

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06109

研究課題名(和文) Na⁺, K⁺-ATPaseによるK⁺選択的結合機構の構造生物学的研究研究課題名(英文) Structural basis for K⁺-selective binding of Na⁺, K⁺-ATPase

研究代表者

金井 隆太 (Kanai, Ryuta)

東京大学・定量生命科学研究所・特任講師

研究者番号：50598472

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)：Na⁺ポンプ(Na⁺, K⁺-ATPase)はATP 1分子当たり3個のNa⁺を細胞外へ、2個のK⁺を細胞内へ濃度勾配に逆らって輸送するイオンポンプである。本研究はそのK⁺輸送機構、すなわちNa⁺ポンプは2個のK⁺をどのように選択的に結合するとともに脱リン酸化を引き起こし、細胞外ゲートを閉じるのか、また細胞内ゲートを開き、細胞内へ排出するのか、を原子レベルで解明することを目的としている。そこで、その過程における中間状態の結晶構造解析およびクライオ電顕解析を行ったところ、ほぼ全ての中間状態の立体構造を決定することができた。その結果、K⁺輸送の仕組みを詳細に理解することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はあらゆる動物細胞の物質輸送や神経の活動電位、浸透圧調節など様々な生命活動を支えているNa⁺ポンプ(Na⁺, K⁺-ATPase)の働きを原子レベルで明らかにすることを目的としている。今回の研究では、Na⁺ポンプはどのようにしてK⁺を細胞外から細胞内へ輸送しているのかを詳細に理解することができた。K⁺を輸送する過程は薬剤標的とされている一方、天然毒物の標的にもなっている。本研究は更なる薬剤の改良や天然毒物に対する新規薬剤開発を可能にするものである。

研究成果の概要(英文)：Na⁺-pump (Na⁺, K⁺-ATPase) transports three Na⁺ ions from cytoplasm to external, and two K⁺ ions from external to cytoplasm across cell membrane with one ATP molecule hydrolyzed against ion concentration gradients. The aim of this study is to elucidate the K⁺-selective transporting mechanism at atomic level, how Na⁺-pump proceeds dephosphorylation and extracellular gate closing with K⁺-selective binding, and how it opens the cytoplasmic gate and releases K⁺ ions. Here, we determined most of three-dimensional structures of the intermediate states related in this process by X-ray crystallography and cryo-EM single particle analysis. These results enabled us to understand the K⁺-transporting mechanism in detail.

研究分野：構造生物学

キーワード：イオンポンプ 膜蛋白質 X線結晶構造解析 クライオ電顕

1. 研究開始当初の背景

Na^+, K^+ -ATPase は全ての動物細胞の細胞膜に局在し、ATP 1 分子あたり 3 個の Na^+ を細胞外へ、2 個の K^+ を細胞内へ濃度勾配に逆らって輸送するイオンポンプである。こうして形成されるイオン濃度勾配は神経の電気信号、浸透圧、物質輸送などに用いられ、生命活動の基盤を成す。 Na^+, K^+ -ATPase のイオン輸送機構は Na^+ に高親和性な状態(E1 状態)と低親和性な状態(E2 状態、相対的に K^+ に対して高親和性)の 2 つの状態変化、細胞質側および細胞外側のゲートの開閉より説明される(図 1)。磷酸化過程で細胞内 Na^+ を細胞外へ輸送し、脱磷酸化過程で細胞外 K^+ を細胞内に輸送する。このようにイオンに対する親和性変化とゲートの開閉が ATP 加水分解反応の進行と精緻に連動しているが、その実体とは一体、どのようなものだろうか。私はその能動輸送機構の解明、特に Na^+ 選択性の構造的な理解を目指して、いくつか中間体の結晶構造を明らかにしてきた。その結果、 Na^+, K^+ -ATPase はどのように 3 個の Na^+ を結合し、ATP を結合して磷酸化と同時に細胞質側ゲートを閉じるのか(E1 \rightarrow E1 \cdot 3 $\text{Na}^+ \rightarrow$ E1 \cdot P \cdot ADP \cdot 3 Na^+)、その詳細な仕組みを理解できるようになった。

