

**平成28年度科学研究費助成事業（特別推進研究）自己評価書**  
〔追跡評価用〕

平成28年 4月21日現在

<b>研究代表者 氏名</b>	豊島 近	<b>所属研究機関・ 部局・職 (研究期間終了時)</b>	東京大学・分子細胞生物学研究所・ 教授
<b>研究課題名</b>	イオン輸送体の構造生物学		
<b>課 題番号</b>	19002013		
<b>研 究組織 (研究期間終了時)</b>	研究代表者 豊島 近（東京大学・分子細胞生物学研究所・教授） 研究分担者 小川 治夫（東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授）		

**【補助金交付額】**

年度	直接経費
平成19年度	89,200 千円
平成20年度	98,410 千円
平成21年度	89,500 千円
平成22年度	96,700 千円
総 計	373,810 千円



## 1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(2) 論文発表、国際会議等への招待講演における発表など（研究の発展過程でなされた研究成果の発表状況を記述してください。）

論文発表

平成 23 年度 3 報 *Biochem. Biophys. Res. Commun., J. Biol. Chem., Structure*  
 平成 24 年度 3 報 *Nature, J. Biol. Chem., The Encyclopedia of Biological Chemistry*  
 平成 25 年度 4 報 *Nature, J. Biol. Chem., Curr. Opin. Struct. Biol., Encyclopedia of Metalloproteins*  
 平成 26 年度 5 報 *Cell reports, Open Biol., Bioorg. Med. Chem., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, J. Biol. Chem.*  
 平成 27 年度 5 報 *Nature Commun., FEBS Letters, Biochim. Biophys. Acta.* (3 報),

招待講演

平成23年度 4件  
 C. Toyoshima, Y. Norimatsu: “Do lipid bilayers follow movements of transmembrane helices? If so, to what extent?” The EMBO Meeting 2011, Sep. 12, 2011, Vienna Austria 他  
 平成24年度 2件  
 C. Toyoshima: “Structural study on the calcium ATPase: ion pumping mechanism and its regulation” The 1st NRPB International Symposium and Workshop for Membrane Proteins: From Structure to Drug Discovery, Jun. 4, 2012, Taipei, Taiwan 他  
 平成25年度 1件  
 C. Toyoshima: “Structural understanding of ion pumping by P-type ATPases” Benzon Symposium No.59, Structure, Function and Dynamics, Aug. 19-22, 2013, Copenhagen, Denmark  
 平成26年度 3件  
 C. Toyoshima: “New crystal structures of Ca<sup>2+</sup>-ATPase(SERCA) and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPases” Barcelona BioMed Conference, Transporters and Other Molecular Machines, Nov.18, 2014, Barcelona, Spain 他  
 平成27年度 2件  
 C. Toyoshima: “Structural biology of P-type ion translocating ATPase: towards complete understanding of the mechanism” Aminoff Prize Symposium 2016, Mar 30, 2016, Gothenburg, Sweden 他

受賞

平成 22 年 2009 年度 朝日賞：カルシウムポンプ作動機構の解明（朝日新聞社）  
 平成 23 年 第 11 回山崎貞一賞：燐脂質を利用した膜蛋白質の結晶化技術の開発とカルシウムポンプ作動機構の解明（材料科学財団）  
 平成 27 年 紫綬褒章：構造生物学研究功績（日本国）  
 平成 28 年 上原賞：イオンポンプによる能動輸送機構の原子構造による解明（大正製薬）  
 平成 28 年 Gregori Aminoff Prize2016: “for their fundamental contributions to understanding the structural basis for ATP-driven translocation of ions across membranes”（The Royal Swedish Academy of Sciences）

## 1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

## (3) 研究費の取得状況（研究代表者として取得したもののみ）

特別推進研究「薬剤開発を視野に入れた膜輸送体の構造研究」（平成 23 年度 - 27 年度 総額 399,600,000 円）

戦略的国際科学技術協力推進事業「心臓収縮機能の制御」（平成 21 年度 - 24 年度 総額 13,205,000 円）

## (4) 特別推進研究の研究成果を背景に生み出された新たな発見・知見

(1)に述べたように、本研究で追求した課題はそれぞれ大きな発展を見せ、豊島を代表者とする特別推進研究「薬剤開発を視野に入れた膜輸送体の構造研究」（平成 23-27 年度）に引き継がれた結果、多くの新しい知見をもたらした。

