

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06105

研究課題名(和文)筋小胞体カルシウムポンプを用いた脂質膜環境の膜タンパク機能に与える影響の評価

研究課題名(英文) Effects of lipid environment on the functions of sarcoplasmic reticulum calcium pump

研究代表者

山崎 和生 (Kazuo, Yamasaki)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：60241428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋小胞体カルシウムポンプを用いて、膜タンパク質の機能に対し過剰なタンパク質-脂質間の相互作用が及ぼす影響について調べた。その結果結晶構造で相互作用すると予想されていたArg324とリン脂質のリン酸基間の相互作用が、カルシウムポンプのカルシウム放出過程において、内向きのカルシウム親和性を決めるのに重要な役割を持っていることが明らかになった。またArg324は反応サイクル中で複数種類の脂質との間で相互作用の相手を入れ替えていることが分かった。生理的条件下でのカルシウムポンプの機能を完全に理解するためには、単一の脂質環境ではなく、複合脂質環境での振る舞いを調べるのが不可欠であると結論付けられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質は生命機能について知る上で、非常に重要なターゲットであるが、タンパク質と脂質両方の要因が絡むため問題が非常に複雑で取り扱いが難しい。今回の研究ではナノディスクにカルシウムポンプを組み込んだ標品を用いることにより、様々な脂質環境での酵素機能測定が容易となった。また結晶構造を基にターゲットとなるアミノ酸残基を絞り込むことができたため、部位特異的変異と組み合わせで焦点を絞った研究を行うことができた。得られた結果は、酵素反応サイクル中に特定のアミノ酸残基が相互作用する脂質の種類を変えるという予想していないものであり、脂質組成の重要性を浮き彫りにする意義深いものであった。

研究成果の概要(英文)：Sarcoplasmic reticulum Ca pump was used to investigate the effect of transient protein-lipid interactions on the function of membrane proteins. The results show that the interaction between Arg324 and the phosphate group of the phospholipid, which was observed in the crystal structure, plays an important role in determining the affinity for luminal Ca in the calcium release process of the calcium pump. It was also found that Arg324 changes partners with multiple types of lipids during the reaction cycle. It was concluded that in order to fully understand the function of the calcium pump under physiological conditions, it is essential to examine its behavior in a complex lipid environment rather than a single lipid environment.

研究分野：イオン輸送膜タンパク質のメカニズム

キーワード：カルシウムポンプ イオン輸送 ナノディスク 静電相互作用 リン脂質 膜タンパク質 タンパク質-脂質相互作用 部位特異的変異

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA1a) は P-type に属するイオン輸送ポンプであり、その活性に及ぼす脂質の効果について既に多くの報告がなされていた。脂質のアルキル鎖の長さに関しては、短くても (<鎖長 C14) あるいは長くても (>C24) 活性が抑えられ、膜厚 4.6nm の脂質層が最適であるとされている。また phosphatidylethanolamine (PE) 含量が上がると一旦は活性が上昇するが、PE の比率が著しく高い領域では逆に阻害的に働くことが報告されている。近年同じ P-type のイオン輸送ポンプである  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase では複数の脂質結合部位が見つかり、そこに特定の脂質が結合することにより活性の変化や安定性変化が起こることが報告されている (Habeck et al. PNAS 2017)。これに対し SERCA1a の結晶構造中に PE あるいは PC (phosphatidylcholine) が結合しているものがあるが、このうち PE を PC に置き換えても結晶構造に変化が見られないことが報告されている (Drachmann et al. FEBS J. 2014)。また 2017 年には豊島らにより結晶構造中の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase を取り巻く脂質の位置が特定された (Norimatsu et al. Nature 2017)。これによると  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase を取り囲む一層目の脂質は、多くが水素結合でタンパクとリンクしているが、特定の脂質結合部位は見当たらないこと。また SERCA1a 中の Arg324 が構造変化によって細胞質領域から膜近傍に移動し、リン脂質のリン酸基と静電相互作用を形成することによって、中間体を安定化していることが示されていた。Arg324 については私が以前にリン酸化中間体の転換ステップにおいて重要な役割を持つことを指摘していた (Yamasaki et al. JBC 2004)。しかしながらそのメカニズムについては不明であったが、豊島らの報告で SERCA1a の側鎖の膜へのアンカーリングが  $\text{Ca}^{2+}$  輸送活性と直接関与している可能性が示唆されていた。