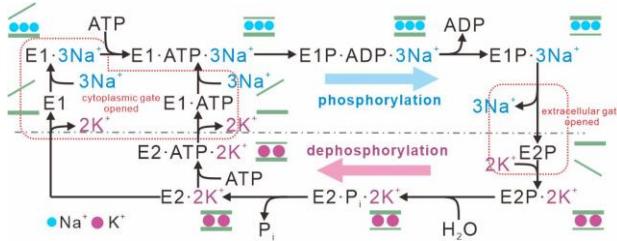


図 1 Na^+, K^+ -ATPase の反応サイクル。本研究は主に下半分の K^+ 輸送にかかる E2P から E1 \cdot ATP までの構造的な理解に注目している。

2. 研究の目的

一方、それ以外の反応サイクルの大部分の構造的な理解は進んでいない。特に Na^+ 輸送と対をなす K^+ 輸送については 10 年以上前の E2 \cdot P $_i$ \cdot 2 K^+ の結晶構造解析から K^+ 結合構造が明らかになっているだけで、どのように K^+ 輸送しているのか、全く分かっていない。脱磷酸化に伴う細胞外から内への物質輸送は同じ P 型 ATPase で、 Na^+, K^+ -ATPase よりも構造研究が圧倒的に進んでいる Ca^{2+} -ATPase でも実はあまりよく分かっていない。なぜなら、対向輸送するイオンが H^+ であるため、構造解析による H^+ の可視化が非常に困難だからである。そこで、本研究では K^+ 結合前の E2P 状態から K^+ 放出に至る E2 \cdot ATP \cdot 2 K^+ に至る K^+ 輸送の構造的な理解を目指すことにした。

特に E2P 状態は奇妙な生化学的特性があることが知られている。通常、E2P 状態の再現には磷酸や磷酸アナログを用いて本来のサイクルとは逆の反応で行う(図 2)。実際、私は磷酸アナログ BeF_3^- を用いて E2P 状態の結晶構造解析に成功し、細胞外ゲートが開いた様子を明らかにした。ところが、共同研究者デンマーク Aarhus 大学 Cornelius 教授らなどの生化学的解析によると、どうやら生理的に起こる正反応(ATP を用いた反応)から得た E2P(ここでは E2P^{ATP} と表記)と逆反応から得た E2P(E2P^{Pi} と表記)では生化学的特性が異なることを発見した。具体的には K^+ 添加による脱磷酸化反応の促進は E2P^{ATP} では顕著にみられるが、E2P^{Pi} ではほとんど見られない。 Mg^{2+} 親和性は E2P^{ATP} では低い(数 mM 以上)のに対し、E2P^{Pi} では高い(< 1 mM)。さらには、蛋白質分解酵素を用いた限定分解の切断パターンは両者で明らかに異なる。このような違いは構造的に一体、どのように説明されるであろうか。1 つの可能性として E2P^{ATP} では磷酸基転移反応で生じた ADP がそのまま留まっている、あるいは ATP が置き換わって結合し、E2P^{Pi} とは異なる構造になっていることが挙げられる。実際、生理的には ATP/ADP は数 mM 存在し、 Ca^{2+} -ATPase では E2 状態においても ATP と結合できることが結晶学的にも示されている。したがって、本研究では E2P^{Pi} と E2P^{ATP} の生化学的特性の違いの構造的な理解を目指す。

3. 研究の方法

(1) E2P 状態の構造解析

既に BeF_3^- を用いて得た E2P^{Pi} 状態の結晶構造解析に成功している。しかし、生理的な意義では正反応から得た E2P^{ATP} 状態の構造解析がより重要である。両者間で生化学的特性が異なるならば、なおさらである。したがって、ここでは Na^+ と ATP を添加して得た E2P^{ATP} 状態の結晶化を行った。正反応で得た E2P^{ATP} 状態は僅かながら Na^+ を対向輸送して状態変化が進んでしまう可能性があり、結晶化が困難である可能性が考えられたため、heterogeneity に強い、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析も行った。

