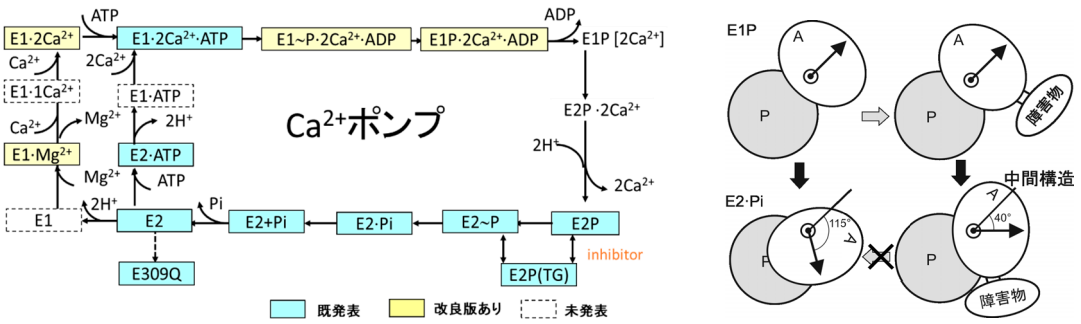
| 33　イオンポンプ蛋白質作動機構の構造的理解の完成 | 豊島　近 |
|---|---|

**【目的】**代表的イオンポンプである筋小胞体 $Ca^{2+}$ポンプに関し、X 線結晶解析によって 15 の反応中間体の原子構造を決定した。その結果、作動機構の大略は理解できるようになったが、最重要ともいえる「膜内に結合したイオンを放出する過程」（E1P·ADP·$2Ca^{2+}$→E2P）に関してはよくわからないままである。この過程における構造変化は非常に大きく、且つ幾つもの場所で起こるため、何が原因で何が結果かも判然としない。この問題の解決には「人工的反応中間体を創出する」しかないと考えた。この過程では、3 つある細胞質ドメインの大規模な再配置が起こるが、特に重要なのは A ドメインの 90° に及ぶ回転である。それを途中で止めたい。そのために、ポンプ蛋白質に立体障害となる「コブ」を導入する。コブの大きさを変えれば、系統的に幾つもの人工的反応中間体を生み出せるはずである。その構造を決定することよって「イオンポンプ作動機構の原子構造に基づく理解」の完成を目指す。

**【方法】**要件としては、導入するコブによって ATP による燐酸化は阻害されないことが必須である。従って、コブの導入場所としては A ドメインのどこかであり E1P 状態で溶媒に露出している必要がある。一方で E2P 状態の成立は阻止されなければならないから、E1P と E2P で構造が変わらない「硬い」領域との接触面の近くにコブをつくるべきである。そうなると、導入部位は限定され、P ドメインと接触する A ドメインの領域ということになる。コブとしては側鎖レベルから二次構造要素等広く考えられるが、まずは点変異体から始める。その設計には急速に進歩しているフォールディングソフトウェアを、構造の安定性の評価には分子動力学計算が利用できよう。実験的には蛋白質分解酵素による部分分解が有効であることを経験している。高等動物の大型膜蛋白質ではあるが、変異体の生産・X 線結晶解析技術は既に確立済みである。本研究では、まずクライオ電顕による単粒子解析によって構造を検討することにした。

**【結果】**現時点で 4 つの変異体を大量生産し、そのうち 2 つについてはクライオ電顕による予備的検討を終えた段階にある。作製した変異体は、E2P 状態で P ドメインとの接触面に位置する A ドメインの一残基と二残基に変異を入れたものに加え、Rosetta ソフトウェアを利用してヘリックスを導入したもの、A ドメインにあるすべての P 型 ATPase で保存されている TGES ループを伸ばしたもの、の 4 つである。4 つめの「TGES ループを伸ばしたもの」が系統的に大きさを変えられることから有望と考え、分子動力学計算による安定性評価でも優れていた。しかし、蛋白質分解酵素による部分分解では、精製前の膜標品で既に分解産物が認められ、この変異体は正しく fold していないだろうという結論になった。分子動力学計算で検討できるのはあくまでも作製した原子モデルの安定性であり、発現蛋白質がその構造をとるかは別問題であるとはいえ、この結果は驚きであった。また、構造解析の手法としては、クライオ電顕による単粒子解析を予定していたが、ここでも問題が生じた。$Ca^{2+}$ポンプとは同族の $Na^{+}$ポンプ（$Na^{+}$、$K^{+}$-ATPase）に関して実績を積み上げており、特段の問題はあるまいと考えていた。ところが、$Na^{+}$ポンプと同様の条件で電顕試料を作製した場合、$Ca^{2+}$ポンプは単量体から三量体のゆるい集合体を作るため、高分解能での解析が著しく困難であることが判明した。このように、2 つのステップで予想外の困難に直面したため、研究の完成にはまだ時間を要することになった。

