

科学研究費補助金（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成19年度採択分

平成22年 3月31日現在

研究課題名（和文）イオン輸送体の構造生物学

研究課題名（英文）Structural biology of ion transporters

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：イオン能動輸送は、ATP の化学エネルギーを利用し、生命活動の基盤となる生体膜を隔てたイオンの濃度勾配を形成する、極めて重要な活動である。本研究は、Ca²⁺ポンプやNa⁺,K⁺ポンプを主な対象とし、そのメカニズムを X 線結晶解析による原子構造に基づいて完全に解明すること、そして輸送体蛋白質の「構造はどうしてそうでなければいけないか」を理解することを目標とする。

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

1. 研究開始当初の背景

我々は既に P 型（或いは E1/E2 型）イオン輸送 ATPase（イオンポンプ）を代表する筋小胞体 Ca²⁺-ATPase (SERCA1a) を対象に、その反応過程のほぼ全体をカバーする 6 つの状態の結晶構造を決定し、それに基づいて非常に大きな構造変化を伴う能動輸送のメカニズムの大略を明らかにした。また原子構造に基づく変異体の研究を米国 Inesi 博士グループと行い、個々の残基の役割を明らかにしてきた。さらに、分子動力学計算をも取り入れ「どうしてそういう構造でなければならないのか」という問いにもアプローチしてきた。しかし、まだまだ十分とは言えない。

2. 研究の目的

Ca²⁺-ATPase の結晶構造解析とそれに基づく能動輸送機構の理解を、残された中間体の構造解析に取り組み、他のポンプや変異体にも対象を広げることによって発展させることが第一の目標である。イオン輸送体は生体の恒常性の維持に極めて重要なものであるから、最終的には結核菌等の病原菌の膜輸送体の構造解析を行うことによって薬剤の開発へと結びつけたい。

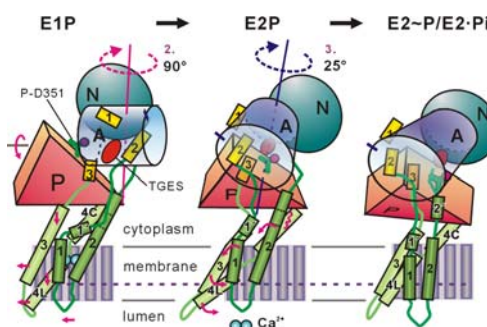
3. 研究の方法

本研究の柱は X 線結晶構造解析である。膜蛋白質であるイオン輸送体蛋白質を界面活性剤で可溶性化、精製し、結晶化する。材料としては、Ca²⁺-ATPase の場合ウサギ骨格筋筋小胞体であり、Na⁺,K⁺-ATPase の場合、鮫直腸線

である。変異体の解析に当たっては、高等動物培養細胞による発現系を用いる。最終的折データ収集は SPring-8 で行う。

4. これまでの成果

a) 筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の中間体の構造解析：内腔側ゲートが開いていると考えられる唯一の状態である E2P 基底状態（Ca²⁺非存在下のリン酸化状態）の理解を目指し、安定なアナログである E2·BeF_x 複合体の構造を、強力阻害剤 thapsigargin (TG) 存在下では 2.4 Å、非存在下では 3.8 Å 分解能で決定した。TG の結合によってゲートは閉じてしまうがリン酸化部位付近の構造は変わらない。従って、この状態ではゲートは開閉両方の状態を取り得、リン酸化部位付近の詳細な構造情報は TG 有りの構造から、ゲートの開閉機構は TG 無しの構造から理解できると考えられた。下図に示すように、M1/M2 ヘリックスで形成される V 字型構造の高さを A ドメインの回転が制御することがゲートの開閉の本質であること、A ドメインの 115° の回転途中（E2P →



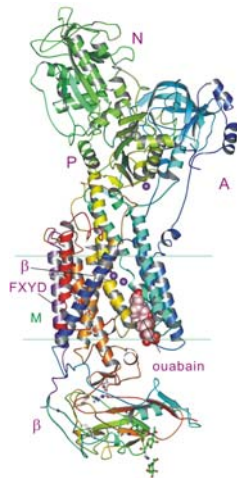
[4. これまでの成果 (続き)]

