

Ca²⁺ ポンプの分子作動機構：部位特異的変異及びリン酸化中間体アナログの開発と構造解析による理解

鈴木 裕,* 山崎和生, 大保貴嗣, Stefania DANKO

Mechanism of Ca²⁺ Pump as Revealed by Mutations, Development of Stable Analogs of Phosphorylated Intermediates, and Their Structural Analyses

Hiroshi SUZUKI,* Kazuo YAMASAKI, Takashi DAIHO, and Stefania DANKO
Department of Biochemistry, Asahikawa Medical College, 2-1-1 Midorigaoka-higashi, Asahikawa, Hokkaido 078-8510, Japan

(Received September 1, 2009)

Sarco (endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase is a representative member of P-type cation transporting ATPases and catalyzes Ca²⁺ transport coupled with ATP hydrolysis. The ATPase possesses three cytoplasmic domains (N, P, and A) and ten transmembrane helices (M1–M10). Ca²⁺ binding at the transport sites in the transmembrane domain activates the ATPase and then the catalytic aspartate is auto-phosphorylated to form the phosphorylated intermediate (EP). Structural and functional studies have shown that, during the isomerization of EP in the Ca²⁺ transport cycle, large motions of the three cytoplasmic domains take place, which then rearranges the transmembrane helices thereby destroying the Ca²⁺ binding sites, opening the luminal gate, and thus releasing the Ca²⁺ into lumen. Stable structural analogues for the Ca²⁺-occluded and -released states of phosphorylated intermediates and for the transition and product states of the phosphorylation and dephosphorylation reactions were developed for biochemical and atomic-level structural studies to reveal the coupled changes in the catalytic and transport sites. Mutation studies identified the residues and structural regions essential for the structural changes and Ca²⁺ transport function. Genetic dysfunction of Ca²⁺-ATPase causes various isoform-specific diseases. In this manuscript, recent understanding of the Ca-ATPase will be reviewed.

Key words—sarco (endo)plasmic reticulum ATPase (SERCA); Ca²⁺-ATPase; Ca²⁺-pump; P-type ATPase

1. はじめに

膜タンパクである Ca²⁺ ポンプ, Na⁺, K⁺ ポンプ, H⁺, K⁺ ポンプ, Cu ポンプ, Ca²⁺, Mn²⁺ ポンプは共通の ATP 分解反応機構でそれぞれの特異的カチオンを能動輸送する。その過程で自己リン酸化中間体 (auto-Phosphorylated intermediate) を形成するので P-type ATPase と呼ばれている。このカチオン輸送 ATPase ファミリーの代表的メンバーである Ca²⁺ ポンプすなわち Ca-ATPase は形質膜と小胞体膜に存在し, ATP の加水分解に共役して, Ca²⁺ を数千倍の濃度勾配に逆らい細胞外あるいは小胞内腔にくみ上げる。¹⁻⁸⁾ それぞれ 4 つ (形質膜) 及び 3

つ (小胞体) の異なる (しかし保存性の高い) 遺伝子によりコードされ, さらに組織及び発達段階依存的に複数のアイソフォームを形成する。⁶⁾ 他の Ca²⁺ 排出系 (例えば Na⁺, Ca²⁺ 交換輸送系) に比べて, Ca-ATPase は輸送する Ca²⁺ に対する親和性が顕著に高く, したがって細胞休止時の低い細胞質 Ca²⁺ 濃度を厳密に設定する。小胞体 Ca-ATPase はまた, Ca²⁺ シグナル形成のための Ca²⁺ ストアとしての小胞体機能や小胞体内腔で起こる様々な Ca²⁺ 依存性プロセスを可能にする。1962 年, 江橋とリップマンにより筋弛緩因子として機能する筋小胞体 Ca²⁺ ポンプが発見されて以来, 普遍的な細胞内プロセス制御因子としての“カルシウム説”が発展した。⁹⁾ 最近, 豊島らにより解かれた原子レベルの筋小胞体 Ca-ATPase 立体構造¹⁰⁻¹⁵⁾ とこれまでに蓄積してきた酵素学的情報とに基づき, ポンプ作動機構の理解が急速に深まり, これにより Ca-ATPase の

旭川医科大学医学部生化学講座 (〒078-8510 北海道旭川市緑が丘東 2-1-1)

*e-mail: hisuzuki@asahikawa-med.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第 129 年会シンポジウム S27 で発表したものを中心に記述したものである。

みならず P-type ATPase ファミリーが担う細胞イオンホメオスタシス制御の分子機序の理解が進んでいる。¹⁰⁻¹⁶⁾ 他方、細胞の生存と機能に必須である Ca-ATPase の遺伝子異常は、発がん、糖尿病、高血圧、皮膚異常角化(細胞分化異常)、筋弛緩障害、神経細胞異常など様々の重篤な病態と密接に関連することも明らかになり、発症機序解のための分子基盤確立が進んでいる。

Ca-ATPase は、ATP の γ -リン酸を特異的 Asp 残基 (Asp351) に転移して自己リン酸化反応中間体を形成する。ポンプは 10 回膜貫通タンパクで、大きな細胞質領域は 3 つのドメイン (N, P, A) を形成する (Fig. 1)。ATP アデノシン部分の結合ポケットは N ドメインに、自己リン酸化部位 (Asp351) は P ドメインに存在し、輸送される Ca^{2+} の結合部位は膜貫通ヘリックス M4, M5, M6, M8 上の残基から形成される。他の P-type ATPase メンバーも、ATP 分解とそれに共役したカチオン輸送を可能にする必須の残基と共通のドメイン構造を保持し、共通の機構でそれぞれの特異的カチオンを輸送する。カチオンの選択性はカチオン配位子の構成と配置における極わずかな違いに起因する。²⁻⁴⁾ 50 Å も離れた触媒 (ATP 分解) 部位とカチオン結合部位の間

でのエネルギー共役は構造変化を介した相互応答によると考えられているが、その実態を明らかにすることが膜を介した P-type ATPase によるカチオン輸送機構を理解するための本質的テーマである。

われわれは筋小胞体 Ca-ATPase について、細胞質 3 ドメインが Ca^{2+} 輸送過程で 4 種の顕著に異なる集合状態を変化すること、そして自己リン酸化中間体の異性化における A ドメインの 90° 以上にも及ぶ回転と P ドメインへの強い結合が内腔への Ca^{2+} 放出に必要な輸送部位の構造変化を引き起こすこと、さらにこれらの変化に必須な構造因子を残基レベルで明らかにした。また自己リン酸化中間体の種々の安定な構造アナログを開発して結晶構造解析に供するだけでなく、これらアナログの構造特性解析と反応中間体への帰属により、触媒部位と Ca^{2+} 輸送部位の共役した動きが内腔への Ca^{2+} 放出と内腔 Ca^{2+} の輸送部位へのアクセス (細胞質への漏れ出し) を制御するかを明らかとした。他方、Ca-ATPase 遺伝子異常による病態についてダリエー病をモデルとして解析を行い、各家系の変異に依存した異なる内容のポンプ分子異常が発症原因となっていることを明らかにした。本稿ではこれらわれわれの成果とともに Ca-ATPase についての最新