$Ca^{2+}$ポンプの反応サイクルと障害物の導入による人工的反応中間体の創生



# 33. イオンポンプ蛋白質作動機構の構造的理解の完成

豊島　近

東京大学 定量生命科学研究所 膜蛋白質解析研究分野

Key words：イオンポンプ，反応中間体，構造解析，作動機構

## 緒　言

イオンポンプは生体膜に存在する膜蛋白質であり、濃度勾配（正確には電気化学ポテンシャル）に逆らったイオン輸送を行い、膜を隔てたイオンの濃度勾配を確立する。イオンの濃度勾配は神経の興奮や信号伝達等に使われ、生命活動の基盤となる。例えば、筋小胞体 $Ca^{2+}$ポンプ（SERCA）が働かなくなれば、筋肉の収縮弛緩は失われてしまう。濃度勾配に逆らった輸送のためにはエネルギーが必要であり、$Ca^{2+}$ポンプは ATP1 分子あたり 2 個の $Ca^{2+}$を輸送する。従って、イオンポンプ蛋白質は ATP を分解する酵素でもあり、その化学反応と連携して構造変化が起こる。実際、私たちが示したように、イオンポンプ蛋白質はミクロの手押しポンプのように動いてイオンを汲みだすのである［1］。

ポンプの輸送サイクルは多数の中間体からなる。筋小胞体 $Ca^{2+}$ポンプに関し、既に 15 の反応中間体の構造を X 線結晶解析により決定した。本研究で追及したいのは、非常に大きな構造変化を伴う E1P·ADP·$2Ca^{2+}$→ E2P 遷移間の中間体を人工的に作り出し、その立体構造を決定することである。E1P·ADP·$2Ca^{2+}$状態では、2 個の $Ca^{2+}$は膜貫通部位に高い親和性（E1）で結合しているが、ATP から蛋白質に燐酸（P）が転移された結果、2 つあるゲートは閉っており、$Ca^{2+}$は膜内に隔離されている。ADP が離脱すると $Ca^{2+}$に対し低親和性状態（E2）になり、小胞体内腔側ゲートは開く。同時に、膜貫通ヘリックス M4 は内腔側にαヘリックス一巻き分（～5.5 Å）下がり、$Ca^{2+}$を押し出す。このとき（E1P·$2Ca^{2+}$→ E2P）、3 つある細胞質ドメインの 1 つ A ドメインは膜に対し垂直から 25° 傾いた軸の周りに 90°回転し、燐酸化 Asp の加水分解に伴い（E2P→ E2·Pi）さらに 25°回転する。この A ドメインの回転を途中で止めたい。そのために、A ドメイン（或いは P ドメイン）に障害物（コブ）を導入することを考える。コブの大きさを系統的に変えることによって複数の人工的中間体を生み出し得るはずである。その構造はクライオ電顕による単粒子解析で決定すればよいであろう。本研究では手始めに点変異体から始めて計 4 つの変異体を作製し、構造決定を試みた。

