

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570130

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によるカルシウム輸送部位の構造変化

研究課題名(英文)Structure changes in transport sites by phosphoenzyme isomerization of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：CaポンプによるCa²⁺輸送はリン酸化中間体(EP)を経由する。EP異性化では、触媒部位を持つ細胞質領域の構造変化が膜領域の輸送部位に伝わりCa²⁺を内腔に放出する。そこで両領域を繋ぐ、ヘリックスM2とそれに続くlinkerの機能的役割を変異導入で調べた。その結果、構造上区別される3つの構成部分が、ATP加水分解とCa²⁺輸送の共役、EP加水分解、細胞質側または内腔側gateの開閉、非リン酸化中間体のCa²⁺による活性化に機能することが示された。即ち、各反応段階に応じてM2～linkerの各部分が構造変化し、両領域間の相互応答によるエネルギー共役に重要な機能を果たすことが示された。

研究成果の概要(英文)：Ca²⁺ pump forms phosphorylated intermediates (EP) in Ca²⁺ transport cycle. In EP isomerization structural changes in cytoplasmic domains are transmitted to the Ca²⁺ sites in the membrane domain to translocate Ca²⁺ into lumen. Functional roles of helix M2 and its linker with the cytoplasmic Actuator-domain are explored by mutation study. The results show that each portion of M2 and its linker function in coupling of ATP hydrolysis and Ca²⁺ transport, EP hydrolysis, open-close of cytoplasmic and luminal Ca²⁺-gate, and Ca²⁺-induced activation of unphosphorylated intermediate. Therefore, the structural changes of M2 and its linker play critical roles region-specifically and step-specifically, and thereby couple the structural events in the catalytic site and the transport sites for the Ca²⁺ transport.

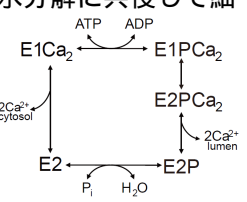
研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：カルシウムポンプ 小胞体 リン酸化中間体 カチオン輸送 部位特異的変異 gate ドメイン ATPアーゼ

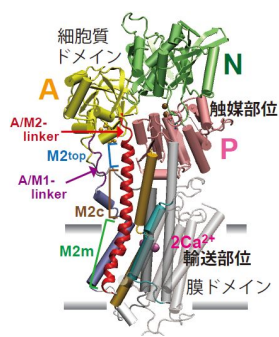
1. 研究開始当初の背景

小胞体 Ca²⁺ポンプは P-型イオン輸送 ATP アーゼの一つで、ATP 加水分解に共役して細胞質の Ca²⁺を内腔に輸送する。輸送サイクル(右図)は、ATP により自己リン酸化された中間体 (EP) を形成し、その異性化、加水分解を経る。EP の異性化に伴って EP に閉塞した Ca²⁺が内腔に放出される (E1PCa₂ → E2P + 2Ca²⁺)。このとき、触媒部位を形成する 3 種の細胞質ドメイン N、P、A が配置変化し、これが膜ドメインの膜貫通ヘリックスの配列変化を起こし、輸送部位の構造が変わって Ca²⁺が放出される。特に A ドメインは EP の異性化で大きく回転して P、N ドメインと固く結合し、Ca²⁺輸送の構造変化を駆動すると考えられている。しかし、遠く 50 も離れた触媒部位と輸送部位(下図)の間でどのような構造変化の相互応答があるかは明らかでなかった。



2. 研究の目的

筆者は A ドメインの動きによって細胞質側、または内腔側の Ca²⁺-gate の開閉が制御されると予想した。A ドメインは膜貫通ヘリックス M1、M2 に linker で繋がれていることから、これらの構造因子が相互応答に機能する可能性が高い。筆者は既に A ドメイン/M1-linker の長さがこの EP 異性化と内腔側の Ca²⁺-gate の開放に必須で、それを伸長する変異導入により Ca²⁺放出がブロックされた E2PCa₂ が新しい中間状態として蓄積することを示した (Daiho, *et al.* JBC(2007))。これより、EP の異性化では、A ドメインの回転に伴い A/M1-linker が張力を持ち、A ドメインとそれが結合した P ドメイン/M4/M5 を引っ張って傾けることで膜ドメインの構造変化を引き起こすと考えた。



一方、膜ドメインから細胞質にのびる長いヘリックス M2、および M2 と A ドメインを繋ぐループ A/M2-linker はサイクル中に大きく構造変化するが、その意義が不明であった。本研究では、各反応段階におけるそれらの機能的役割を部位特異的変異導入と反応速度論的解析により明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