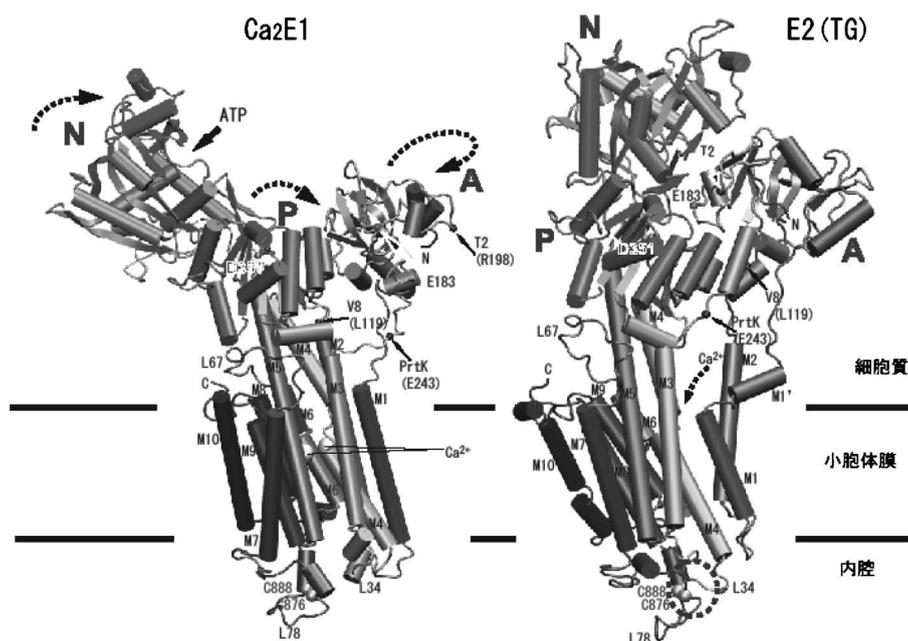


Fig. 1. Atomic Structures of Sarcoplasmic Reticulum Ca-ATPase, Ca₂E1 and E2(TG) (the Enzyme without Bound Ca²⁺ and Stabilized with Thapsigargin) (PDB Accession code 1SU4 and 1IWO)^{10,11)}

Arrows indicate motions of cytoplasmic N, P, and A domains from Ca₂E1 to E2(TG). The auto-phosphorylation site (Asp351) and primary cleavage sites with proteinase K (PrtK), V8 protease (V8), and trypsin (T2) were indicated.

の知見を紹介したい。

2. 反応機構

小胞体 Ca-ATPase (SERCA; sarco (endo) plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase) の Ca²⁺ 輸送サイクル (Fig. 2) ではまず輸送される 2 個の細胞質 Ca²⁺ が協同的に高親和性部位 (輸送部位, $K_d \sim 0.5 \mu\text{M}$) へ結合することによって ATPase が活性化され (ステップ 1-2), ついで MgATP ($K_d \sim 5 \mu\text{M}$) からリン酸基が Asp351 に転移し自己リン酸化中間体 (EP) が形成する (ステップ 3-4). この EP は ADP と反応して ATP を再生できる ADP 感受型 (E1P; ADP-sensitive EP) で, 輸送部位の Ca²⁺ はこの EP 形成に伴い膜の両側からアクセスできない閉塞された状態となる (Ca₂E1P). 次に E1P は ADP 非感受型の E2P (ADP-insensitive EP) に異性化し, 輸送部位は内腔側を向き親和性が数千分の 1 に低下し Ca²⁺ が内腔に放出される (ステップ 5-6). E2P の構造になると, 特異的水分子によるアシルリン酸結合の攻撃が可能となり, E2P が加水分解する (ステップ 7-8). このサイクルは 1 秒あたり最大 ~30 回転し, EP 異性化/Ca²⁺ 放出 (ステップ 5-6) が律速である. なお, Ca²⁺ 放出に伴い内腔側から H⁺ が Ca²⁺ 配位子に結合し, 次のサイクルで細胞質側に放出されるので厳密に言えば Ca-ATPase は Ca²⁺, H⁺ ポンプである. 形質膜 Ca²⁺ ポンプ (PMCA; plasma membrane Ca²⁺-ATPase) では, 高親和性 Ca²⁺ 結合部位が 1 つであるため輸送される Ca²⁺ は ATP1 分子あたり 1 個であり, また活性はカルモジュリンにより制御されている.¹⁷⁾

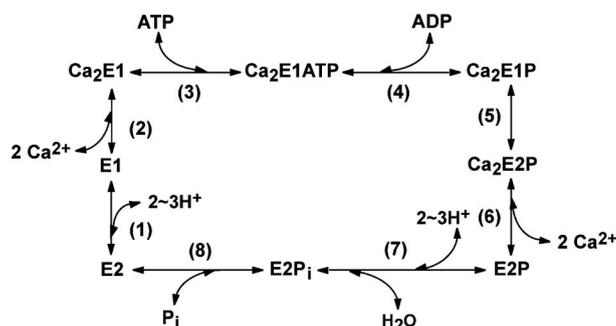


Fig. 2. Reaction Cycle of Ca²⁺-ATPase

The ATPase is converted from its inactive form (E2) to active form (Ca₂E1) upon binding of cytoplasmic Ca²⁺ at the high affinity transport sites. The activated enzyme forms auto-phosphorylated intermediate (E1P), which then goes the isomeric transition (to E2P) and releases the bound Ca²⁺ into lumen.

3. 細胞質 3 ドメイン集合状態変化と Ca²⁺ 輸送

豊島らにより解明された非リン酸化酵素の原子レベルの結晶構造 Ca₂E1 と E2 (TG) (特異的阻害剤タブシガーギンで固定された非 Ca²⁺ 結合酵素) を見ると, 細胞質の 3 つのドメインの集合状態が大きく異なる (Fig. 1).^{10,11,18)} われわれは輸送サイクルでドメイン集合状態がどのように変化するか, プロテナーゼ K (PrtK), V8 プロテアーゼ (V8), トリプシン (T1, T2) に対する各中間体の抵抗性を解析して明らかにした.¹⁹⁻²¹⁾ これらの切断部位ではドメインが互いに離れている場合は迅速に切断されるし, 集合すれば立体障害によりプロテアーゼ攻撃は不可能になるはずである (Fig. 1). その結果, 細胞質 3 ドメインは顕著に異なる 4 種の集合状態を変化することが示された (Fig. 3). Ca₂E1 では 3 ドメインは離れているが, ATP が結合すると N-P ドメインが閉じて (ATP で架橋され) リン酸基転移が起こる (ステップ 3-4). 次の EP 異性化/Ca²⁺ 放出 (ステップ 5-6) で A ドメインは大きく回転して P/N ドメインに集合し, 最もコンパクトな集合状態である E2P が形成される. E2P 分解 (ステップ 7-8) に伴い 3 ドメインは E2 の集合状態 (A ドメインはまだ集合しているが, E2P よりは弱い結合状態) になる. これらの成果により, EP 異性化/Ca²⁺ 放出ステップにおける A ドメインを中心とした細胞質 3 ドメインの大きな動きと 3 ドメイン間の結合エネルギーが, 輸送部位の構造を変化させ Ca²⁺ を内腔に放出させる, というエネルギー変換の仕組みが強く示唆された. そしてその実態を明らかにすることが Ca²⁺ 輸送機構解明の本質的アプローチであることが指摘された (項目 5., 6. 参照). またわれわれは, このように明らかにされた各中間体それぞれの構造特性を指標として, 迅速に遷移・分解してしまう各中間体について安定な構造アナログを開発し, 構造解析に資した (項目 4. 参照).