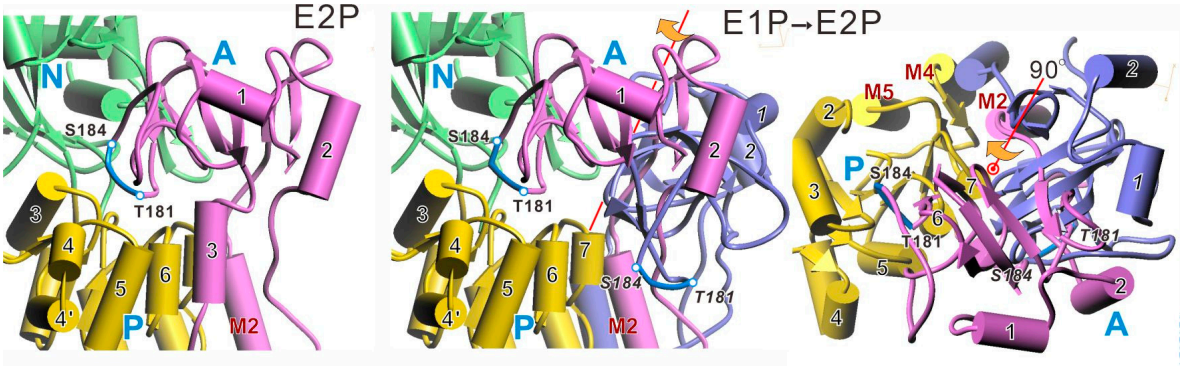



図 1. $Ca^{2+}$ポンプの E1P·$2Ca^{2+}$→E2P における A ドメインの運動

左と中央の図は膜にほぼ並行に、右図は細胞質側から膜面にほぼ垂直に見たもの。中央と右の図では A3 ヘリックスは除いて見やすくしてある。$^{181}$TGES$^{184}$（水色で示す）は P 型 ATPase の signature sequence の 1 つで、燐酸化 Asp の加水分解に重要な働きをする。

## 方法および結果

### 1. 変異体の設計

ここでは（1）コブの挿入場所の決定、(2）コブのアミノ酸配列の決定、(3）計算機による評価に関し記述する。E1P→E2P 遷移においてはA ドメインの 90° の回転が起こる（図 1)。E2P 状態成立の肝は、A ドメインの鍵である$^{181}$TGES ループが溶媒に露出した状態から、燐酸化サイトを持つ P ドメインの奥深くに挿入され、N ドメインとも接触することである。このときに S184 の水酸基が P ドメインの上面に位置し鍵となる残基の 1 つである D627 と水素結合を作って安定化する。また、2 残基上の S186 は N ドメインの E439 と水素結合を作る。そこで、S184 や S186 を嵩高い Phe や Trp に置換することが考えられる。図 1 に示すように E1P 状態では TGES ループは P ドメインの上面より下に位置しているから、Phe や Trp に置換すれば P ドメインの上面に滑り込む手前で衝突すると考えられる。つまり、図 1 からわかるように E1P における位置から 60° 程度回転したところで止まることが期待される。実際、S184D/R や S186F では E1P で反応が止まることが示されている［2, 3]。そこで、S186F と S184W-V185P の 2 つの変異体を候補とした。

次に TGES ループを含む$^{179}$ILTGESVS$^{186}$に適当な配列を挿入することを考えた。ツールとして RosettaDesign（https://www.rosettacommons.org/）を利用し、ヘリックス template を用いた時に提示された配列は、ILGGSINKGEVS（MT8 と略す）であり 4 残基の挿入を含む。この配列では 2 つの Ile 間の 6 残基がヘリックスを形成すると期待された。しかし、12 残基中 Gly を 3 残基も含む配列は柔らかすぎるとも考えられたので、ツールに頼らず構造を検討した結果、TGES ループを挟む IL と SV を重複させ ILIL$^{181}$TGESVS$^{186}$VS（ADD4 と略す）が良いのではという結論になった。これが上手くいけば、挿入配列の繰り返しによって系統的にコブを大きく出来ると考えた。

その評価のために A ドメイン単独ではあるが 0.5〜1 $\mu$s という長時間の分子動力学計算を試みた。MT8 は構造が壊れてしまうが、ADD4 は TGES ループを挟む $\beta$ ストランドも正しく保たれ、さらに 2 残基ずつ付加して 8 残基挿入したものも安定であるとの計算結果になった。以上の結果を踏まえ、4 つの変異体を発現・精製してみることとした。

### 2. 変異体の発現

これまで recombinant SERCA の大量生産に当たっては、アデノウィルス・COS 細胞発現系を使用してきたが、アデノウィルス作製には 2 か月程度を要するため、時間がかかりすぎる。本研究ではクライオ電顕による構造決定でまずは十分であろうと考え、バキュロウィルス・浮遊 293 細胞系を採用した。生産効率はアデノウィルス系には劣るが、ウィルス作製は 2 週間ほどに短縮できるため、十分と判断した。Halo タグを N 末端に付加し精製に用いることにした。

### 3. 変異体の評価

発現膜蛋白質が正しい構造をとっているかどうかを評価するための有効な方法の 1 つは、蛋白質分解酵素による部分分解を可溶化前の膜標品に対して行うことである。正しい構造をとっていればドメイン構造があるためにズタズタになることは無い。SERCA の場合、proteinase K（PrtK）での部分切断が特に有用であり、切断パタンから生理的状態を推定できる。本研究の場合は、E1·2$Ca^{2+}$状態で ATP による燐酸化が正しく起こることが前提となるが、正しい構造をとっていれば、$Ca^{2+}$のみでは A ドメインと M3 ヘリックス間のリンクのみが切断されるのに対し、ATP の非加水分解アナログである AMPPCP（ACP と略す）を加えるとそのリンクも切断されなくなる［4]。このことは、3 つある細胞質ドメインがコンパクトな配置をとり、A ドメイン-M3 リンクを引っ張るためと考えられる。そこで、デザインした 4 つの変異体に関し、PrtK 切断の時間経過を見た（図 2)。