(2) K^+ 結合過程の構造解析

E2P 状態で K^+ が 1 個あるいは 2 個結合した直後の構造を明らかにするために、既に BeF_3^- を用いて得た E2P^{Pi} 状態の結晶を用いて、様々な濃度の K^+ あるいは Rb^+ を含む結晶化溶液に結晶を一晚ソークした。その結晶の回折測定を行い、結晶構造を試みた。また、 K^+ が 2 個結合した状態についてはクライオ電顕による構造決定も行った。

さらに 2 個の K^+ が結合して、脱磷酸化した状態(E2 \cdot 2 K^+)については既に 10 年以上前から結晶

化には成功していたものの、良好な回折像が得られず、構造決定できなかった。そこで、本課題では K^+ のみを添加してクライオ電顕単粒子解析により $E2 \cdot 2K^+$ の構造決定を行った。

(3) K^+ 解離過程の構造解析

ATP 存在下で K^+ 有無の 2 状態($E2 \cdot ATP \cdot 2K^+$, $E1 \cdot ATP$)の結晶化を試みたが、良好な結晶が得られなかったため、ここではクライオ電顕を用いて構造決定した。

いずれの実験も結晶の回折測定は高輝度放射光施設 SPring-8 のビームライン BL41XU にて、クライオ電顕(Titan Krios G4)は東京大学定量生命科学研究所の胡桃坂仁志研究室にて行った。

4. 研究成果

(1) K^+ 結合前($E2P$)の構造

既に逆反応(P_i)から得た $E2P$ 状態の結晶は得られており、分解能 3.3 \AA で構造決定できたが、正反応(ATP, Na^+)から得た $E2P$ 状態の良好な結晶は得られなかった。そこで、正反応および逆反応から得た $E2P$ 状態のクライオ電顕単粒子解析を行ったところ、それぞれ 3.4 \AA と 3.8 \AA の分解能で構造決定できた。それらの蛋白質構造は思いのほかよく似ていたが、 $E2P^{ATP}$ では N ドメインの ATP 結合部位に ATP が結合し、その γ 磷酸基は A ドメインと塩橋を形成し、ATP は A ドメインと N ドメインを架橋する格好であった(図 2)。逆反応から得た $E2P$ では ATP は含まれていないし、N ドメインが直接、A ドメインと相互作用するような残基も無いため、ATP による A-N ドメイン間のクロスリンクは $E2P^{ATP}$ にユニークなものである。ATP は脱磷酸化を遅くすることが知られているが、本結果は ATP が A-N ドメイン間をクロスリンクし、 $E2P$ 状態を安定化することで、脱磷酸化を起りにくくしていると考えられた。

また、 $E2P^{ATP}$ では驚くことに膜貫通領域内のイオン結合サイトに 1 個の Na^+ が結合していた(図 3)。確かにイオン結合サイトは複数の Asp, Glu 残基から成る負の静電ポテンシャル領域であり、何かしらの陽イオンが結合することで静電的中を保つことは容易に想像できる。予想外の発見はその結合した Na^+ がサイト III への Na^+ 結合を自ら阻害しているような格好であることだった。サイト III への Na^+ 結合は背骨のような役割である M5 ヘリックスを M10 に傾くようにし、全体構造を E1 型へ移行させて逆反応が起きてしまう。したがって、 $E2P$ 状態にはサイト III への Na^+ アクセスを阻害し、 $E2P$ から $E1P \cdot 3Na^+$ 状態に戻る逆反応を防ぐ仕組みがあるはずである。本構造から分かったことはサイト III アクセスのためのゲートの実体は水素結合で結ばれた Asp808 側鎖-Ser775 側鎖であり、その水素結合ネットワークを安定化しているのが Na^+ であった。ちなみに $E2P^{P_i}$ では Na^+ の代わりに Mg^{2+} が結合している。このことは何故、 $E2P^{ATP}$ は $E2P^{P_i}$ に比べて K^+ による脱磷酸化促進が顕著であり、 Mg^{2+} に対する親和性が低いかを説明する。すなわち、 $E2P^{ATP}$ は最初から Na^+ がイオン結合サイトに結合しているために、何も結合していない Mg^{2+} を結合する前の $E2P^{P_i}$ に比べて Mg^{2+} 親和性が低い。一方、 Mg^{2+} の結合は Na^+ の結合よりも強く、 $E2P^{P_i}$ で結合した Mg^{2+} は $E2P^{ATP}$ で結合した Na^+ に比べて K^+ 置換が遅いのだろう。

