

長期利用課題報告

膜能動輸送体の結晶学的研究

東京大学 分子細胞生物学研究所
金井 隆太、小川 治夫、豊島 近

Abstract

細胞内外のイオン濃度勾配は、神経の電気信号や浸透圧調節、物質輸送のためのポテンシャルエネルギーに使われ、生命活動の基盤に必須のものである。ナトリウムポンプは、ATP1分子当たり3個の Na^+ を細胞内から細胞外へ、2個の K^+ を細胞外から細胞内へ能動輸送し、イオン濃度勾配を形成する膜蛋白質である。我々は、2009年に K^+ と結合した状態のナトリウムポンプの構造を決定したが、今回、 Na^+ と結合した状態の構造を2.8 Å分解能で決定し、3個の Na^+ が結合した様子を詳細に明らかにすることに成功した。その結果、どのようにしてナトリウムポンプが Na^+ を選択的に輸送できるのか、その巧妙な仕組みを明らかにすることができた。

1. はじめに

2013A期からBL41XUを利用して、長期利用課題「膜能動輸送体の結晶学的研究」を遂行した。この長期利用課題は、ポンプ蛋白質のイオン能動輸送機構の原子構造に基づいた完全な理解を目指すもので、具体的には以下の4つのテーマからなる。(i) 10年以上にわたって追及してきた筋小胞体カルシウムポンプの反応サイクルの全ての中間体の結晶構造を明らかにすること、また今やカルシウムポンプの大量発現・精製が可能になったので、その変異体、調節蛋白質との複合体、心筋カルシウムポンプの構造解析を進めること、(ii) 医学的にはより重要で、激しい国際競争が続いているナトリウムポンプの反応中間体や薬剤複合体の結晶解析を進めること、(iii) 植物のプロトンポンプであり、ATPの代わりにピロリン酸をエネルギー源とする H^+ -PPaseの構造研究を進めること、(iv) コントラスト変調法や重原子同型置換法を用いて膜蛋白質結晶の脂質二重膜を可視化すること、である。この4つのテーマに関していずれも大きな進展があったが、(ii)に関して Na^+ が結合した状態のナトリウムポンプの構造をNature誌に発表したの¹⁾、本稿ではその解説を行うことにしたい。

2. ナトリウムポンプとは

全ての細胞は脂質二重膜で外界と仕切られてお

り、イオンは脂質二重膜をほとんど透過できないので、細胞内外のイオン組成は大きく異なる。例えば、 Na^+ は細胞外に豊富（細胞内：5~15 mM、細胞外：145 mM）に存在し、 K^+ は細胞内に多く存在する（細胞内：140 mM、細胞外：5 mM）。細胞内外のイオン濃度勾配は神経の電気信号や浸透圧調節、細胞内外への物質輸送のためのポテンシャルエネルギーとして使われ、生命活動の基盤に必須である。そのイオン濃度勾配の形成を担うのがポンプ蛋白質である。ナトリウムポンプ (Na^+, K^+ -ATPase) は先に触れた Na^+ と K^+ の濃度勾配を形成するポンプ蛋白質で、筋収縮に重要な筋小胞体の Ca^{2+} の濃度勾配を形成するカルシウムポンプや胃の酸性pHを形成するプロトンポンプなどと同じP型ATPaseファミリーに属する。

P型ATPaseは、濃度勾配に逆らって物質を輸送するためにエネルギーを必要とする。そのエネルギーの源としては生体エネルギーの通貨であるATP（アデノシン三リン酸）が使われる。ナトリウムポンプはATP1分子当たり3個の Na^+ を細胞内から細胞外へ、2個の K^+ を細胞外から細胞内へ濃度勾配に逆らって輸送する（図1a）。イオン輸送の反応サイクルは、イオンの結合親和性が異なる2つの状態（E1、E2と呼ぶ。）から説明される。E1状態では Na^+ に対して高親和性で、イオン結合サイトは細胞質側を向いており、細胞外側ゲートは閉じてい

