

機関番号：10107

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570102

研究課題名 (和文) 小胞体カルシウムポンプのリン酸化中間体の異性化とカルシウム輸送の  
連関研究課題名 (英文) Linkage between Isomerization of Phosphoenzyme Intermediate and  
Calcium Transport in Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump

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

研究成果の概要 (和文)：小胞体カルシウムポンプの輸送反応は、ATP でリン酸化された中間体 (EP) の形成と加水分解を経由する。細胞質から EP に結合した  $\text{Ca}^{2+}$  は、その異性化 ( $\text{E1P}\cdot\text{Ca}_2 \rightarrow \text{E2P}$ ) 段階で内腔に放出される。筆者は、その異性化に必須な構造因子を発見し、これら 2 つの EP 間に新しい中間体 ( $\text{E2P}\cdot\text{Ca}_2$ ) を同定した。また、原子構造解析などを行う目的で、 $\text{E1P}\cdot\text{Ca}_2$  と  $\text{E2P}\cdot\text{Ca}_2$  の安定なアナログを開発した。さらに、EP への  $\text{K}^+$  イオン結合の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送における新しい役割、高濃度 ATP によるポンプ活性化機構の解明に貢献した。

研究成果の概要 (英文) :  $\text{Ca}^{2+}$  is transported by sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -pump through formation and hydrolysis of phosphoenzyme intermediate (EP) phosphorylated with ATP.  $\text{Ca}^{2+}$  ions bound to EP from cytoplasm are released into lumen in its isomerization ( $\text{E1P}\cdot\text{Ca}_2 \rightarrow \text{E2P}$ ). I found structural elements essential for the isomerization, and found a new EP intermediate ( $\text{E2P}\cdot\text{Ca}_2$ ) between these two EPs. To perform atomic or other structural analysis, I then developed stable analogs for  $\text{E1P}\cdot\text{Ca}_2$  and  $\text{E2P}\cdot\text{Ca}_2$ . Furthermore, I have elucidated some new roles of the  $\text{K}^+$  ion bound to EP during  $\text{Ca}^{2+}$  transport and the mechanism of pump activation by high-concentration of ATP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード： $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase、カルシウムポンプ、イオン輸送、酵素反応速度論、部位特異的変異、P-type ATPase、中間体構造アナログ

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプは 1 個の ATP の加水分解に  
共役して 2 個の  $\text{Ca}^{2+}$  を細胞質から小胞体内腔

に輸送する。このポンプは、輸送反応におい  
て ATP によりリン酸化されたリン酸化中間  
体 (EP) を経由する。この EP の異性化段階  
にて、EP に結合していた細胞質由来の  $\text{Ca}^{2+}$

が内腔へ放出される (E1P·Ca<sub>2</sub> → E2P + 2Ca<sup>2+</sup><sub>in</sub>)。本酵素の触媒部位は膜から突き出た細胞質領域にある。この領域は3つのドメイン(ATPを結合するNドメイン、リン酸化部位を持つPドメイン、actuatorと呼ばれるAドメイン)

で構成される。これに対し、Ca<sup>2+</sup>輸送部位は触媒部位から遠く離れた膜貫通ドメインにある。しかし、触媒部位からの構造変化シグナルが如何にしてCa<sup>2+</sup>輸送部位に伝達されるか、それにより膜ドメインのどのような構造変化が起こり、内腔側のCa<sup>2+</sup> gateを開いてCa<sup>2+</sup>を放出するかは未だ不明である。

