

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291012

研究課題名(和文) 心筋細胞のカルシウムイオン制御機構の結晶学的解明

研究課題名(英文) Structural analysis of PLN/SERCA regulatome toward understanding of the mechanism of Ca<sup>2+</sup>-regulation in the cardiac muscle cells

研究代表者

小川 治夫 (Ogawa, Haruo)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：40292726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：SERCA2aは筋小胞体へのCa<sup>2+</sup>の取り込みを担うCa<sup>2+</sup>ポンプであり、PLN(フォスフォルアンパン)はその直接的制御因子である。PLNは アドレナリンシグナルの最も重要なmediatorであり、その磷酸化状態に依存したSERCA2aの制御を行う。近年PLN/SERCA2a系を制御する因子群が発見され、大規模な複合体(レギュラトーム)を形成することが判明した。だが、SERCA2aやPLNの大量発現・精製系が存在しなかったために、制御機構の詳細を明らかにできないでいた。そこで我々独自の大量発現・精製系を用いることで、レギュラトームの制御機構の解明を目指した。

研究成果の概要(英文)：SR calcium uptake is mediated by a SERCA2a, whose activity is reversibly regulated by its direct mediator phospholamban (PLN). PLN is the most important mediator of adrenergic signal, and it controls SERCA2a depending on its phosphorylation state. Recently many regulators that controls the PLN/SERCA2a complex was discovered. They are thought to form a large-scale complex (PLN/SERCAa regulatome). However, due to lack of efficient expression/purification system for SERCA2/PLN, the details of the mechanisms how they regulate PLN/SERCAa complex is unclear. Thus, we aimed to elucidate the mechanism of regulation of PLN/SERCA2a by regulators with using our own large expression and purification system.

研究分野：構造生物学

キーワード：膜蛋白質 イオンポンプ蛋白質 X線結晶解析

### 1. 研究開始当初の背景

心臓病は、我が国を含めた先進国での死因の主原因であるが、現在の治療は対症療法が主で、分子メカニズムに基づいた根本的な治療法が求められている。心臓病の主要因の1つに、心筋細胞での  $Ca^{2+}$  制御の異常がある。その中心となるのが、筋小胞体  $Ca^{2+}$  ポンプである SERCA2a である。SERCA2a は骨格筋(速筋)の SERCA1a と類似性が高い(84%同一)。SERCA2a の活性は心筋細胞の収縮力と直接関係しており、活性が増大すれば、筋小胞体中に取り込まれる  $Ca^{2+}$  濃度が上昇し、放出される  $Ca^{2+}$  も増大する結果、収縮力は増大する。SERCA2a の活性は、少なくとも心室においては PLN によって制御されており、PLN は アドレナリンシグナルの最も重要な mediator である。PLN は 51 残基からなる 1 回膜貫通型の膜蛋白質であり、複数の燐酸化サイトを持つ。PLN が燐酸化されていない状態では、PLN は SERCA2a の阻害剤として働くが、アドレナリン刺激の下流にあって燐酸化(PKA, CaMKII による)を受けると SERCA2a を抑制する作用は消失し、SERCA2a は活性化される。すなわち、PLN による抑制は、アドレナリンによる心臓収縮の制御を可能にする「貯め」を作るためである。PLN と SERCA2a の比は重要であり、甲状腺ホルモンと直接的に関連している。PLN に変異を持つ家系は重篤な心臓病を持つことが報告されている等、SERCA2a/PLN 複合体の重要性は明らかである。PLN 単体に関しては NMR による研究がなされているが、SERCA2a との構造研究は無い。そのため、PLN が SERCA2a を制御する機構は未解明である。SERCA2a 反応サイクル中のどの中間状態で結合するのかについても混乱している。