る。この状態では細胞質側ゲートは開いているので、ナトリウムポンプは細胞質にある Na^+ と結合する。この時、ATP も結合すると、ATP の γ 位の磷酸基は Asp 残基に転移され (磷酸基転移反応)、細胞質側ゲートが閉じる。ナトリウムポンプから ADP が遊離すると、直ちに E2 状態 (イオン結合サイトが細胞外側を向き、 Na^+ に対して低親和性で相対的に K^+ には高親和性な状態) に変化し、同時に細胞外

側ゲートが開く。こうして Na^+ は細胞外へ放出され、空いたイオン結合サイトに K^+ が結合する。すると、今度は磷酸化 Asp が加水分解され (脱磷酸化反応)、細胞外側ゲートは閉じる。磷酸が遊離し、再び ATP が結合すると、細胞質側ゲートが開くと同時に E1 状態に戻り、 K^+ は細胞内へ放出される。

ナトリウムポンプは、200 年以上前から心不全の治療薬として使用されているジギタリス類の標的

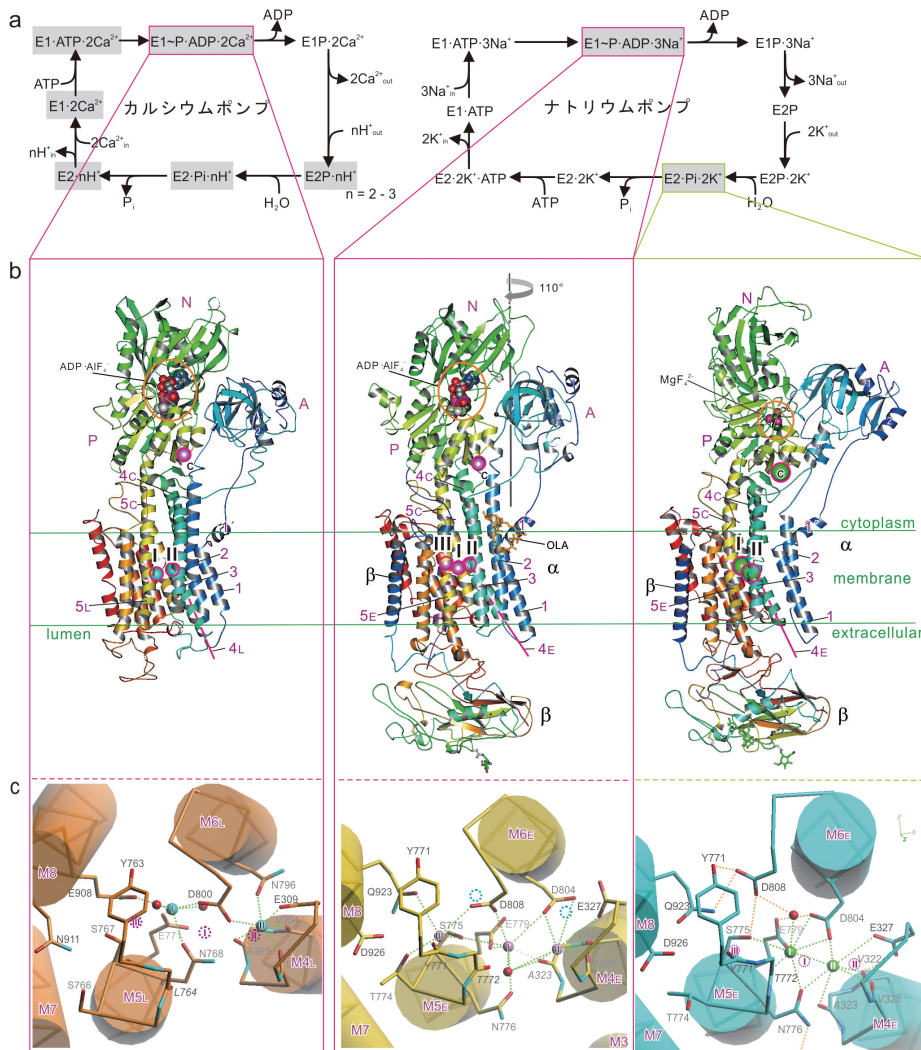


図 1 (a) ナトリウムポンプとカルシウムポンプの反応サイクル。(b) 今回決定した E1~P-ADP-3Na⁺ 状態 (中央) と既に明らかになっている E2~Pi-2K⁺ 状態 (右) のナトリウムポンプ、E1~P-ADP-2Ca²⁺ 状態のカルシウムポンプ (左) の全体構造。膜貫通領域に輸送のためのイオン結合サイト (I~III) がある他に、細胞質側の P-ドメインには安定化に関わる 1 価陽イオン結合サイト (C) がある。10 本ある膜貫通ヘリックス (M1-M10) のうち、M1-M5 は 1-5 でラベルした。ヘリックス番号後ろの “C” は細胞質側、“E” は細胞外側、“L” は筋小胞体内腔側を示す。この向きでは FXYD は α サブユニットの裏側に来るため見えない。(c) 膜貫通領域のイオン結合サイトを細胞質側から見た図。 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、水分子をそれぞれピンク、緑、シアン、赤色の球で示す。紫の点線の円はナトリウムポンプの Na^+ 結合サイトを、シアンの点線の円はカルシウムポンプの Ca^{2+} 結合サイトを表している。

