

研究種目：特別推進研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19002013

研究課題名（和文）イオン輸送体の構造生物学

研究課題名（英文）Structural biology of ion transporters

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

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：イオンポンプ・膜蛋白質・結晶解析

1. 研究計画の概要

本研究はこれまでのウサギ骨格筋の筋小胞体カルシウムポンプ (Ca^{2+} -ATPase、SERCA1a)の構造解析とそれに基づく能動輸送機構の理解を進展させ、最終的には結核菌等の病原菌の膜輸送体の構造解析を行うことによって薬剤の開発へと結びつけることを目標とするものである。比較的手近にある具体的な課題として(1)筋小胞体 Ca^{2+} -ATPaseの残された中間体、特に内腔側ゲートが開いている唯一の状態と考えられる E2P 基底状態 (Ca^{2+} 非存在下のリン酸化状態)の構造決定。(2) Ca^{2+} -ATPase 変異体の構造解析、特に Ca^{2+} が1個だけ結合した状態の構造決定を可能にすると考えられる E309Q/A 変異体の解析。(3) Ca^{2+} -ATPase (変異体)と薬物複合体の構造決定、特に抗マラリア薬であるアルテミシニン或いはその派生物との複合体の構造決定。(4) 生物学・医学的にはより重要ともいえる Na^{+} , K^{+} -ATPase の構造決定。(5) Ca^{2+} -ATPase とは大きく異なった構造を有する重金属ポンプの構造決定、特に銅イオンのポンプである CopA の構造決定。(6) バクテリアの P 型 ATPase の構造決定。(7) 植物液胞の H^{+} ポンプである PPase の構造決定、を提案した。

2. 研究の進捗状況

(1-3) 筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の中間体の構造解析：内腔側ゲートが開いていると考えられる唯一の状態である E2P 基底状態 (Ca^{2+} 非存在下のリン酸化状態)の理解を目指し、 $\text{E2}\cdot\text{BeF}_x$ 複合体の構造を、強力阻害剤タブシガーニン存在下、非存在下で決定した。この結果、内腔側ゲートの開閉という構造変化と

リン酸化アスパラギン酸の加水分解という化学反応を結びつけることに成功した。また、P ドメインが楔形をしていることの意義、A ドメイン M1 ループの長さの重要性等も明らかになり、研究は飛躍的に前進した(論文)。

(4) Na^{+} , K^{+} -ATPase の構造解析：デンマークグループとの共同研究により 2.4 Å 分解能で $\text{E2}\cdot 2\text{K}^{+}\cdot\text{Pi}$ 状態のほぼ全構造の決定に成功した。サブユニットと FXFD 蛋白質の構造的意義をも明らかにした。また、ほとんど同じ残基が関与するにもかかわらず、 Ca^{2+} -ATPase と Na^{+} , K^{+} -ATPase では対向輸送におけるイオン選択性が大きく異なることの原因も明らかにできた(論文)。また、強心配糖体として有名なウアバインとの低親和性複合体の構造決定にも成功した。これまでの多くの予想に反して、ウアバインは膜内に深く挿入されており、ラクトン部分が膜貫通ヘリックスの一部をほどこすことも示した。(論文)。これによって、医学的にも重要な貢献ができた。

(5) 重金属ポンプの構造解析：古細菌由来銅ポンプ CopA の PN ドメインと、AMPPCP、ADP などの複合体の構造を高分解能で決定した。また、重金属ポンプで絶対的に保存される Wilson 病で変異が見られる H479Q 複合体の構造も決定した。この結果、重金属ポンプは他の P 型 ATPase とは全く異なる ATP の認識の仕方をすることや、His 残基の ATP 結合における役割が明らかになり、変異の効果も理解できた(論文)。

3. 現在までの達成度

当初の計画以上に進展している。

(理由)

本研究開始時点では(1)の Ca^{2+} -ATPase の中間体の構造解析に関しては、E2P 基底状態の構造決定、それもタブシガーギン存在下で、内腔側ゲートは閉まった状態の解析しか見通しは立っていなかった。しかし、実際はタブシガーギン無しの状態の結晶化にも成功し、リン酸化サイトで起こる化学反応とイオン結合サイトの機械的運動をみごとに結びつけることができた。さらに、まだ未発表ではあるが、これ迄まったく見通しのなかった Ca^{2+} 非存在下のE1状態の構造決定にも成功した。得られた結果は驚くべきものであり、これ迄の生化学的データを見事に説明できた。この構造の意義は絶大である。

