

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570147

研究課題名(和文)カルシウムポンプにおける静電相互作用の役割と環境による影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effects of lipid environment and roles of electrostatic interactions on the Ca²⁺-ATPase function

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：筋小胞体カルシウムポンプの機能発現における静電的相互作用の役割と、それに対する脂質を中心とする環境要因の影響について、ナノディスクに組み込んだカルシウムポンプ標品を用いて検討した。その結果、脂質頭部の電荷とカルシウムポンプ本体との静電的相互作用、及び脂質とポンプ本体との直接的相互作用がともにポンプの活性に重要な影響を及ぼし、ポンプの機能発現における脂質環境の重要性を明らかにすることが出来た。本研究はカルシウムポンプの機能に及ぼす脂質の影響を、静電的相互作用によるものとそれ以外とに明確に分けることに成功した初めてのものである。

研究成果の概要(英文)：The role of electrostatic interactions in and the effects of the lipid environment on the reaction mechanisms on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase were explored. The experiments using the Ca²⁺-ATPase buried into nanodiscs which contained various lipid contents revealed that the not only electrostatic interactions between protein and lipids but also steric interactions between them have important for function of the pump. This study succeeded clearly to divide the effects of the lipid environment between electrostatic interactions and steric interactions.

研究分野：筋小胞体カルシウムポンプの構造機能関連

キーワード：カルシウムポンプ Ca²⁺-ATPase 酵素反応 生体エネルギー転換 静電的相互作用 ナノディスク リン脂質 タンパク-脂質相互作用

1. 研究開始当初の背景

(1)筋小胞体カルシウムポンプ(SERCA1a、SR Ca²⁺-ATPase)のCa²⁺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及びそのアナログの結晶構造が解かれ、ATP加水分解反応とCa²⁺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。

(2)我々は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Ca²⁺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)。そこで私は細胞質ドメインのこのようなダイナミックな動きを引き起こす原動力(motive force)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、遠隔力として働く静電力に着目し、平成21-23年度科学研究費補助金による研究「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」を進め、P-Nドメインのヒンジ領域に存在する荷電残基の変異体を用いた解析と、タンパク質の周りに出来る電気力線の様子から、筋小胞体Ca²⁺-ATPaseのリン酸化中間体転換過程において静電相互作用が重要な役割を持つことを示すことができた。また反応の塩濃度依存性から反応における静電相互作用の寄与を定量化できる可能性を見出し、EP転換過程における静電相互作用の役割について解析を行った。

2. 研究の目的

上記研究を進めるなかで興味深い結果が得られた。これまでCa²⁺-ATPase研究の中で、ウサギ骨格筋から得られたSR膜標品を用いた場合と、cDNAを使って発現させた培養細胞のマイクロソームを用いた場合の結果は明確に区別せずに考えられていた。しかしながら、EP転換過程の静電相互作用の寄与においてSR膜標品とSERCA1aを発現させたCOS-1マイクロソーム画分との間に明確な違いがあった。これは周りの環境によりCa²⁺-ATPaseの反応に重要な静電相互作用が影響を受けることを示した結果であり、次のような意味で非常に重要である。①Ca²⁺-ATPaseの活性に関与する静電的相互作用が周囲の環境(脂質、調節因子、膜中のタンパク密度?)の影響を受けることを示している。②SRを用いた実験とマイクロソームを用いた実験の比較は慎重に行う必要があることを示している。③SRとマイクロソームとの差が生じる原因を明らかにすることにより、Ca²⁺-ATPaseの反応経路における静電的相互作用の役割が明らかになる可能性を示している。

本研究ではCa²⁺-ATPase反応の各ステップにおける静電的相互作用の役割を明らかにし定量化すること、及びSR膜とマイクロソームでの違いを明らかにし、活性に重要な静電的相互作用に対する脂質環境の影響について調べることを目的とした。静電的相互作用は他の酵素でも重要な役割を果たしていると考えられ、酵素機能と静電的相互作用の関係を調べる上で非常に有用な結果が得られることが期待できた。