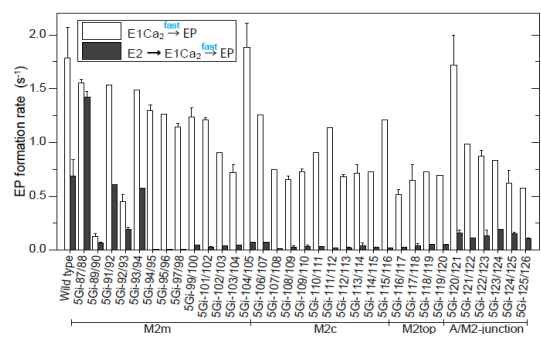
M2 はその位置から 3 つの領域に区別できる(上図)。膜貫通領域 M2m、細胞質領域 M2c、P ドメインと相互作用し得る M2top である。これらと A/M2-linker に種々の部位得的変異 (1~5 個の Gly 挿入、1~4 個の残基削除、2

~3 残基の Gly 置換、いくつかの単置換)を導入した。変異を含んだ Ca²⁺ポンプ遺伝子を構築後、COS-1 細胞で発現させ、ミクロソーム画分を調製した。構築・発現・解析した変異体の総数は 100 を優に超える。ELISA による発現量測定、[γ-³²P]ATP や ⁴⁵Ca²⁺などの放射性同位元素を用いて ATPase 活性や Ca²⁺輸送活性の測定、リン酸化中間体(EP)形成、異性化、加水分解の反応速度論的解析、膜フィルトレーション法による EP への ⁴⁵Ca²⁺結合 (閉塞)などの機能解析を行った。

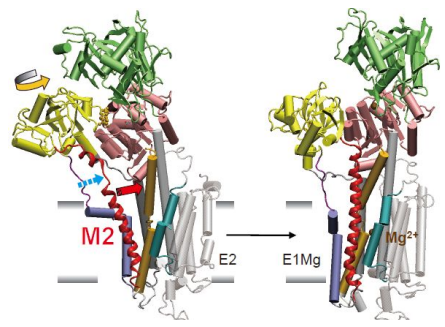
4. 研究成果

M2 から A/M2-linker までの殆どの残基間に 5 個の Gly を連続的に挿入(5Gi)した一連の変異において最も顕著な結果が得られた。この 5Gi により、ヘリックスの解け/伸長を、またループ部分では伸長を意図した。

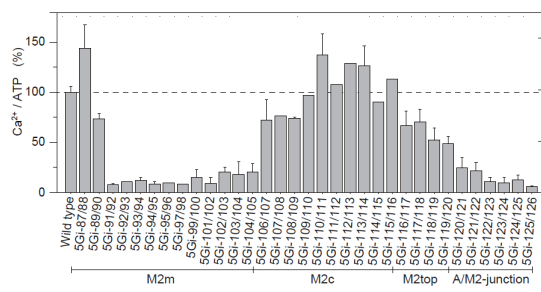
(1) まず、非リン酸化中間体の活性化段階 (E2 → E1) を E2 からの EP 形成速度で測定した。E1 への Ca²⁺結合と E1Ca₂ → EP は E2 → E1 に比べて十分速く、E2 (E1)



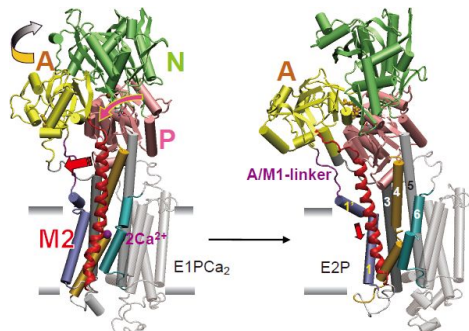
E1Ca₂ → EP の律速は E2 → E1 となる。結果は、M2 ヘリックス殆どの部分への 5Gi でその活性化が強く阻害された(上図)。E2 → E1 で細胞質側の Ca²⁺-gate が開いた後、細胞



質 Ca²⁺が結合する。このとき、E2 → E1 の構造変化には M2 のほぼ全体が連続的なヘリックス構造をとって M2 が M4、M6 と helix-helix 相互作用することが必要であることが分かった(上図)。

