

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料  
〔研究進捗評価用〕

平成23年度採択分

平成26年5月31日現在

研究課題名（和文） **薬剤開発を視野に入れた膜輸送体の構造研究**  
研究課題名（英文） **Structural biology of membrane transporters  
with a view to drug development**



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

研究の概要：イオンポンプ蛋白質による能動輸送機構を原子構造に基づいて完全に理解することを目指し、筋小胞体カルシウムポンプとナトリウムポンプを主な対象に反応中間体の結晶構造解析を行うとともに、薬剤との複合体や病原菌輸送体の構造研究を通じ薬剤開発に寄与する。

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、エネルギー変換

### 1. 研究開始当初の背景

我々は筋小胞体カルシウムポンプ ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, SERCA1a) に関し反応サイクルほぼ全体をカバーする9つの状態の結晶構造を決定し、能動輸送のメカニズムの大略を原子構造に基づいて明らかにした。医学的にはより重要ともいえるナトリウムポンプ ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase) に関しても2状態の構造を決定した。その結果、イオンポンプをはるかに超えた広い領域に多大なインパクトを与えることができたが「どうしてそういう構造でなければならないのか」、「ATPの化学エネルギーはどう使われているのか」という本質的問いに対する正面からのアプローチは出来ていない。

また、これまでの構造研究によって、ポンプ蛋白質の阻害剤に関する知識は著しく深まった。ポンプ蛋白質は生体の恒常性の維持に本質的な役割を果たすため、疾病に関わるものは多くないにしても、病原菌を殺すためには優れた標的である。実際、マラリア原虫の一つの薬剤の標的はポンプ蛋白質である。

### 2. 研究の目的

第一に、上記二つのポンプ蛋白質を主な対象とし、イオン能動輸送機構を完全に理解すること、第二に、薬剤との複合体や病原菌の輸送体の構造研究を通し、薬剤開発にも貢献することである。

### 3. 研究の方法

基本と成るものはX線結晶解析である。変異体の構造解析も重要となるため、大型膜蛋白質の組替え体の大量生産が必須となる。そのためにアデノウィルス・COS細胞系を確立し

た。最適化の結果、150φ培養皿10枚（培養液1L相当）から1mgのSERCA精製標品を得るという驚異的効率を達成できた。

### 4. これまでの成果

以下には、特に重点を置いて推進した研究の成果についてのみ述べる。

(1) 筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の残された中間状態と変異体の高分解能構造決定：SERCA1aの反応経路のうち構造決定がなされていない最後の中間体とも言うべき  $\text{E1}(\text{Ca}^{2+}$ 無しだが  $\text{Ca}^{2+}$  に対し高親和性。生理的条件下では  $\text{E1} \cdot \text{Mg}^{2+}$ ) 状態に関し 3.1 Å 分解能で結晶構造を決定した。2個の  $\text{Ca}^{2+}$  の結合によって引き起こされると考えられてきた構造変化の大部分は既実現されていること、結合した  $\text{Mg}^{2+}$  は1個目の  $\text{Ca}^{2+}$  の結合を阻害しない上に、 $\text{Ca}^{2+}$  の結合によって容易に追い出され、 $\text{Mg}^{2+}$  によって  $\text{Ca}^{2+}$  の結合が促進されることを良く説明することが分かった。一方、驚いたことに、sarcolipin (SLN) と考えられる膜貫通

ヘリックスが解像された (図1)。SLNは心筋での  $\text{Ca}^{2+}$  制御の中心となる phospholamban (PLN) と同族であり、また、脂肪の燃焼に深く関わるといって健康維持の観点でも注目されているカルシウムポンプ調節蛋白質である。さらに、野生型

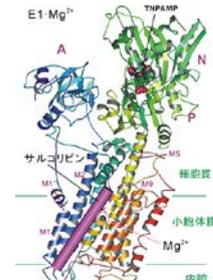


図1. カルシウムポンプの  $\text{E1} \cdot \text{Mg}^{2+}$  状態の構造とサルコリピン

SERCA1a を発現させ、SLN を含まない標品の結晶構造を決定した。その結果、SLN/PLN は  $E1 \cdot Mg^{2+}$  状態を安定化することが分かり多くの文献にある混乱を解消できた(論文 3)。これは、ポンプの生理的制御の最初の構造的解明であり、PLN との結合を阻害できれば拡張型心筋症などに大きな改善を期待できる。