3. 研究の方法

(1)筋小胞体の調製:ウサギ骨格より従来の方法で筋小胞体膜画分(SR膜)を調製する。このSRVはSR Ca²⁺-ATPaseの含量が70%以上であり、これをSR Ca²⁺-ATPase標品として各種の測定に用いる。

(2)COS-1細胞を用いたCa²⁺-ATPaseの発現:発現ベクターに入れたSERCA1a遺伝子をCOS-1細胞にリポフェクション法で導入し、Ca²⁺-ATPaseを発現させる。Ca²⁺-ATPaseを発現しているCOS-1細胞を回収して破碎し、マイクロソーム画分を調製する。この標品には発現させたCa²⁺-ATPaseが膜タンパクの1-5%存在しており、これを発現Ca²⁺-ATPase標品として用いる。

(3)リン酸中間体(EP)の測定:Ca²⁺-ATPase標品(SR由来、発現)を特定の条件下で[γ-³²P]ATPあるいは³²Piを用いてリン酸化させる。トリクロロ酢酸の加えることにより反応を停止させると同時に沈殿させる。過剰の放射性物質を遠心で除いたのちSDS-PAGEにかけ、デジタルオートラジオグラフでCa²⁺-ATPaseのバンドに付随する放射活性を定量する。

(4)Ca²⁺結合量測定:Ca²⁺-ATPaseに種々の条件下で⁴⁵Caを添加し反応を行う。その後メンブランフィルター上サンプルをスポットしCa²⁺結合測定用washerでメンブランをwashする。メンブランを乾燥させた後メンブランに残る⁴⁵Ca量を定量する。これと同時に同じ操作をCa²⁺-ATPase特異的阻害剤thapsigargin存在下で行いメンブラン上に残る⁴⁵Caの量を測定し二つの差をCa²⁺-ATPase特異的なCa²⁺結合量とする。

(5)反応素過程における静電的相互作用の定量化:Ca²⁺-ATPaseの反応素過程を塩濃度の異なる条件で測定し、横軸にSIT法により見積もった溶液の活量係数の2乗、縦軸に反応速度の対数を取ってプロットする。このプロットから得られた直線の傾きから静電的相互作用の寄与、切片からそれ以外の要因による寄与を見積もる。(図1)

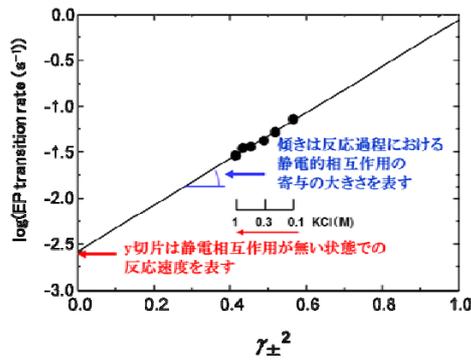


図 1

(6) ナノディスクへの Ca^{2+} -ATPase の組み込み: Ca^{2+} -ATPase (SR、発現) を C_{12}E_8 で可溶化し、Membrane scaffold protein (MSP)、脂質と混合した後、バイオビーズで C_{12}E_8 を除去し、ナノディスクを形成させるとともに Ca^{2+} -ATPase を組み込む(図 2)。形成した Ca^{2+} -ATPase 含有ナノディスク (CND) はゲル濾過カラムを通して精製する。

