

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：32606

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770131

研究課題名（和文） 銅イオン輸送 ATPase のドメイン間相互作用

研究課題名（英文）

Domain-domain interaction of Cu⁺-transporting ATPase

研究代表者

津田 岳夫（TSUDA TAKEO）

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：10345233

研究成果の概要（和文）：銅イオン輸送 ATPase（CopA）は、ATP を加水分解し余分な銅イオンを排出するイオンポンプである。同じくイオンポンプであるカルシウム ATPase では、3 つの細胞質ドメインの運動がイオン輸送に重要であることが明かされた。それらに加え、CopA では N 末端側に他のイオンポンプには存在しない金属結合ドメイン（NMBD）を持つが、その意味は謎である。本研究では、CopA の生理的中間体を現す細胞質ドメインの複数の X 線結晶構造を決定し、NMBD を含めたドメイン間の相互作用の解明を目指した。

研究成果の概要（英文）：Copper-transporting ATPase, CopA, is an ATP-powered ion-pump which exports excess copper ions from cytoplasm to the opposite side. The X-ray crystal structures of Ca²⁺-ATPase, also belonging to the ion-pump family, have been determined for several different states in the reaction cycle. Comparison of these structures reveals that large rearrangements in the three cytoplasmic domains are important for ion transporting in the transmembrane helices. CopA also contains an additional N-terminal metal binding-domain (NMBD), while it is unclear the functional meaning of it. Therefore, we performed to determine the X-ray crystal structures of the complex for the cytoplasmic domains of CopA to elucidate the roles of domain-domain interactions including the NMBD for Cu-transport.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：生体エネルギー変換、X 線結晶構造解析、イオン輸送 ATPase

1. 研究開始当初の背景

補酵素として生体に必須である重金属イ

オンは、細胞内に過剰に存在すると毒にもなる。細胞膜にある重金属イオンポンプは、ATP を加水分解し過剰な重金属イオンを排出し

そのバランスを保っている。実際、人のウィルソン病では Cu^+ -ATPase 遺伝子が変異した結果、銅が肝臓などに蓄積し臓器障害を起こす。 Cu^+ -ATPase に代表される重金属イオンポンプは幅広い種に存在し、P 型 ATPase ファミリーの中で PIB 型に分類される。一方、PII 型に分類される Ca^{2+} -ATPase や Na^+ , K^+ -ATPase などは、PIB 型比べると機能・構造解析が圧倒的に進んでいる。だからと言って、それらの知見のみで PIB 型を説明出来るかと言うと、そう単純ではなさそうだ。なぜなら、PIB 型は PII 型と異なり、N 末端側に Cys-X-X-Cys 配列からなる「金属結合ドメイン (NMBD)」が存在する (図 1)。NMBD 欠損や Cys 残基の変異により、ATPase 活性が低下するが、その理由は謎である。また、膜貫通ヘリックスが PII 型より 2 本少ない 8 本で、細胞質ドメインの挿入箇所も異なる。

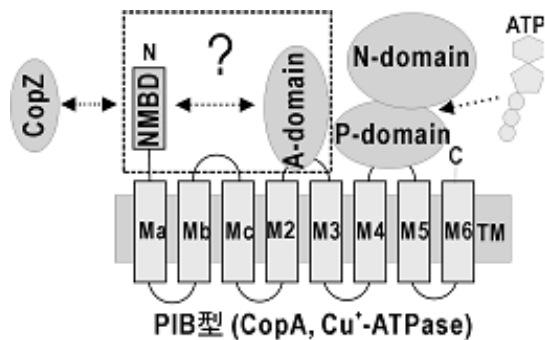
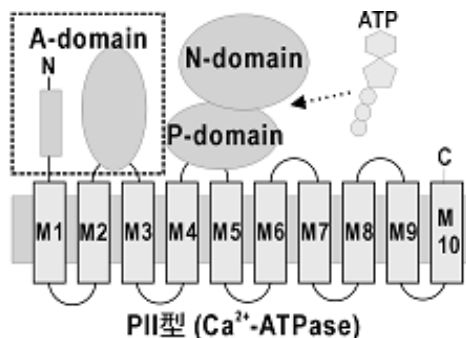