4. Ca²⁺ 結合型及び非結合型リン酸化中間体構造アナログの開発

われわれは Ca₂E1・ATP 酵素基質複合体, 及びリン酸基転移反応遷移状態 Ca₂E1P・ADP[‡], Ca₂E1P[‡] のアナログが Ca²⁺ 存在下それぞれ AMPPCP, AIF_x (+ or - ADP) の結合で形成されることを示した (Table 1).^{19,20)} AIF_x (AIF₃ あるいは AIF₄) ではその配位化学的性質として, アルミニウムとフ

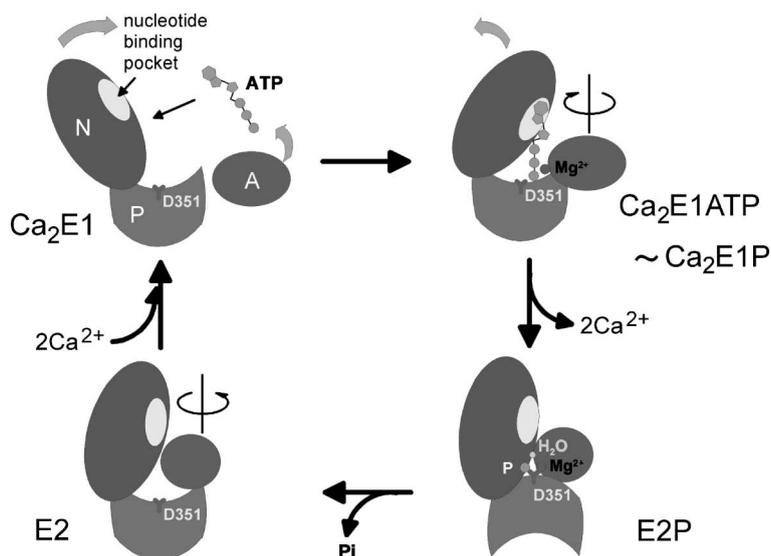


Fig. 3. Four Distinct Arrangements of Cytoplasmic 3 Domains (N, P, and A) in Catalytic Cycle of Ca^{2+} -ATPase²⁰⁾

Table 1. Formation of Stable Analogs of Ca^{2+} -bound Phosphorylated Intermediates^{20,22)}

State of EP formation (configuration of phosphate)	Complex formed	Nature of Catalytic site	Ca^{2+} at transport sites
$\text{Ca}_2\text{E1} \cdot \text{ATP}$ (enzyme-substrate complex)	$\text{Ca}_2\text{E1} \cdot \text{AMPPCP}$		non-occluded
$\text{Ca}_2\text{E1P} \cdot \text{ADP}^\ddagger$ (transition state: penta-coordinated trigonal bipyramidal)	$\text{Ca}_2\text{E1} \cdot \text{AlF}_4^- \cdot \text{ADP}$		occluded
$\text{Ca}_2\text{E1P}^\ddagger$ (transition state; penta-coordinated trigonal bipyramidal)	$\text{Ca}_2\text{E1} \cdot \text{AlF}_x$	hydrophilic	occluded
$\text{Ca}_2\text{E1P}$ (product; covalently bound tetrahedral)	$\text{E1Ca}_2 \cdot \text{BeF}_3^-$	Hydrophobic, ADP-sensitive	occluded
$\text{Ca}_2\text{E2P}$ (isomerized from $\text{Ca}_2\text{E1P}$ and trapped by elongation of A-domain/ MI' -linker) (covalently bound tetrahedral)	$\text{E2PCa}_2, \text{E2Ca}_2 \cdot \text{BeF}_3^-$	probably hydrophobic, ADP-insensitive	occluded

ッ素が平面状に配置され、その両 apical 側から酸素（例えばリン酸化部位 Asp351 側鎖と $\text{ADP}\beta$ リン酸基あるいは H_2O ）が配位して bipyramidal 構造を形成する。したがって AlF_x は、“in-line-associative” な機序によるリン酸基転移と加水分解反応の遷移状態の bipyramidal 構造に相似となる。われわれはさらに、 $\text{Ca}_2\text{E1}$ と BeF_3^- の安定な複合体 $\text{Ca}_2\text{E1} \cdot \text{BeF}_3^-$ を形成することに成功し、この複合体はリン酸化中間体 $\text{Ca}_2\text{E1P}$ （すなわち反応生成物）の性質を持つことを示した。²²⁾ BeF_3^- の配位化学的性質

として、ベリリウムは3つのフッ素のほかにもう1つの配位子、例えばアスパラギン酸側鎖の酸素を直接配位し tetrahedral 構造を形成する。したがって、 BeF_3^- は共有結合したリン酸（すなわち Asp351 アシルリン酸）の相似構造となるのである。さらにわれわれは、これら遷移状態や生成物のアナログ複合体の性質を解析し、遷移状態 $\text{Ca}_2\text{E1P}^\ddagger$ から $\text{Ca}_2\text{E1P}$ が生成するのに伴い、A ドメインが膜面と平行に少し回転し触媒部位の性質が親水性から疎水性に大きく変化することを明らかにした（Table 1）。触媒

部位は H₂O 分子を排除してアシルリン酸の無駄な加水分解を防ぐ構造を獲得するのであろう。さらにこの触媒部位の変化に伴い Ca²⁺ 輸送部位の構造が (Ca²⁺ を閉塞したまま) 逐次的に変化していき、Ca²⁺ を放出する大きな変化を引き起こすための構造を準備することが分かった。このように、迅速に分解してしまうがゆえにこれまで明らかにされていなかった Ca₂E1P の構造特性を明らかにして、リン酸化中間体形成反応 (Ca₂E1·ATP → Ca₂E1P·ADP[‡] → Ca₂E1P[‡] → Ca₂E1P) における触媒部位の構造変化とそれに伴う輸送部位における Ca²⁺ 閉塞の理解を大きく進めた。

このリン酸化反応には補因子として生理的には Mg²⁺ が必須である。触媒部位の Mg²⁺ を Ca²⁺ に代えると、Ca₂E1P は異常に安定化し、E2P への異性化が著明に遅くなる。Ca₂E1·BeF₃⁻ の触媒部位への Ca²⁺ 結合の影響を解析した結果、Mg²⁺ と Ca²⁺ の配位距離と配位数におけるわずかな違いにより、細胞質 3 ドメインの集合状態が大きく異なること、Mg²⁺ で形成した Ca₂E1P では迅速に E2P に異性化する構造 (すなわち A ドメインが若干回転した構造) を獲得しているが、Ca²⁺ ではその構造には至っておらず、遷移状態 Ca₂E1P·ADP[‡] に近い構造であることが分かった。²²⁾ すなわち Mg²⁺ の補因子としての生理的機能が構造的に理解され、なぜ Mg²⁺ が迅速な Ca²⁺ 輸送を可能にするかが明らかとなったのである。