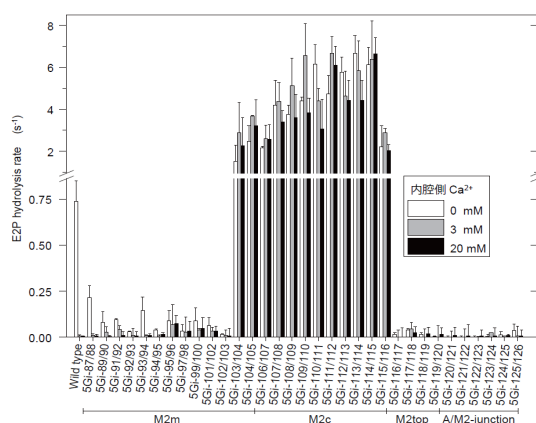


(2) M2m 領域と M2top ~ A/M2-linker への 5Gi 変異体は何れも ATPase 活性はあるが Ca^{2+} 輸送活性を失っており、強い脱共役がみられた。即ち、ATP 加水分解あたり輸送される Ca^{2+} の比: $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ が著しく低下した(上図)。 Ca^{2+} 輸送の鍵となる段階は EP 異性化 ($\text{E1PCa}_2 \rightarrow \text{E2P} + 2\text{Ca}^{2+}$) であり、EP に結合(閉塞)した Ca^{2+} が内腔に放出される。これらの変異体が形成する EP は Ca^{2+} 閉塞能を失っており、また EP 異性化が促進されていた。従って、



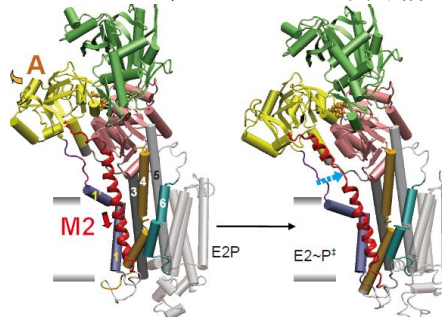
M2m、A/M2-linker の正常な構造が、EP 異性化で細胞質側の Ca^{2+} -gate を閉じて Ca^{2+} を細胞質に逃がさないことに重要である。M2m と A/M2-linker に挟まれた M2c への 5Gi は共役と Ca^{2+} 閉塞に影響しなかった。A/M2-linker は A ドメインの回転に伴って M2 を引っ張り、M2 の相互作用の相手を変換することで P ドメインが正常に傾くことを促し、また M2m は直接 gate 残基に作用することによって、いずれも細胞質側の Ca^{2+} -gate の閉じた状態を安定化すると考えられる(上図)。

(3) E2P の加水分解 ($\text{E2P} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{E2} + \text{P}_i$) でもやはり M2 の 3 つの領域が異なる役割を演じることが分かった。E2P の加水分解は M2m と M2top ~ A/M2-linker への 5Gi でほぼ完全にブロックされた(下図)。ところが、M2c へ 5Gi を施すと EP 加水分解の速度が最



大 10 倍も促進された。また、これと同時に内腔側 Ca^{2+} (3mM、または 20mM) による EP 分解のバックドア阻害が全く効かなくなっていた。即ち、EP の内腔側の gate は Ca^{2+} 輸送後すぐに固く閉じてしまう。従って M2c ヘリックスの解け/伸長は、加水分解のための触媒部位の形成と内腔側の Ca^{2+} -gate を閉じることの両者を同時に促進した。この結果は

M2c 部分が unwound し、内腔側の gate を閉じている EP 加水分解の遷移状態 ($\text{E2} \sim \text{P}^\ddagger$) の結晶構造と合っている(下図)。M2top ~ A/M2-linker が A、P ドメインと強く相互作用



し、M2m が膜に沈んで M2c を上下に引っ張って M2c が解け/伸長することにより、触媒部位の形成と内腔側の Ca^{2+} -gate の閉じを共役させることが明らかとなった。

以上の結果は、反応段階に応じて M2 の各部分領域および M2top ~ A/M2-linker の 2 次構造や長さが変化することが、細胞質領域と膜ドメイン間の構造変化を介した相互応答によるエネルギー共役に必須であり、EP の異性化ならびに加水分解と Ca^{2+} -gating に重要であることを示している。

筆者が以前示した (Daiho, *et al.* JBC(2007))ように、A/M1-linker は EP 異性化において、A ドメインの回転による細胞質ドメインの構造変化を膜ドメインに伝達して内腔側 Ca^{2+} -gate を開く。この linker の引っ張りが P ドメイン/M4/M5 を傾けることで EP からの Ca^{2+} 脱閉塞、即ち内腔側の Ca^{2+} -gate の開きに必須の役割を果たす。本研究では、M2top ~ A/M2-linker と M2m が EP 異性化の過程で Ca^{2+} を逃がさないように細胞質側 Ca^{2+} -gate を閉じること、また E2P 加水分解では内腔側の Ca^{2+} -gating を閉じることが明らかとなった。従って、これら 2 つの linker が、異なる段階で特異的な Ca^{2+} -gate の開閉を制御すること、それにより細胞質領域と膜ドメイン間が相互応答して Ca^{2+} 輸送のエネルギー共役が成立することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yamasaki K., Daiho T., Danko S., Suzuki H. Roles of long-range electrostatic domain interactions and K^+ in phosphoenzyme transition of Ca^{2+} -ATPase *J. Biol. Chem.*, 288, 20646-20657 (2013). (学術誌論文、査読有り)
doi:10.1074/jbc.M113.482711