一方、心房では PLN と同属で 32 残基のサルコリピン(SLN)が SERCA2a を制御している。SLN は骨格筋でも発現しており、SERCA1a の調節因子でもある。SLN もやはり、アドレナリンシグナルによる制御を受けることが、分かってきた。この構造研究は PLN 以上に遅れていたが、申請者による SERCA1a/SLN 複合体の決定により、更なる発展を迎えることとなる。驚くべきことに SLN/PLN はこれまで考えられていた E2( $Ca^{2+}$ 非結合、 $Ca^{2+}$  に対し低親和性)状態ではなく、E1( $Ca^{2+}$ 非結合だが、 $Ca^{2+}$  に対し高親和性)状態を安定化することが判明し、制御機構に関しても手がかりが得られるに至った。

以上のような状況の中、SERCA2a/PLN 複合体に結合し、SERCA2a の活性を制御する因子群の存在が明らかになり、大規模な複合体(SERCA2a/PLN レギュラトーム)を形成することが判明した。例えば、HRC の恒常的な過剰発現が加齢による心不全を引き起こすことや、その変異が拡張型心筋症の患者の重篤な洞性不整脈を引き起こすこと、HAX-1 の減

少が心臓病で見られることなどから、これらの因子の重要性は明らかだが、その詳細はまったく未知であった。この様に SERCA2a 研究の重要性は明白だが、心筋からの蛋白質精製が困難なため、立体構造解析はおろか、生化学実験も極めて不十分な状態にあった。その一方で、我々は独自のアデノウイルス/哺乳類培養細胞発現・精製系を立ち上げ、SERCA1a や SERCA2a 等の大量発現・精製系が立ち上がった。また 2 種類のウイルスを共感染させることによって SERCA2a/PLN 複合体の発現にも成功し、PLN による活性制御も確認できたため、本研究で SERCA2a/PLN レギュラトームについての研究に取り組むこととした。

### 2. 研究の目的

心筋細胞での  $Ca^{2+}$  制御機構を原子構造に基づいて理解するために、その中心にある SERCA2a/PLN レギュラトームについての研究に取り組んだ。SERCA2a は筋小胞体への  $Ca^{2+}$  の取り込みを担う  $Ca^{2+}$  ポンプであり、PLN(フォスフォランバン)はその直接的制御因子である。PLN は アドレナリンシグナルの最も重要な mediator であり、その燐酸化状態に依存した SERCA2a の制御を行う。近年 SERCA2a/PLN 系を制御する因子群が発見され、大規模な複合体(レギュラトーム)を形成することが判明した。一方、その生物学的・医学的重要性にも関わらず、SERCA2a/PLN の結晶構造解析には手の出しようがなかったが、我々の研究の進展の結果、十分実現可能なものとなった。そこで SERCA2a の結晶解析を手始めに、レギュラトーム全体の構造的研究を目指した。

### 3. 研究の方法

本研究の遂行には大型の高等動物膜蛋白質である SERCA1a, SERCA2a, PLN の大量の精製標品が必要とされた。そのために、我々の独自技術であるアデノウイルス/哺乳類培養細胞を用いた大量生産系を用いた。発現 SERCA の精製には、N 末端に融合した Halo-Tag を用いて行った。PLN に関しては当初 SERCA と PLN の 2 種類のウイルスを共感染させることによって SERCA2a/PLN 複合体を得ていたが、精製の際に両者が一部解離してしまうことが明らかになった。そこで、新たに PLN の N 末端にマルトース結合蛋白を融合し、大腸菌で大量に発現する系を確立した。精製は、アミロースレジンで精製後、逆相クロマトグラフィーで行った。また、活性測定のために、精製した SERCA と PLN とを *in vitro* でリポソームへ再構成する系の確立を行った。活性制御因子群の発現・精製には、当初大腸菌での発現を試みたが、最終的には Sf9/バキュロウイルス系により発現を行った。また、精製は各蛋白質の N 末端に融合させた Halo-Tag を用いて行った。

### 4. 研究成果

期間全体を通じ、SERCA2a/PLN レギュラトームの解析のため、SERCA2a/PLN 複合体を制御する因子群の大量発現系の構築、PLN 単体の発現系の構築、SERCA2a/PLN のリポソームへの *in vitro* 再構成、SERCA のナノディスクへの再構成、SERCA2a の結晶構造解析、に取り組んだ。