## 2. 研究の目的

SERCA1a の活性は脂質による影響を受けるが、それは特定の脂質結合部位によるものではない。脂質を変えることにより、その活性が大きく変化することは多くの膜タンパク質でしばしば観察される。しかしながら、その詳細なメカニズムについては不明な点が多い。膜タンパク自体に脂質結合部位が存在する場合は、その結合の影響で活性に変化が現れるということは容易に想像できるし、結合を阻害するような変異体の作成、結合部位に競合するような阻害剤の影響、結合の有無によるタンパクの立体構造の変化を観測することにより、その機構の詳細な解析も (これはこれで言うほど簡単な仕事ではないだろうが) 比較的容易であると考えられる。これに対し、特定の結合ではなく脂質環境全体として膜タンパクの機能、活性に影響が出ている場合はどうであろう。機能、活性の変化自体は膜タンパクを異なる組成の脂質二重膜に再構成して、観測することは可能であるが、どういう機構でその変化が引き起こされるかを解析するのは容易ではない。本研究ではこのタイプのタンパク-脂質相互作用の解析を目指すものである。

## 3. 研究の方法

### (1) 野生型及び変異体 SERCA1a の発現

COS-1 細胞に SERCA1a の cDNA を導入し、野生型及び Arg324 を Ala あるいは Glu に変えた変異体および E1Ca2 構造において Arg324 と水素結合を形成している Tyr122 を Phe に変えた変異体を発現させ、ミクロソーム画分を調製し野生型および変異体 SERCA1a 標品とした。

### (2) ミクロソーム画分を用いた反応速度論的解析

ミクロソーム標品を用いて ATP 分解活性の Ca 濃度依存性、E2-E1 転換速度、E1Ca2 からの Ca 遊離速度を調べ、また SERCA1a の律速段階であるリン酸化中間体転換ステップに対して、速度定数の対数 vs 活量係数の 2 乗プロットを用いた解析を行うことにより、Arg-脂質間相互作用の変化を静電的要因とそれ以外とに分け解析した。

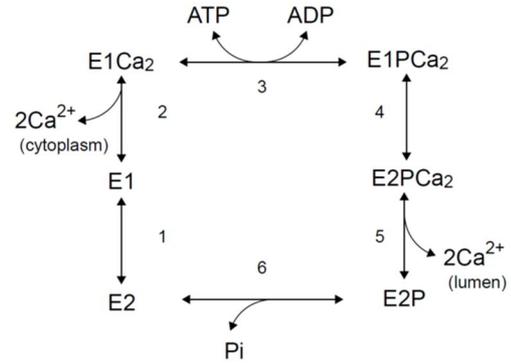
### (3) ナノディスクに組み込んだ SERCA1a を用いた反応速度論的解析

異なる脂質環境で Arg324-脂質間相互作用がどのように変化するか調べるため、組み換え SERCA1a をナノディスクに組み込んで脂質環境の影響を評価した。palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC)、palmitoyl-oleoyl-phosphatidylethanolamine (POPE)、palmitoyl-oleoyl-phosphatidylserine (POPS) 及び palmitoyl-oleoyl-phosphatidylglycerol (POPG) を単独で含む、あるいは POPC、POPE、POPS を SR 膜と同じの脂質組成と同じ比率で混合した脂質ナノディスク (triple) に COS-1 で発現した野生型及び点変異導入した SERCA1a を再構成した。このようにして調製した様々な脂質組成を持つ野生型及び変異体 SERCA1a ナノディスクに対して、リン酸化中間体転換ステップの、速度定数の対数 vs 活量係数の 2 乗プロットを用いた解析を行い異なる脂質環境における Arg324-脂質間相互作用の違いを解析した。