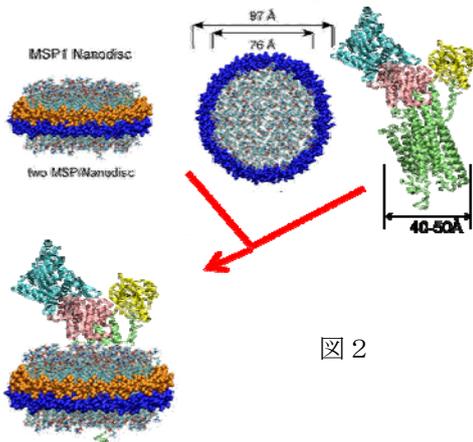


図 2

4. 研究成果

(1) Ca^{2+} -ATPase への Ca^{2+} 結合量測定法の改良: 従来 Ca^{2+} -ATPase の Ca^{2+} 結合測定では、washのステップを入れると Ca^{2+} も洗い流されるため、バックグラウンドを下げる有効な手段がなく、S/N比が悪くなっていた。また、筋小胞体膜標品 (SRV) では膜中の Ca^{2+} -ATPase 含量が高いため、ある程度の S/N を確保できるが、COS-1 細胞で発現させた Ca^{2+} -ATPase を含むマイクロソームでは発現量が低いため非常に S/N の悪い測定しかできなかった。これに対し私は、バックグラウンドを減らすために、washer の検討、 ^{45}Ca による前処理時間の検討を行い、マイクロソームを用いた測定で S/N 比を大幅に向上させることができた。この測定法を用い、マイクロソーム上に発現した Ca^{2+} -ATPase 変異体で、 E1PCa_2 から E2P を経て Ca^{2+} を放出する過程を測定し、野生型では生じない E2P への転換に先立つ Ca^{2+} 放出を見出すことができた(図 3)。この結果は筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の Ca^{2+} 放出過程で、現在発表されている構造の間を埋める中間体 (E2PCa_2) の存在を示すものであり、 Ca^{2+} 輸送

機構の解明において、非常に重要なデータである。

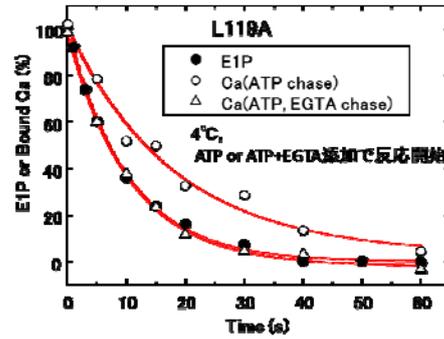


図 3

(2) ① Ca^{2+} -ATPase のナノディスクへの組み込み: Ca^{2+} -ATPase の活性に対する脂質の影響を調べるため、 Ca^{2+} -ATPase を可溶化したのち NLPs に組み込むことを検討した。その結果 SRV から得た可溶性 Ca^{2+} -ATPase を、MSP1D1 から構成されるナノディスクに組み込むことができ、ナノディスクに組み込まれた Ca^{2+} -ATPase はリン酸化中間体形成能、 Ca^{2+} 依存性 ATPase 活性を保持しており、その活性は脂質組成の影響を受けることが明らかとなった(図 4)。

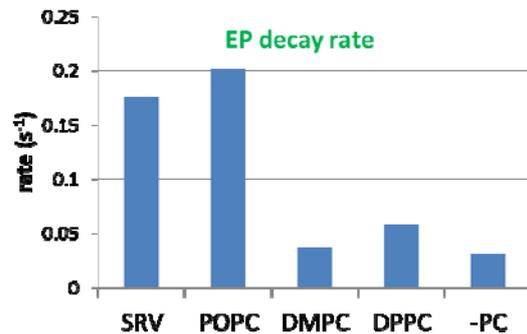


図 4

② Ca^{2+} -ATPase を組み込んだナノディスクの精製: 筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase をナノディスクに活性が保持された状態で組み込むことに成功したが、ゲル濾過カラムによる分析でその純度が低いことが明らかになった。そのためより効率よく Ca^{2+} -ATPase をナノディスクに組み込む条件を探し、さらにゲル濾過カラム