SERCA2a/PLN 複合体を制御する因子群の大量発現系の構築

制御因子群として、S100A, calreticulin, HRC, HAX1 の 4 因子群に焦点を絞り、その発現・精製系の構築に取り組んだ。S100A1 は N 末端に GST を融合することで大量発現に成功し、GST セファロースにより、精製にも成功した。Calreticulin, HRC, HAX1 に関しては、N 末端に Halo-Tag を融合し、当初大腸菌での発現を試みたが、ほとんど発現が見られなかった。最終的に Sf9/バキュロウイルス発現系を導入することで、大量発現に成功した。Halo-Tag レジンをを用いることで、精製にも成功した。4 因子群は、どれも 1 段階目の精製で、純度 90%程度での精製に成功したが、更なる精製を目指し、イオン交換クロマトグラフィー・ゲル濾過による精製を試みた。その結果、SDS-PAGE の CBB 染色でほぼシングルバンドとして得ることに成功し、結晶化が可能な段階に到達した。これら因子群に関しては精製度の向上を目指すと共に、結晶化にも取り組んでいるが、現時点では結晶を得るに至っていない。今後も引き続き結晶化を行い、最終的には構造決定を目指す予定である。

PLN 単体の発現系の構築

SERCA2a/PLN 複合体に関しては、当初 SERCA と PLN の 2 種類の変異アデノウイルスを哺乳類細胞に感染させることで得ていた。実際、本ウイルスに感染させた細胞からマイクロソーム画分を単離し、Ca<sup>2+</sup> 濃度依存的な ATPase 活性の測定を行ったところ、PLN の有無での活性に違いが見られた。だが、SERCA2a/PLN 複合体を精製のために Ca<sup>2+</sup> 存在下、界面活性剤により可溶化し、Halo-Tag レジンによる精製を行ったところ、精製の際に両者が一部解離してしまう問題が明らかになった。そこで、2 種類の変異アデノウイルスによる共発現系では本研究の遂行は困難であると判断し、PLN を単独で発現・精製する系を構築し、精製 SERCA と *in vitro* でリポソーム再構成する方針へと変更した。そこで PLN の発現系として、まず、N 末に Halo-Tag を融合し、変異アデノウイルス/哺乳類培養細胞による発現系を構築した。変異アデノウイルスを培養細胞へ感染、マイクロソーム画分を単離し、SDS-PAGE/CBB 染色で発現確認を行ったところ、メインバンドとして確認でき、1 L の培養あたり 0.5 mg 程度の発現蛋白を確認できた。だが、Halo-Tag による精製を行ったところ、レジンへの非特異的な吸着量が想定外に多く、その後の精製に困難を来すこと

が明らかになった。そこで次に N 末端にマルトース結合蛋白を融合し、大腸菌による発現を試みた。水溶性画分に発現したマルトース結合蛋白融合 PLN をアミロースレジンでの精製/マルトース結合蛋白の TEV プロテアーゼによる切断/逆相クロマトグラフィーによる精製により、1 L の培養液から 10 mg 強の精製標品を得ることに成功した。

SERCA2a/PLN のリポソームへの *in vitro* 再構成

精製 SERCA、PLN に PC を加え、バイオビーズで徐々に界面活性剤の除去を行い、脂質 2 重膜への再構成を行った。PLN を加えない場合でも同様に再構成を行い、Ca<sup>2+</sup> 濃度依存的な ATPase 活性の測定を行ったところ、PLN の有無で活性の違いを検出することができた。以上の結果から、SERCA2a/PLN のリポソームへの *in vitro* 再構成には成功したと考えられる。現在この再構成膜を用いてこれら制御因子が SERCA2a/PLN 系を制御する機構を解析中である。