Ca²⁺ 非結合型 (放出型) のリン酸化中間体、E2P のアナログとして、BeF₃⁻, AlF_x, MgF₄²⁻ の各リン酸アナログを、Ca²⁺ 非結合型酵素 E2 に結合させた複合体を形成し、E2P 加水分解反応状態 (E2P + H₂O → E2P[‡] → E2·P_i → E2 + P_i) へ

の構造帰属を生化学的に行った (Table 2).²¹⁾ E2·BeF₃⁻ は Ca²⁺ 放出直後の E2P 基底状態、E2·AlF_x は加水分解の遷移状態 (E2P[‡])、E2·MgF₄²⁻ は生成物複合体 (E2·P_i) の構造アナログであった。MgF₄²⁻ は tetrahedral 構造をとるが、このマグネシウムはベリリウムとは異なり Asp351 側鎖酸素には直接配位できないので非共有結合型リン酸 P_i の相似構造となる。このように 3 種のリン酸アナログの配位化学的性質と構造も上記帰属を支持した。さらにこれら安定な複合体の特性を解析して、E2P 加水分解反応における触媒部位と Ca²⁺ 輸送部位・放出路における構造変化を明らかにした。E2·BeF₃⁻ の触媒部位は強く疎水性であり、E2·AlF_x と E2·MgF₄²⁻ ではこの特性が失われ E2 と同様に親水性となっていた。すなわち E2P 基底状態では、非特異的な多数の H₂O 分子を排除し、特異的な H₂O 分子がアシルリン酸を攻撃し得る触媒部位の構造を保持している。Ca²⁺ を放出することなしに、Ca₂E2P で加水分解が起きてしまうことを防ぐための構造的機序であろう。また E2·BeF₃⁻ では小胞体内腔の Ca²⁺ が輸送部位に容易にアクセスできるが、E2·AlF_x と E2·MgF₄²⁻ ではアクセスは強く制限されていた。内腔への Ca²⁺ 放出直後、ポンプは放出路/内腔ゲートを閉じて、内腔 Ca²⁺ の細胞質への漏れ出しを防ぐ構造を獲得する必要がある。E2P 基底状態から遷移状態へ触媒部位が構造変化する際、それに共役してゲートが閉じ輸送を完結させることが明らかになったのである。3 種のアナログ複合体は 4°C で 1 ヶ月保存しても全く崩壊しないし、膜から可溶性・精製し、三次元結晶化条件で 1 ヶ月保存しても全く崩壊・変性しない。²³⁾

Table 2. Stable Analogs for E2P Hydrolysis-reaction States and Their Structural Properties¹⁹⁻²¹⁾

State of E2P hydrolysis (configuration of phosphate)	Complex with Metal-fluoride	Nature of catalytic site	Nature of Ca ²⁺ -release pathway (accessibility of luminal Ca ²⁺ to transport sites)
E2P ground state (covalently bound tetrahedral)	E2·BeF ₃ ⁻	hydrophobic (closed)	open (accessible)
transition state (penta-coordinated trigonal bipyramidal)	E2·AlF ₄ ⁻	hydrophilic (open)	closed (inaccessible)
product state (E2·P _i complex) (non-covalently bound tetrahedral)	E2·MgF ₄ ²⁻	hydrophilic (open)	closed (inaccessible)

5. 結晶構造解明：リン酸化中間体の原子構造モデルから明かされた Ca^{2+} 輸送の仕組み

豊島らにより各中間体の安定構造アナログの結晶化と原子構造解明が次々になされ、輸送機能の理解が大きく進展した。¹⁰⁻¹⁶⁾ P-type ATPase 研究のみならず、膜タンパク結晶化と構造解明、生体エネルギー転換、細胞イオンホメオスタシスとその異常による病態発症の分子基盤といった観点からもエポックメイキングな画期的成果である。これまでに非リン酸化酵素の Ca^{2+} 結合型及び非結合型モデル $\text{Ca}_2\text{E1}$ 及び E2 (TG) に加え、さらに $\text{Ca}_2\text{E1}\cdot\text{AMPPCP}$ ($\text{Ca}_2\text{E1}\cdot\text{ATP}$ 複合体), $\text{Ca}_2\text{E1}\cdot\text{AlF}_4\cdot\text{ADP}$ ($\text{Ca}_2\text{E1P}\cdot\text{ADP}^{\ddagger}$ 遷移状態), $\text{E2}\cdot\text{AlF}_4$ (E2P^{\ddagger} 遷移状態), $\text{E2}\cdot\text{MgF}_4^-$ ($\text{E2}\cdot\text{P}_i$ 複合体), そして $\text{E2}\cdot\text{BeF}_3^-$ (E2P 基底状態) の原子構造が解き明かされた。^{10-15,24-26)} そして豊島らは膨大かつ詳細な原子レベル情報に基づき、 Ca^{2+} 輸送とエネルギー共役機構について次

のような見事な解釈を行っている (Fig. 4).¹³⁾ $\text{Ca}_2\text{E1}$ で開いている N と P ドメインは $\text{Ca}_2\text{E1}\cdot\text{ATP}$ では ATP により架橋されて閉じた状態となる。これにより ATP の末端リン酸が Asp351 に到達しリン酸基転移が起こる (実際、 $\text{Ca}_2\text{E1}\cdot\text{AMPPCP}$ と $\text{Ca}_2\text{E1}\cdot\text{AlF}_4\cdot\text{ADP}$ は実際ほぼ完全に一致した構造である)。 $\text{Ca}_2\text{E1} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E1}\cdot\text{ATP}$ 及び $\text{Ca}_2\text{E1}\cdot\text{AlF}_4\cdot\text{ADP}$ の変化では、A ドメインが膜面垂直方向に約 30 度回転し、これに伴い A ドメインに連結している M1 が引き上げられ膜面に局在化する両親媒性の M1' が形成する。そしてこれらの構造変化の結果として Ca^{2+} が輸送部位に閉塞される仕組みが解明された。¹²⁾ すなわち M4 上の Ca^{2+} 配位子 Glu309 が細胞質側ゲートとして Ca^{2+} をキャップして逃さないようにし、さらに、M1 上の Leu65 の側鎖が van der Waals 接触により Glu309 側鎖のこのコンフォメーションをロックして閉塞状態を保つのである。