S184W 変異体、S184W-V185P 変異体は野生型とほぼ同等の切断パタンを示したが、MT8 では、SERCA 本体の 100 kDa バンドが野生型よりもかなり早く、明快な extra バンドを示すことなく消失した。しかし、不十分

とは言え、ACP による保護効果は認められるから、少なくとも部分的には正しい構造をとっている蛋白質も含まれると考えられる。このような挙動は以前に $Ca^{2+}$結合のゲートとなる E309 の Ala 変異体でも観察された［5］。それでも結晶解析まで可能であったので、この変異体は追求する価値はあると判断した。実際、Halo タグを利用した精製は可能であり、カラムからの溶出にも問題は無かった。これまで、発現はしているものの正しい構造をとらない場合は Halo タグ精製に失敗していたので、この結果は、MT8 は揺らぎが大きいだけで構造そのものは正しいことを示唆する。一方で、Add4 変異体に関しては、分子動力学計算では安定しており有望視していたが、膜標品の段階で多数のバンドが低分子量側に認められ、細胞側の品質管理によって切断されていることが示唆された。

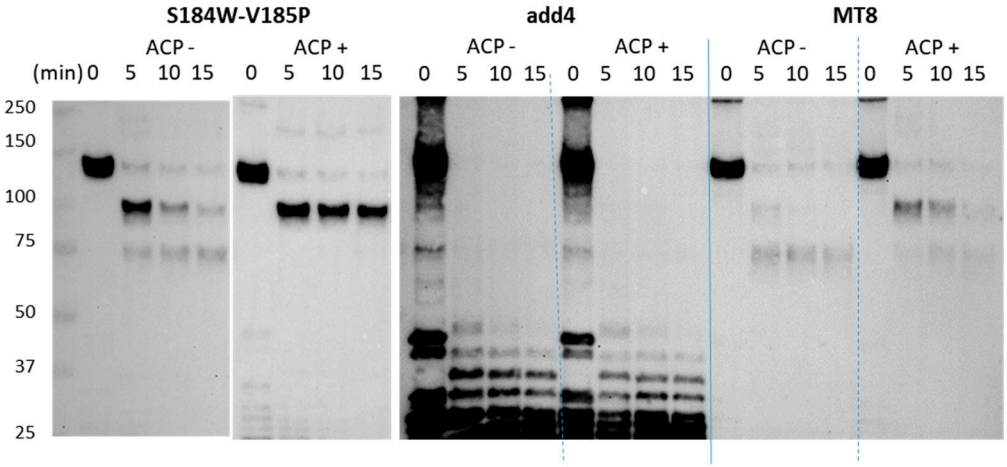



図 2. $Ca^{2+}$ポンプ変異体の proteinase K による部分切断
高等動物培養細胞（Exp293i と COS7）で Halo タグ付きで発現させた $Ca^{2+}$ポンプ（SERCA1a、～130 kDa）の proteinase K による部分切断の時間経過。先ず N 末に付加した Halo タグと SERCA 間が切断され 100 kDa バンドが生じるが、SERCA が正しく折りたたまれていれば、$Ca^{2+}$と AMPPCP（ACP）存在下ではそれ以上の切断は起こらない。SERCA1a の C 末端側抗体を用いた Western ブロット。

**4. 変異体の構造決定**

精製が上手くいった 3 つの変異体に関し、予備的なクライオ電顕観察を行った。その一例を図 3 に示す。一方で、ポジコンとして native SERCA（筋小胞体から精製した $Ca^{2+}$-ATPase）の単粒子解析を行った。既に $Na^{+}$ポンプに関しては、私たちの研究室で比較的高い分解能の構造決定に成功している［6］。そのため、この部分は容易と予想していた。しかし、$Ca^{2+}$ポンプの場合、意外なことに、燐脂質が十分存在する条件下では単量体から三量体まで（或いはそれ以上）のゆるい集合体を形成し、高い分解能での解析はなかなか困難であることが判明した（図 3b）。$Na^{+}$ポンプの場合は、ほとんどが二量体であり、単量体での解析も十分可能であった［6］。この$Ca^{2+}$ポンプ特有の問題の解決にはまだ時間を要する。