〔学会発表〕(計 14 件)

大保 貴嗣、山崎 和生、Stefania Danko、鈴木 裕
筋小胞体 Ca^{2+} ポンプのヘリックス M2 膜貫

通部分と細胞質部分、およびその連結領域の役割

日本生体エネルギー研究会第 39 回討論会、
2013 年 12 月 18 日、静岡

山崎 和生、Stefania Danko、大保 貴嗣、
鈴木 裕

筋小胞体カルシウムポンプのナノディスクへの組み込みとその性質

日本生体エネルギー研究会第 39 回討論会、
2013 年 12 月 18 日、静岡

大保 貴嗣、山崎 和生、Stefania Danko、
鈴木 裕

筋小胞体 Ca^{2+} ポンプのヘリックス M2 膜貫通部分(M2m)と細胞質部分(M2cyt)およびその連結領域の役割

第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日、横浜

山崎 和生、Stefania Danko、大保 貴嗣、
鈴木 裕

筋小胞体カルシウムポンプのナノディスクへの組み込みとその性質

第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日、横浜

大保 貴嗣、山崎 和生、Stefania Danko、
鈴木 裕

筋小胞体 Ca^{2+} ポンプの輸送反応における膜貫通ヘリックス M2 の役割

日本生体エネルギー研究会第 38 回討論会、
2012 年 12 月 22 日、岡山

山崎 和生、大保 貴嗣、Stefania Danko、
鈴木 裕

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の E1P-E2P 転換と Ca^{2+} 放出の共役機構

日本生体エネルギー研究会第 38 回討論会、
2012 年 12 月 22 日、岡山

大保 貴嗣、山崎 和生、Stefania Danko、
鈴木 裕

筋小胞体 Ca^{2+} ポンプにおけるエネルギー共役；膜貫通ヘリックス M2 およびその細胞質領域アクチュエータードメインとの連結部分の役割

第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14 日、福岡

山崎 和生、大保 貴嗣、Stefania Danko、
鈴木 裕

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の E1P-E2P 転換と Ca^{2+} 放出の共役機構

第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14 日、福岡

Suzuki H., Daiho T., Yamasaki K., Danko S.

Mechanism of Ca^{2+} -ATPase revealed by

mutations, kinetics, and development of stable analogs of phosphorylated intermediates

3rd International Workshop on Expression, Structure and Function of Membrane Proteins
Florence, Italy. (Sep25, 2012). (招待講演)

大保 貴嗣、山崎 和生、Stefania Danko、
鈴木 裕

筋小胞体 Ca^{2+} ポンプにおけるエネルギー共役；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との連結部分の役割

日本生体エネルギー研究会第 37 回討論会
シンポジウム、2011 年 12 月 21 日、京都

山崎 和生、大保 貴嗣、Stefania Danko、
鈴木 裕

筋小胞体 Ca^{2+} -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

日本生体エネルギー研究会第 37 回討論会
シンポジウム、2011 年 12 月 21 日、京都

Daiho T., Danko S., Yamasaki K., Suzuki H.

Critical importance of helix-loop conversions, length, and Actuator-domain junction structure of M2 in Ca^{2+} -ATPase for Ca^{2+} transport

2011 ASBMB Special Symposia Series, Na,K-ATPase and Related P-type Transport ATPases:

Structure, Biology, and Medicine

The 13th International ATPase Conference
California, USA (Sep28, 2011). (招待講演)

Suzuki H., Daiho T., Yamasaki K., Danko S.

Mechanism of Ca^{2+} -ATPase revealed by mutations, kinetics, and development of stable analogs of phosphorylated intermediates

2011 ASBMB Special Symposia Series, Na,K-ATPase and Related P-type Transport ATPases:

Structure, Biology, and Medicine

The 13th International ATPase Conference
California, USA (Sep28, 2011). (招待講演)

Yamasaki K., Daiho T., Danko S., Suzuki H.

Roles of electric interactions between cytoplasmic domains on the phosphoenzyme transition of Ca^{2+} -ATPase and a critical importance of the charged residues at the hinge of the P and N domains

2011 ASBMB Special Symposia Series, Na,K-ATPase and Related P-type Transport ATPases:

Structure, Biology, and Medicine

The 13th International ATPase Conference
California, USA (Sep28, 2011).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/biochem2/>

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