(2) K^+ 結合過程の構造

磷酸アナログ BeF_x を用いて得ていた $E2P$ 状態の結晶に K^+ の congener である Rb^+ を様々な濃度で添加して回折測定を行ったところ、1 個の Rb を結合した結晶構造を得ることができた。ただし、ヘリックスが解像できる程度の分解能で、詳細な議論ができるほどの精度の高いデータは得られていない。そこで、 BeF_x で再現した $E2P$ 状態に K^+ を添加してクライオ電顕単粒子解析を行ったところ、分解能 3.1 \AA で 2 個の K^+ を結合した $E2P$ 状態の構造を得ることができた。驚くことに得られた構造は脱磷酸化後の状態($E2 \cdot P_i \cdot 2K^+$)に近いものであった。既に K^+ 結合前の $E2P$ と $E2 \cdot P_i \cdot 2K^+$ の構造は明らかになっており、その両者の間には細胞外側ゲートを閉じるために大きな構造変化が生じていることが分かっていた。その構造変化の大部分は脱磷酸化によってもたらされる、すなわち、磷酸化状態にある高エネルギーはその大きな構造変化を引き起こすことに利用されると考えていたが、今回の結果は全くそれを覆すものであった。膜貫通領域の構造変化の大部分は K^+ 結合そのものによって引き起こされていたのである。ならば、脱磷酸化に伴って放出されるエネルギーは何に使われているのか。おそらくは”閉じた”細胞質ドメインを開いた

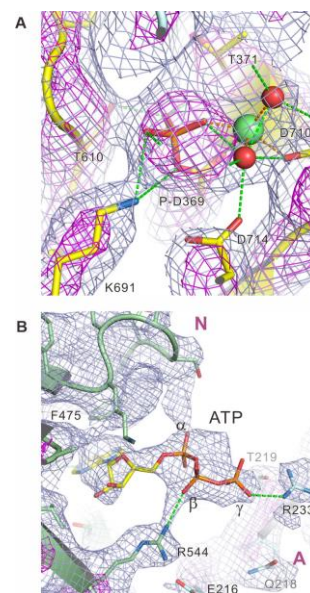


図 2 $E2P^{ATP}$ で確認された触媒残基 Asp369の磷酸化(A)と ATP 結合(B)。

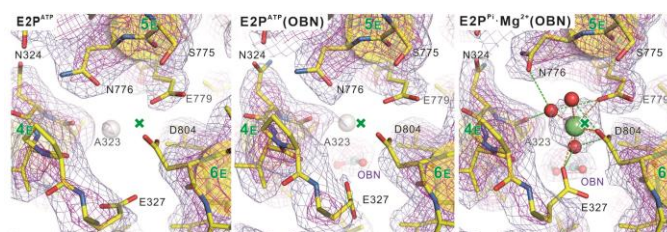


図 3 正反応から得た $E2P^{ATP}$ のイオン結合サイトに結合した Na^+ (左、中)。逆反応から得た $E2P^{P_i}$ では同サイトに Mg^{2+} が結合している。