蛋白質であり、また近年では多くの神経疾患やアルツハイマーとの深い関連も示唆されている。従って、ナトリウムポンプの構造研究は疾患のメカニズムの理解や薬剤開発に極めて重要である。ナトリウムポンプは Na^+, K^+ -ATPase と呼ばれるが、実は K^+ の代わりに様々な 1 価の陽イオンを細胞内に運ぶことができ、 Na^+ や有機陽イオンさえも運ぶことができる。従って、 K^+ はナトリウムポンプが働く上で必須ではない。一方、 Na^+ の代わりに細胞外へ運べるのは Li^+ と H^+ だけである。このようなことから Na^+, K^+ -ATPase は本質的にはナトリウムポンプである。興味深いのは、E1 状態であっても Na^+ に対する結合親和性は数 mM で低いにもかかわらず、厳密に Na^+ を選別し、かつ 3 個の Na^+ が結合した時にのみ磷酸基転移反応が進行して、細胞質側ゲートは閉じる。これまでにナトリウムポンプの E2 状態の結晶構造は既に明らかにされているが^[2-5]、ナトリウムポンプの本質というべき E1 状態の構造は報告されていない。一体、3 個の Na^+ 結合サイトはどのようなものであろうか？類似のカルシウムポンプは 3 個の Na^+ の代わりに 2 個の Ca^{2+} を運ぶ。 Ca^{2+} が結合した E1 状態のカルシウムポンプの構造は既に明らかになっており、 Ca^{2+} に配位するアミノ酸残基はナトリウムポンプでも見事に保存されている。従って、ナトリウムポンプの 3 個の Na^+ 結合サイトのうちの 2 個は、カルシウムポンプの Ca^{2+} 結合サイトと似ていると予測される。しかし、それらのイオン選択性は全く異なり、しかもカルシウムポンプの Ca^{2+} の結合親和性は $0.1 \sim 1 \mu\text{M}$ 程度で極めて高い。なぜ、このような性質の違いが生じるのであろうか？そして、3 個目のイオン結合サイトはどこにあるのだろうか？

そこで我々は Na^+ 、ADP、磷酸アナログ (AlF_4^- 、 Al^{3+} を中心に 4 個の F^- が平面四角形に配置したもので、遷移状態の磷酸基アナログ) 存在下で E1 \sim P-ADP- 3Na^+ 状態 (3 個の Na^+ が結合し、ATP から γ 位の磷酸基が Asp 残基に転移される直前の状態で、細胞質側ゲートは閉じている。) のナトリウムポンプを結晶化し、SPring-8 のビームライン BL41XU にて 2.8 \AA の回折データを収集、構造決定に成功した。その結果、ナトリウムポンプは Na^+ を選択的かつ効率的に運ぶために驚くべき様々な仕組みを備えることが分かった。そして、それはカルシウムポンプの Ca^{2+} を運ぶ仕組みとは全く異なっていた。