図 1 P I B 型 (上) P I I 型 (下) ATPase のドメイン構成



これらの解明を目指し、古細菌や細菌の Cu^+ -ATPase である CopA を用いた構造決定に複数のグループが凌ぎを削っている。膜貫通ヘリックスの配置については、2008 年に 15 分解能の電顕モデルが報告された。3 つの細胞質ドメインについては、結晶構造が明らかにされている。我々は ATP 結合状態の PN ドメインの原子構造を解き、CopA 独自のアデニン環認識様式を解明した。一方 Ca^{2+} -ATPase では、反応サイクルで基本となる 7 つの生理的状态の原子構造が解かれ、構造変化とイオン輸送の関係を理解するに至った (図 2)。反

応サイクル中に PN ドメインと A ドメインの相互作用が変化し、A ドメインが運動して膜貫通ヘリックスを操つりイオンを輸送する。イオン輸送への鍵を握る A ドメインは、 Ca^{2+} -ATPase では 2 つの領域から構成されているが、CopA では C 末端側しか保存されていない (図 1)。

我々は、CopA では「NMBD が A ドメインの一部となり、ドメイン間相互作用に重要な役割を果たす」可能性を提案した。実際、電顕像や蛋白質限定分解などによって、NMBD と A ドメインが協調して動く可能性が示唆された。 Cu^+ の有無が NMBD と PN ドメインの相互作用に効くらしい。さらに、 Ca^{2+} -ATPase の場合に A ドメインと相互作用する P ドメイン内的一部分が、CopA では完全に欠落している。これらの事実は、CopA では「NMBD を含めた独自のドメイン間相互作用機構」の存在を予感させる。

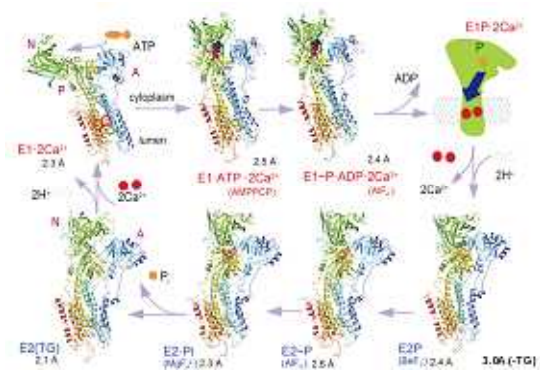


図 2 Ca^{2+} -ATPase の構造解析から明らかになった反応サイクル中の構造変化

2. 研究の目的

Cu^+ -ATPase (CopA) は、ATP を加水分解し余分な銅イオンを排出するイオンポンプである。同じ P 型 ATPase の Ca^{2+} -ATPase では、細胞質ドメインの運動がイオン輸送に重要であることが一連の構造解析で明かされた (図 2)。CopA は他の P 型 ATPase には存在しない金属結合ドメイン (NMBD) を持つが、その意味は謎である。

本研究では、CopA の生理的中間体を現す細胞質ドメインの複数の X 線結晶構造を決定し、ドメイン間の相互作用様式を解明したい。相互作用の直接の証拠となる複合体に加え、蛋白質表面の変化を知るため単体も構造解析の対象とする。その結果、 Cu^+ 輸送における NMBD の役割が推測可能になり、イオン輸送機構の理解が深まると期待される。

3. 研究の方法

好熱菌 (*A. fulgidus*)由来 CopA の A, P, N そして NMBD の 4 種類のドメインを用い、生理的状态を現す複合体や単体の X 線結晶構造を決定する。

研究の手順

(1) 蛋白質試料の調製

大腸菌発現系を用いて、大量に生産させる。N 末端にポリ His や GST タグなどを遺伝子工学的に導入することで、アフィニティークロマトグラフィーを利用した少ないステップでの高純度の精製を目指す。

(2) 結晶化

市販の結晶化スクリーニングキットを用いて約 600 条件のランダムな粗い条件検討を行う。微結晶が得られた条件については、結晶化条件の最適化を進める。

(3) X 線回折測定

高エネルギー加速器研究機構 (KEK) の放射光施設 (PF) と SPring-8 を利用して回折データを収集する。得られたデータはその場で処理し、初期の位相決定まで計算しデータの質を評価する。