筆者は最近、Aドメインと膜ドメインのM1ヘリックスを繋ぐループのA/M1-linker (Glu<sup>40</sup>-Ser<sup>48</sup>)の長さが適切であることが、EPの異性化から分解までの各段階に重要であることを示した。即ち、A/M1-linkerを1残基分短くするとADP感受性(E1P·Ca<sub>2</sub>に特徴的な性質であり、ADPと反応してATPを再合成し、EPが速やかにdecayする)の消失(即ちE1P·Ca<sub>2</sub> → E2P + 2Ca<sup>2+</sup><sub>in</sub>)、およびE2Pの加水分解が阻害される。逆に、このlinkerに2個以上のGlyを挿入して伸長するとlumenへのCa<sup>2+</sup>脱閉塞がblockされ、ADP非感受性のE2P·Ca<sub>2</sub>が蓄積する。これより、1段階と考えられていた“Ca<sup>2+</sup>の輸送を伴うEPの異性化”が、実は細胞質ドメインの集合状態変化とそれに続くCa<sup>2+</sup>放出の2段階(E1P·Ca<sub>2</sub> → E2P·Ca<sub>2</sub> → E2P + 2Ca<sup>2+</sup><sub>in</sub>)で起こることが判明した。Aドメインが回転してPドメインの上に乗り上げて結合することにより、このlinkerに「strain」が発生し、Aドメインが膜

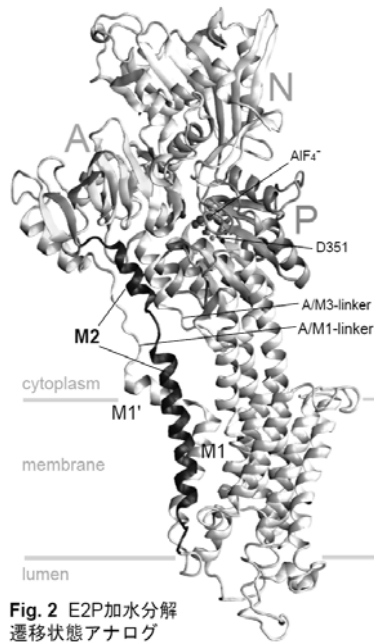


Fig. 2 E2P加水分解遷移状態アナログ E2AIF<sub>4</sub><sup>-</sup> (PDB code: 2ZBG)

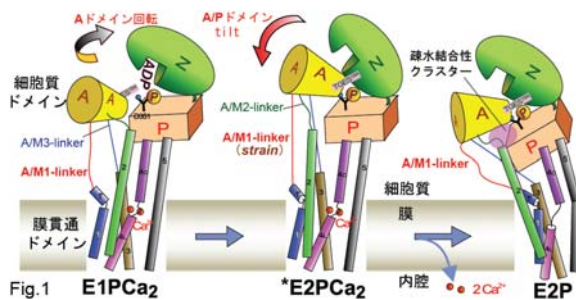


Fig.1

方向に引っ張られ、それが結合したPドメインを引っ張って膜方向に倒しこむ。この大きな動きが膜ドメインのヘリックス配置を変えて内腔側のCa<sup>2+</sup>-gateを開き、E2P·Ca<sub>2</sub> → E2PでのCa<sup>2+</sup>脱閉塞がおこすと推測される。以上の成果より、EPの異性化/Ca<sup>2+</sup>放出の機構がより詳細に解析できる道が拓けた。

## 2. 研究の目的

筆者の最近の研究成果より、EPの異性化を2つのstepに分けて解析することが可能となった。前半は、後半で起こるCa<sup>2+</sup>放出のための準備段階であり、細胞質ドメインの構造変化が膜ドメインに伝達されてCa<sup>2+</sup>放出が起こる。Ca<sup>2+</sup>輸送機構を理解するためにはこれら両方の構造変化を解明する必要がある。そして、これらの解析に多くの情報・ヒントを与えてくれるのが新しい中間体E2P·Ca<sub>2</sub>の原子モデルであろう。本研究の第1の目的は、E2P·Ca<sub>2</sub>の安定なアナログを開発し、結晶化の安定化条件を検討することにより、結晶構造解析に供することである。また、E1P·Ca<sub>2</sub>の安定なアナログも未開発であったため、その開発も行う。本研究の第2の目的は、前半のstepでAドメインが回転してPドメインに結合するとき、細胞質ドメインがどのように集合状態を変えてE2P·Ca<sub>2</sub>の構造となるかを明らかにする。そのために、EPアナログの結晶構造を参考にして、細胞質ドメイン同士の接触部を中心に、前半のstep (ADP感受性の消失)に必須な構造因子をmutation studyにより検索する。さらに、その構造変化が如何にして膜ドメインに伝達されるかを明らかにする。そのために、細胞質ドメインと膜ドメインの連結部を中心に、Ca<sup>2+</sup>放出に必須な構造因子をmutation studyにより検索する。変異体の反応速度論的な解析、およびproteolysisに対する抵抗性を用いた細胞質ドメインの集合状態の解析により、注目した因子の構造/機能的な役割を検討する。

