

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 17 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570127

研究課題名（和文）筋小胞体カルシウムポンプ細胞質ドメインの動きにおける静電的相互作用の役割の解析

研究課題名（英文）Analysis of the role of electrostatic interactions between cytoplasmic domains of sarcoplasmic reticulum calcium pump

研究代表者

山崎 和生 (YAMASAKI KAZUO)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：60241428

研究成果の概要（和文）：筋小胞体カルシウムポンプ細胞質ドメインの動きにおける静電的相互作用の役割を、変異体を用いた反応速度論的解析によって調べた。その際反応速度の対数と活量係数の二乗との間に直線関係が成り立つことを見出し、このプロットを用いて、カルシウムポンプのドメインの動きをガイドするドメイン間の静電的相互作用の存在を明らかにすることができた。この研究で見出された反応速度の対数 vs 活量係数の二乗のプロットはタンパク質の分子内、分子間相互作用中の静電相互作用の寄与を定量的に見積もる有効な手段となりうる。

研究成果の概要（英文）：I explored the roles of electrostatic interactions in the movement of cytoplasmic domain of sarcoplasmic reticulum calcium pump by using a kinetic analysis of site-directed mutants. In this study, I found a linear relationship between logarithm of rate constant and square of the activity coefficient. This plot revealed that electrostatic interactions between domains act like a guide line of domain motion. This plot would provide a useful tool for quantification of electrostatic effects in the enzyme reactions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・機能生物化学

キーワード：生体エネルギー転換・カルシウムポンプ

1. 研究開始当初の背景

筋小胞体カルシウムポンプの Ca^{2+} 輸送機構についての研究は古くから行われてきており、長年にわたる反応速度論的解析、及び部位特異的変異体の解析結果の蓄積がある。また 2000 年に豊島らにより他の P-type イオン輸送タンパクに先駆けてこのポンプタンパクの分子構造モデルが明らかにされたのを皮切りに、さまざまな反応中間体もしくは

そのアナログの結晶構造が解かれた。これらの結果を合わせることにより、ATP 加水分解反応と Ca^{2+} 輸送反応の共役を分子レベルの動きで記述する準備が出来上がってきたといえる。

最初に得られた立体構造から次のようなことが明らかにされた。細胞質ドメインは大きく A（アンカーあるいはアクチュエーター）、P（リン酸化）、N（ヌクレオチド結合）

の3つに分かれており、Pドメインにリン酸化部位、NドメインにATP結合部位が存在する。また膜貫通領域は10本の α -ヘリックスで構成されており、ここに輸送される Ca^{2+} の結合サイトが存在する。内腔側は大きなドメイン構造は存在せず、膜貫通ヘリックスをつなぐループから出来ている。膜貫通領域と細胞質ドメインとは、5本のヘリックス及びループで繋がっているが、リン酸化サイトと Ca^{2+} 結合サイトとは50Å近く離れており、ATP加水分解反応と Ca^{2+} 輸送反応の共役には大きな構造変化が必要であることが予測された。我々の研究グループでは実際に細胞質ドメインの集合状態が反応中間体ごとに大きく変化することをプロテアーゼの限定分解パターンから指摘していたが、このことは、その後発表された結晶構造により確認された。

結晶構造から分かった細胞質ドメインの動きは以下のようなものであった。 Ca^{2+} が結合した状態(E1Ca_2)では3つの細胞質ドメインはお互いに大きく離れている。これがATPによってリン酸化されると(E1P)、細胞質ドメインは1つに集合した状態になる。この状態ではNドメインにADPが結合すると末端リン酸がPドメイン上のリン酸化部位に接近することができるので、このリン酸化中間体はADP添加によりATPを再生し分解してしまう(ADP感受性)。E1PからE2Pへの変換に伴いP、NドメインはAドメイン側に倒れこみ、Aドメインは回転する、これにより細胞質ドメインの再配置が起こり、Aドメイン上のTGESループがリン酸化部位とヌクレオチド結合部位の間に入り込むため、ADP感受性が消失する。この構造変化に伴いリン酸化部位の配位が変化し、アシルリン酸が加水分解可能となる。その結果、自発的脱リン酸化を起こしてE2が生じ反応サイクルが完結する。