SERCA のナノディスクへの再構成

SERCA2a/PLN のリポソームへの *in vitro* 再構成には成功したが、制御因子によっては、細胞質側から作用するものもあるし、小胞体内腔側から作用するものもある。その点、ナノディスクに組み込まれた SERCA2a/PLN 系は、制御分子が細胞質側と小胞体内腔側の両面からのアクセスが可能であり、制御機構の理解に好都合と考えられる。そこで精製 SERCA のナノディスクへの組み込みを検討した。精製 SERCA に PC と精製 MSP1D1 を加え、バイオビーズで徐々に界面活性剤の除去を行い、ナノディスクへの組み込みを行った。その後、ゲル濾過で SERCA が組み込まれたナノディスクのみを単離した。SERCA が組み込まれたナノディスクの ATPase 活性を測定したところ、native とほぼ同等の比活性を示した。以上のことから、SERCA のナノディスクへの再構成は成功したと考えられる。現在は SERCA/PLN 複合体をナノディスクへ組み込みを検討すると共に、それを用い、制御因子が SERCA2a/PLN 系を制御する機構を解析する予定である。

SERCA2a の結晶構造解析

高輝度放射光実験施設 SPring-8 でデータ収集を引き続き行っている最中である。既に幾つかの条件では構造決定に成功しており、現在構造精密化の最終段階である。結晶化条件の更なる改善を行うと共に、データ収集を続け、より高分解能のデータ取得を目指すと共に、早急に研究成果をまとめる予定である。また、SERCA/PLN 複合体に関しても、その結晶化に取り組む予定である。

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 6 件)

1. Murayama, T., Kurebayashi, N., Ogawa, H., Yamazawa, T., Oyamada, H., Suzuki, J., Kanemaru, K., Oguchi, K., Iino, M., Sakurai, T.,  
Genotype-Phenotype Correlations of Malignant Hyperthermia and Central Core Disease Mutations in the Central Region of the RYR1 Channel, *Human Mutation*, 37, 2016, 1231-1241, 10.1002/humu.23072 査読 有

2. Ogawa, H., Cornelius, F., Hirata, A., Toyoshima, C.  
Sequential substitution of K<sup>+</sup> bound to Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase visualized by X-ray crystallography, *Nat Commun.*, 6, 2015, 8004,10.1038/ncomms9004 査読 有

3. Habek, M., Haviv, H., Katz, A., Kapri-Pardes, E., Ayciries, S., Ogawa, H., Toyoshima, C., Karlisch, S.J., Stimulation, inhibition, or stabilization of Na,K-ATPase caused by specific lipid interactions at distinct sites, *J. Biol. Chem.* 290, 2015, 4829-4842. 10.1074/jbc.M114.611384 査読 有

4. Morita, M., Ogawa, H., Ohno, O., Yamori, T., Suenaga, K., Toyoshima, C. Biselyngbyasides, Cytotoxic Marine Macrolides, are Novel and Potent Inhibitors of the Ca<sup>2+</sup> Pumps with a Unique Mode of Binding., *FEBS Lett.*, 589, 2015, 1406-1411, 10.1016/j.febslet.2015.04.056 査読 有

5. Zhao, Y., Ogawa, H., Yonekura, S., Mitsuhashi, H., Mitsuhashi, S., Nishino, I., Toyoshima, C., Ishiura, S.  
Functional analysis of SERCA1b, a highly expressed SERCA1 variant in myotonic dystrophy type 1 muscle., *Biochim. Biophys. Acta.* 1852, 2015, 2042-2047 10.1016/j.bbadis.2015.07.006. 査読 有

6. 小川治夫, 金井隆太, 豊島近  
ナトリウムポンプ蛋白質がナトリウムを選択的に運搬する機構 - How the Na<sup>+</sup>-pump recognizes and transports Na<sup>+</sup> selectively. *医学のあゆみ*, 254, 2015, 1186-1187

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 小川治夫  
Recent advances in structural studies of SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase, 第94回日本生理学会 2017 3/28-30, 浜松アクロシティコンgresセンター (静岡県・浜松市)

2. Haruo Ogawa, Chikashi Toyoshima  
Large-scale production of mammalian membrane proteins toward determination of high resolution structures  
Biophysical Society 61<sup>st</sup> Annual Meeting 2017 2/11-15, New Orleans, Louisiana (USA)