## 4. 研究成果

### (1) E2-E1 転換ステップにおける、Arg324-脂質間相互作用の影響

反応サイクル中の E2-E1 転換ステップ (右図中 step 1) の速度を測定したところ、Arg324 を Ala に置換した変異体 (R324A) は野生型 (WT) の 2 倍程度速く Arg324 を Glu に置換した変異体 (R324E) はさらに速くなっていた。結晶構造では E2 構造では Arg324 とリン脂質のリン酸基の間に静電的相互作用が見られるが、E1 構造ではそれが消失している。野生型は E2-E1 転換ステップにおいて静電的相互作用を切る必要があるため、速度が遅くなるが、R324A ではこの相互作用が無いことにより速い転換が可能となり、R324E では Glu とリン酸基間の負電荷の反発によりさらに速くなっていることが考えられた。しかしながら細胞質側から  $\text{Ca}^{2+}$  結合の親和性は野生型と変異体とで変化はなく、E1-E2 間の平衡定数は変化していなかった。このことは野生型とこれらの変異体で E2 構造のエネルギーレベルが等しいことを示唆している。これは野生型では Arg324-脂質間の静電的相互作用によってその他の部分の構造的ストレス (おそらく細胞質ドメインの強いベンディング) を補償しており、R324A や R324E では脂質との相互作用が無い分、構造的ストレスが小さい構造を取っているのではないかと考えられた。



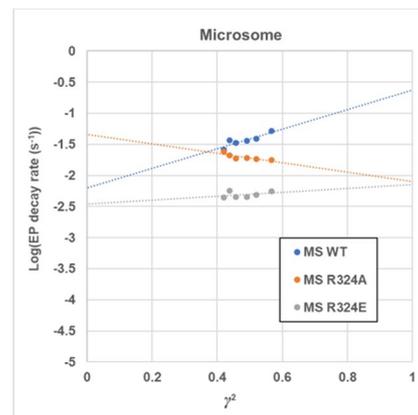
### (2) 内腔側への $\text{Ca}^{2+}$ 放出における Arg324-脂質間相互作用の役割

ミクロソーム標品を用い、ATP 分解活性の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存性を測定した。どの標品も  $\mu\text{M}$  以下の  $\text{Ca}^{2+}$  で活性化され、sub mM 程度の  $\text{Ca}^{2+}$  で阻害を受けるベル型の濃度依存性を示した。このうち高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  による阻害は内腔側からの  $\text{Ca}^{2+}$  結合による、 $\text{Ca}^{2+}$  放出阻害を反映している。変異型 SERCA1a ではどちらも WT と比較して低い  $\text{Ca}^{2+}$  濃度で阻害が起きており、内向きの  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位の親和性が十分に下がっていないことを示している。また R324E の方が R324A と比較してより低濃度で阻害が起きており、Arg324 とリン酸基間の静電的相互作用が  $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性に低下に働いていることを強く示唆している。以前私のグループで報告した SERCA2b のダリエー病原因変異体の内、L321F (321 番目の Leu が Phe) という変異体において、今回見つかった現象と真逆の  $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性が大きく低下することが観察されていた。SERCA1a において Leu321 は Arg324 に隣接し E2P の構造では 7 番目の膜貫通領域にある Phe809 と近接する。従って Leu321 の Phe への変異は Phe809 との相互作用を強めると考えられた。以上の結果から Arg324, Leu321 を含む 4 番目の膜貫通ヘリックスと P ドメインの接続領域が、E2P 構造で膜近傍に強くアンカーされることが、E2PCa<sub>2</sub> で内向きの  $\text{Ca}^{2+}$  親和性を低下させるために重要であると推論できた。