さらに、これも全く見通しがなかった Na^+, K^+ ATPase の高分解能構造決定にも成功した。これは Ca^{2+} ATPase のメカニズムの理解にも大きく貢献するだけでなく、本研究が目標とするところの「人の役に立つ構造研究」にも大きく貢献するものとなった。さらにウアバインとの複合体の構造決定はこれ迄の定説を完全に覆すものであり、ダウンロードの件数から見て、絶大なインパクトがあった。この仕事から逆に、強心配糖体が心筋で働くアイソフォームにのみ効くようにするにはどうすれば良いかの指針も得られ、次の標的も明らかになった。

同じく未発表ではあるが、溶媒の電子密度を変えることによって、乱れた構造を可視化する技術の開発に成功した。この方法によって、脂質二重膜を直接可視化でき、本質的に新しい知見が得られた。さらに、この方法を用いれば溶媒の accessibility を溶媒置換確率として直接測定できるわけで、研究進捗評価(現地調査)でも認められたように、学術的価値は高いと考えられる。研究開始当初は、ここまで発展できるとは考えていなかったため、研究目標にも掲げなかったが、期待以上の成果が得られているといえよう。

4. 今後の研究の推進方策

(1) Ca^{2+} ATPase に関して: 残された E1 状態の構造解析を完成させることが当面の目標である。これによって、 Ca^{2+} ATPase によるイオンポンプ機構のほぼ完全な構造的描像が得られる。変異体の精製方法、微量結晶化法もほぼ確立できたので、その構造決定も視野に入っている。

(2) Na^+, K^+ ATPase に関して: 強心配糖体が高親和性で結合した複合体 ($\text{E}2 \cdot \text{BeF}_x \cdot \text{ouabain}$) と $\text{E}2 \cdot 2\text{K}^+$ 状態の構造解析が当面の目標である。酵母発現系を利用したヒト 1-1 アイソフォームに関しては、イスラエルグループの協力が得られる。

(3) 膜蛋白質発現系の開発: 高等動物発現系が稼動しただけで、研究対象は大幅に拡大することが期待される。発現の当面の標的

としては、 Ca^{2+} ATPase (SERCA1a) の他に、 Na^+, K^+ ATPase のヒト 2-1 アイソフォームがある。また、マラリアの Ca^{2+} ATPase であり、抗マラリア薬であるアルテミシニンの標的とされる PfATP6 と薬剤の複合体の構造決定を目指す。結核菌のイオン輸送体に関しては、まだ発現系から開発が必要である。

(4) 脂質二重膜の可視化: コントラスト変調法による Ca^{2+} ATPase の4つの状態におけるデータ収集は既にほぼ完成している。アルゴリズムに多少の問題点があるので、それを解決し論文にまとめるのが当面の目標である。また、分子動力学シミュレーションによるモデルの検証を進める。

(5) 植物液胞膜 H^+ PPase の結晶構造解析: H^+ PPase は H^+ のポンプであり、ATP の代わりにピロリン酸が使われる、植物のエネルギー代謝には非常に重要な蛋白質である。16回膜貫通型でありP型とは異なった全く新規の構造が予想されている。研究期間内に結晶構造を決定できよう。

5. 代表的な研究成果

(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13件)

H. Ogawa, T. Shinoda, F. Cornelius and C. Toyoshima: Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na^+, K^+ -ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **106**, 13742-13747 (2009)

T. Tsuda and C. Toyoshima: Nucleotide recognition by CopA, a Cu^{2+} -transporting P-type ATPase. *EMBO J.* **28**, 1782-1791 (2009)

T. Shinoda, H. Ogawa, F. Cornelius and C. Toyoshima: Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* **459**, 446-450 (2009)

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

C. Toyoshima, Y. Norimatsu, S. Iwasawa, T. Tsuda and H. Ogawa: How processing of aspartylphosphate is coupled to lumenal gating of the ion pathway in the calcium pump. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **104**, 19831-19836 (2007)

[学会発表](計9件)

C. Toyoshima: A Molecular Machine at Works: The Case of the Calcium Pump Protein. The Charles M. and Martha Hitchcock Lectures, Berkeley, USA, Apr 30 and May 1, 2008