

平成14年度採択分

平成19年11月20日現在

研究課題名 (和文) P型イオンポンプによる能動輸送機構の構造的解明

研究課題名 (英文) Structural basis of active ion transport by P-type pump

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:

P型イオンポンプを代表する筋小胞体カルシウム ATPase の反応中間体 (或いはそのアナログ) を結晶化し、X線結晶解析によって原子構造を決定する。原子構造に基づいて、イオンが濃度勾配に逆らって輸送される仕組みを、分子生物学的手法や分子動力学計算をも利用し、解明する。

研究分野/科研費の分科・細目/キーワード: 複合領域 / 基礎生物学・生物物理学 / 能動輸送、イオンポンプ、膜蛋白質、構造生物学、X線結晶解析、ATPase

### 1. 研究開始当初の背景

P型イオンポンプは、ATPの化学エネルギーを利用してイオンを濃度勾配に逆らって輸送し、生体のイオン環境を維持する極めて重要な膜蛋白質群である。その重要性から、同族のNa<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPaseの発見に対し1997年のノーベル化学賞が与えられたほどである。さらに、Ca<sup>2+</sup>ポンプは、Ca<sup>2+</sup>が生体中の信号伝達に最もよく使われるイオンであるため、がん・細胞死・心筋梗塞・皮膚病とも深くかかわっており、医学的にも極めて重要である。濃度勾配に逆らってイオンを輸送する機構を解明できれば、能動輸送という現代生物学の中心的課題の一つが解決されたことになる。しかも蛋白質の原子分解能での立体構造という確固たる基盤に基づいてである。従って、本研究が成功すればそのインパクトは巨大であると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的はP型イオンポンプのメカニズムを原子レベルでの構造に基づいて理解することである。それによってATPの化学エネルギーをイオンの輸送に変換する機構を明らかにできよう。また、リン酸化によって制御される蛋白質は数多いがその一つの形を明らかにする。研究の出発点は反応中間体のX線結晶解析であり、主な材料として筋小胞体Ca<sup>2+</sup>-ATPaseを用いる。さらに、分子動力学計算によって、結晶解析によって得られる離散的且つ静的な構造の間をつなぐことを究極的には目指す。

### 3. 研究の方法

第一の目標は筋小胞体Ca<sup>2+</sup>-ATPaseの反応中間体 (またはそのアナログ) すべてを結晶化し、X線結晶解析によって立体構造を決定することである。結晶化のために、反応中間体を安定化する方法を開発し、得られた構造がどのようなものかを生化学的に調べる。第二に、変異体の生化学的解析により、アミノ酸残基レベルでの理解を進めるとともに、変異体の構造解析に向けて、高等動物の培養細胞由来のCa<sup>2+</sup>-ATPaseの精製手法を確立する。第三に、得られた構造の意味や熱揺らぎとの関係を明らかにするため、また、X線結晶解析では可視化できないH<sup>+</sup>の位置を決定し、H<sup>+</sup>対抗輸送の意味を明らかにするために、分子動力学計算等を援用する。

### 4. 研究の主な成果

(1) 原子構造に基づくCa<sup>2+</sup>-ATPaseによるイオンのポンプ機構の解明: AMPPCPがATPの、BeF<sub>x</sub>、MgF<sub>4</sub><sup>2-</sup>、AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>がリン酸の良い類似物であることを見出し、結晶化に成功、X線結晶解析によって7つの状態の立体構造を2.6 Åより良い分解能で決定した。この結果、構造的には、反応サイクルは4つの基本状態からなることがわかった(図1)。構造変化は図に示すように、極めて大きくかつ複雑であり、逆反応が起こらないよう、随所に工夫が凝らされていた。Aドメインが膜内Ca<sup>2+</sup>通路のゲートの開閉を制御するスイッチのように機能しており、他の二つのドメインはATPの結合やリン酸化によって、Aドメインと

[ 4. 研究の主な成果 (続き) ]

の接触面を変え、それによって A ドメインの位置を制御していることがわかった。ゲートの開閉そのものには、ヘリックスの再配置という大きな運動が用いられていた。これは、熱エネルギーを有効に利用するためと考えられる。ATP はここでは、切断可能な架橋剤として働き、ATP がないと実現できないような構造を蛋白質が一時的にとるために使われている。構造変化は ADP や磷酸が離脱することによって起こっている。ATP の加水分解反応により放出されるエネルギーは逆反応を抑え、熱運動という確率的に揺らいでいるものから一定の方向への運動を生み出すために使われているらしいことが判明した。