このように結晶構造から、酵素反応に伴う大きな構造変化が明らかとなり、酵素の部分反応との立体構造との関連も明らかとなった。しかしながら、結晶構造の比較から分かることはあくまでも構造変化の枠組みであり、どのような力が加わることによりそのような構造変化が起こるのかということはまったく分からない。

2. 研究の目的

私はこのように細胞質ドメインがダイナミックな動きを起こす原動力として働く力または構造が、ドメイン間に存在するのではないかと考えた。我々はこれまでに部位特異的変異体を用いた解析により、細胞質ドメインの構造変化と Ca^{2+} 輸送との共役機構に重要な役割を持つ多くの構造因子を見出し報告してきた(Y122-HC, A/M1-linker, V200-loop等)。しかしながら、これらの構造因子は特

定の中間体で細胞質ドメイン間に形成される相互作用部位であったり、ドメインの動きを制御する構造であり、ドメインの動きを直接引き起こす因子とは考えにくい。そこで本研究では、ドメインの動きを引き起こす構造因子を探すことを目的とした。

今回着目したのは、PドメインとNドメインの動きである。前述の反応サイクル中の、P-Nドメインのなす角度の変化に着目すると、1サイクルに少なくとも2度の開閉を繰り返すことが結晶構造から予想される。この動きにはP-Nドメインの間に働く力が関与し、バネ要素のように働いているのではないかと推測した。PドメインとNドメインの間は2本のループで直接結びついているが、このループ自体には特に力を発生させるような構造は見取れない。このドメイン間に力が働いているとすれば、ループ本体ではなく、その近傍のドメインが近接している部分であると予想された。実際に結晶構造上でP-Nドメインの近接部位を見ると、PドメインとNドメインの荷電側鎖との間に静電的相互作用の存在が確認され、予備的な実験からこの荷電側鎖への変異導入によりリン酸化中間体の転換過程に大きな影響が出ることが分かっていた。この予備実験を踏まえ本研究ではP-Nドメインの動きと静電的相互作用の関わりを明らかにすることを最終的な目標とした。これまでの機能構造連関に関する研究では静的な相互作用を示すものが主であったが、本研究は力を生み出す要因を探ろうとする点に独創性がある。この研究によって得られる成果は、これまでに得られた結晶構造をつなぐダイナミックな動きを記述する上で重要な情報を与えることが期待できた。

3. 研究の方法

(1) 結晶構造に基づく静電的相互作用の予測と変異をかける側鎖の決定。これまでに報告されている結晶構造を基に、各反応中間体のP-Nドメインにある静電的相互作用に関与すると思われる、側鎖をピックアップし、変異体の設計を行った。

(2) 目標とする側鎖の荷電を変化させた変異体cDNAの作成。設計した変異体を発現するのDNAを作成。発現用ベクターに組み込みtransfection用のプラスミドを得る。

(3) COS-1細胞を用いた変異カルシウムポンプタンパク質の発現。プラスミドをリポフェクション法によりCOS-1細胞に導入。発現したタンパク質を含むミクロソーム分画を調製し、変異カルシウムポンプ標品として用いる。現在私の用いている標品では、全ミクロソームタンパク質の2-5%程度カルシウムポンプが発現しており、また内在性のカルシウムポンプ活性はほぼ無視できる程度であるため、酵素反応速度論的解析を行うのに

十分な品質が確保されていた。

(4) 発現タンパク質を用いたカルシウムポンプ部分反応活性の測定。調製したマイクロソーム画分を用いて、変異体カルシウムポンプの部分反応活性を測定し、変異による影響を見た。

(5) 変異による反応への影響の評価。各部分反応測定の結果から、導入した変異の影響を評価した。その際結晶構造を元にコンピューター上で変異を導入したモデルを作成し、側鎖周辺の電場や電気力線の変化と見比べ、反応速度論的解析結果と照らし合わせた。このコンピューターシミュレーションに関しては、フリーソフト VMD とそのプラグインを用いた。

4. 研究成果

(1) P-N ヒンジ変異体の作成と部分反応への影響の解析。

結晶解析による結果から筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (SERCA1a) は Ca^{2+} 輸送反応サイクルに伴って細胞質領域の3つのドメインの集合状態がダイナミックに変化し、それに伴い TM 領域の配列が変化していることが見てとれる。図に示すように P-N ドメインは A ドメイン側に対して、1回の反応サイクル中に少なくとも2度の開閉を繰り返している。我々はこの動きには P-N ドメインの間に働く力が関与し、バネ要素のように働いているのではないかと推測し P-N ドメインのヒンジ部分に着目し解析を行った。