技術的側面からは、(b)の高等動物大型膜蛋白質大量発現系の開発の寄与が大きい。本研究での予備的結果を発展させ、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase のような高等動物大型膜蛋白質でも培養液 1 L あたり精製標品 1 mg を十分越える量が得られる大量生産系を確立できた。その結果、SERCA1a の野生型のみならず変異体の大量生産、結晶化にも成功した (*Nature* 2013)。この技術は世界に誇りえるものである。実際、この技術を利用した変異体の構造解析から、プロトン化カルボキシル基をアミド基に置換するという僅かな変異が非常に大きな構造変化を起こしえることがわかった。このことは、ポンプ蛋白質にはそのような僅かな差を検出できる機構が備わっていることを示しており、E2→E1 遷移における脱プロトン化の役割に関しても本質的に新しい知見が得られた。

また、結晶性の改善のためには脱水和法が膜蛋白質結晶でも有効であることを(c)  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の結晶構造解析で初めて示したが、その後の構造研究で重要な手段となった。

概念として新しいものとしては、蛋白質内で力を伝えるために「ループを引っ張る」とこと「脂質二重膜の積極的利用」が挙げられる。ともに、(1)で述べたように、E1P→E2P→E2·Pi への構造変化で認識されたことであるが、前者はフレキシブルなループを引っ張ることは一方向にのみ力を伝え、逆反応を抑える（フレキシブルなループを押しても摩擦が大きいために動かない）ために有効であること、その結果、本来方向性のない熱エネルギーを一方向への運動に有効に利用することが可能になることを示すものである。蛋白質も thermal ratchet として機能するという考えが提唱されているが、そのような考えを支持し、蛋白質の機能発現の一般則につながる重要な知見であると考えられる。後者は、単なる領域を区切るものとしか認識されてこなかった脂質二重膜が、実は、能動輸送にあっては構造変化を実現（伝達）するために重要な役割を果たしているというまったく新しい知見である。本研究に続く特別推進研究「薬剤開発を視野に入れた膜輸送体の構造研究」において、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の 4 つの異なった状態での結晶中に存在する脂質二重膜を可視化することによって確認することができた。

## 2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況

特別推進研究の研究成果が他の研究者に活用された状況について、次の(1)、(2)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

### (1) 学界への貢献の状況（学術研究へのインパクト及び関連領域のその後の動向、関連領域への関わり等）

蛋白質の原子構造は、圧倒的な量の情報をもたらすので、多大な波及効果がある。特に、本研究で対象としたものは高等動物の重要な大型膜蛋白質であり、多くの疾病にかかわり、創薬のターゲットとなるものでもある。その原子モデルの提供は研究の進め方、結果の解釈を大きく変えることになる。

$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase が生み出す  $\text{Na}^+$  の濃度勾配は多くの二次輸送体の駆動力となるため、 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase は高血圧や心臓病、癌などとも深く関わっている。最近になって、 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase は多くの神経疾患にも深く関わることが知られるようになり、我々が本研究とその後の研究で提出した原子モデルに基づいて議論されるようになった。また、 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase は単なるイオンポンプではなく、信号伝達にも重要な役割を果たすとされ、本研究でその結合様式を解明したウアバインの類似物が生体内での制御の鍵となるらしい。本研究で解明された結合様式 (PNAS 2009) はそれまでに広く受け入れられていた考えを完全に否定するものであり、且つ変異体のデータをよく説明するものであった。そのため、大きな興奮を持って迎えられるとともに、新たな系統的研究を刺激した。強心配糖体のいくつかは既に臨床実験段階にあるが、現在、代表者の研究室でほぼ完成した多数の強心配糖体との複合体の高分解能構造決定は、これまでの大きな問題点であった組織特異性の欠如を解決するための重要な情報を提供するものと期待できる。

また、本研究による  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の結晶解析の結果は、発表時期の点では競争相手のデンマークグループに先行を許したものの、分解能や精度の点では明らかに大きく勝っており、新しい共同研究を生むことになった。その結果が、2013年の  $\text{Na}^+$  結合時の構造の決定につながった。また、燐脂質や強心配糖体との相互作用の点でもイスラエルグループと共同研究を開始することとなった。さらに、提出した原子モデルは多くの変異体の性質を良く説明するものであり、 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の原子構造に基づく研究は国際的に大きく活性化されることとなった。