(2)  $Na^+, K^+$ -ATPase の反応中間体の構造決定: 2009 年に  $K^+$  と結合した状態 ( $E2 \cdot Pi \cdot 2K^+$ ) の構造を決定したが、 $Na^+, K^+$ -ATPase は本質的にナトリウムポンプなので、 $Na^+$  結合状態の方がはるかに重要である。実際、この ATPase の  $Na^+$  に対する親和性は  $K^+$  より低いのに  $Na^+$  を厳密に選択して運搬するが、 $K^+$  は  $Na^+$  でも置換可能である。本研究で  $E1 \sim P \cdot 3Na^+ \cdot ADP$  状態の構造を 2.8Å 分解能で決定し、*Nature Article* として報告した(論文 1; 図 2)。すなわち、 $Na^+, K^+$ -ATPase は  $Na^+$  のイオン選択性と効率的な輸送のために、2 つの大きな特徴を持つことが分かった。その一つは 3 個の  $Na^+$  と段階的 (III → I → II の順; 図 4b) 且つ協同的に結合することである。個々の  $Na^+$  結合部位は狭く、また非常に近接して配置されている。そのため  $K^+$  や  $Ca^{2+}$  は結合できない。つまり、3 個の  $Na^+$  を輸送するのは、効率のためだけではなく、選択性のためでもある。もう一つはサイト III の位置である。サイト III は 2 つに分かれた M5 ヘリックスのヒンジ部分に位置し、陽イオンの結合が細胞質側半分 (M5c) の傾きを決定する。3 つの細胞質側ドメインは、この傾きが正しい時にだけ、N ドメインに結合した ATP が P ドメインの Asp 残基をリン酸化することが可能な配置をとる。つまり適切な大きさを持つイオン ( $Na^+$ ) だけが反応を進めることができ、 $Na^+$  はアロステリックナリガンドとして機能する。また、抗生物質である oligomycin の結合様式を解明した。

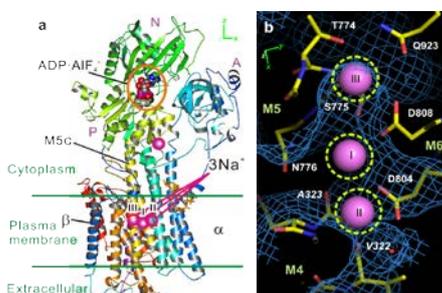


図 2. a. ナトリウムポンプの  $E1 \cdot P \cdot 3Na^+$  状態の構造。b.  $Na^+$  結合部位を細胞質側から見たところ。紫:  $Na^+$ , 黄色の破線:  $K^+$  (仮想的)

(3) 植物液胞の  $H^+$  ポンプである  $H^+$ -PPase の高分解能構造決定: 既に多数の阻害剤や、基質アナログとの複合体の構造解析に成功している。この結果、基質 (ピロリン酸) の加水分解に伴って、配位している  $Mg^{2+}$  の位置が変

化し、膜貫通ヘリックスの一本が動いてゲートが開閉され、膜内 Glu 残基のプロトン化状態が変わり、プロトン輸送が行われるというまったく新しい機構を見出した。

## 5. 今後の計画

(1) 大量発現系の確立によって  $Ca^{2+}$ -ATPase 変異体の構造決定が可能になった。既に、イオン通路のゲートである E309 の変異体に関しては構造決定に成功している。他の残基に関してもその意味を明らかにする。

(2) カルシウムポンプの他のアイソフォームに関する構造を決定し、カルシウム制御におけるアイソフォームの意味を明らかにする。既に、複数のものに関し構造決定に成功している。また、SLN/PLN との複合体の構造決定を行う。

(3)  $Na^+, K^+$ -ATPase は多くの疾病に関わる。中でも強心配糖体や高血圧薬の標的である。既に 4 つの薬剤との複合体の構造決定に成功しているので、それを完成させる。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

(研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、連携研究者は点線)

(1) R. Kanai, H. Ogawa, B. Vilsen, F. Cornelius and C. Toyoshima: Crystal structure of a  $Na^+$ -bound  $Na^+, K^+$ -ATPase preceding the  $E1P$  state. *Nature* 502, 201-206 (2013)

(2) C. Toyoshima and F. Cornelius: New crystal structures of PII-type ATPases: Excitement continues. *Curr. Opin Struct. Biol.* 23, 507-514 (2013)

(3) C. Toyoshima, S. Iwasawa, H. Ogawa, A. Hirata, J. Tsueda and G. Inesi: Crystal structures of the calcium pump and sarcolipin in the  $Mg^{2+}$ -bound  $E1$  state. *Nature* 495, 260-264 (2013)

(4) F. Cornelius, R. Kanai, and C. Toyoshima: A structural view on the functional importance of the sugar moiety and steroid hydroxyls of cardiotonic steroids in binding to  $Na, K$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 288, 6602-6616 (2013)

(5) C. Toyoshima, S. Yonekura, J. Tsueda and S. Iwasawa: Trinitrophenyl derivatives bind differently from parent adenine nucleotides to  $Ca^{2+}$ -ATPase in the absence of  $Ca^{2+}$ . *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 108, 1833-1838 (2011)

(受賞等)

山崎貞一賞 (2011) 材料科学技術振興財団

ホームページ

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/StrBiol/index.html>