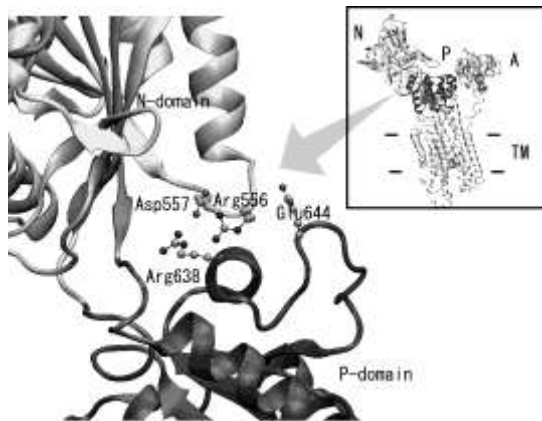


図1 P-N ヒンジ領域の構造と変異を入れた荷電残基。

図1は今回着目した領域の拡大図 (E1Ca₂, pdb code: 1SU4) である。P ドメインと N ドメインとの間は2本のループで直接結びついているが、このループ自体には特に力を発生させるような構造は見取れない。このループのそばに P ドメインと N ドメインから互いに電荷を持った側鎖が伸びて近接している領域が存在する。この部分はあたかも両ドメインから符号の異なる側鎖が伸びてペアを組んでいるように見える (Arg556-Glu644,

Asp557-Arg638)。またこの側鎖間の距離は反応中間体によって大きく変わる。以上のことから、これらの残基には P-N ドメインの動きになんらかの役割があるのではないかと予測し、これらの残基に変異を導入し、その影響を調べた。

着目した残基をアラニンあるいは逆の電荷を持つ残基に置換した変異体を COS-1 細胞に発現させて、そのマイクロソーム画分を調製し反応速度論的解析に用いた。いずれの変異体の発現量も野生型と同等であり、ATP からの EP 形成能も正常に保持していた。また、E1Ca₂ からの EP 形成速度もすべて、野生型と同等であった。次に ATP から形成したリン酸化中間体の分解を測定したところ、アルギニン残基を置換した変異体で、EP の分解速度の強い抑制が見られた (図2、R556E, R638D)。これに対し負電荷を持つ側鎖を置換しても EP 分解の速度はほとんど変化しなかった。面白いことにアルギニンの位置に負の電荷を導入しても、その対となる側鎖をアルギニンに置換することにより、抑制を打ち消すことが出来た (図2、R556E/E644R, D557R/R638D)。この結果はこの領域にある程度の正電荷が存在することが、EP 分解に重要であることを示している。さらに E2P 分解への変異影響を解析したところ、R556E, R638D では E2P 分解が促進され、逆に D557R, E644R では E2P 分解が抑制されていた。またこの場合も同じように電荷の交換は互いの影響を打ち消すよ

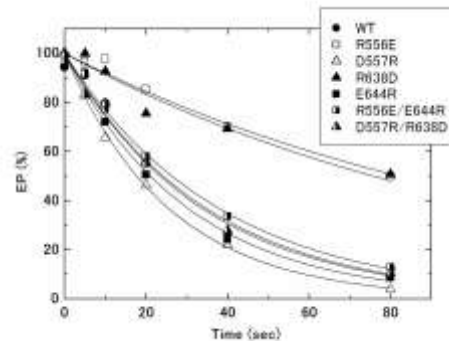


図2 P-N 変異体の E1P 分解タイムコース

うな効果があることが分かった。

(2) 変異導入による静電相互作用への影響。

次に変異導入によってどのように静電場が変化するか調べるため、E1P のアナログの結晶構造を元に P-N ドメインの部分の野生型及び変異体の構造モデルを作成し、その周りの静電場を Poisson-Boltzmann の式に従って計算した。その結果、野生型では今回着目したヒンジを挟んで P ドメインと N ドメインの間を結ぶような電気力線が描かれた (図3)。これに対して E1P-E2P が遅くなった変異体ではこの電気力線の流れが大きく乱されていた。また E1P-E2P の速度に影響を及

ぼさない変異体では野生型と同じように P と N を結ぶ電気力線は保持されており、E1P-E2P の速度が回復した交換変異体 (R556E/E644R, D557R/R638D) では P-N を結ぶ電気力線が復活しているように見えた。このように