$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase に関しては、ここまで多くの反応中間体の構造が決定された蛋白質は、水溶性蛋白質を含めてもきわめて数少なく、しかも  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の反応サイクルは非常に大きな構造変化を伴うので、計算機によるシミュレーションや、蛋白質内運動の予測等、多くの物理的・化学的研究を刺激した。長時間の分子動力学シミュレーションが数多く成されたが、その結果は一致せず、結晶構造からも外れるため、手法の問題点を指摘することにもなった。また、これだけの数の中間体を決定できることを示したことは、構造研究のやり方を変革したとも言え、幾つかの膜輸送体を含む蛋白質で中間体を網羅的に決定しようという試みが成されるようになった。その点で、本研究は蛋白質の構造研究が目指すべき一つの方向を指し示したとも言えよう。

一方で、本研究の大きな成功から、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase は膜蛋白質の新たな結晶化技術や解析技術をテストするためのモデルシステムとも成った。一方、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase や  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の結晶化は外部から燐脂質を添加することによって行なわれており、これは、膜蛋白質の結晶化法のスタンダードを大きく変えることとなった。また、膜の構成成分である燐脂質やコレステロールが幾つか解像されたことで、脂質膜と蛋白質の相互作用を再検討しようという機運も盛り上がった。

## 2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況(続き)

(2) 論文引用状況(上位10報程度を記述してください。)

## 【研究期間中に発表した論文】

No	論文名・著者名・発行年・ページ数等	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution: T. Shinoda, H. Ogawa, F. Cornelius and C. Toyoshima (2009) <i>Nature</i> 459, 446-450	Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase の初の高分解能結晶構造。αサブユニットに加え、βサブユニットのほぼ全体と調節蛋白質 FXYP の原子モデルをも提供することに成功。また、何故 Ca <sup>2+</sup> -ATPase は K <sup>+</sup> を対向輸送できないかを解明した。	296
2	Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase) with bound potassium and ouabain: H. Ogawa, T. Shinoda, F. Cornelius and C. Toyoshima (2009) <i>Proc. Nat. Acad. Sci. USA</i> 106, 13742-13747	Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase とウアバインの複合体の初の結晶構造。ウアバインに代表される強心配糖体は膜貫通領域に深く挿入されることを示し、細胞外側領域表面に結合するという通説は誤っていることを証明した。	144
3	Structural aspects of ion pumping by Ca <sup>2+</sup> -ATPase of sarcoplasmic reticulum: C. Toyoshima (2008) <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> 476, 3-11	Ca <sup>2+</sup> -ATPase がイオンを能動輸送する機構の全体を原子モデルに基づいて詳細に説明した総説。	109
4	How Ca <sup>2+</sup> -ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane: C. Toyoshima (2009) <i>Biochem. Biophys. Acta</i> 1793, 941-946	Ca <sup>2+</sup> -ATPase によるイオン輸送の過程を、蛋白質立体構造の遷移に基づいて概説し、なぜ構造はそのようであればならないかを説明した総説。	85
5	Interdomain communication in calcium pump as revealed in the crystal structures with transmembrane inhibitors: M. Takahashi, Y. Kondou and C. Toyoshima (2007) <i>Proc. Nat. Acad. Sci. USA</i> . 104, 5800-5805	結合部位の異なる複数の阻害剤を単独あるいは組み合わせて Ca <sup>2+</sup> -ATPase の結晶構造を解析し、膜貫通部位と細胞質ドメイン間の構造的な連携を検討した。	80
6	How processing of aspartylphosphate is coupled to lumenal gating of the ion pathway in the calcium pump: C. Toyoshima, Y. Norimatsu, S. Iwasawa, T. Tsuda and H. Ogawa (2007) <i>Proc. Nat. Acad. Sci. USA</i> . 104, 19831-19836	BeF <sub>3</sub> <sup>-</sup> を燐酸アナログとして得られた Ca <sup>2+</sup> -ATPase 結晶の E2P 状態の解析により、内腔側ゲートの開閉機構と燐酸化 Asp の加水分解反応の連関を解明した。	71
7	Conformational fluctuations of the Ca <sup>2+</sup> -ATPase in the native membrane environment-Effects of pH, temperature, catalytic substrates, and thapsigargin: G. Inesi, D. Lewis, C. Toyoshima, A. Hirata and L. de Meis (2008) <i>J. Biol. Chem.</i> 283, 1189-1196	pH、温度、酵素反応基質、阻害剤が Ca <sup>2+</sup> -ATPase の構造変化に与える影響を、天然の膜環境下での蛋白質限定分解により系統的に解析した。	35
8	Domain organization and movements in heavy metal ion pumps: Papain digestion of CopA, a Cu <sup>+</sup> -transporting ATPase: Y. Hatori, E. Majima, T. Tsuda and C. Toyoshima (2007) <i>J. Biol. Chem.</i> 282, 25213-25221	Cu <sup>2+</sup> ポンプである CopA について、パパインを用いた蛋白質限定分解実験により Ca <sup>2+</sup> -ATPase の構造変化との類似性を明らかにした	30
9	Trinitrophenyl derivatives bind differently from parent adenine nucleotides to Ca <sup>2+</sup> -ATPase in the absence of Ca <sup>2+</sup> : C. Toyoshima, S. Yonekura, J. Tsueda and S. Iwasawa (2011) <i>Proc. Nat. Acad. Sci. USA</i> . 108, 1833-1838	アデニンヌクレオチドのトリニトロ化合物は Ca <sup>2+</sup> -ATPase の ATP 結合部位のレポーターとして使われるが、複合体の結晶構造を決定し、Ca <sup>2+</sup> -ATPase に対して元の ATP 等とは異なった様式で結合することを明らかにした。	29
10	Interaction sites among phospholamban, sarcolipin, and the sarco(endoplasmic reticulum) Ca <sup>2+</sup> -ATPase: T. Morita, D. Hussain, M. Asahi, T. Tsuda, K. Kurzydowski, C. Toyoshima, D. H. MacLennan (2008) <i>Biochem. Biophys. Res. Comm.</i> 369, 188-194	Ca <sup>2+</sup> -ATPase の調節蛋白質であるホスホランバンとサルコリピンについて、Ca <sup>2+</sup> -ATPase との結合サイトは両者が同時に存在する時と単独で存在する時でどう違うかを明らかにした。	25