## 3. 研究の方法

本研究の第1の目的を達成するために、リン酸アナログとしてAl<sup>3+</sup>/F<sup>-</sup>、Be<sup>2+</sup>/F<sup>-</sup>等をカルシウムポンプに結合させ、E2P·Ca<sub>2</sub>の安定なアナログを開発する。また、それらを結晶化するための安定化条件を検討する。平成21年度以降では、本研究の第2の目的を達成するために、EP異性化の前半のstepでAドメインが回転してPドメインに結合するという構造変化に必須な構造因子をmutation studyにより細胞質ドメイン接触部に検索する。それらの因子について、E2P·Ca<sub>2</sub>のドメイン集合における構造的または機能的役割を検討する。

#### 4. 研究成果

本研究の第1の目的を達成するために、A/M1-linker に 4Gly を挿入した変異体 (4Gi-46/47) にリン酸アナログとして metal/フッ素を結合させた安定な E2P·Ca<sub>2</sub> アナログを開発した。4Gi-46/47 を Ca<sub>2</sub>E1 にしておき、リン酸アナログである Be/F あるいは Al/F を添加すると ATP からの EP 形成能が阻害された (Fig. 1A and B)。この阻害には、Be<sup>2+</sup> または Al<sup>3+</sup>、F<sup>-</sup>、および Mg<sup>2+</sup> の添加が必要であった。4Gi-46/47 に Be/F を添加して形成した複合体には EP あたり約 2 個の Ca<sup>2+</sup> が閉塞されていた。

一方、E2P は lumen 側 Ca<sup>2+</sup>-gate が開いており、Ca<sup>2+</sup> が結合すると Ca<sup>2+</sup> 放出の逆反応がおこって 4Gi-46/47 では E2P·Ca<sub>2</sub>、野生型では E1P·Ca<sub>2</sub> を形成する。E2P アナログの E2·Be/F を形成後、Ca<sup>2+</sup> イオノフォア A23187 存在下 10 mM Ca<sup>2+</sup> で処理すると、野生型では EP 形成能が回復したが、4Gi-46/47 では回復しなかった (Fig. 1C and D)。この 4Gi-46/47 の E2·Be/F + Ca<sup>2+</sup> で得た複合体にも EP あたり約 2 個の Ca<sup>2+</sup> が閉塞されていた。一方、E2·Al/F + Ca<sup>2+</sup> では 4Gi-46/47 と野生型の両方で EP 形成能が回復した。

また、得られた複合体を trypsin および proteinase K (prtK) で処理し、特異的切断部位の切断感受性から細胞質ドメインの会合状態 (E1P·Ca<sub>2</sub> 型かあるいは E2P 型か) を調べた。その結果、4Gi-46/47 で形成した Ca<sub>2</sub>E2·Be/F では、Arg<sup>198</sup> が trypsin で切断されず、また Leu<sup>119</sup> が prtK により迅速に切断された。その性質は 4Gi-46/47 で蓄積した E2P·Ca<sub>2</sub> のものと一致している。以上の結果から 4Gi-46/47 に Be/F と Ca<sup>2+</sup> を結合した複合体は E2P·Ca<sub>2</sub> のアナログであると結論した (雑誌論文⑤)。また、このアナログ Ca<sub>2</sub>E2·Be/F は 25°C で長時間 (7 日以上) 安定であることが示された。さらに、筆者は、まだ開発されていなかった E1P·Ca<sub>2</sub> のアナログ Ca<sub>2</sub>E1·Be/F を、野生型 Ca<sup>2+</sup> ポンプに Be/F を結合させることにより開発した (雑誌論文②)。これらより、EP 異性化/Ca<sup>2+</sup> 放出の全体像 (E1P·Ca<sub>2</sub> → E2P·Ca<sub>2</sub> → E2P + 2Ca<sup>2+</sup><sub>in</sub>) を段階的に詳しく構造的解析をすることが可能となった。