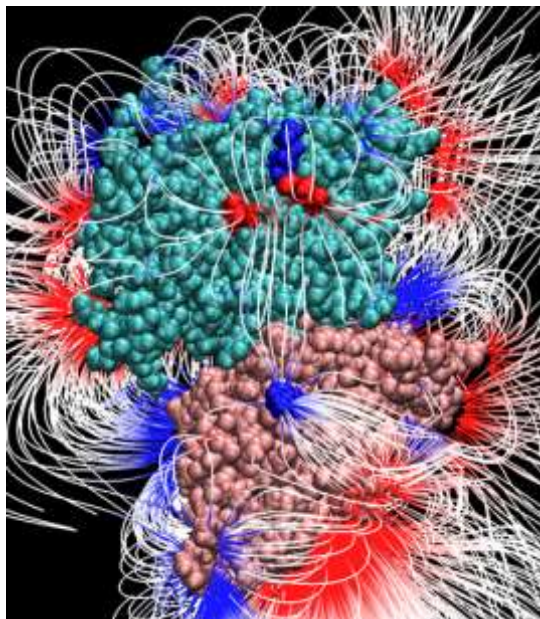


図3 野生型 Ca^{2+} -ATPase の P (cyan)-N (pink) ドメイン間を結ぶ電気力線

E1P-E2P 転換の速度と P-N 間の電気力線の流れは相関性を示し、E1P から E2P が形成する過程において電場が P-N の動きのガイドラインを果たしている可能性が示唆された。さらに、E2P アナログの構造を用いた解析では、E2P の加水分解を促進されている変異体で、P-N 間の静電的反発が強まっていることが確認された。このことは P-N 間の静電的反発が E2P 分解に重要である可能性を示している。

(3) 変異による静電的相互作用への影響の定量化。

実際に静電的相互作用が反応ステップで役割を持っているのであれば、イオン強度を変化させて静電的相互作用の大きさを変えることにより、影響が現れることが予想される。そこで EP 転換速度の濃度依存性から、EP 転換ステップに関する静電的相互作用の関与の定量化を試み、P-N ヒンジ領域変異体の性質について再検討を行った。

野生型 Ca^{2+} -ATPase について反応溶液中の KCl 濃度を 0.1M から 1M まで変化させて EP 転換の速度を測定したところ、KCl 濃度の上昇に伴い EP 転換速度の減少が見られた。KCl の代わりに NaCl 濃度を変化させても同様の結果が得られたが、LiCl 及び choline-Cl の場合はイオン強度を上昇させても EP 転換速度は大きく変化せず、choline-Cl の場合はむしろ速度が増した。次に KCl 濃度を 0.1M に固定し LiCl あるいは choline-Cl でイオン強度を変化させたところ KCl 単独でイオン強度

を変化させた場合とほぼ同様の結果が得られた。この結果は KCl 濃度上昇で見られた EP 転換速度の低下が K^+ を結合した Ca^{2+} -ATPase において起きる現象であり、かつ K^+ 上昇によるものではなくイオン強度の上昇の影響であることを示している。

これら種々の塩を用いてイオン強度を変化させて得たデータを、SIT (Specific Interaction Theory) 法によりイオン強度から見積もった活量係数を用いて、EP 転換速度の対数を活量係数の 2 乗に対してプロットしたところ、両者の間に直線関係が得られた (図 4)。このプロットでは直線の傾きは部分反応における静電相互作用の寄与の大きさを表しており、y 切片は静電相互作用以外の寄与を表している。P-N ヒンジ変異体につい

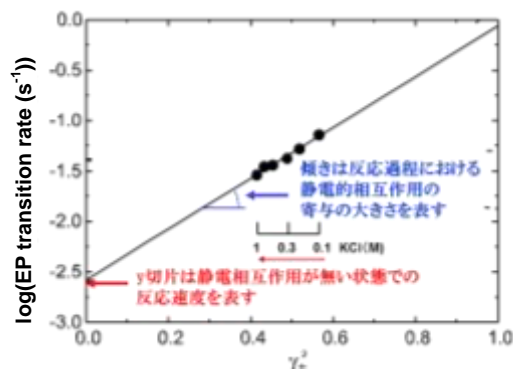


図4 反応速度の対数の活量係数の2乗に対する plot

て、KCl 存在下での EP 転換速度のイオン強度依存性を測定したところ、R556E 及び R638D のみならず D557R と E644R においてもプロットの傾きが野生型と比べて小さくなり、EP 転換を促進する静電相互作用が減弱していることが示された。P-N ドメイン間の電気力線を再検討すると、これらの変異体では R556E や R638D と比較して全体的な電気力線の乱れは小さいが、P-N を結ぶ線の数が減ったり向きが変わったりしていた。これらの変異体では速度 vs 活量係数のプロットにおいて、y 切片が大きくなっており、この影響により、先に測定した 0.1M KCl 存在下では EP 転換ステップの速度が野生型と変わらないという結果が得られていた。