## 【研究期間終了後に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	Crystal structures of the calcium pump and sarcolipin in the Mg <sup>2+</sup> -bound E1 state. C. Toyoshima, S. Iwasawa, H. Ogawa, A. Hirata, J. Tsueda and G. Inesi (2013) <i>Nature</i> <b>495</b> , 260-264	待望されていた、Ca <sup>2+</sup> 結合前の E1 状態の結晶構造。Mg <sup>2+</sup> 1 個が Ca <sup>2+</sup> サイトに結合しており、調節蛋白質サルコリピンの有無による結晶構造の違いから、サルコリピンの結合様式と生理的調節機構を明らかにした。	63
2	Crystal structure of a Na <sup>+</sup> -bound Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase preceding the E1P state. R. Kanai, H. Ogawa, B. Vilsen, F. Cornelius and C. Toyoshima (2013) <i>Nature</i> <b>502</b> , 201-206	待ち望まれていた Na <sup>+</sup> イオンを結合した Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase の初の結晶構造。これによって、Na <sup>+</sup> を厳密に選択する精緻なメカニズムが明らかになった。	57
3	First crystal structures of Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase: New light on the oldest ion pump. C. Toyoshima, R. Kanai and F. Cornelius(2011) <i>Structure</i> <b>19</b> , 1732-1738	2009 年に発表した 2 つの結晶構造を基に、Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase の酵素反応サイクルを原子モデルに基づいて説明した総説。	27
4	A structural view on the functional importance of the sugar moiety and steroid hydroxyls of cardiotonic steroids in binding to Na,K-ATPase. F. Cornelius, R. Kanai, and C. Toyoshima (2013) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>288</b> , 6602-6616	糖鎖部分とステロイド環の水酸基が強心配糖体の Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase に対する結合活性に深く関わることを示した。	16
5	Metal fluoride complexes of Na, K-ATPase. F. Cornelius, Y.A. Mahmmoud and C. Toyoshima (2011) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>286</b> , 29882-29892	Ca <sup>2+</sup> -ATPase で非常に有効であった金属 - フッ素複合体が Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase でも有効であるかを、消化酵素による限定分解と速度論的解析により検討した。	16
6	New crystal structures of PII-type ATPases: excitement continues. C. Toyoshima, F. Cornelius (2013) <i>Curr. Opin. Struct. Biol.</i> <b>23</b> , 507-514	2013 年に発表した Ca <sup>2+</sup> -ATPase の E1·Mg <sup>2+</sup> 状態と 2011 年発表の TNPAxP との複合体の構造を中心に、Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase や H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase の構造研究をも含め、最近の進歩を解説した。	12
7	Neutral phospholipids stimulate Na,K-ATPase activity: a specific lipid-protein interaction . H. Haviv, M. Habeck, R. Kanai, C. Toyoshima, and S.J.D. Karlsh (2013) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>288</b> , 10073-10081	Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase について、サブユニットの組合せが異なる複合体を作製し、ATPase 活性に影響を与える燐脂質が膜貫通領域のどこに結合するかを検討した。	11
8	Electron crystallography of ultrathin 3D protein crystals: Atomic models with charges. K. Yonekura, K. Kato, M. Ogasawara, M. Tomita and C. Toyoshima (2015) <i>Proc. Nat. Acad. Sci. USA.</i> <b>112</b> , 3368-3373	X 線では解析できない超薄三次元結晶について、電子線回折データ収集の方法を開発し、Coulomb potential map を得ることにより酸性残基の荷電状態を明らかにできることを示した。	3
9	General and specific lipid-protein interactions in Na,K-ATPase. F. Cornelius, M. Habeck, R. Kanai, C. Toyoshima and S.J.D. Karlsh (2015) <i>Biochim. Biophys. Acta.</i> <b>1848</b> , 1729-1743	これまでに蓄積されてきた膜蛋白質 - 脂質相互作用に関する情報を Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase を中心にまとめた総説。	3
10	Biselyngbyasides, cytotoxic marine macrolides, are novel and potent inhibitors of the Ca <sup>2+</sup> pumps with a unique mode of binding. M. Morita, H. Ogawa, O. Ohno, T. Yamori, K. Suenaga, C. Toyoshima (2015) <i>FEBS Letters</i> , <b>589</b> , 1406-1411	海洋性シアノバクテリア由来のマクロライド Byselyngbyaside が Ca <sup>2+</sup> -ATPase の活性を阻害することを明らかにし、複合体の結晶構造を決定した。この結果、阻害剤の新しい結合様式が明らかになった。	1