次に各種脂質を持つナノディスクに組み込んだ SERCA1a を用いて、内腔側  $\text{Ca}^{2+}$  親和性に対して脂質ヘッドグループの違いが及ぼす影響について調べた。ミクロソームで観察された内向き  $\text{Ca}^{2+}$  親和性の順 R324E > R324A > WT は、POPC 及び POPS で構成されるナノディスクでは観察されず、どちらの脂質環境でも内向き  $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性はミクロソーム中よりも低く、野生型と変異体間での差は無かった。これに対し POPE を持つナノディスクに組み込んだ場合野生型及び変異体の内向き  $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性はミクロソーム標品とほぼ同じであり、親和性の順 R324E > R324A > WT が維持されていた。これは E2PCa<sub>2</sub> において Arg324 が相互作用している脂質は結晶構造にある PC ではなく PE である可能性を強く示唆する結果である。

### (3) E1P-E2P 転換ステップにおける Arg324-脂質間相互作用の役割

E1P-E2P 転換ステップは SERCA1a の反応サイクルにおいて律速段階であるため、このステップの速度を EP の加水分解速度から見積もることができる。ミクロソームを用い 0.1M KCl 存在下で測定した EP 転換速度は WT > R324A > R324E となり、このステップに Arg324-脂質間相互作用が重要な役割を持つことが示唆された。実際に静電的相互作用がどのようにこのステップに効いているかを調べるために、KCl 濃度を変えて EP 転換速度を測定し速度定数の対数 vs 活量係数の 2 乗プロットを使って解析した。このプロットは反応素過程における静電的相互作用の寄与と非静電的な相互作用に寄与とに分けて評価することができる。その結果、最初の印象とは異なり、EP 転換ステップに対する静電的な促進効果は WT > R324E > R324A の順に弱くなっていった (右図)。R324A では非静電的相互作用による阻害効果が WT や R324E と比較して軽減されているため (y 切片が大きい) 0.1M KCl の測定では総合的に見て WT > R324A > R324E の順になっていたことが分かった。これは単に速度を比較しただけでは見落とされて結果であり、このプロットの有用性を示すものである。またこの結果

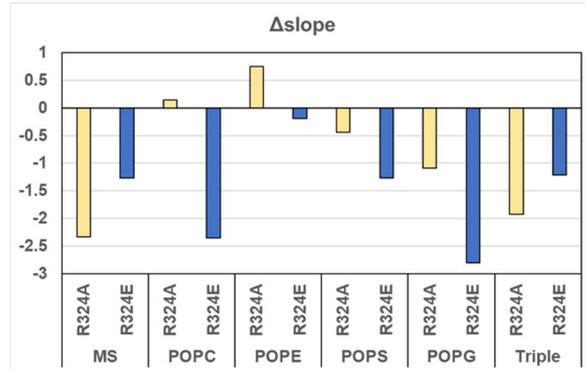


またこの結果

は単純に Arg324 とリン酸基間の相互作用だけではこのステップの Arg324-リン脂質間相互作用の寄与は語れないことを示していた。

ナノディスクに組み込んだ標品で同様の解析を進めたところ、酸性リン脂質 (POPS、POPG) に埋め込んだ場合は WT > R324A > R324E の順番となり、リン酸基との相互作用だけを抜き取れば Arg324-脂質間相互作用は EP 転換ステップに促進的に働くことが示された。これに対し中性リ

ン脂質 (POPC、POPE) では R324A > WT > R324E の順になりリン酸基以外の正電荷がこのステップに影響を及ぼしていることを示している。これらの結果を並べて考えると、すべてのナノディスク標品の結果は R324A > R324E となっており、R324E > R324A であるミクロソームでの結果を単一脂質環境の線形結合として表すことはできないことを示していた。これに対し POPS、POPE 及び POPS を筋小胞体膜の脂質組成を参考に混合したナノディスク (triple、PC:PE:PS = 42:11:7) ではミクロソームで見られた WT > R324E >