E2·Pi) で、M2 ヘリックスの細胞質側の一部分がほどけスイッチの役割を果たすことが明らかになった。一方、A ドメインの位置を制御しているものはリン酸化アスパラギン酸を攻撃する一分子の水であり、A ドメイン TGES ループ中の E183 がこの水を活性化する結果、反応が進み、ゲートが閉じた状態が安定化されるのである。すなわち、内腔側ゲートの開閉という構造変化とリン酸化アスパラギン酸の加水分解という化学反応を結びつけることに成功した。また、P ドメインが楔形をしていることの意義、A ドメイン- M1 ループの長さの重要性なども明らかになり、研究は飛躍的に前進した (論文 7)。

(b) Na⁺, K⁺-ATPase の構造解析: デンマーク Cornelius 博士との共同研究により 2.4 Å 分解能で、ほぼ全構造の決定に成功した。β サブユニットと FXYD 蛋白質のモデリングにも初めて成功し、FXYD モチーフの構造的意味もわかった。また、ほとんど同じ残基が関与するにもかかわらず、Ca²⁺-ATPase では H⁺ しか対向輸送できないのに対し、Na⁺, K⁺-ATPase では一価の陽イオンなら何でもよいのは、M5 ヘリックス中の Pro 残基と β サブユニットの寄与が本質的であること、コレステロールが関与することも明らかになった。この結果を *Nature* 誌上に発表した (論文 3)。

また、強心配糖体として有名な ouabain の結合部位を明らかにすることにも成功した。これまでの多くの予想に反して、ouabain は膜内に深く挿入されており、ラクトン部分が膜貫通ヘリックスの一部分をほどくことも判明した (右図。論文 1)。医学的にも重要な貢献ができたと考える。

(e) 重金属ポンプの構造解析: 古細菌由来 CopA の PN ドメインを大腸菌で発現させ、AMPPCP, ADP などの複合体の構造を 1.85 Å 分解能で決定した。また、重金属ポンプで絶対的に保存され Wilson 病で変異が見られる H479Q 複合体の構造も 1.95 Å 分解能で決定した。この結果、His 残基の ATP 結合における役割が明らかになり、Gln に変異させた場合には Gln の側鎖が His のイミダゾール環を模倣する結果、ATP の結合が維持されること、N ドメインに見られる Gly は P ループとは異なり、β 燐酸の結合には関与しないこともわかった。さらに、P 型 ATPase 共通と考えられる、リン酸化時に ATP から Mg²⁺ をはずす機構のモデルを提唱できた (論文 2)。



5. 今後の計画

Ca²⁺-ATPase に関しては、残された E1 状態の構造解析を完成させることが当面の目標である。これによって、Ca²⁺-ATPase によるイオンポンプ機構のほぼ完全な構造的描像が得られる。変異体の構造決定も視野に入ってきている。Na⁺, K⁺-ATPase に関しては、強心配糖体が高親和性で結合した複合体 (E2·BeF_x·ouabain) と E2·2K⁺ 状態の構造解析が当面の目標である。また、X 線溶媒コントロール変調法による脂質二重膜の可視化の研究を完成させ、発表する。

高等動物発現系が稼動しだしたので、研究対象は大幅に拡大することが期待される。マラリアの Ca²⁺-ATPase であり、抗マラリア薬である artemisinin の標的とされる PfATP6 と薬剤の複合体の構造決定を目指す。結核菌のイオン輸送体に関しては、まだ発現系から開発が必要である。

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) H. Ogawa, T. Shinoda, F. Cornelius and C. Toyoshima: Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺, K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 106, 13742-13747 (2009)

(2) T. Tsuda and C. Toyoshima: Nucleotide recognition by CopA, a Cu⁺-transporting P-type ATPase. *EMBO J.* 28, 1782-1791 (2009)

(3) T. Shinoda, H. Ogawa, F. Cornelius and C. Toyoshima: Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* 459, 446-450 (2009)

(4) C. Toyoshima: How Ca²⁺-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 1793, 941-946 (2009)

(5) C. Toyoshima: Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 3-11 (2008)

(6) Y. Hatori, A. Hirata, C. Toyoshima, D. Lewis, R. Pilankatta, and G. Inesi: Intermediate phosphorylation reactions in the mechanism of ATP utilization by the copper ATPase (CopA) of *Thermotoga maritima*. *J. Biol. Chem.* 283, 22541-22549 (2008).

(7) C. Toyoshima, Y. Norimatsu, S. Iwasawa, T. Tsuda and H. Ogawa: How processing of aspartylphosphate is coupled to lumenal gating of the ion pathway in the calcium pump. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 104, 19831-19836 (2007)

朝日賞(2009)

ホームページ等

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