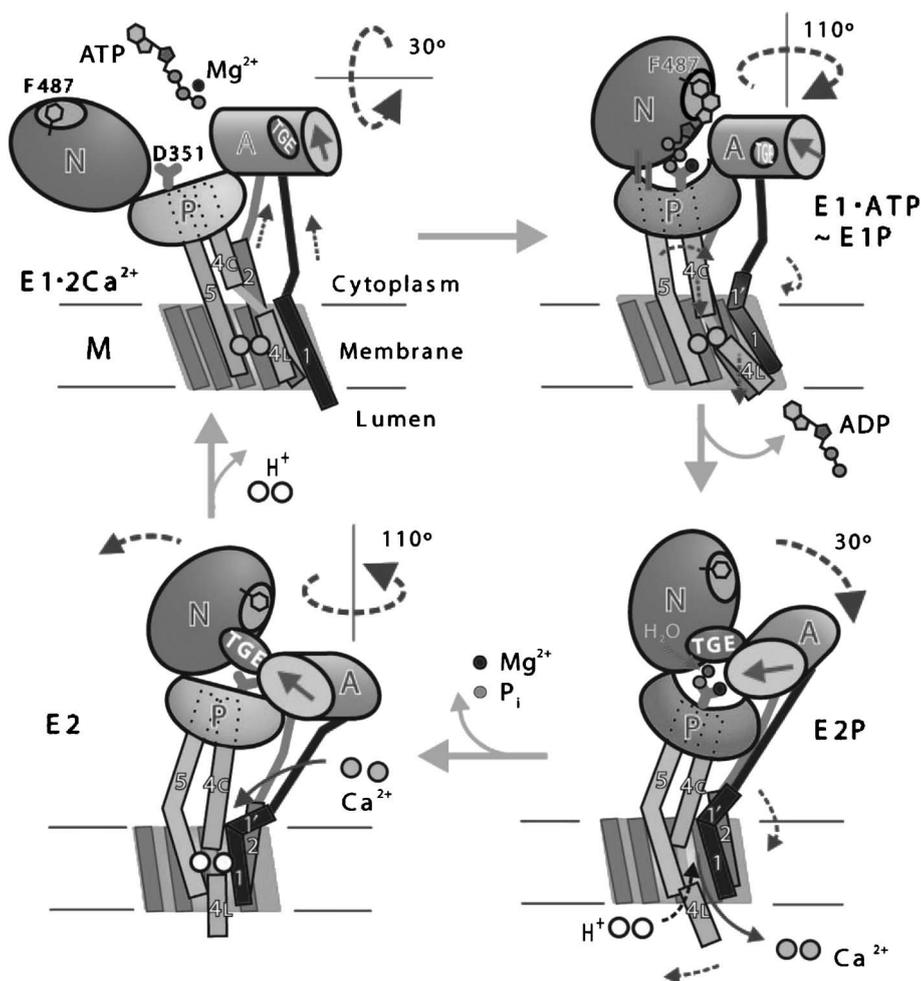


Fig. 4. The Structural Changes of Ca-ATPase during the Reaction Cycle¹³⁾

輸送する Ca^{2+} を輸送部位内に閉じ込め、逃さないようにする仕組みが分かったのである。

EP の異性化と Ca^{2+} 放出過程のモデルである $\text{Ca}_2\text{E1} \cdot \text{AlF}_4^- \cdot \text{ADP} \rightarrow \text{E2} \cdot \text{AlF}_4^-$ 及び $\text{E2} \cdot \text{MgF}_4^{2-}$ の変化では A ドメインが膜面と平衡に約 110 度も回転する。P ドメインは A ドメイン側に大きく倒れ込んで A ドメインに結合する。この細胞質領域の大きな動きにより、M2 は大きく傾き M1 を介して M4 内腔側を押してその位置をずらす。P ドメインに連結した M4/M5 は P ドメインとともに傾く。このように膜内ヘリックスの配向性が大きく変化して、 Ca^{2+} 親和性を低下させ内腔への放出路を開き Ca^{2+} を内腔に放出させるのである。そして最後に E2P が加水分解する ($\text{E2} \cdot \text{BeF}_3^- \rightarrow \text{E2} \cdot \text{AlF}_4^- \rightarrow \text{E2} \cdot \text{MgF}_4^{2-} \rightarrow \text{E2}(\text{TG})$)。Ca-ATPase の活性化 ($\text{E2} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E1}$) では、 Ca^{2+} が細胞質から結合することにより、膜貫通ヘリックス (特に M4 と M5) の構造が変化しその結果、P ドメインから A ドメインが離れ、ATP 結合とリン酸化が可能となる。これらの詳細については、原著¹²⁾並びに豊島研究室のホームページ情報をぜひ参照されたい。構造変化の様子が連続したムービーとして紹介されている。また豊島らの原子レベルの情報は、 Ca^{2+} 配位、ATP 結合及びリン酸基転移、アシルリン酸加水分解と攻撃水分子の配位、さらにリン酸基転移と加水分解の補因子 Mg^{2+} の結合について、残基及び原子レベルの情報を与えたことは言うまでもない。部位特異的変異から予想された多く^{27,28)}とも一致し、見事に生化学的情報が可視化された。さらに豊島らは、心筋及び骨格筋小胞体 Ca-ATPase を制御するホスホランバン及びサルコリピンの Ca-ATPase への結合構造解明、また Ca-ATPase・脂質二重膜・溶媒の全体の系についての分子動力学計算による Ca^{2+} ポンプ機能の研究も発展させている。²⁹⁻³¹⁾ 今後、EP の異性化と内腔への Ca^{2+} 放出の過程 $\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E2P} \rightarrow \text{E2P} + 2\text{Ca}^{2+}$ という Ca^{2+} 輸送の鍵となるプロセスの理解をさらに深めるため、 $\text{Ca}_2\text{E1P}$ そして transient な状態 $\text{Ca}_2\text{E2P}$ の原子構造を解明することが必須の課題として残されている (Fig. 5)。われわれは $\text{Ca}_2\text{E1P}$ の真のモデル $\text{Ca}_2\text{E1} \cdot \text{BeF}_3^-$ を開発し、²²⁾ 他方、部位特異的変異を用いて $\text{Ca}_2\text{E2P}$ を安定にトラップすることに成功して、³²⁾ このプロセスの構造学的アプローチを可能にしたば