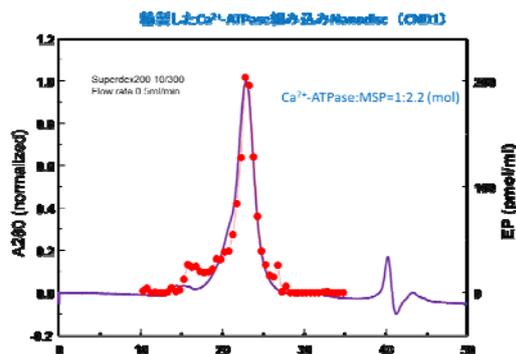


図 5

ムによる精製を組み合わせた。得られた標品はCa²⁺-ATPaseとMSPのモル比が1:2に近く、純度の高い標品を得ることが出来たことが確認された(図5)。

③ COS-1 で発現させた Ca²⁺-ATPase のナノディスクへの組み込み：COS-1 細胞で発現させた Ca²⁺-ATPase をナノディスクに組み込み、活性を保持していることが確認できた。しかしながら COS-1 から精製したマイクロソームでは Ca²⁺-ATPase の含量が低いためこのままでは精製標品を得ることは難しい。そのため発現した Ca²⁺-ATPase を精製するための His タグを付けた Ca²⁺-ATPase を発現させるコンストラクトを構築し、活性が保持されていることを確認した。

(3) ① SRV より抽出した Ca²⁺-ATPase を、アルキル鎖が同じ (パルミトイル-オレオイル) でヘッドグループだけが異なるリン脂質 (フォスファチジルコリン (POPC)、フォスファチジルエタノールアミン (POPE)、及びフォスファチジルグリセロール (POPG)) を含むナノディスクに組み込んだ標品を作成した。作成において脂質の差により条件を変える必要であったが、いずれもゲル濾過カラムにおいてシングルのピークを持つ標品を得ることが出来た。またいずれの標品も Ca²⁺-ATPase 活性を保持していることが確認でき以降の解析に用いることが可能であった

②この標品を用いて E1P-E2P 転換速度を測定したところ、0.1M KCl 存在下で比較すると、POPC に組み込んだ標品は SRV 中と比較して 80%程度の速度であったのに対し、POPG 及び POPG ではそれぞれ SRV 中の 30%及び 20%と大きく抑えられていた。次に反応液中の塩濃度を変えて測定し、活量と反応速度の関係をみると、POPE は POPC と比べて大きく速度が低下しているが、静電的相互作用は E1P 転換ステップに対し促進効果を持ちその程度は PC と PE ほぼ同等であること、活性の違いは静電相互作用以外の効果によることが明らかとなった。このことは PC と PE が直接的に Ca²⁺-ATPase と直接的に相互作用している証拠であり、本研究により始めて明らかになった知見である。また POPG では静電的相互作用は E1P 転換速度に関して中立的であり、静電的相互作用以外の効果は PC 及び PE と比較して促進的に働くことが明らかになった(図6)。

③PC と PE を 1:1 で混合したナノディスクに Ca²⁺-ATPase を組み込んだ場合、静電的相互作用の寄与は変化せず、非静電的相互作用の効果が中間的に出ることが期待されたが、実際には静電的相互作用は減弱され、非静電的相互作用は PC のみのナノディスクのときと等しいという結果が出た。これは、脂質ヘッドグループの電荷が混合により複雑に変化する可能性を示しており、脂質に埋め込まれた

膜タンパクの機能を探るうえで、非常に興味深い知見である。

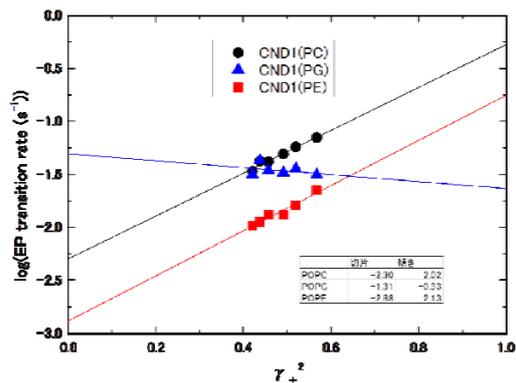


図 6

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 2 件)