3. ナトリウムポンプ E1 \sim P-ADP- 3Na^+ 状態の結晶構造解析

図 1b には今回明らかにした E1 \sim P-ADP- 3Na^+ 状態のナトリウムポンプの全体構造を示す。ナトリウムポンプはカルシウムポンプと相同である α サブユニット、高度に糖鎖修飾された β サブユニット、組織特異的調節因子 FXYP 蛋白質の 3 つからなる、分子量およそ 160 kDa の巨大膜蛋白質複合体である。単量体であるカルシウムポンプに比べて複雑で、しかも脂質として、phosphatidylserine やコレステロールを必要とするなど、結晶化はカルシウムポンプよりもはるかに困難であり、構造決定にはおよそ 3 年を要した。図 1b に示すように α サブユニットは 3 つ (A: アクチュエーター、N: ヌクレオチド結合、P: 磷酸化) の細胞質ドメインと 10 本の膜貫通ヘリックス (M1-10) からなる。 β サブユニットは細胞質側の短い N 末端領域と 1 本の膜貫通ヘリックス、細胞外側ドメインからなる。FXYP 蛋白質も 1 本の膜貫通ヘリックスを持ち、その前後に数 10 残基からなる N 末端、C 末端領域を持つ。

さて、 Na^+ 結合サイトに注目すると、カルシウムポンプの 2 個の Ca^{2+} 結合サイト I、II に相当する Na^+ 結合サイト I、II が存在し、その Na^+ 結合の cavity の一番奥にサイト III が位置していた (図 1c, 2)。この Na^+ 結合サイトの構造を詳細に解析すると、3 つの

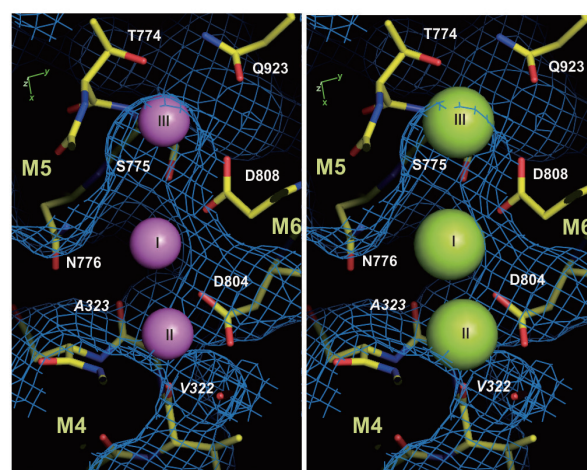


図 2 Na^+ 結合サイトの cavity を細胞質側から見た図。青のネットは Na^+ がアクセスできる蛋白質表面を表す。(左) ピンクの球は正しい大きさを示した Na^+ 。(右) 仮想的に Na^+ の代わりに K^+ を置き、 K^+ のイオン半径で表示 (緑の球)。 Na^+ は cavity に収まるのに対し、 K^+ は特にサイト II、III からはみ出すことが分かる。

