

カルシウムポンプのイオン輸送機構の構造的解明

東京大学 分子細胞生物学研究所
豊島 近

Abstract

Calcium ATPase is an ATP-powered calcium pump and the best studied member of the P-type ion-transporting ATPases. Its crystal structures have been determined using SPring-8 for 5 different states that cover the whole reaction cycle. These structures show how the ion pump works and reveal what ATP and phosphorylation do.

カルシウムは骨や歯になるだけではない

生体は金属イオンを非常に巧みに使っている。蛋白質が安定に存在するために、また、酵素反応の触媒のために亜鉛や鉄、銅イオンを使い、また、細胞の内外で濃度差を作り、それを電気信号として使っている。例えば、同じ1価の陽イオンでも Na^+ は細胞外に多く、 K^+ は細胞内に多く存在し、神経が興奮するときは Na^+ が外から濃度勾配に従ってチャネル蛋白質を通じて流入し、膜電位が変化する。これが、興奮の実体であり、電気信号と化学信号の橋渡しにもイオンが使われている。

数あるイオンのうち、生体反応の制御のためにもっとも広範に使われ重要な働きをするのは、カルシウムである。人体には1400グラムのカルシウムがあるが、その大部分は骨や歯で、信号の伝達に使われるのは10グラムにも満たないとされる。しかし、その働きは大変重要である。たとえば、筋肉の収縮弛緩を例にとって見ると、筋小胞体とよばれる筋繊維を取り囲む袋状の組織があり、カルシウムの貯めになっている。この貯めからカルシウムが放出されると収縮がおこり、もう一度カルシウムをポンプを使って汲み上げると弛緩が起こる。カルシウムを汲み上げるためには、小胞体内外でのカルシウムの濃度差に関係なく、一万倍の濃度差に打ち勝って、カルシウムを運搬（能動輸送）する必要があり、そのエネルギー源としてATPが分解される。

つまり、カルシウムポンプの実体は、小胞体膜に埋まった膜蛋白質であり、ATPを分解する酵素で、 Ca^{2+} -ATPaseと呼ばれる。このポンプは一個のATPを分解して2個のカルシウムを運ぶことができる。

筋肉の収縮弛緩を十分な速さで行うために、筋小胞体膜の全膜蛋白質の60%をこのポンプ蛋白質が占めており、構造解析にあたって最初に解決しなければならない「量の問題」は存在しない。（実際、我々の競争相手であるデンマークグループは、膜結合蛋白質を除いただけの試料から結晶化に成功している。）

運搬に当たっては、カルシウム結合部位の構造を高親和性で細胞質を向いている（E1）状態から低親和性で細胞外を向いている（E2）状態に変化させて、濃度勾配に依存しない運搬を行っていると考えられている。この蛋白質の間には、高等生物ならどの細胞にもある Na^+K^+ ポンプや、胃のpHを低く保つのに使われる H^+K^+ ポンプ（胃潰瘍の原因にもなる）があり、いずれも、細胞の恒常性を保つのに大変重要である。そのために、医薬品の対象にはなりにくい、抗マラリア薬の標的がマラリアのカルシウムポンプであることが判明し、新薬の開発もされて話題になった。

SPring-8での回折実験

さて、私の研究室は1988年以来、この膜蛋白質の構造研究に集中してきた。最初は電子顕微鏡によるチューブ状結晶の解析で、分解能は8 Å止まり（ヘリックスが何とか見える分解能）であったが、1998年にX線結晶解析にかかる3次元結晶を作ること成功した。それ以降、研究は順調に進み、反応サイクル全体をカバーする5つの状態の構造を2.3~2.9 Å分解能で解き、イオンのポンプ機構のほぼ全貌を明らかにすることが出来た^[1-5]。2000年の