- ① Daiho T, Yamasaki K, Danko S, and Suzuki H., Second transmembrane helix (M2) and long range coupling in Ca²⁺-ATPase, Journal of Biological Chemistry, 査読有, 289 巻, 2014, 31241-31252
DOI: 10.1074/jbc.M114.584086
- ② K. Yamasaki, T. Daiho, S. Danko, and H. Suzuki, Roles of Long-range Electrostatic Domain Interactions and K⁺ in Phosphoenzyme Transition of Ca²⁺-ATPase, Journal of Biological Chemistry, 査読有, 288 巻, 2013, 20646-20657
DOI: 10.1074/jbc.M113.482711

[学会発表] (計 16 件)

- ① 山崎 和生 他、筋小胞体カルシウムポンプ EP 転換とカルシウム放出の共役機構における Tyr¹²²-hydrophobic cluster の役割、第 40 回生体エネルギー研究会、2014 年 12 月 11 日～2014 年 12 月 13 日、愛媛大学
- ② 大保 貴嗣 他、筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の第 2 膜貫通ヘリックス (M2) とロングレンジ共役、第 40 回生体エネルギー研究会、2014 年 12 月 11 日～2014 年 12 月 13 日、愛媛大学
- ③ 山崎 和生 他、ナノディスクに組み込んだ筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の活性に対する脂質ヘッドグループの影響の解析、第 87 回日本生化学会、2014 年 10 月 15 日～2014 年 10 月 18 日、国立京都国際会館
- ④ 大保 貴嗣 他、筋小胞体 Ca²⁺ポンプの M2 ヘリックス：膜貫通部分と細胞質部分の連結領域の役割、第 87 回日本生化学会、2014 年 10 月 15 日～2014 年 10 月 18 日、国立京都国際会館

- ⑤ 小島 知樹 他、1分子蛍光観察による Ca^{2+} -ATPase の数と立体構造変化検出の試み、第40回生体エネルギー研究会、2014年12月11日～2014年12月13日、愛媛大学
- ⑥ Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki, A New Method for Ca^{2+} -binding Measurement Applicable to a Small Quantity of Ca^{2+} -ATPase: Transient E2P with Bound Ca^{2+} and Role of Leu119 on M2 in Ca^{2+} -affinity Reduction and Ca^{2+} Release, 第52回日本生物物理学会、2014年09月25日～2014年09月27日、札幌コンベンションセンター
- ⑦ Kazuo Yamasaki, Stefania Danko, Takashi Daiho, and Hiroshi Suzuki, A New Method for Ca^{2+} -binding Measurement Applicable to a Small Quantity of Ca^{2+} -ATPase: Transient E2P with Bound Ca^{2+} and Role of Leu119 on M2 in Ca^{2+} -affinity Reduction and Ca^{2+} Release, 14th International Conference on P-type ATPases and Related Cation Pumps, 2014年08月30日～2014年09月04日、Conference Center "De Werelt", Netherlands
- ⑧ Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki, Long-range Coupling between Catalytic and Transport Sites via Second Transmembrane Helix (M2) in E2P Hydrolysis and E2-E1 Transition of Ca^{2+} -ATPase, 14th International Conference on P-type ATPases and Related Cation Pumps, 2014年08月30日～2014年09月04日、Conference Center "De Werelt", Netherlands
- ⑨ 大保 貴嗣 他、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～2013年12月20日、静岡
- ⑩ 山崎 和生 他、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～2013年12月20日、静岡
- ⑪ 大保 貴嗣 他、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、日本生体エネルギー研究会第39回討論会、2013年12月18日～2013年12月20日、横浜
- ⑫ 山崎 和生 他、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09月11日～2013年09月13日、横浜
- ⑬ 大保 貴嗣 他、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～2012年12月24日、岡山大学薬学部
- ⑭ 山崎 和生 他、筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の E1P-E2P 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～2012年12月24日、岡山大学薬学部
- ⑮ 大保 貴嗣 他、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～2012、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
- ⑯ 山崎 和生 他、筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の E1P-E2P 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～2012年12月16日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

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