3. 小川治夫, 樺島佳樹, 豊島近  
Ca<sup>2+</sup>-ポンプ構造研究の最前線, 日本生体エネルギー研究会 第 42 回討論会, 2016 12/19-21, 名古屋工業大学 4 号館ホール (愛知県・名古屋市)

4. 小川治夫, 村山尚, 呉林なごみ, 豊島近  
高分解能構造解析へ向けた哺乳類由来膜蛋白質の大量生産, 第89回 日本生化学会大会シンポジウム, 2016 9/25-27, 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス (宮城県・仙台市)

5. Haruo Ogawa, Flemming Cornelius, Ayami Hirata, Chikashi Toyoshima  
Kinetics by X-ray crystallography: sequential substitution of K<sup>+</sup> bound to Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, Biophysical Society 60th annual meeting, 2016 2/27-3/2 Los Angeles Convention center, Los Angeles, California (USA)

6. 小川治夫, 平田 絢美, Flemming Cornelius, 豊島近  
X線結晶構造解析によるキネティックス測定: Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseに結合したK<sup>+</sup>は段階的に置換される, 日本生体エネルギー研究会 第41回討論会, 2015 12/21-23, 東京大学医学部1号館 講堂 (東京都・文京区)

7. Haruo Ogawa, Flemming Cornelius, Ayami Hirata, Chikashi Toyoshima  
Kinetics by X-ray crystallography: sequential substitution of K<sup>+</sup> bound to Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase., BMB2015 (第38回日本分子生物学会 第88回日本生化学会合同大会) ワークショップ, 2015 12/1-4, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

8. Haruo Ogawa, Flemming Cornelius, Ayami Hirata, Chikashi Toyoshima  
Sequential substitution of bound K<sup>+</sup> in the transmembrane binding sites of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, kinetics by X-ray crystallography., 日本生物物理学会第53回年会シンポジウム, 2015 9/13-15 金沢大学 角間キャンパス 自然科学本館 (石川県・金沢市)

9. Haruo Ogawa, Yimeng Zhao, Ayami Hirata, Junko Tsueda, Shoichi Ishiura, Giuseppe Inesi, Chikashi Toyoshima, Large Production of SERCA toward determination

of three-dimensional structures,  
14th International Conference Na,K-ATPase  
and related transport ATPases: Structure,  
mechanism, cell biology, health and  
disease,  
2014 8/30-9/5, De Werelt Conference Centre,  
Lunteren (Netherlands)

10. Haruo Ogawa, Kanna Motoyama, Flemming  
Cornelius, Bente Vilsen, Chikashi  
Toyoshima, X-ray crystallographic study  
of Na,K-ATPase in complex with cardiotonic  
steroids, Biophysical Society 59th Annual  
meeting, 2015 2/7-11, Baltimore  
Convention Center, Baltimore, MD, (USA)

11. 森田真布, 小川治夫, 杖田淳子, 大野  
修, 矢守隆夫, 豊島近, 末永聖武,  
X-線結晶構造解析が明かすピセリングピア  
サイド類の Ca<sup>2+</sup>ポンプ阻害機構, 日本化学  
会第 95 春季年会, 2015 3/26-29, 日本大学理  
工学部船橋キャンパス/薬学部 (千葉県・船  
橋市)

12. 趙一夢, 小川治夫, 米倉慎一郎, 三橋  
弘明, 豊島近, 石浦章一, 筋強直性ジスト  
ロフィーの病態に関わる筋小胞体  
Ca<sup>2+</sup>-ATPase 1 スプライスバリエーションの機能  
的差異, 第 87 回日本生化学会, 2014  
10/15-18, 京都国際会館 (京都・京都市)

13. 小川治夫, 元山かん奈, Cornelius  
Flemming, Vilsen Bente, 豊島近,  
Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase と強心配糖体複合体の X 線結  
晶構造解析, 第 87 回日本生化学会,  
2014,10/15-18, 京都国際会館

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織  
(1) 研究代表者  
小川治夫 (OGAWA HARUO)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号 : 40292726

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者  
( )