めかもしれない。

また、10年以上前から結晶は得られていたにもかかわらず、高分解能データを得られなかった E2·2K⁺ 状態について、クライオ電顕解析を行ったところ、分解能 3.1 Å で構造決定できた。先に触れた通り、細胞外側ゲートの closing は K⁺ 結合が直接、M4 ヘリックスを傾けることで起きている(図 4)。その後の脱リン酸化ではゲートにロックがかかるような仕組みがあることが分かった。脱リン酸化でリン酸基が外れると、P ドメインは脱リン酸化型構造に変化する。その構造変化は主に M3 ヘリックスを伝わり、細胞外側ゲートを構成する M1-2、M4 ヘリックスを動かす。その結果として、M4 ヘリックスにある Phe316 側鎖は内部空洞を埋めるように配向変化し、細胞外側ゲートを固く閉じていることが分かった(図 4)。

(3) K⁺ 解離過程の構造

ATP を結合した E2·2K⁺ 状態 (E2·2K⁺·ATP) のクライオ電顕構造も低分解能だが、得ることができた。その結果、ATP 結合によって N ドメインは A ドメインに向かって傾いて A ドメインを M1, M2 方向に押し出すと同時に E1 型に回転する(図 5)。

M1, M2 ヘリックスは A ドメインに直結しており、A ドメインの動きに伴って M1, M2 は lateral 方向に移動する。その移動によって、どうやら固く閉じられていたイオン結合サイトの細胞質側ゲートは開くようだ。条件検討の結果、最近、高分解能データを得ることができ、現在、構造決定中である。

また、K⁺ が解離した後の E1·ATP のクライオ電顕構造も決定できた。その構造は E1·Mg²⁺ と類似しており、全体構造としては E1 型でありながらも M6 ループ領域は E2 型の構造である。ただし、E2 型では Asp808-Ser775 の水素結合によってサイト III への Na⁺ アクセスは遮断されているが、E1·ATP では E1·Mg²⁺ と同じく、その水素結合が解消されており、Na⁺ はサイト III にアクセスできるようになっている。

全ての期間を通じて、本研究はリン酸化状態 E2P から K⁺ を結合して脱リン酸化し、ATP を結合して K⁺ を解離する K⁺ 輸送に関わるほぼ全ての中間状態を原子レベルで明らかにすることができた。

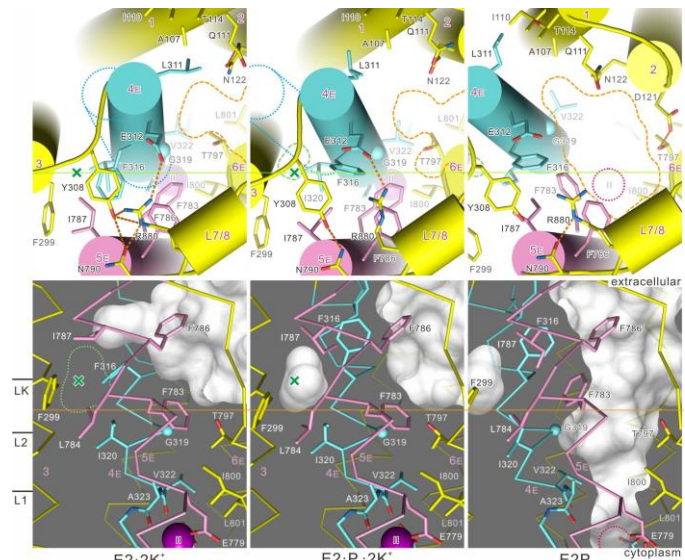


図 4 細胞外側ゲートが閉じる様子。E2P から E2·Pi·2K⁺ でゲートは閉じるが、E2·2K⁺ では、E2·Pi·2K⁺ の時にある、緑の*で示す空洞が Phe316 の配向の変化によって完全に埋められる。