次に、本研究の第2の目的を達成するために、EP 異性化の前半の step で A ドメインが回転して P ドメインに結合するという構造変化に必須な構造因子を mutation study により細胞質ドメイン接触部に検索した。その結果から、A-N ドメイン接触領域にある Ser<sup>186</sup>-Glu<sup>439</sup> の水素結合形成が E2P の構造を安定化させること、また ATP による EP 構造転換の促進を生起させることを示した (雑誌論文③)。

ところで、膜ドメインから延びる M2

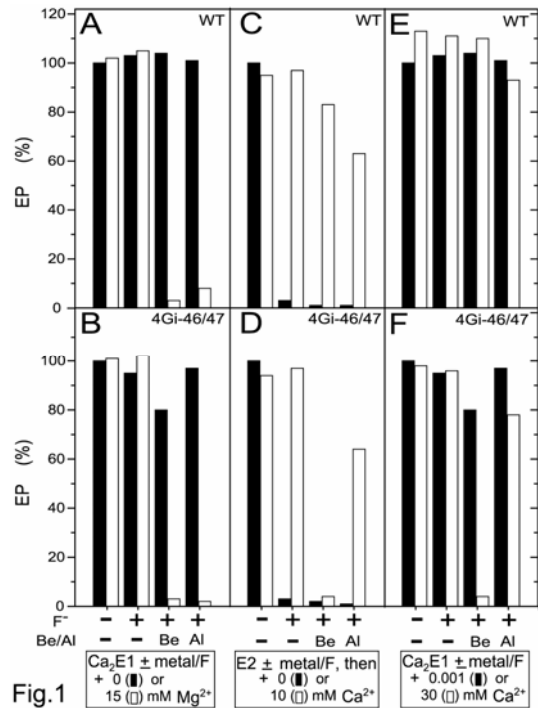


Fig. 1

ヘリックス上には Tyr<sup>122</sup> があるが、E2P ではこれを中心として、A-P ドメイン接触領域と M2 の上部によって疎水性クラスターが形成される。しかし、E1P·Ca<sub>2</sub> では形成されない。筆者は、このクラスターが Ca<sup>2+</sup> 輸送段階において、Ca<sup>2+</sup> 親和性の低下と lumen 側の gate を開くことに重要であることを示した。また、P ドメインへの K<sup>+</sup> 結合がこのクラスターと同様の働きをすることを示した (雑誌論文①)。さらに、K<sup>+</sup> 非存在下では、E1P·Ca<sub>2</sub> → E2P 転換に際し、ADP 感受性の喪失と Ca<sup>2+</sup> 放出が独立に起こりうることを示した (雑誌論文⑥)。これらより、P ドメインへの K<sup>+</sup> 結合が E1P·Ca<sub>2</sub> への Ca<sup>2+</sup> 結合を安定化するという生理的意義をもつことを明らかにした。

次に、Ca<sup>2+</sup> 輸送サイクル各段階において、A ドメインと膜貫通ヘリックス M2 を結ぶ A/M2-linker、および M2 ヘリックスに着目して、Gly 挿入などの部位特異的変異導入によりその構造を崩してその効果を調べた。これより A/M2-linker の長さが適切であること、また M2 の 2 次構造が変化することが重要な反応段階が見出された。そして、M2 の構造変化が、E2P の加水分解、Ca<sup>2+</sup> による非リン酸化酵素の活性化など Ca<sup>2+</sup> 輸送サイクル全体にわたる各段階を押し進める中心的役割を果たしていることを示した。[学会発表⑭、⑯、⑰]。

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 6 件)