重要な特徴が明らかになった。① Na^+ 結合サイトは小さく、かつ揺らぎが小さくなるようにデザインされており、小さなイオン、すなわち Na^+ (イオン半径 = 0.95 Å, K^+ は 1.33 Å。) しか入れない。② 3つの Na^+ 結合サイトは Na^+ 同士でないと結合できないように近接して配置されている。すなわち、 K^+ ではサイズが大きいため、 Ca^{2+} では静電的な反発力のために Na^+ のように近接して結合できない。ATP1 分子当たり 3 個の Na^+ を運ぶのは単に効率のためだけでなく選択性のためでもある。③ E2 状態の K^+ の結合と同様、最初の Na^+ は M5 ヘリックス (以下、M5 と記す。) のほどけた部分に結合する (サイト III)。M5 はポンプ蛋白質の背骨であり、3 つある細胞質ドメインの配置を制御している。正しい大きさである Na^+ が結合した時だけ M5C (M5 は膜中央付近でほどけており、M5 の細胞質側半分を M5C と呼ぶ。) の傾きは正しくなり、ATP からの磷酸基転移が可能ないように細胞質ドメインが配置する。ドメイン間のヒンジ部分にリガンドが結合した時のみ反応が起こるようにするのがアロステリック制御の主要な形であるが、ここではそれが正しい大きさのイオンの結合という極限の形で行われ、高い効率と特異性が生み出されていることが明らかになった。また、カルシウムポンプにはない、長い C 末端領域と β サブユニットが M5 の傾きの精確な制御に貢献していることも示された。

ナトリウムポンプではカルシウムポンプに比べて、より多くの主鎖カルボニルがイオン結合サイトに寄与している。しかも、カルシウムポンプで Ca^{2+} 結合サイト II に寄与している M4E (M4 も膜中央付近でほどけており、M4 の細胞外側半分を M4E と呼ぶ。ただし、筋小胞体カルシウムポンプは筋小胞体膜に局在し、細胞外ではなく、筋小胞体内腔側を向いているため、M4L と呼ぶ。) の主鎖カルボニルがナトリウムポンプでは Na^+ 結合サイト I と II 両方に寄与している。その結果、カルシウムポンプの Ca^{2+} 結合サイトはヘリックスバンドルの中央にあるのに比べて、ナトリウムポンプの Na^+ 結合サイトは M4E、M5 方向にずれている (図 1c) のだが、単にそれだけではない。1 つは、側鎖に比べて揺らぎが小さい主鎖カルボニルの寄与は、イオン結合サイトのサイズを厳密に制御するのに適していることである。もう 1 つは、M4E にある Ala323 の主鎖カルボニルが、サイト I の Na^+ 結合に寄与す

ることでサイト II がサイト I に近接したところになることである。

このサイト I とサイト II の近接は、Ala323 のサイト I の Na^+ 結合だけでなく、M4E が膜に平行な方向により傾いていることにもよる (図 3)。これはナトリウムポンプでは M4E と M5E の間でより大きな側鎖の疎水性残基 (Phe316、Phe783) 同士がコンタクトしているからである。

M6 にある Asp804 側鎖はサイト I とサイト II の Na^+ に、M5 の Ser775 側鎖と M6 の Asp808 側鎖はサイト I とサイト III の Na^+ に配位している (図 1c)。1 個の側鎖が 2 個のイオン結合に寄与するのは特徴①のイオン結合サイトの大きさを制御し、揺らぎを小さくするのに重要であるだけでなく、3 個

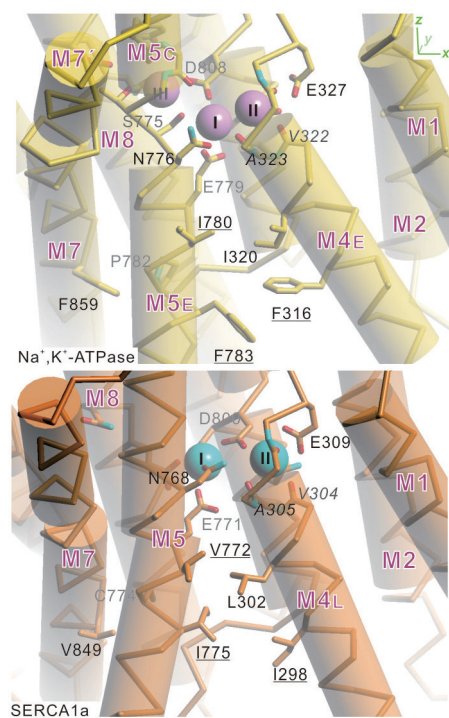


図 3 ナトリウムポンプ (上: 黄) とカルシウムポンプ (下: オレンジ) の膜貫通領域のイオン結合サイトと M4 の傾きの違い。膜に平行に見たもの。ナトリウムポンプの M5 は膜中央付近でほどけており、M5C と M5E に分かれているのに対し、カルシウムポンプの M5 は曲がっているものの、連続的な 1 本のヘリックスである。ナトリウムポンプの M4E と M5E の間では Phe316、Phe783 などの大きな側鎖を持つアミノ酸残基がコンタクトしており、M4E はカルシウムポンプに比べて傾き、サイト I と II を接近させている。