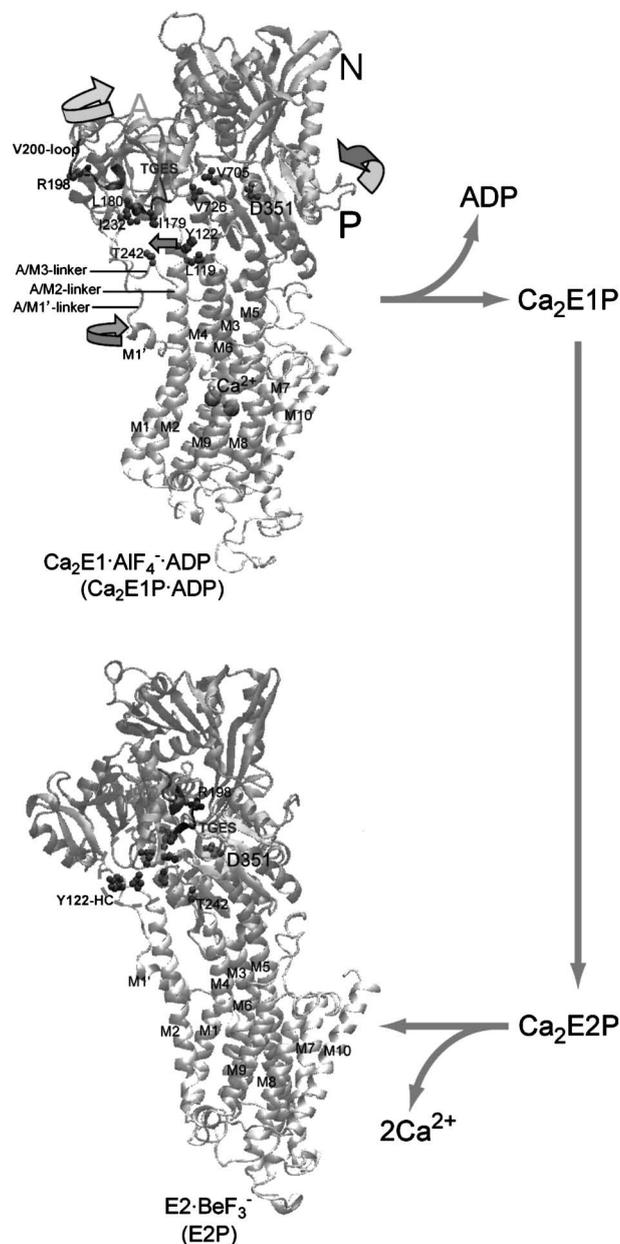


Fig. 5. Structural Change during Processing of Phosphorylated Intermediate

$\text{Ca}_2\text{E1} \cdot \text{AlF}_4^- \cdot \text{ADP}$ (transition state analog for phosphorylation $\text{Ca}_2\text{E1P} \cdot \text{ADP}^{\ddagger}$) and $\text{E2} \cdot \text{BeF}_3^-$ (ground state E2P analog²¹⁾) were obtained from Protein Data Bank (PDB accession code 1T5T²⁴⁾ and 2ZBE,¹⁵⁾ respectively). The arrows on the domains, M1', and M2 (Tyr122) in $\text{Ca}_2\text{E1} \cdot \text{AlF}_4^- \cdot \text{ADP}$ indicate their approximate motions predicted for $\text{Ca}_2\text{E1P} \cdot \text{ADP}^{\ddagger} \rightarrow \text{E2P} \cdot \text{Mg}$. The phosphorylation site Asp351, TGES184 of the A domain, Arg198 (tryptic T2 site) on the Val200 loop (DPR198AV200NQD) of the A domain, Thr242 (proteinase K site) on the A-domain-M3 linker are shown. Seven hydrophobic residues gather in the E2P state to form Tyr122-hydrophobic cluster (Y122-HC); Tyr122/Leu119 on the top part of M2, Ile179/Leu180/Ile232 of the A domain, and Val705/Val726 of the P domain. The overall structure of $\text{E1Ca}_2 \cdot \text{AlF}_4^- \cdot \text{ADP}$ is virtually the same as that of $\text{E1Ca}_2 \cdot \text{CaAMP} \cdot \text{PCP}$ ^{24,12)}

かりでなく生化学的解析から理解をさらに深めている (次項 6. 参照).

6. リン酸化中間体異性化と Ca^{2+} 放出のエネルギー共役——内腔への Ca^{2+} 放出を可能にする A ドメインの動きとドメイン間相互作用に必須な構造因子の同定

EP 異性化と Ca^{2+} 放出を引き起こす動きがどのように生み出されエネルギー変換が成立するかを理解するため、部位特異的変異導入と速度論的機能解析を行い、A ドメインの回転や P ドメインの倒れ込みを生起させる因子、A-P ドメイン間結合に関与する構造因子を同定しそれぞれの機能の具体を明らかにした。³²⁻⁴¹⁾ その結果、これまで 1 つのステップとみなされていた EP 異性化/ Ca^{2+} 放出 ($\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{E2P} + 2\text{Ca}^{2+}$) は、実は 2 つの逐次的ステップ ($\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E2P} \rightarrow \text{E2P} + 2\text{Ca}^{2+}$) から構成され、それぞれには異なる構造因子が機能することが分かり、 Ca^{2+} 放出のエネルギー変換の仕組みについて新たな観点からの理解を切り開いた。まず EP の異性化 ($\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E2P}$; ADP 感受性 (ATP 再生能) の消失) では、A ドメインが 90 度以上も大きく回転し P ドメインの上に乗上がった配置でドッキングし、A ドメイン TGES184 ループがリン酸化部位に上部から水素結合して ADP のアシルリン酸へのアクセスをブロックする (ADP 感受性の消失)。A ドメインの水平方向の回転の原動力は、 $\text{Ca}_2\text{E1} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E1P}$ で A ドメインが膜面垂直方向に回転することにより引っ張りあげられた A ドメイン-M3 連結ループの“緊張”であろう。¹²⁾

驚いたことに、A ドメイン-M1' 連結ループ (A ドメイン/M1'-リンカー) を 1 残基分短くすると、EP 異性化 ($\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E2P}$) は完全に阻害され、³⁷⁾ 逆に、このリンカー中にアミノ酸を 2 個以上挿入しこのリンカーを長くすると、EP 異性化 ($\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E2P}$) は著明に促進された。³²⁾ リンカーを短くした場合は A ドメインが P ドメイン上部に位置できなくなるからであり、長くするところの A-P ドメインの配置がたやすくなるからであろう。すなわち $\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E2P}$ を生起させるために A ドメイン/M1'-リンカーは十分に長い必要がある。一方、リンカーを長くした変異体で形成した $\text{Ca}_2\text{E2P}$ は、 Ca^{2+} を輸送部位内に閉塞した極めて安定な状態であり、 Ca^{2+} 脱閉塞と放出がほぼ完全にブロックされていた。このように、これまで存在

が予測されていた $\text{Ca}_2\text{E2P}$ が初めて捕捉され、同時に、 $\text{Ca}_2\text{E2P}$ からの Ca^{2+} の脱閉塞と放出のための構造変化を生起させるためには、($\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E2P}$ の場合とは逆に) A ドメイン/M1'-リンカーは適切に短い必要があることが分かった。

プロテアーゼに対する抵抗性から明らかにされた $\text{Ca}_2\text{E2P}$ の構造は、 $\text{Ca}_2\text{E1P}$ と Ca^{2+} 放出型 E2P の中間状態であった。すなわち、 $\text{Ca}_2\text{E2P}$ では A ドメインは既に大きく回転し P ドメインにドッキングしているが、 Ca^{2+} 放出型 E2P において A-P ドメイン間で形成される 3 ヲ所の相互作用 (TGES184 領域水素結合、Val200 領域静電的結合、及び Tyr122 領域疎水結合) のうちの 1 ヲ所、すなわち Tyr122 を中心とした疎水クラスターの形成がまだ不完全であった。このクラスターは Fig. 5 に示したように、大きく回転した A ドメインと倒れ込んだ P ドメイン、そして傾いた M2 上の計 7 つの疎水性残基が Tyr122 (M2 上) に集合して形成される。結果は、 $\text{Ca}_2\text{E2P}$ では P ドメイン及び M2 の動きが不十分であり、 Ca^{2+} 放出に必要な完全な集合状態には至っていないを示していた。実際、この Tyr122 疎水クラスターの形成は Ca^{2+} 親和性低下と放出路開放に必須であった。³⁸⁻⁴⁰⁾