(4) 構造解析

全てのドメイン単体の構造は既にわかっているため、既知構造をサーチモデルとした分子置換法で構造の決定を行う。もちろん、分子置換法で決定が困難な場合は、大腸菌の培養時に Se-Met を組換え蛋白質に導入して異常散乱効果を利用した位相決定を行うことも考えている。

特に工夫を行う点に関しては、

(1) 安定した複合体の形成

膜貫通部位により束縛されていない単離された状態では、複合体として会合しにくいのだろう。それに対して、ヘアピン構造を取るポリペプチドや Gly リッチなリンカーを用い、遺伝子工学的にお互いのドメインを繋ぐ事で解決を目指す。これが結晶化に負に働く可能性もあり、幅広く慎重な条件検討が必要ではあるが、面白くチャレンジングな工夫だと思われる。

(2) 変異体を利用した中間状態の安定化

ATP 加水分解過程の結晶化については、通常あり得ない状態でトラップされた構造を得るため、加水分解部位近傍にアミノ酸置換を行い複数の PN ドメインを作成して試したい。

4. 研究成果

蛋白質試料の調製に関しては、全てに関して高純度な試料を大量に得ることに成功した。具体的には、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過カラムを用いた 2 段階の精製によって、1L 培養液当たり、少なくとも 5 mg の精製蛋白質を得ることができた。この収量は、結晶化スクリーニングを行うには充分であると判断した。特に、通常の大腸菌を用いた発現法と異なる点としては、好熱菌由来の試料であったため、複数の組み合わせのレアコドンに対応した大腸菌ホストを宿主とすることで安定した蛋白質の発現が実現できた。

次に、蛋白質の結晶化であるが、本研究で構造決定の対象としたドメインの組み合わせは大きく 3 種類に分類される。

(1) NMBD と A ドメイン複合体

(2) ATP 加水分解過程の PN ドメイン

(3) NMBD と銅シャペロン (CopZ) 複合体

(1) に関しては、精製した両ドメインを単純に混ぜて結晶化した場合、得られた結晶の全てから A ドメイン単体のみしか含まれていなかった。つまり、両者の複合体として結晶を得ることができなかった。それに対する改善策として、ゲルろ過によって複合体を回収し結晶化することを試みたが効果はなかった。また、両者をポリペプチドや Gly リッチなリンカーを用い、遺伝子工学的にお互いのドメインを繋ぐことを試みたが、解析可能な結晶は今のところ得られていない。これについては、リンカーの長さや使用するアミノ酸の種類など、試行錯誤すべき条件が多く、今後も他の蛋白質の解析で行われた成功例を参考に改良を行う価値があると考えている。

一方、(2) に関しては、新たに PN ドメインに無機燐酸 (Pi) と Mg イオンを結合した状態の構造を決定した。Pi は活性部位近傍に配置していた。以前の ATP 結合型 (P4₃22) とは異なり、空間群が P2₁ となりパッキングが変わっていたものの、PN ドメイン自体の構造はほとんど変化していなかった。つまり、ATP 加水分解過程の構造変化を捕らえようとの試みであったが、結果は ATP 加水分解前後で変化なしであった。

変異体を用いた解析では、リン酸化残基である Asp424 をアミノ酸置換した PN ドメインを作成し、本来の基質である ATP を加えて結晶化を行ってみた。この変異体は ATP

を加水分解できないので、 磷酸基が転移される直前の状態を模倣できることを期待した。現在、結晶を得るに至っていない。

(3) に関しても、(1) の場合と同様、単体のみの結晶が得られるのみであった。複合体が得られやすいように結晶化溶液中に銅イオンを加えると沈殿が生じる場合が多く、それが結晶化における大きな障害となっていた。それに対して、一価の銅イオンを安定して得られるように還元剤の種類や濃度、そして蛋白質試料を銅イオンと混合する方法などを制御することで、沈殿の問題は解決された。また、銅イオンの替わりになる亜鉛イオンなども試しているが、複合体結晶化への効果は今のところ得られていない。

今後も、複合体結晶が得られやすいような工夫を試し、結晶化を進め、複合体構造の決定を目指して研究を進めている。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 岳夫 (TSUDA TAKEO)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：10345233