- ① Yamasaki K., Daiho T., Danko S., Suzuki H. Ca<sup>2+</sup> Release to Lumen from ADP-sensitive Phosphoenzyme E1PCa<sub>2</sub> without Bound K<sup>+</sup> of Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol. 285, No. 49, 2010, 38674-38683
- ② Daiho T., Danko S., Yamasaki K., Suzuki H. Stable structural analog of Ca<sup>2+</sup>-ATPase ADP-insensitive phosphoenzyme with occluded Ca<sup>2+</sup> formed by elongation of A-domain/M1'-linker and beryllium fluoride binding, *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol. 285, No. 32, 2010, 24538-24547
- ③ Suzuki H., Yamasaki K., Daiho T., Danko S. Mechanism of Ca<sup>2+</sup> pump as revealed by mutations, development of stable analogs of phosphorylated intermediates, and their structural analyses, *Yakugaku Zasshi*, 査読無, Vol. 130, No. 2, 2010, 179-189
- ④ Liu X., Daiho T., Yamasaki K., Wang G., Danko S., Suzuki H. Roles of interaction between actuator and nucleotide binding domains of sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase as revealed by single and swap mutational analyses of serine 186 and glutamate 439, *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol. 284, No. 37, 2009, 25190-25198
- ⑤ Danko S., Daiho T., Yamasaki K., Liu X., Suzuki H. Formation of the stable structural analog of ADP-sensitive phosphoenzyme of Ca<sup>2+</sup>-ATPase with occluded Ca<sup>2+</sup> by beryllium fluoride: structural changes during phosphorylation and isomerization, *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol. 284, No. 34, 2009, 22722-22735
- ⑥ Yamasaki K., Wang G., Daiho T., Danko S., Suzuki H. Roles of Tyr<sup>122</sup>-hydrophobic cluster and K<sup>+</sup> binding in Ca<sup>2+</sup>-releasing process of ADP-insensitive phosphoenzyme of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol. 283, No. 43, 2008,

29144-29155

[学会発表] (計 20 件)

- ① 山崎 和生, 大保 貴嗣, Stefania Danko, 鈴木 裕  
筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase のリン酸化中間体転換過程における静電的相互作用の役割、  
第 83 回日本生化学会第 33 回日本分子生物学会年会合同大会、2010、12 月 7 日、神戸
- ② 大保 貴嗣, ダンコ ステファニア, 山崎 和生, 鈴木 裕  
筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase のリン酸化中間体の異性化と加水分解に影響を及ぼす構造因子、  
第 83 回日本生化学会第 33 回日本分子生物学会年会合同大会、2010、12 月 7 日、神戸
- ③ 山崎 和生, 大保 貴嗣, Danko Stefania, 鈴木 裕  
筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase の反応サイクルにおける静電的相互作用の役割とイオン強度依存性との関連、  
生体エネルギー研究会第 36 回討論会、2010、11 月 18 日、大阪
- ④ 大保 貴嗣, Danko Stefania, 山崎 和生, 鈴木 裕  
筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase による Ca<sup>2+</sup> 輸送; 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を結ぶループの役割、  
生体エネルギー研究会第 36 回討論会、2010、11 月 18 日、大阪
- ⑤ 山崎 和生, 大保 貴嗣, 鈴木 裕  
筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase の E1P-E2P 転換と Ca<sup>2+</sup> 共役における K<sup>+</sup> の役割、  
生体エネルギー研究会第 35 回討論会、2009、12 月 18 日、旭川
- ⑥ 大保 貴嗣, Danko Stefania, 山崎 和生, 鈴木 裕  
筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase のリン酸化中間体転換と Ca<sup>2+</sup> 輸送; 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を結ぶループの役割、  
生体エネルギー研究会第 35 回討論会、2009、12 月 18 日、旭川
- ⑦ 山崎 和生, 大保 貴嗣, 鈴木 裕  
筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase の E1P-E2P 転換と Ca<sup>2+</sup> 共役における K<sup>+</sup> の役割、  
第 82 回日本生化学会大会、2009、10 月 24 日、神戸
- ⑧ 大保 貴嗣, 山崎 和生, ダンコ ステファニア, 鈴木 裕

高濃度 ATP による筋小胞体リン酸化中間体分解の促進効果について；Actuator/M1-linker を伸長させた変異体を用いた解析、第 82 回日本生化学会大会、2009、10 月 24 日、神戸