### 3. その他、効果・効用等の評価に関する情報

次の(1)、(2)の項目ごとに、該当する内容について具体的かつ明確に記述してください。

#### (1) 研究成果の社会への還元状況（社会への還元の程度、内容、実用化の有無は問いません。）

- ・ 朝日賞スーパートーク 2010年4月17日
- ・ 大型放射光施設 SPring-8 記者セミナー  
豊島 近、「放射光が解き明かすナノ機械の精緻なしくみ—生体反応の基礎を作るカルシウムポンプの作動機構の解明—」千代田区、2010年11月4日
- ・ 日本加速器学会主催 市民公開講座放射光学会  
豊島 近、「カルシウムポンプタンパク質ってどんなもの」、姫路市、2010年8月4日
- ・ Spring-8の一般向けインタビュー 2011年8月24日  
<https://www.youtube.com/watch?v=0DZYtucZrww>
- ・ 第219回生命科学フォーラム  
豊島 近、「蛋白質を理解するということ」—生命活動の基盤となるイオンポンプの精妙さに驚く—  
日本記者クラブ、2016年3月24日

などの一般向け講演や

- ・ 日本放射光学会編「放射光が解き明かす驚異のナノ世界 魔法の光が拓く物質世界の可能性」  
講談社ブルーバックス 2011年9月20日  
[分担執筆]豊島 近、第2章-7「筋肉を動かすために日夜働き続けるポンプの仕組みとは？」

などの一般向け書籍によって、研究成果の普及に努めている。また、本研究で開発された大量生産系を用い、心不全に対する薬剤の開発を目指し、心筋のカルシウムポンプである SERCA2a と調節蛋白質 phospholamban の複合体の活性化剤を検討する研究を製薬会社と1年間行った。さらに、本研究で開始したマラリア原虫のイオンポンプの構造研究を目指した大量生産系の開発は継続して行なっている。結核菌のイオンポンプに関しても同様である。



**3. その他、効果・効用等の評価に関する情報（続き）****(2) 研究計画に関与した若手研究者の成長の状況（助教やポスドク等の研究終了後の動向を記述してください。）**

東京大学 分子細胞生物学研究所 講師 → 現在 理化学研究所 主任研究員

東京大学 分子細胞生物学研究所 助教 → 現在 青森大学 薬学部 准教授

東京大学 分子細胞生物学研究所 博士研究員 → 現在 近畿大学 生物理工学部 准教授

東京大学 理学系研究科 博士後期課程学生 → 現在 安田女子大学 薬学部 助教

東京大学 分子細胞生物学研究所 助教 → 現在 岡山大学 理学部 助教

東京大学 農学系研究科 博士後期課程学生 → 現在 理化学研究所 研究員

東京大学 理学系研究科博士後期課程学生 → 現在 東京大学 分子細胞生物学研究所 研究員

東京大学 理学系研究科博士後期課程学生 → 現在 製薬会社 研究員