論文^[1]は、陽イオンのポンプとして初めての構造であり、広範な分野で注目を集めた。初期の回折実験はSPring-8の立ち上げ時期に重なっており、使用したビームラインもBL44B2（理研）BL41XU（共用）BL44XU（蛋白研）BL40B2（共用）とさまざまであるが、最近はおそらくBL41XUを利用している。特に、E2状態の結晶はc軸方向（脂質二重膜が積み重なる方向で座布団の厚さの方向）の格子の長さが600 Å近くあり、分解能は現在2.4 Åなので、R-Axis Vが必須だからでもある。図1に一例を示すが、4,000 × 4,000のR-Axis Vでもやっとであり、もっと大きな検出器が欲しい。カルシウムポンプの結晶は、いずれも、脂質二重膜が多数積み重なった形の三次元結晶であり、板状であることが多く、厚さも20 μmに満たなかったりする。従って、SPring-8が立ち上がっていなかったら、この研究はほとんど不可能であった。独走しているつもりであったが、4年もすれば追いつかれるもののように、2004年発表の2つの論文^[3, 4]ではデンマークグループと熾烈な競争になった。

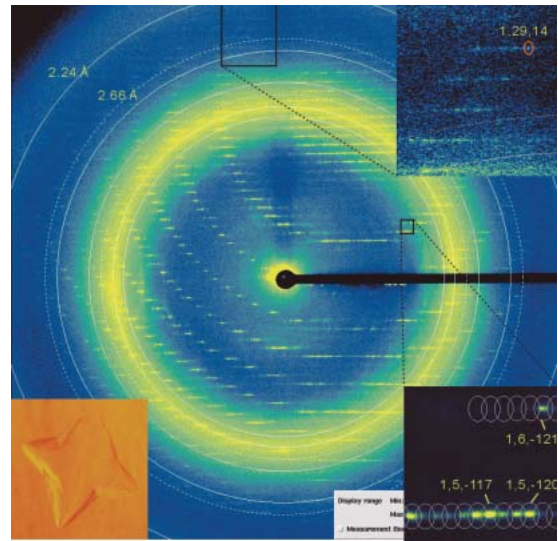


図1 骨格筋筋小胞体Ca²⁺-ATPase（ポンプ）のカルシウム非存在時の結晶とその回折パターン。この結晶は約1辺600 μm、厚さ50 μmほどあり、空間群はP4₁、格子定数はa = b = 71.4 Å、c = 591.0 Å。回折点（1, 29, 14）は1/2.46 Å⁻¹にある。

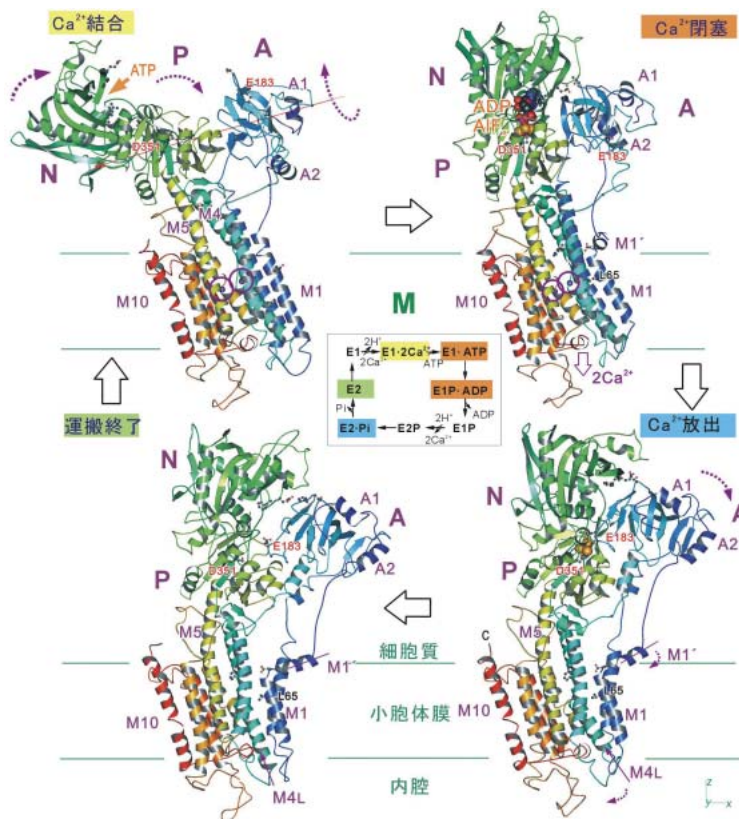


図2 Ca²⁺-ATPaseの4つの基本状態の構造。骨格筋筋小胞体Ca²⁺-ATPaseは10本の膜貫通ヘリックスと3つの細胞質ドメインを持つ分子量11万の膜蛋白質である。膜内に結合したCa²⁺は紫色の円で囲ってある。

