplasmic and Transmembrane Segments of Second Transmembrane Helix in Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.*, 291, 24688-24701.
- ⑨ Yamasaki K., Daiho T., Danko S., Suzuki H. (2015) Assembly of a Tyr¹²² Hydrophobic Cluster in Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase Synchronizes Ca^{2+} Affinity Reduction and Release with Phosphoenzyme Isomerization. *J. Biol. Chem.*, 290, 27868-27879.
- ⑩ Danko S., Yamasaki K., Daiho T., Suzuki H. (2017) Membrane Perturbation of ADP-insensitive Phosphoenzyme of Ca^{2+} -ATPase Modifies Gathering of Transmembrane Helix M2 with Cytoplasmic Domains and Luminal Gating. *Sci. Rep.*, 7, 41172.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Danko S., Yamasaki K., Daiho T., Suzuki H. (2017) Membrane Perturbation of ADP-insensitive

Phosphoenzyme of Ca^{2+} -ATPase Modifies Gathering of Transmembrane Helix M2 with Cytoplasmic Domains and Luminal Gating *Sci. Rep.*, 7, 41172. (学術誌論文、査読有り)
DOI : 10.1038/srep41172

- ② Daiho T., Yamasaki K., Danko S., Suzuki H. (2016)
Glycine 105 as Pivot for a Critical Knee-like Joint between Cytoplasmic and Transmembrane Segments of Second Transmembrane Helix in Ca^{2+} -ATPase.
J. Biol. Chem., 291, 24688-24701. (学術誌論文、査読有り) DOI: 10.1074/jbc.M116.759704
- ③ Yamasaki K., Daiho T., Danko S., Suzuki H. (2015)
Assembly of a Tyr¹²² Hydrophobic Cluster in Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase Synchronizes Ca^{2+} Affinity Reduction and Release with Phosphoenzyme Isomerization.
J. Biol. Chem., 290, 27868-27879. (学術誌論文、査読有り) DOI: 10.1074/jbc.M115.693770
- ④ Daiho T., Yamasaki K., Danko S., Suzuki H. (2014)
Second Transmembrane Helix (M2) and Long Range Coupling in Ca^{2+} -ATPase.
J. Biol. Chem., 289, 31241-31252. (学術誌論文、査読有り) DOI: 10.1074/jbc.M114.584086

[学会発表] (計 18 件)

- ① 山崎和生、大保 貴嗣、Danko Stefania、鈴木裕、脂質ヘッドグループが筋小胞体カルシウムポンプ活性に及ぼす影響—ナノディスク組み込み標品を用いて、日本生体エネルギー研究会 第 42 回討論会、2016 年 12 月 19 日、名古屋
- ② 大保 貴嗣、山崎和生、Stefania Danko、鈴木裕、Ca ポンプのエネルギー共役；M2-helix 膜貫通部分 (M2m) と細胞質部分 (M2c) をつなぐ Gly¹⁰⁵ の柔軟性の機能、日本生体エネルギー研究会 第 42 回討論会、2016 年 12 月 19 日、名古屋
- ③ Stefania Danko, Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, and Hiroshi Suzuki、Membrane Perturbation of ADP-insensitive Phosphoenzyme of Ca^{2+} -ATPase Modifies Gathering of Transmembrane Helix M2 with Cytoplasmic Domains and Luminal Gating、日本生体エネルギー研究会 第 42 回討論会、2016 年 12 月 19 日、名古屋
- ④ 大保 貴嗣、山崎和生、Stefania Danko、鈴木裕、筋小胞体 Ca^{2+} ポンプ M2 ヘリックスの膜貫通部分と細胞質部分の連結領域：エネルギー共役における役割、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日、仙台
- ⑤ 山崎和生、大保 貴嗣、Stefania Danko、鈴木裕、ナノディスクに組み込んだ標品を用いた筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の EP 転換ステップに及ぼす脂質組成及び A23187 の影響の解析、第 89 回日本生

学会大会、2016 年 9 月 25 日、仙台

- ⑥ 大保 貴嗣、山崎和生、Danko Stefania、鈴木裕、筋小胞体 Ca^{2+} ポンプのエネルギー共役における M2 ヘリックス膜貫通部分 (M2m) と細胞質部分 (M2cyt) の連結領域の役割、日本生体エネルギー研究会 第 41 回討論会、2015 年 12 月 21 日、東京
- ⑦ 山崎和生、大保 貴嗣、Danko Stefania、鈴木裕、ナノディスクへ組み込んだ筋小胞体カルシウムポンプを用いたタンパク質—脂質相互作用の解析、日本生体エネルギー研究会 第 41 回討論会、2015 年 12 月 21 日、東京
- ⑧ 大保 貴嗣、山崎和生、Danko Stefania、鈴木裕、筋小胞体 Ca^{2+} ポンプのエネルギー共役における M2 ヘリックス膜貫通部分 (M2m) と細胞質部分 (M2cyt) の連結領域の役割、第 88 回日本生化学会第 38 回日本分子生物学会合同年会、2015 年 12 月 1 日、神戸
- ⑨ 山崎和生、大保 貴嗣、Danko Stefania、鈴木裕、筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の EP 転換ステップにおける Tyr¹²²-Hydrophobic cluster の集合過程とエネルギー共役、第 88 回日本生化学会第 38 回日本分子生物学会合同年会、2015 年 12 月 1 日、神戸
- ⑩ 大保 貴嗣、山崎和生、Danko Stefania、鈴木裕、Long-range Coupling between Catalytic and Transport Sites via Second Transmembrane Helix (M2) in Ca^{2+} -ATPase、第 54 回日本生物物理学会年会、2015 年 9 月 13 日、金沢
- ⑪ 小島知樹、戸田啓太、山崎和生、Danko, Stefania、小山洋幸、横田龍一、中山莉奈子、大保 貴嗣、鈴木裕、政池知子、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、日本生体エネルギー研究会 第 40 回討論会、2014 年 12 月 11 日、松山
- ⑫ 大保 貴嗣、山崎和生、Stefania Danko、鈴木裕、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、日本生体エネルギー研究会 第 40 回討論会、2014 年 12 月 11 日、松山
- ⑬ 山崎和生、Stefania Danko、大保 貴嗣、鈴木裕、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、日本生体エネルギー研究会 第 40 回討論会、2014 年 12 月 11 日、松山
- ⑭ 大保 貴嗣、山崎和生、Stefania Danko、鈴木裕、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、日本生化学会 第 87 回大会、2014 年 10 月 15 日、京都
- ⑮ 山崎和生、大保 貴嗣、Stefania Danko、鈴木裕、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、日本生化学会 第 87 回大会、2014 年 10 月 15 日、京都

- ⑩ Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki、Second Transmembrane Helix (M2) and Long-range Coupling in Ca^{2+} -ATPase、日本生物物理学会第52回年会、2014年9月25日、札幌
- ⑪ Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki、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8月30日、オランダ
- ⑫ Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki、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8月30日、オランダ

[その他]

ホームページ等

<http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/biochem2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大保 貴嗣 (DAIHO, Takashi)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90207267