結果を総合すると次のような逐次的構造変化の仕組みが見えてきた。まず EP 異性化 ($\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E2P}$) では、A ドメインが大きく回転して P ドメインの上に乗上がった配置でドッキングする。これにより $\text{Ca}_2\text{E2P}$ では A ドメイン/M1'-リンカーがピンと張られた“緊張”状態となる。次に Ca^{2+} 脱閉塞と放出 ($\text{Ca}_2\text{E2P} \rightarrow \text{E2P} + 2\text{Ca}^{2+}$) では、この A ドメイン/M1'-リンカーが原動力となって A ドメインを膜面に向かって引っ張り P ドメインや M2 及び M4/M5 を傾かせる。これらの動きにより Ca^{2+} 輸送部位が破壊され、放出路が開き Ca^{2+} が内腔へ放出され、³²⁾ また A、P ドメインと M2 は Tyr122 疎水性クラスターを形成し、 Ca^{2+} 放出型の E2P の構造が安定化される。A ドメイン/M1'-リンカーの長さはこのように逐次的構造変化を生起させるために絶妙にデザインされている。

われわれの部位特異的変異はさらに、A-P ドメイン境界面の 2 ヲ所 (Tyr122 疎水クラスターと Val200 ループ領域における静電的結合) で生じる強い相互作用がともに E2P 加水分解に必須である

ことを明らかにしている。^{36,38-40)} すなわちこれら 2 ヶ所における A-P ドメインの結合によって生み出される構造変化 (エネルギー) が膜貫ヘリックスの配置と構造を変化させて Ca^{2+} を内腔に放出させるばかりでなく、同時に E2P のアシルリン酸結合を加水分解するための触媒部位の構造を整えるのである。アシルリン酸への攻撃は TGES184 ループの Glu183 が配位した H_2O 分子による。A-P ドメインの相互作用が形成されることにより TGES184 ループや補因子 Mg^{2+} が触媒部位内に適切に配置されると予想される。この構造変化の仕組みにより、 Ca^{2+} 放出後に E2P 分解が起こるようになり、 Ca^{2+} 放出なしに $\text{Ca}_2\text{E2P}$ が加水分解されてしまうことが防がれ、 Ca^{2+} 輸送のエネルギー共役が成立している。

7. 遺伝子異常と病態

Ca-ATPase の異常はアイソフォーム特異的に癌、高血圧、インスリン非依存型糖尿病、常染色体劣性遺伝性骨格筋弛緩障害 (プロディー病)、平衡感覚・運動障害 (有毛細胞異常)、常染色体優性遺伝角化異常症 (細胞分化異常によるダリエー病) など、様々な病態原因となる。⁶⁾ 原因遺伝子解析は SERCA2b アイソフォーム異常によるダリエー病家系について顕著に進み、現在までにヨーロッパ・アジアの約 100 家系以上で解析され、家系毎に異なる (1 ヶ所ずつの) 変異が Ca^{2+} ポンプ分子の全域に渡り存在することが明らかとなった。解析された家系の約半数近くはナンセンス変異であり、ほかはアミノ酸の 1 残基置換あるいは削除変異であった。

そこでわれわれは、ダリエー病を発症させる残基置換及び削除変異のほとんどすべての 51 家系について、それぞれの変異が Ca-ATPase タンパクの発現と機能に与える影響を解析した。⁴²⁻⁴⁴⁾ 細胞の Ca^{2+} 動態異常と機能異常のよいモデルとなり得るからである。結果は次のようなものであった。15 の変異体タンパクはほとんど発現せず、品質管理システムにより迅速に分解されている可能性が示唆された。野生型に近い発現量を示した他の 36 変異体のうち、29 変異体ではその ATPase 活性がほぼ完全に阻害されていた。高い ATPase 活性を示した 7 変異体のうち 4 変異体では Ca^{2+} 輸送活性がほぼ完全に消失しており、ATP 分解と Ca^{2+} 輸送が脱共役していた。興味深いことに残りの 3 つの変異体

は、一見正常な Ca^{2+} 輸送活性とタンパク発現を保持していた。これらの 3 変異体は偶然ではあるが、われわれが日本で初めて行ったダリエー病家系の遺伝子解析で見いだされた 3 家系のものであった。⁴²⁾ 詳細な速度論的解析の結果、これらの 3 変異体は、 Ca^{2+} 輸送における 1) Ca^{2+} 親和性の 2-3 倍程度のわずかの低下、2) ~20-30% 程度のわずかの速度低下、3) 高濃度 Ca^{2+} による阻害に対する感受性低下、のいずれかあるいは複合的な異常を保持していた。⁴³⁾ 1) は細胞質 Ca^{2+} の設定レベルがわずかに高くなることを意味し、2) は Ca^{2+} シグナルへの対応速度がわずかではあるが不十分であることを意味する。3) の変異体は小胞体内腔に輸送蓄積された Ca^{2+} によるポンプのフィードバック阻害に対する感受性が低く、したがって内腔 Ca^{2+} レベルを異常に高く設定してしまうことを意味する。51 家系変異の解析の結果、このように異なる内容と程度の Ca^{2+} 動態異常が病態を引き起こすであろうことが分かった。⁴⁴⁾ 組織は極めて微妙な Ca^{2+} 動態のチューニングを必要としている。さらにわれわれは上記 3) の異常、すなわち小胞体内腔の異常な高レベルの Ca^{2+} の設定とこの変異を有するダリエー病家系の特異的付随症状である重篤な精神症状との関連を指摘した。⁴³⁾

8. おわりに

P ドメインの立体構造 (触媒部位) は P-type ATPase の属する HAD (haloacid dehalogenase) superfamily で保存されている⁴⁵⁾ が、エネルギー変換に必須の機能を担う A ドメインは P-type ATPase のみに存在する。A ドメインは共役輸送に特化して形成されたドメインと言える。 Ca^{2+} ポンプに加え、豊島らは最近 Na^+ 、 K^+ ポンプ、Cu ポンプなど他の P-type ATPase の結晶構造を次々に解き明かしている。⁴⁶⁻⁴⁸⁾ これらのポンプについても Ca^{2+} ポンプと同様、各中間体アナログの開発、生化学的特性解明と構造帰属、そして結晶構造解析を実施することにより、P-type ATPase メンバーの作動機構における共通点や特性が明らかとなり、細胞イオンホメオスタシスにおける絶妙なバランス形成と細胞機能の理解がさらに進むであろう。他方、他のメンバー、例えばゴルジ装置 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ ポンプなどについても局在や細胞分化における必須な役割、遺伝的異常による病態など、基本的知見が明ら

かにされてきており、細胞機能調節研究における新たな観点からの展開が切り開かれている。⁴⁹⁾

謝辞 日本薬学会第129年会におけるシンポジウム講演と本稿執筆の機会を与えて下さいました森井孫俊教授（鈴鹿医療科学大学薬学部）並びに酒井秀紀教授（富山大学薬学部）に心より感謝申し上げます。共同研究者の旭川医科大学化学講座・機能分子科学分野・Wang Guoli, Liu Xiaoyu, 吉田雅紀の各氏、並びに皮膚科学講座・飯塚一教授、宮内勇貴氏に御礼申し上げます。本研究の一部は、学術創生研究「P型イオンポンプによる能動輸送機構の構造的解明」により可能となったものであり、研究代表者・東京大学分子細胞生物学研究所・豊島近教授に深謝いたします。