R324A の順が再現された。以上の結果は EP 転換ステップに於いて Arg324 は相互作用するリン脂質の種類を変えながらその役割を果たしていることが示唆された。E1P の構造では Arg324 と相互作用するリン脂質は 1 つであるのに対し、E2P では 2 つのヘッドグループと相互作用しており E2 ではまた 1 つになる。このステップに於いて、Arg は相互作用する相手のリン脂質を相手の種類を含めて大きく変えている、つまり Arg-PC PE-Arg-PC PE-Arg というように相手のリン脂質をスイングするような過程を取っている可能性を示唆する結果であった。

#### (4) 結論

今回の研究によって SERCA1a の機能が、Arg324-脂質間相互作用によって確かに影響を受けることが示された。特に細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の厳密な調節に係る、内向き  $Ca^{2+}$  親和性に影響を及ぼし、しかも相互作用する脂質の種類にも依存するという結果は、非常に重要なものであった。また反応サイクル中に SERCA1a が相互作用する脂質の種類を変えているという結果は、膜タンパクの機能解析において新たな着目点を与え、混合脂質環境の影響を考えることの重要性を示すものである。現在膜タンパク質の構造解析の多くは可溶化された状態で行われ、単一の脂質存在下で行われたものである。今回の研究結果が示すように、一過的な脂質 タンパク質間相互作用とその組み換えが機能発現に重要であるということを踏まえると、膜タンパクの動的な機能解析のためにはより多種類の脂質組成を持つ環境下での解析が重要であると結論付けられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎 和生、大保 貴嗣、安田 哲、Stefaina Danko、川辺 淳一、鈴木 裕
2. 発表標題 筋小胞体カルシウムポンプの結晶構造中に見られたArg324とリン脂質間のリンクが果たす役割について
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎 和生、大保 貴嗣、安田 哲、Stefania Danko、川辺 淳一、鈴木 裕
2. 発表標題 筋小胞体カルシウムポンプの結晶構造中に見られた Arg324とリン脂質間のリンクが果たす役割について
3. 学会等名 第46回日本生体エネルギー研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎和生、山崎誠一郎、市村佑人、大保貴嗣、Stefania Danko、安田哲、鈴木裕
2. 発表標題 筋小胞体カルシウムポンプTyr122-疎水性クラスター変異体の古典的物理化学公式を用いた解析 - 酵素反応における疎水性結合の寄与の定量化の試み
3. 学会等名 第45回日本生体エネルギー研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎和生、市村佑人、山崎誠一郎、大保貴嗣、Stefania Danko、安田哲、鈴木裕
2. 発表標題 筋小胞体カルシウムポンプのTyr122クラスター変異体で観測された異常に遅いIEP分解
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 山崎 和生, 大保 貴嗣, Stefania Danko, 安田 哲, 鈴木 裕
2. 発表標題 筋小胞体Ca <sup>2+</sup> -ATPaseの脱共役モードについて
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 山崎 和生, 大保 貴嗣, Stefania Danko, 安田 哲, 鈴木 裕
2. 発表標題 筋小胞体Ca <sup>2+</sup> -ATPaseの脱共役モードについて
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第44回討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹村 勤哉, 小島 知樹, 山崎 和生, 大保 貴嗣, Stefania Danko, 鈴木 裕, 政池 知子
2. 発表標題 ナノディスク中の筋小胞体Ca <sup>2+</sup> -ATPaseに標識された単一分子の角度と明滅による中間体構造の評価
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第44回討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤 孝信, 藤村 章子, 山崎 和生, 大保 貴嗣, Danko Stefania, 鈴木 裕, 西坂 崇之
2. 発表標題 デフォーカスイメージング法の確度評価とSERCA1aの構造変化検出に向けた試み
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第44回討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎和生、大保貴嗣、 Danko Stefania、安田 哲、川辺 淳一、鈴木裕
2. 発表標題 筋小胞体カルシウムポンプの多機能性残基 Arg324 と脂質との相互作用の多様性について
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第47回討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎和生、大保貴嗣、 Danko Stefania、安田 哲、川辺 淳一、鈴木裕
2. 発表標題 筋小胞体カルシウムポンプの多機能側鎖Arg324と多種のリン脂質のアンサンブル
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〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------