の Na⁺ 結合が段階的に、かつ協調的に起きる仕組みを説明するものである (図 4)。すなわち、サイト III に Na⁺ がやって来ると、Ser775 側鎖と Asp808 側鎖が配位すると同時に、サイト I が形成される。そこへ 2 個目の Na⁺ がやって来ると、Asp804 側鎖や Ala323 主鎖カルボニルが配位して、サイト II が形成される。そして、3 個目の Na⁺ がサイト II に結合すると、M4C の位置が変わり、P ドメインが曲がって Asp 残基は磷酸化されると考えられる。このようにナトリウムポンプは驚くべき緻密な仕組みで Na⁺ を厳密に選別し、効率的に輸送することが明らかになった。

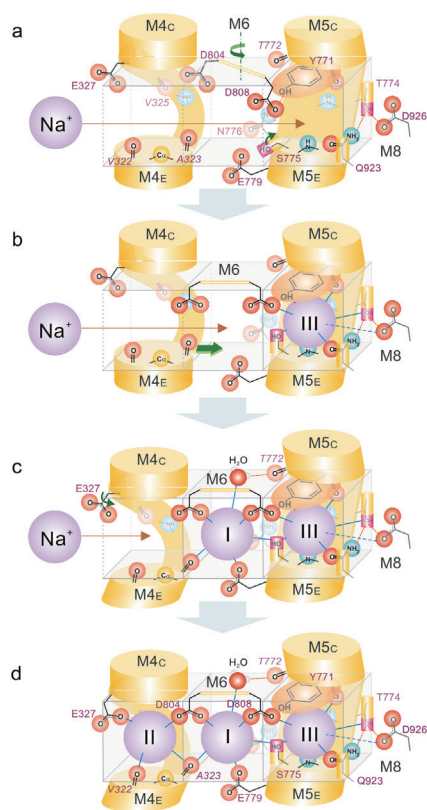


図 4 ナトリウムポンプによる段階的、協調的な Na⁺ 結合のメカニズム。

謝辞

本研究の回折データは全て SPring-8 BL41XU を利用して得られたものである。ビームラインスタッフの長谷川和也博士、奥村英夫博士にはこの場を借りて深くお礼申し上げる。

参考文献

- [1] R. Kanai, H. Ogawa, B. Vilsen, F. Cornelius and C. Toyoshima: *Nature* **502** (2013) 201-206.
- [2] J. P. Morth *et al.*: *Nature* **450** (2007) 1043-1049.
- [3] T. Shinoda, H. Ogawa, F. Cornelius and C. Toyoshima: *Nature* **459** (2009) 446-450.
- [4] H. Ogawa, T. Shinoda, F. Cornelius and C. Toyoshima: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106** (2009) 13742-13747.
- [5] H. Ogawa, F. Cornelius, A. Hirata and C. Toyoshima: *Nat. Commun.* **6** (2015) 8004.

金井 隆太 KANAI Ryuta

東京大学 分子細胞生物学研究所
〒113-0032 東京都文京区弥生1-1-1
TEL : 03-5841-8942
e-mail : ryuta-kanai@iam.u-tokyo.ac.jp

小川 治夫 OGAWA Haruo

東京大学 分子細胞生物学研究所
〒113-0032 東京都文京区弥生1-1-1
TEL : 03-5841-1916
e-mail : haru@iam.u-tokyo.ac.jp

豊島 近 TOYOSHIMA Chikashi

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