イオンポンプのメカニズム

骨格筋の筋小胞体カルシウムポンプ (SERCA1a) は994個のアミノ酸残基がつらなった分子量約11万の一本のポリペプチド鎖によって構成されており、細胞質領域の3つのドメイン (A、NおよびP) と10本の膜貫通ヘリックス (M1-M10) より成る (図2)。細胞質領域には反応の途中で磷酸化が起こるPドメイン、ATPのアデニン環部分が結合するNドメイン、カルシウムの通路のゲートの開け閉めのレバー (actuator) となるAドメインがある。ATPaseとしての大きな特徴は、反応サイクルの途中で自己磷酸化が起こる (そのためにP型ATPaseと呼ばれる) ことであり、この点、ミオシンやF1とは大きく異なる。磷酸化される残基はAspであり、バクテリア型である。実際、二次構造要素の並び方は異なるものの、バクテリアの二成分制御系蛋白質と磷酸化反応に使われる残基は同一である。

得られた結晶構造は、 Ca^{2+} 2個を結合した $\text{E1}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$ 、それにATPの非加水分解類似物であるAMPPCPが結合した $\text{E1}\cdot \text{AMPPCP}$ 、ATPの代わりに、安定な磷酸類似物である AIF_x とADPが結合した $\text{E1}\cdot \text{AIF}_x\cdot \text{ADP}$ (状態としては磷酸の転移が起こった直後の $\text{E1P}\cdot \text{ADP}$ に相当) Ca^{2+} 非存在下で磷酸の安定な類似物である MgF_4^{2-} が結合した $\text{E2}\cdot \text{MgF}_4^{2-}$ (厳密にはE2Pではなく、product stateである $\text{E2}\cdot \text{Pi}$ に相当) Ca^{2+} 非存在下のE2 (但し、強力阻害剤であるthapsigarginで安定化) と5つあるが、 $\text{E1}\cdot \text{AMPPCP}$ と $\text{E1}\cdot \text{AIF}_x\cdot \text{ADP}$ の構造はほとんど同一であるため、構造的には、反応サイクルは4つの基本状態からなると考えられる (図2)。 Ca^{2+} の運搬に伴う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、随所に構造的工夫が凝らされている。 Ca^{2+} の結合部位は膜貫通ヘリックスM5、M6、M8で作られるサイトとほとんどM4ヘリックスの上にM4-M6で作られるサイトから成り、サイトが一個目のカルシウム結合サイトである (図3)。両方のカルシウムに配位するのはD800 (M6) のみである。磷酸化残基であるD351とは約50 Å離れている。

構造変化の大略を以下に記すが、重要なことはAドメインが膜内 Ca^{2+} 通路のゲートの開閉を制御するアクチュエーターであり、他の二つのドメインはATPの結合や磷酸化によってAドメインとのインターフェースを変え、それによってAドメインの位置を制御していることである。

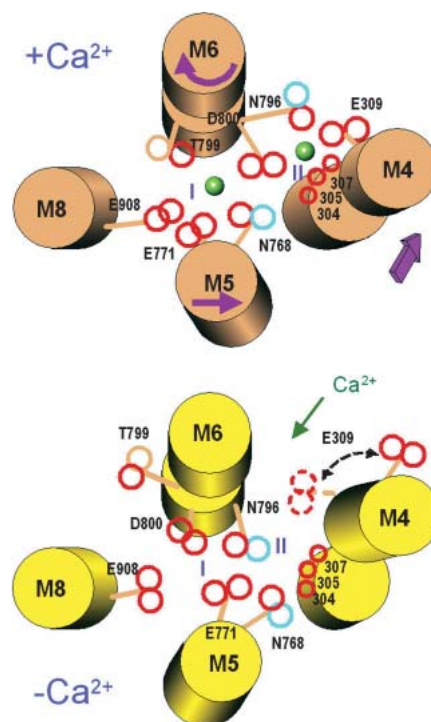


図3 膜貫通領域にある Ca^{2+} 結合サイトの Ca^{2+} 存在時、非存在時の構造の模式図。円筒はヘリックスを示す。脂質二重膜にほぼ直角に細胞質側から見たもの。矢印は Ca^{2+} の離脱に伴うヘリックスの動きを示す。