⑨ 山崎 和生、大保 貴嗣、鈴木 裕  
筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の E1P-E2P 転換と  $\text{Ca}^{2+}$  輸送の共役における  $\text{K}^+$  の役割、日本生化学会 第 46 回北海道支部例会、2009、7 月 17 日、旭川

⑩ 大保 貴嗣、Stefania Danko、山崎 和生、鈴木 裕  
筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase のリン酸化中間体転換と  $\text{Ca}^{2+}$  輸送；細胞質領域 Actuator ドメインと膜貫通ヘリックス M1 を結ぶループの役割、日本生化学会 第 46 回北海道支部例会、2009、7 月 17 日、旭川

⑪ 鈴木 裕、山崎 和生、大保 貴嗣、Stefania Danko  
 $\text{Ca}^{2+}$  ポンプの分子作動機構：部位特異的変異およびリン酸化中間体アナログの開発と構造解析による理解、日本薬学会 第 129 年会、2009、3 月 26 日、京都

⑫ Xiaoyu Ryu, Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki  
Roles of interactions between Actuator- and Nucleotide binding- domains of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase、第 81 回日本生化学会第 31 回日本分子生物学会年会合同大会、2008、12 月 9 日、神戸

⑬ 山崎 和生、王 国麗、大保 貴嗣、鈴木 裕  
筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の E2PCa<sub>2</sub> における Tyr122-Hydrophobic cluster の果たす役割について、第 81 回日本生化学会第 31 回日本分子生物学会年会合同大会、2008、12 月 9 日、神戸

⑭ 大保 貴嗣、Stefania Danko、山崎 和生、鈴木 裕  
筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の  $\text{Ca}^{2+}$  結合型-リン酸化中間体アナログの安定性に及ぼすヌクレオチドの効果、第 81 回日本生化学会第 31 回日本分子生物学会年会合同大会、2008、12 月 9 日、神戸

⑮ 山崎 和生、大保 貴嗣、鈴木 裕  
筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の P-N ヒンジ領域に存在する荷電側鎖の役割と一価イオンの影響、生体エネルギー研究会第 34 回討論会、2008、11 月 8 日、東京

⑯ 鈴木 裕、大保 貴嗣、山崎 和生、劉曉宇、Danko Stefania  
 $\text{Ca}^{2+}$  ポンプの輸送機構一部位特異的変異およびリン酸化中間体アナログの開発と構造解析による理解、生体エネルギー研究会第 34 回討論会、2008、11 月 8 日、東京

⑰ 大保 貴嗣、山崎 和生、鈴木 裕  
筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase のリン酸化中間体の転換及び  $\text{Ca}^{2+}$  輸送におよぼすヌクレオチドの顕著な効果、生体エネルギー研究会第 34 回討論会、2008、11 月 8 日、東京

⑱ Hiroshi Suzuki, Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Xiaoyu Liu, and Stefania Danko  
Roles of the A domain and its linkers of sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump for processing the phosphorylated intermediates and  $\text{Ca}^{2+}$  release, 12th International ATPase Conference Na,K-ATPase and Related Transport ATPases of P-type: Structures, Mechanisms, and Roles in Health and Disease, 2008, Aug, Aarhus (Denmark)

⑲ Kazuo Yamasaki, Guoli Wang, Takashi Daiho, and Hiroshi Suzuki  
Roles of Tyr122-Hydrophobic cluster and  $\text{K}^+$  binding in  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing Process of ADP-insensitive Phosphoenzyme of Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, 12th International ATPase Conference Na,K-ATPase and Related Transport ATPases of P-type: Structures, Mechanisms, and Roles in Health and Disease, 2008, Aug, Aarhus (Denmark)

⑳ Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki  
Critical Role of Glu40-Ser48 Loop Linking Actuator Domain and First Transmembrane Helix of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in  $\text{Ca}^{2+}$  Deocclusion and Release from ADP-insensitive Phosphoenzyme, 12th International ATPase Conference Na,K-ATPase and Related Transport ATPases of P-type: Structures, Mechanisms, and Roles in Health and Disease, 2008, Aug, Aarhus (Denmark)

## 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