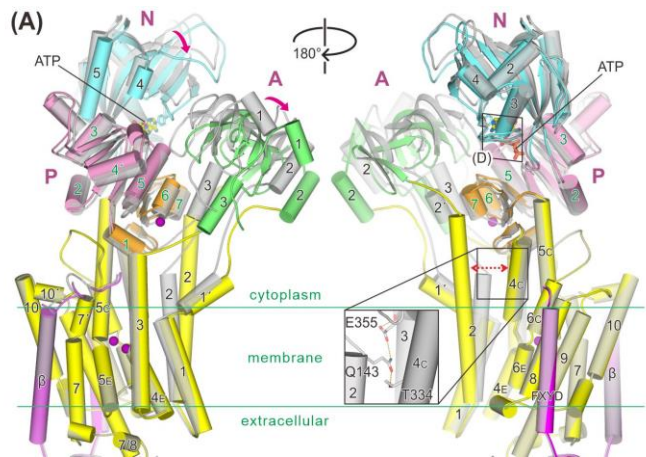


図 5 E2·2K⁺ と E2·2K⁺·ATP の構造比較。ATP の結合により N ドメインは A ドメイン方向に倒れ、それによって押された A ドメインは P ドメインから離れると同時に E1 型方向に回転する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanai Ryuta, Cornelius Flemming, Vilsen Bente, Toyoshima Chikashi	4. 巻 596
2. 論文標題 Cryo electron microscopy of Na ⁺ ,K ⁺ ATPase reveals how the extracellular gate locks in the E2·2K ⁺ state	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2513 ~ 2524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakuragi Takaharu, Kanai Ryuta, Tsutsumi Akihisa, Narita Hirota, Onishi Eriko, Nishino Kohei, Miyazaki Takuya, Baba Takeshi, Kosako Hidetaka, Nakagawa Atsushi, Kikkawa Masahide, Toyoshima Chikashi, Nagata Shigekazu	4. 巻 28
2. 論文標題 The tertiary structure of the human Xkr8-Basigin complex that scrambles phospholipids at plasma membranes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 825 ~ 834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-021-00665-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakuragi Takaharu, Kanai Ryuta, Otani Mayumi, Kikkawa Masahide, Toyoshima Chikashi, Nagata Shigekazu	4. 巻 300
2. 論文標題 The role of the C-terminal tail region as a plug to regulate XKR8 lipid scramblase	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105755 ~ 105755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2024.105755	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanai Ryuta, Vilsen Bente, Cornelius Flemming, Toyoshima Chikashi	4. 巻 597
2. 論文標題 Crystal structures of Na ⁺ ,K ⁺ ATPase reveal the mechanism that converts the K ⁺ bound form to Na ⁺ bound form and opens and closes the cytoplasmic gate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1957 ~ 1976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14689	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Xu Xingya, Kanai Ryuta, Wang Li, Yanagida Mitsuhiro	4. 巻 119
2. 論文標題 Cohesin ATPase activities regulate DNA binding and coiled-coil configuration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2208004119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2208004119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Xu Xingya, Kanai Ryuta, Wang Li, Yanagida Mitsuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Single amino acid substitutions in hydrophobic cores at a head-coiled coil junction region of cohesin facilitate its release of DNA during anaphase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Open Biology	6. 最初と最後の頁 210275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsob.210275	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanai Ryuta, Cornelius Flemming, Vilsen Bente, Toyoshima Chikashi	4. 巻 119
2. 論文標題 Cryoelectron microscopy of Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase in the two E2P states with and without cardiotonic steroids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2123226119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2123226119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 金井隆太、Bente Vilsen, Flemming Cornelius, 豊島近
2. 発表標題 Na ⁺ , K ⁺ -ATPaseのNa ⁺ 選択性の構造的理解
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金井隆太、Bente Vilsen, Flemming Cornelius, 豊島近
2. 発表標題 陽チャネル化したNa ⁺ ,K ⁺ -ATPaseの構造解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金井隆太、Bente Vilsen, Flemming Cornelius, 豊島近
2. 発表標題 パリトキシンを結合したNa ⁺ ,K ⁺ -ATPaseの構造解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金井隆太、Bente Vilsen, Flemming Cornelius, 豊島近
2. 発表標題 Na ⁺ ,K ⁺ -ATPaseと脂質二重膜との相互作用の結晶学的解析
3. 学会等名 第 22 回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金井隆太、Bente Vilsen, Flemming Cornelius, 豊島近
2. 発表標題 Na ⁺ を結合した非磷酸化状態のNa ⁺ ,K ⁺ -ATPaseの結晶構造解析
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
---------	---------