Ca^{2+} が無い状態 (E2、図2、4左下) では、3つの細胞質ドメイン (A、N、P) は寄り集まって、閉じた構造をとっている。M5ヘリックスは大きく湾曲しており、M3、M4ヘリックスは下に下がっている。古典的モデルと違って内腔側ゲートは閉じており、細胞質側ゲートは開いている。

そこに Ca^{2+} が来て、ポンプ蛋白質に結合すると ($\text{E1}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$) M5ヘリックスはまっすぐになり、Pドメインと一緒に起き上がって、3つの細胞質ドメインは離れる (図2、4左上)。その結果、ATPは自由に動けるようになったNドメインに結合できる。

Nドメインが傾斜してPドメインに近い位置に来ると、ATPの磷酸側がPドメインに結合できるようになる ($\text{E1}\cdot \text{ATP}$)。その結果、ATPがNドメインとPドメインを橋渡し、 Mg^{2+} もPドメインに結合する結果、Pドメインは変形しAドメインとNドメインも結合する。このとき、Aドメインは30°傾斜し、M3ヘリックスとAドメインを結ぶループが引張られ、力のかかった状態が実現される。Aドメインの

すとかいったことは起こっていない。

そのエネルギーは逆反応を抑え、正反応しか実現しないために使われているのではないか。燐酸化にしても同様である。また、いずれの反応でも Mg^{2+} が必須であるのは、協同的にすることによって逆反応を抑えているのではないか。熱エネルギーを有効に利用するために、大きなドメイン運動を用い、ATPや Mg^{2+} などによってドメイン間インターフェースを変えると「大きな」調節を行っている。ゲートの開閉にしても、残基レベルではなくヘリックスの再配置を使っている。それによって、熱運動という方向性のない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している。それが、この大きな構造変化が教えていることであろう。

謝 辞

結晶のほとんどは技官の野村博美さん（現、生理研）が、E1-AMPPCPの結晶は修士課程の学生であった水谷龍明君が作製したものである。E1-2Ca²⁺の最初のモデリング（1 EUL）は中迫雅由博士（現、慶応大学）が行った。X線回折実験では他に小川治夫博士（現、ネバダ大学）、津田岳夫博士の協力を得た。SPring-8の実験では各ビームライン担当者の多大な協力を頂いているが、特に、BL41XUの担当者である河本正秀博士には本研究の当初から尽力頂いた。記して、深く感謝申し上げる。

参考文献

- [1] C. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura and H. Ogawa : Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* **405** (2000) 647-655.
- [2] C. Toyoshima and H. Nomura: Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* **418** (2002) 605-611.
- [3] C. Toyoshima and T. Mizutani: Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* **430** (2004) 529-535.
- [4] C. Toyoshima, H. Nomura and T. Tsuda : Luminal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature* **432** (2004) 361-368.
- [5] C. Toyoshima and G. Inesi: Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **73** (2004) 269-92.

豊島 近 TOYOSHIMA Chikashi

東京大学 分子細胞生物学研究所 教授
〒113-0032 東京都文京区弥生1-1-1
TEL : 03-5841-8492 FAX : 03-5841-8491
e-mail : ct@iam.u-tokyo.ac.jp

課題番号 : 1999A0175-NL-np
1999B0155-CL-np
2000A0236-CL-np
2000B0263-CL-np
2001A0048-CL-np
2001B0068-NL-np
2002A0015-NL1-np
2002B0270-NL1-np
2002B0271-NL1-np
2003A0470-NL1-np
2003A0471-NL1-np
2003B0363-NL1-np
2004A0455-NL1-np
(実験責任者 豊島 近)

使用ビームライン : BL41XU
シフト数 : 計75シフト

課題番号 : C00B44XU-7139N
C01B44XU-7404N
C02A44XU-7333N
C02B44XU-7333N
(実験責任者 豊島 近)

使用ビームライン : BL44XU
シフト数 : 計28.5シフト