(2) H<sup>+</sup> 対抗輸送の意味の解明: Ca<sup>2+</sup>-ATPase は Ca<sup>2+</sup> と逆方向に H<sup>+</sup> を輸送するが、筋小胞体膜は H<sup>+</sup> を通してしまうので一見無駄である。H<sup>+</sup> は X 線では可視化できないが、理論計算によって H<sup>+</sup> の位置を同定し、分子動力学計算によってその意義を明らかにした。

(3) 分子動力学計算による変異体の理解: 25 万以上の原子を含む大規模な分子動力学計算を安定して行えるシステムを構築し、まずは Ca<sup>2+</sup>-結合部位の変異体の理解と、心筋における調節蛋白質フォスホランバンの磷酸化の意義を明らかにした。

(4) 阻害剤の結合様式の解明: 膜貫通部位に結合する高親和性阻害剤の結合様式を明らかにし、薬剤開発への道を開いた。

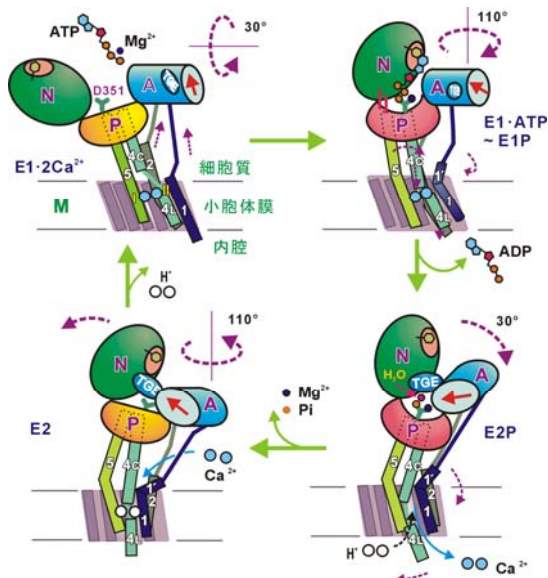


図 1. Ca<sup>2+</sup>-ATPase のイオン輸送に伴う構造変化の模式図。7 状態の結晶構造に基づく。I, II は Ca<sup>2+</sup> 結合部位、白抜き数字は膜貫通ヘリックス、TGE は A ドメインにある P 型 ATPase 共通配列を表す。D351 は磷酸化されるアスパラギン酸残基。論文 4 より改変

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

反応サイクル全体をカバーする多数の状態での原子構造を決定し、蛋白質がどのように構造を変化させて機能を果たしているかを示すことに成功した例は非常に少なく、膜蛋白質では他に例がない。しかも、示された構造変化は極めて大きく、大きな驚きを持って迎えられた。この結果は多方面に大きなインパクトを与え、*Nature* の News & Views で何度も紹介されたほか、既に国際標準の生化学や細胞生物学の教科書に紹介されている。

本研究による構造解析の結果をもとに、前立腺癌の治療のための薬剤の開発がされたり、抗マラリア薬との関連でも本研究は注目されることになった。

本研究の結果が評価され、豊島は米国科学アカデミーの外国人会員に選出され、米国生物物理学会の最高賞である National Lecturer をも務めることになった。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

- (1) **C. Toyoshima**, Y. Norimatsu, S. Iwasawa, T. Tsuda and H. Ogawa: How processing of aspartylphosphate is coupled to luminal gating of the ion pathway in the calcium pump. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **104**, 19831-19836 (2007)
- (2) M. Takahashi, Y. Kondou and **C. Toyoshima**: Interdomain communication in calcium pump as revealed in the crystal structures with transmembrane inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **104**, 5800-5805 (2007)
- (3) K. Obara, N. Miyashita, C. Xu, I. Toyoshima, Y. Sugita, G. Inesi and **C. Toyoshima**: Structural role of countertransport revealed in Ca<sup>2+</sup> pump crystal structure in the absence of Ca<sup>2+</sup>. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **102**, 14489-14496 (2005)
- (4) **C. Toyoshima**, H. Nomura and T. Tsuda: Luminal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature* **432**, 361-368 (2004)
- (5) **C. Toyoshima** and T. Mizutani: Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* **430**, 529-535 (2004)
- (6) **C. Toyoshima** and H. Nomura: Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* **418**, 605-611 (2002)

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo/StrBiol/>