REFERENCES

- 1) MacLennan D. H., Rice W. J., Green N. M., *J. Biol. Chem.*, **272**, 28815–28818 (1997).
- 2) Toyoshima C., Inesi G., *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 269–292 (2004).
- 3) Toyoshima C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **476**, 3–11 (2008).
- 4) Toyoshima C., *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, 941–946 (2009).
- 5) Suzuki H., “Series: Bioscience no Shinseiki (Kankakukikan to Nounaijouhoushori),” Vol. 12, Kyoritsu Shuppan Co., Ltd., Tokyo, 2002, pp. 121–128.
- 6) Suzuki H., *Seikagaku*, **75**, 1215–1224 (2003).
- 7) Suzuki H., *Seibutsu*, **45**, 16–21 (2005).
- 8) Suzuki H., *Membrane*, **31**, 120–126 (2006).
- 9) Ebashi S., Lipmann F., *J. Cell Biol.*, **14**, 389–400 (1962).
- 10) Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H., Ogawa H., *Nature*, **405**, 647–655 (2000).
- 11) Toyoshima C., Nomura H., *Nature*, **418**, 605–611 (2002).
- 12) Toyoshima C., Mizutani T., *Nature*, **430**, 529–535 (2004).
- 13) Toyoshima C., Nomura H., Tsuda T., *Nature*, **432**, 361–368 (2004).
- 14) Obara K., Miyashita N., Xu C., Toyoshima I., Sugita Y., Inesi G., Toyoshima C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 14489–14496 (2005).
- 15) Toyoshima C., Norimatsu Y., Iwasawa S., Tsuda T., Ogawa H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19831–19836 (2007).
- 16) Ogawa H., Toyoshima C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15977–15982 (2002).
- 17) Suzuki H., *Protein, Nucleic acid, and Enzyme*, **43**, 1610–1621 (1998).
- 18) Suzuki H., *Protein, Nucleic acid, and Enzyme*, **47**, 1947–1948 (2002).
- 19) Danko S., Daiho T., Yamasaki K., Kamidochi M., Suzuki H., Toyoshima C., *FEBS Lett.*, **489**, 277–282 (2001).
- 20) Danko S., Yamasaki K., Daiho T., Suzuki H., Toyoshima C., *FEBS Lett.*, **505**, 129–135 (2001).
- 21) Danko S., Yamasaki K., Daiho T., Suzuki H., *J. Biol. Chem.*, **279**, 14991–14998 (2004).
- 22) Danko S., Yamasaki K., Daiho T., Suzuki H., *J. Biol. Chem.*, **284**, 22722–22735 (2009).
- 23) Yamasaki K., Daiho T., Suzuki H., *J. Biol. Chem.*, **277**, 13615–13619 (2002).
- 24) Sørensen L.-M. T., Møller J. V., Nissen P., *Science*, **304**, 1672–1675 (2004).
- 25) Olesen C., Sørensen L.-M. T., Nielsen C., Møller J. V., Nissen P., *Science*, **306**, 2251–2255 (2004).
- 26) Olesen C., Picard M., Winther A.-M. L., Gyrrup C., Morth J. P., Oxvig C., Møller J. V., Nissen P., *Nature*, **450**, 1036–1042 (2007).
- 27) Inesi G., Ma H., Lewis D., Xu C., *J. Biol. Chem.*, **279**, 31629–31637 (2004).
- 28) Einholm A. P., Vilsen B., Andersen J. P., *J. Biol. Chem.*, **279**, 15888–15896 (2004).
- 29) Toyoshima C., Asahi M., Sugita Y., Khanna R., Tsuda T., MacLennan D. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 467–472 (2003).
- 30) Asahi M., Sugita Y., Kurzydowski K., Leon S. D., Tada M., Toyoshima C., MacLennan D. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5040–5045 (2003).
- 31) Sugita Y., Miyashita N., Ikeguchi M., Kidera A., Toyoshima C., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 6150–6151 (2005).
- 32) Daiho T., Yamasaki K., Danko S., Suzuki H., *J. Biol. Chem.*, **282**, 34429–34447 (2007).
- 33) Daiho T., Suzuki H., Yamasaki K., Saino T., Kanazawa T., *FEBS Lett.*, **444**, 54–58 (1999).
- 34) Daiho T., Suzuki H., Yamasaki K., Saino T., Kanazawa T., *J. Biol. Chem.*, **274**, 23910–23915 (1999).

- 35) Daiho T., Yamasaki K., Saino T., Kamidochi M., Satoh K., Iizuka H., Suzuki H., *J. Biol. Chem.*, **276**, 32771–32778 (2001).
- 36) Kato S., Kamidochi M., Daiho T., Yamasaki K., Gouli W., Suzuki H., *J. Biol. Chem.*, **278**, 9624–9629 (2003).
- 37) Daiho T., Yamasaki K., Wang G., Danko S., Iizuka H., Suzuki H., *J. Biol. Chem.*, **278**, 39197–39204 (2003).
- 38) Yamasaki K., Daiho T., Danko S., Suzuki H., *J. Biol. Chem.*, **279**, 2202–2210 (2004).
- 39) Wang G., Yamasaki K., Daiho T., Suzuki H., *J. Biol. Chem.*, **280**, 26508–26516 (2005).
- 40) Yamasaki K., Wang G., Daiho T., Danko S., Suzuki H., *J. Biol. Chem.*, **283**, 29144–29155 (2008).
- 41) Liu X., Daiho T., Yamasaki K., Guoli W., Suzuki H., *J. Biol. Chem.*, **284**, 25190–25198 (2009).
- 42) Takahashi H., Atsuta Y., Sato K., Ishida-Yamamoto A., Iizuka H., Suzuki H., *J. Dermatol. Sci.*, **26**, 169–172 (2001).
- 43) Sato K., Yamasaki K., Daiho T., Miyauchi Y., Takahashi H., Ishida-Yamamoto A., Nakamura S., Iizuka H., Suzuki H., *J. Biol. Chem.*, **279**, 35595–35603 (2004).
- 44) Miyauchi Y., Daiho T., Yamasaki K., Takahashi H., Ishida-Yamamoto A., Danko S., Suzuki H., Iizuka H., *J. Biol. Chem.*, **281**, 22882–22895 (2006).
- 45) Wang W., Cho H. S., Kim R., Jancarik J., Yokota H., Nguyen H. H., Grigoriev I. V., Wemmer D. E., Kim S.-H., *J. Mol. Biol.*, **319**, 421–431 (2002).
- 46) Shinoda T., Ogawa H., Cornelius F., Toyoshima C., *Nature*, **459**, 446–450 (2009).
- 47) Ogawa H., Shinoda T., Cornelius F., Toyoshima C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5800–5805 (2009).
- 48) Tsuda T., Toyoshima C., *EMBO J.*, **28**, 1782–1791 (2009).
- 49) Yoshida M., Yamasaki K., Daiho T., Iizuka H., Suzuki H., *J. Dermatol. Sci.*, **43**, 21–33 (2006).