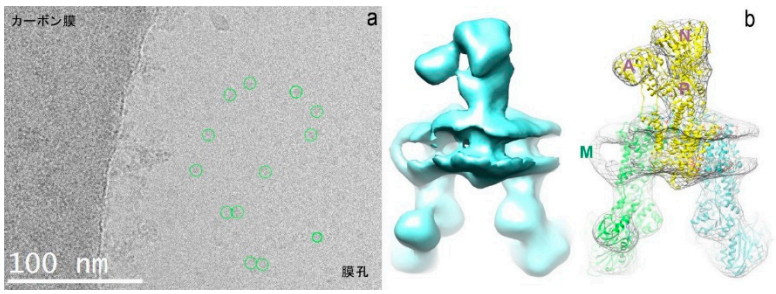



図 3. $Ca^{2+}$ポンプのクライオ電顕による構造解析

a）MT8 変異体のクライオ電顕像。$Ca^{2+}$ポンプの像と考えられるものに丸印を付加。

b）native $Ca^{2+}$ポンプのクライオ電顕・単粒子解析による低分解能三量体構造。密度図と原子モデルとの重ね合わせ。

## 考　察

現時点では 4 つの変異体を作製し、正しい構造をとっているかどうかの検討を行うとともに、2 つの変異体に関しては予備的なクライオ電顕観察まで行うことができた。予想外の困難に 2 つのステップで直面したため、研究の完成にはまだ時間を要することになってしまったが、一通りの過程を遂行できたことは大きな前進である。一番の驚きは長時間の分子動力学計算で安定であった Add4 変異体が正しく fold しなかったことである。分子動力学計算で検討できるのは、あくまでも作製した原子モデルの安定性であり、発現蛋白質がその構造をとるかは別問題である。とはいえ、この結果は驚きであり、戦略の改訂が必要である。レプリカ交換法を使うことも考えるが、蛋白質分解酵素による部分分解の有効性が確認でき、また、変異体設計から fold の評価に至るまでの過程も簡略化できることが判ったので、今後の進展は速いと予想する。E1P·ADP·$2Ca^{2+}$状態での構造検定には結晶化してしまった方が早いかもしれない。

## 共同研究者

本研究は、東京大学定量生命科学研究所膜蛋白質解析研究分野のメンバーが行ったものである。発現ベクターの作製は特任助教の西山尚士、蛋白質生産は学術支援職員の元山かん奈、蛋白分解酵素による評価は学術支援職員の中島理恵、クライオ電顕は特任講師の金井隆太、計算機による評価は特任研究員の恒川直樹が担当した。

## 文　献

1） Toyoshima C. How Ca-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. Biochim Biophys Acta. 2009 Jun;1793(6):941-6. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.10.008. Epub 2008 Oct 29. PMID: 19010358.

2） Anthonisen AN, Clausen JD, Andersen JP. Mutational analysis of the conserved TGES loop of sarcoplasmic reticulum $Ca^{2+}$-ATPase. J Biol Chem. 2006 Oct 20;281(42):31572-82. doi: 10.1074/jbc.M605194200. Epub 2006 Aug 7. PMID: 16893884.

3） Dode L, Andersen JP, Leslie N, Dhitavat J, Vilsen B, Hovnanian A. Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum $Ca^{2+}$-ATPase (SERCA) 1 and 2 isoforms and characterization of Darier disease (SERCA2) mutants by steady-state and transient kinetic analyses. J Biol Chem. 2003 Nov 28;278(48):47877-89. doi: 10.1074/jbc.M306784200. Epub 2003 Sep 15. PMID: 12975374

4) Danko S, Yamasaki K, Daiho T, Suzuki H, Toyoshima C. Organization of cytoplasmic domains of sarcoplasmic reticulum $Ca^{2+}$-ATPase in $E_1P$ and $E_1ATP$ states: a limited proteolysis study. FEBS Lett. 2001 Sep 7;505(1):129-35. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02801-0. PMID: 11557055.
5) Tsunekawa N, Ogawa H, Tsueda J, Akiba T, Toyoshima C. Mechanism of the E2 to E1 transition in $Ca^{2+}$ pump revealed by crystal structures of gating residue mutants. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Dec 11;115(50):12722-12727. doi: 10.1073/pnas.1815472115. Epub 2018 Nov 27. PMID: 30482857.
6) Kanai R, Cornelius F, Vilsen B, Toyoshima C. Cryo-electron microscopy of $Na^+$,$K^+$-ATPase reveals how the extracellular gate locks in the E2·$2K^+$ state. FEBS Lett. 2022 Oct;596(19):2513-2524. doi: 10.1002/1873-3468.14437. Epub 2022 Jul 6. doi: 10.1002/1873-3468.14437. PMID: 35747985.