さらに P-N ドメイン間の電気力線を描画した際、EP 転換ステップで P-N ドメインの動く軌跡に沿った形で、P-N ヒンジから大きく離れた残基間の相互作用がみられ、P-N ヒンジ領域への変異導入によりその相互作用が影響を受けていた。この電気力線の起点となる残基 (Glu394, Asp399, Lys605) の変異体を作成しその影響を調べた。その結果単一塩濃度では分からなかったが、速度の対数と活量係数の 2 乗のプロットの結果これら変異体でも EP 転換での静電相互作用による促進が弱くなることが示された。しかしながら、これ

らの残基間の距離（Glu394-Lys605, Asp399-Lys605）はお互いに 20 Å 以上離れており、直接的な静電的相互作用が EP 転換速度を上げているとは考えにくかった。このことは EP 転換ステップにおいてドメインの動き自体は静電相互作用以外の力（おそらくブラウン運動）によって発生するが静電相互作用は E1P から E2P へのドメインの動きを規定し EP 転換ステップを促進していると考えられる。

（5）研究の成果のまとめ。

以上のように速度の対数と活量係数の 2 乗のプロットを導入した結果、塩濃度を変えなかった時に見落としていた変異による影響が明らかとなり、またドメイン周りの電場から予測された静電相互作用が、確かに反応ステップに寄与していることを確認できた。以上の結果から、次のような結論が導かれた。

①筋小胞体 Ca²⁺-ATPase において、P-N ドメイン間の静電相互作用は、EP 転換過程に重要な役割を持っている。

②その際、特定の荷電残基間の相互作用というよりむしろ全体的な電場の流れが重要である。

③EP 転換ステップにおける N ドメインの動きは、ブラウン運動によるランダムな動きを、静電相互作用が方向付けしていると考えられる。

④本研究では変異体を用いる解析、静電場の変異による影響の評価、変異による静電相互作用に対する影響の定量化を組み合わせることにより、反応ステップでの静電力の役割を明らかにすることが出来た。

この速度の対数と活量係数の 2 乗のプロットは Ca²⁺-ATPase だけでなく、他のタンパク質のドメイン間あるいはサブユニット間の静電相互作用の解析にも有用であると考えられ、この非常に大きな成果である。

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 7 件）

- ① Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki, Ca²⁺ Release to Lumen from ADP-sensitive Phosphoenzyme E1PCa₂ without Bound K⁺ of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase, *Journal of Biological Chemistry*, 査読 有、285 巻、2010、38674-38683
doi: 10.1074/jbc.M110.183343
- ② Takashi Daiho, Stefania Danko, Kazuo Yamasaki, and Hiroshi Suzuki, Stable Structural Analog of Ca²⁺-ATPase

ADP-insensitive Phosphoenzyme with Occluded Ca²⁺ Formed by Elongation of A-domain/M1'-linker and Beryllium Fluoride Binding, *Journal of Biological Chemistry*, 査読 有、285 巻、2010、24538-24547
doi:10.1074/jbc.M110.144535

〔学会発表〕（計 14 件）

- ① 山崎 和生、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、生体エネルギー研究会第 37 回討論会、2011 年 12 月 20 日、京都
- ② Kazuo Yamasaki, 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, 13th International P-type ATPase Meeting "Na, K-ATPase and related P-ATPases: Structure, Biology and Medicine", Sep30-Oct1, 2011, Pacific Grove, CA, U. S. A.
- ③ 山崎 和生、筋小胞体 Ca²⁺-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 年 12 月 9 日、神戸
- ④ 山崎 和生、筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の E1P-E2P 転換と Ca²⁺ 輸送の共役における K⁺ の役割、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 和生 (YAMASAKI KAZUO)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：60241428

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし