

長期利用課題報告

イオンポンプの結晶構造解析

東京大学 定量生命科学研究所
豊島 近

Abstract

一連の長期利用課題は「イオンポンプ蛋白質 (P 型 ATPase) の作動機構を原子構造に基づいて完全に理解すること」を目標とし、すべての可能な中間体の構造決定を進めている。その反応サイクルでは ATP によるポンプ蛋白質の自己リン酸化が起こるが、その構造変化は大規模且つ複雑すぎて因果関係は良く分からなかった。そこで最重要の中間体 (ポンプ蛋白質+ATP+Ca²⁺の三者複合体) に到達する複数の経路を追及することでその解明を目指した。本課題では Ca²⁺非存在下 (E2) で ATP を結合した状態 (E2·ATP) の Ca²⁺ポンプの結晶構造解析を行い、「何故 ATP によるリン酸化のためには Ca²⁺の結合が必須なのか」「何故 E2 状態では無機リン酸によるリン酸化が可能であるのに、Ca²⁺結合状態では不可能なのか」という根本的問題にアプローチした。

1. はじめに

2020A 期から BL1XU において、長期利用課題「イオンポンプの結晶構造解析」を研究室のメンバー (金井隆太助教、梶島佳樹助教) とともに遂行した。この長期利用課題は「イオンポンプ蛋白質によるイオン能動輸送機構の原子構造に基づく理解」の完成を目指すものであり、具体的には (i) 25 年以上にわたって追求してきた筋小胞体 Ca²⁺ポンプ (Ca²⁺-ATPase、sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase (SERCA)) (ATPase は ATP 加水分解酵素) の反応サイクル中間体の結晶構造解析、(ii) 医学的生物学的にはより重要とも言えるナトリウムポンプ (Na⁺,K⁺-ATPase、NKA) の複数の状態の結晶解析、(iii) 「結晶中の脂質二重膜を可視化」し膜蛋白質が働く「場」である脂質二重膜とポンプ蛋白質との相互作用を解明すること、の 3 テーマから成る。

究極の目標は「蛋白質がどうしてそういう構造でなければならないのか」を理解することである。そのために、可能なすべての中間体の構造決定を目指している。SERCA に関しては、既に 10 個の中間体の構造を発表したが、本長期利用課題により 6 つ (図 1)、NKA に関しても 4 つの中間体の結晶構造を新たに決定できた。これまでは、一つだけ (図 1 では一番外側) の反応経路に沿った中間体の構造決定に集中してきたが、異なった経路の中間体構造に踏み込むことで、予

想外に大きな構造情報が得られることが分かった。

例えば、Ca²⁺を結合した SERCA の ATP によるリン酸化に際しては一度に多くの構造変化が起こるために^[1]、何が原因で何が結果なのかよく分からなかったが、Ca²⁺非結合時の ATP 結合状態 (E2·ATP) の構造決定により、ATP の結合だけでどこまでの構造変化が起こるかが明らかになった^[2]。また、NKA の作動原理は SERCA と同じだろうから、一方だけの構造決定で十分と考えていたが、対応する状態の構造が両者で明らかになるにつれ、作動原理は確かに同じだが、その実装 (例えば、A ドメインは何度傾斜するのかとか) は大きく違っていることが分かってきた^[3,4]。その実装の違いは、運搬するイオンの違いや要求される性能 (回転速度とか) によるものはずで、対応する構造の比

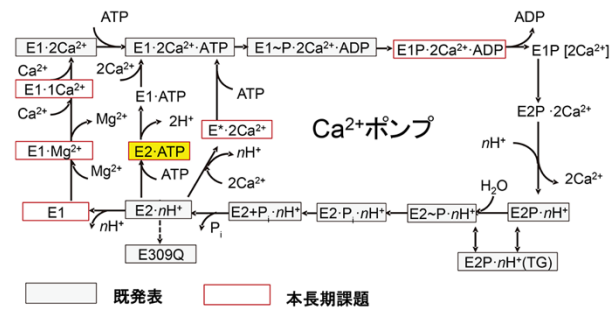


図 1 Ca²⁺ポンプの反応ダイアグラム。□で囲った中間体の原子構造は決定済み。E1/E2は Ca²⁺に対し高親和性/低親和性を意味し、P はリン酸化を、P_iは無機リン酸を示す。

較によって得られる知見は予想を遥かに超える本質的なものであった。本稿では既に PNAS 誌に発表した SERCA の E2·ATP 構造²⁾に関してやや詳しく述べる。

2. Ca²⁺ポンプの反応サイクルとイオン輸送

筋小胞体 Ca²⁺ポンプは約 1,000 個のアミノ酸残基よりなる膜内在型膜蛋白質である。速筋の SERCA1a、心筋の SERCA2a、ともに 10 本の膜貫通ヘリックス (M1-M10) と 3 つの明瞭に分離した細胞質ドメイン (Actuator, Nucleotide binding, Phosphorylation) から成る (図 2)。Ca²⁺ポンプは濃度勾配に逆らってイオンを運搬するのでエネルギーを必要とし、ATP の加水分解を行うが、反応のメカニズムはミオシンを含む他の ATPase とは大きく違う。Ca²⁺ポンプの場合、N ドメインにアデニン環で結合した ATP の γ 磷酸は、まず、P ドメインにある Asp 残基に転移されるが、ここでは水分子の直接的関与はない。標準状態では、カルボキシル基の磷酸化はエネルギー的には不利な (4.4 kcal/mol uphill) 反応であり、逆反応による ADP から ATP の合成は容易に起こる。すなわち、エネルギー的に高い (E1P) 状態を作って、反応サイクル後半のエネルギーを消費する過程を可能にしている (そのため、E1P 状態を ADP 感受性磷酸化状態とも言う)。Ca²⁺ポンプが属する P 型 ATPase 独特のものである。但し、Asp の磷酸化自体はバクテリアの二成分制御蛋白質にも見られ、比較的一般的なものである。磷酸化 Asp は Ca²⁺を小胞体内腔に放出後 (E2P) 加水分解され無機磷酸が放出される (図 1)。

2 個の Ca²⁺結合サイトは Ca²⁺に対し高親和性で細胞質側を開く E1 と低親和性で内腔側を開く E2 状態を行き来する。濃度勾配に打ち勝つ基本戦略は、膜の両側 (細胞質側と内腔側) にゲートを持ち、同時には開かないことである。E1 状態で 2 個の Ca²⁺が結合すると「磷酸転移を可能にせよ」という信号が発生する。この状態では、イオン通路は一応閉じているがゲートに鍵は掛かっていない。ATP が結合し、細胞質頭部が閉じることで鍵が掛かった状態が生じ (E1·ATP·2Ca²⁺; 図 2)、 γ 磷酸が Asp 残基に転移することで安定化される。こうして、Ca²⁺は膜内に隔離される (E1P[2Ca²⁺]; ここで P は磷酸化を、[] は隔離された (occluded) 状態を示す)。

磷酸転移のためには、N ドメインは P ドメインに接近する必要があり大きく傾く。その結果、A ドメインとも接触する。E1·2Ca²⁺状態で開いていた細胞質頭部は閉じ、A ドメインは膜面に対し $\sim 40^\circ$ 傾く。A ドメインには M1-M3 ヘリックスが直接的に連結しているが、A ドメインの端に接続された M2 ヘリックスは 30° の傾斜の結果、 α ヘリックス 1 巻分細胞質側に持ちあがり、M1 ヘリックスは実に 2 巻分持ちあがる (図 2 のステップ 1)。M1-M2 ヘリックスから成る V 字型の狭い部分が持ち上がってイオン通路の出入り口を塞ぐとともに、Ca²⁺に配位するグルタミン酸残基の側鎖を動けなくする。つまり、M1 ヘリックスという丸太棒でイオン通路の出入り口を塞いで鍵を掛けてしまうのである¹⁾。

ATP の結合によって P ドメインにも大きな構造変化が生じる。P ドメインは N 末側 (P_N)、C 末側 (P_C) 二つの領域から成り、中央には 7 ストランドの並行 β シートが走っている。それを挟む α ヘリックスがあり、

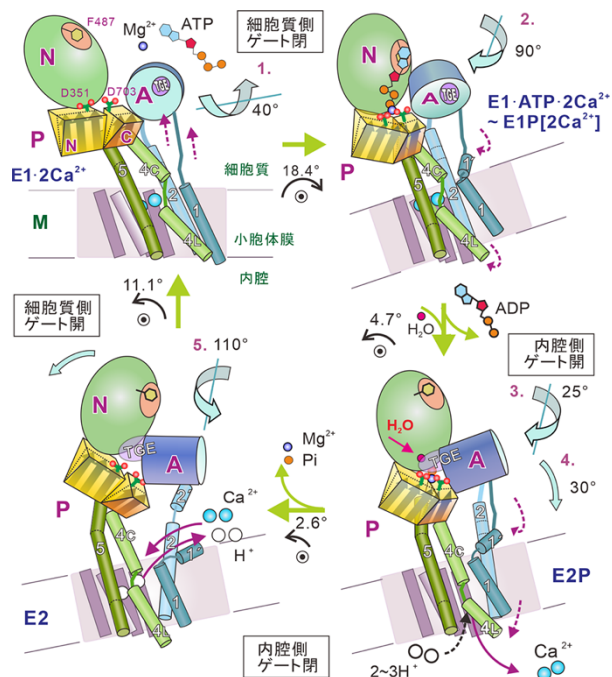


図 2 Ca²⁺輸送サイクルの模式図。4 つの状態では 10 本ある膜貫通ヘリックス (M1-M10) と 3 つの細胞質ドメインの大規模な再配置が起こる (図は構造変化の小さい M7-M10 で揃えてある)。2 個の Ca²⁺を内腔側に放出するところ (ステップ 2) では、A ドメインが 90° 回転し、その回転を M4 の下向き運動に変換して Ca²⁺を押し出す。反応過程でポンプ蛋白質全体が脂質二重膜に対して傾きを変える (rocking 運動)¹⁾。●の上の数字はその角度。

Rossmann fold と呼ばれる構造を採る (図 3b)。

非磷酸化状態では P_N 、 P_C はまっすぐだが (図 3a ; α ヘリックス同士はほぼ平行)、 β シートには 1 番目 ($P\beta 1$) と隣接する β ストランド ($P\beta 5$) の間で段差がある (図 3b、4)。磷酸化時には β シートを構成する 7 つの β ストランドは整列し、 P_N 、 P_C はともに磷酸化残基 Asp351 (図 3 の D351) に接近するように P ドメインは折れ曲がる (図 3a 矢印)。

Ca^{2+} ポンプでも NKA でも、ATP による磷酸化だけではなく、正方向にイオンを運搬した後の E2 状態から、逆反応によって無機磷酸による磷酸化が可能であ

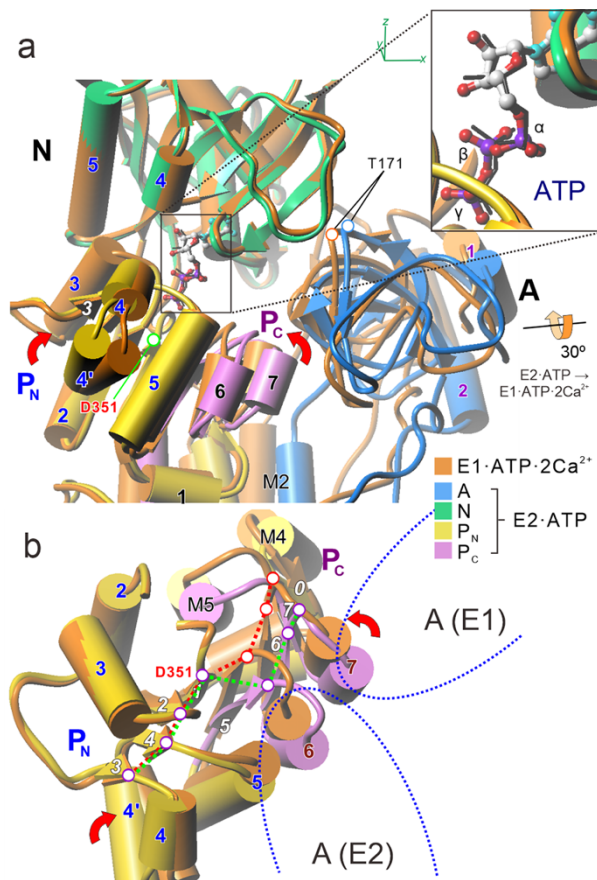


図3 Ca^{2+} ポンプの E2·ATP 状態と E1·ATP· $2Ca^{2+}$ 状態の結晶構造の重ね合わせ。N ドメインが最もよく一致するように重ね合わせた。a 膜に平行に見た細胞質頭部。結合した ATP の構造は二つの結晶構造ではほぼ完全に一致し、三磷酸部分は伸びている (挿入部)。b 膜に垂直に見た P ドメイン。A(E1)、A(E2) は E1 状態、E2 状態における A ドメインの位置 (青点線) を示す。ATP による自己磷酸化に際し、P ドメインを形成する P_N 、 P_C は磷酸化 Asp (D351) に接近するように折れ曲がり、中央の β シートの段差は解消する (赤点線)。

る (図 1)。得られた磷酸化状態は E2P と呼ばれるが、P ドメイン自体の構造は E1·ATP· $2Ca^{2+}$ 、或いは E1~P·ADP· $2Ca^{2+}$ 状態と同一である。つまり、P ドメインの構造は磷酸化状態の折れ曲がった構造 (中央 β シートは整列) と非磷酸化状態の真っ直ぐな構造 (β シートは段差あり) の 2 つのみであり、中間的な構造はこれまで見つかっていない。

このように、 $E1·2Ca^{2+} \rightarrow E1·ATP·2Ca^{2+}$ では非常に大きな構造変化が起こる¹¹⁾。構造変化自体の記述は 2004 年の段階で既にできていたが、構造変化が複雑すぎて、どれが原因でどれが結果なのか、良く分からないまま時間が経過した。特に重要な問題は、「何故 ATP による磷酸化には 2 個の Ca^{2+} の結合が必須であり、E2 では起こらないのか」或いは「何故無機磷酸による磷酸化は E2 では起こるが E1 では起こらないのか」である。このような本質的問いに答えるためには、先ず、ATP 単独でどこまでの構造変化を起こせるかを知ることが重要である。 Ca^{2+} ポンプは Ca^{2+} 非存在下でも ATP に対し高い親和性 (μM) を持つので、生理的条件下では、 Ca^{2+} 放出後の状態は ATP を結合した E2·ATP (或いは既にプロトンを放出した E1·ATP) 状態にいる分子がほとんど考えられる。この状態の構造を決定したいのである。

強力阻害剤 thapsigargin (TG) で E2 状態に固定した Ca^{2+} ポンプに ATP を結合させた E2(TG)·ATP の結晶構造は 2011 年に得た¹²⁾。ATP による磷酸化が起きない理由としては「ATP γ 磷酸は磷酸化部位に正しく配達されない」か「P ドメインの折れ曲がり起きない何らかの理由がある」が考えられる。E2(TG)·ATP では ATP の γ 磷酸は磷酸化 Asp 残基から大きく離れており、「ATP の配達」は E2(TG) 状態では正しく起こらない。これは、E1·ATP· $2Ca^{2+}$ と E2 のどちらの状態でも細胞質側頭部は閉じているが、3 つのドメインの位置関係は大きく異なることに対応している (図 2)。E1 での A ドメインは、膜に垂直な軸の周りに E2 位置から $\sim 110^\circ$ 回転している (図 3b)。P ドメインは楔形をしており (図 5 右下、水色三角)、場所によって厚さが違う。A ドメインは N と P の間に挟まる形になるが、E2 では P ドメインの厚いところに位置し、且つ深く NP 間に挿入される。従って、N ドメインは P ドメインに対し遠い位置に固定され、ATP の位置も

リン酸化部位から遠くなる。

E2(TG)に対してはATPの結合がそのようなドメイン配置を変えることはなかった。しかし、それは強力阻害剤TGでE2状態を安定化したためかもしれないのである。実際、E2状態が優勢であるpH7以下でATPを予め加えておくと、 Ca^{2+} の結合は加速される。このことは、ATP結合によって細胞質側頭部が(少なくともある時間)開くためと考えられ、E2(TG)・ATP状態の結晶構造とは相容れない。NKAの場合ATPの効果はもっと明瞭である。E2・2K⁺状態は非常に安定であるが、ATPの結合はK⁺の放出を5,000倍加速する。実際、我々はクライオ電顕を用い、NKAのE2・2K⁺状態へのATP結合は静電的反発によって細胞質頭部を開くことを証明した^[3]。

3. E2・ATP状態の結晶構造

つまり、阻害剤なし且つ Ca^{2+} なし、pHは7付近という条件でのATP結合構造が必要なのであり、その取得を目指した。結晶化は非常に困難であり、これまで用いてきたウサギ速筋由来の Ca^{2+} ポンプ(SERCA1a)では成功せず、高等動物細胞で発現させたヒト心筋 Ca^{2+} ポンプSERCA2aを用いる必要があった。また、脂質存在下の結晶化であるにも拘らず界面活性剤の選択は重要であり、通常の C_{12}E_8 に加え、これまで使ったことのない C_{13}E_8 との混合物を用いる必要があった。BL41XUでデータ収集を行い、2.6 Å分解能で原子モデルを精密化した^[2]。

得られた構造は幾つもの点で驚くべきものであった。第一に、細胞質側頭部はほぼ開いていて、AドメインはE2位置から110°回転した(図2のステップ5)E1位置にあり、Pドメイン上のソケットに正しくはまり込んでいた。Aドメイン-Nドメイン間の接触は一か所でのみ起こっている(図3aのT171周辺)。その結果、E1P→E2Pで生じる90°の回転(図2のステップ2)の軸受け部分が不完全ながら形成されており、接触部位の位置も正しい(「E1・ATP・2Ca²⁺と同じ」という意味で「正しい」ということにする)。E2・ATPでは、E1・2Ca²⁺→E1・ATP・2Ca²⁺で生じるAドメインの40°の傾斜(図2のステップ1)が実現されていないためにA-N間接触は不完全になっている。E2状態では7つの水素結合によって安定化されていたが、

E2・ATPではThr171を含む一か所しかない。

ATPによるリン酸化が起こるためには、3つある細胞質ドメイン(A, N, P)が正しく配置する必要があるから、ドメイン間接触面が正しくなければE2状態でATPによるリン酸化が起こらないことは簡単に説明できる。しかし、得られた構造ではATPはNドメインとPドメインを正しく架橋し(図3a)、ATPの γ リン酸はリン酸化部位に正しく配置されていた(図4)。また、AドメインはE2位置からほぼ90°膜に対し垂直な軸の周りに回転し、E1・2Ca²⁺状態で期待されるE1位置(図3)にあること、NドメインはPドメインに対しては、E1・ATP・2Ca²⁺状態と完全に一致する位置まで傾斜しており、A/N interfaceもほぼ正しいことが分かった。

つまり、E2状態では閉じていた細胞質側頭部はATPの結合によって一旦開き、その結果、E2状態では大きくM1の方に湾曲していたM5ヘリックスはかなり真っ直ぐになる(「完全に」ではない点が肝心である)(図5)。M5ヘリックスはPドメインに組み込まれているから、M5ヘリックスが真っ直ぐになると、Pドメイン、従ってNドメインはAドメインから離れる方向に動く。その結果、AドメインはM5ヘリックスが真っ直ぐな(に近い)場合に安定なE1位置に移動したと考えられる。この位置では、Aドメインは

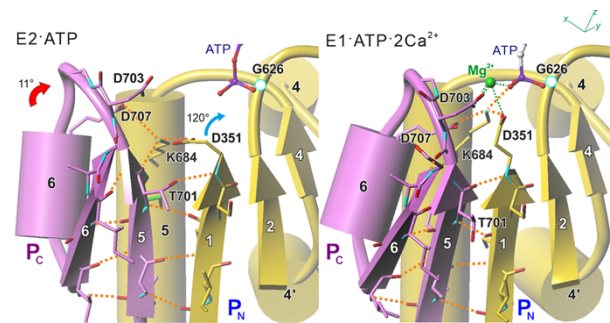


図4 Pドメインのリン酸化部位周辺でリン酸化時に生じる構造変化。中央の β シートにほぼ垂直に、図3bの左上から見たもの。ATPによる自己リン酸化に際し、 P_N 、 P_C はリン酸化Asp(D351)に接近するように折れ曲がり、中央の β シートの β 1- β 5間の段差は解消する。D351の側鎖は横を向いた状態から γ リン酸の方を向く状態に変わるが、それは段差の解消とリンクしていること、 Mg^{2+} が来ない限り、三つのAsp残基+ATPの γ リン酸による負電荷の集中による静電的反発により P_N 、 P_C 間は閉じられないことに注意。オレンジ色の破線は水素結合を、赤矢印はリン酸化に伴う P_C の運動を示す。

Pドメインと正しく接触している（傾斜のための支点はE1・ATPと共通）が、Pドメインが傾いている結果、Aドメインは膜に対し非常に近い位置にあり、また、PドメインのAドメインとの接点はPドメインの端にあるから、AドメインはSERCA本体から殆ど離脱しているように見える。

このように、E2・ATP状態のSERCAの構造は一見したところE1・Mg²⁺状態⁷⁾とよく似ていた。実際、結晶化におけるpHは7.2であり、通常ではE1状態にあると期待される。しかし、膜貫通部位を見ると、Ca²⁺結合残基の配置は側鎖の向きまでE2(TG)結晶構造と同一であり、明らかにE2であった。このことは、閉じた細胞質頭部はE2(TG)の目立つ特徴であるが、E2状態（膜内イオン結合部位にプロトンを結合し、Ca²⁺に対し低親和性状態というのが定義）に必須ではないことを示している。これは、前の長期利用課題で明らかにしたこともあった⁸⁾。

4. 磷酸化に伴うPドメインの構造変化とその役割

一方でE2・ATP状態ではPドメインの折れ曲がり（折れ曲がり）は起こっておらず、中央のβシートもE1・ATP・2Ca²⁺状態とは違い、段差を残したままであった（図3b、4）。PドメインはN末側（P_N）、C末側（P_C）二つに明瞭に分離しており、非磷酸化時には、Pドメインを縦断する中央のβシートも1番目と5番目のβストランドの間で段差がある。磷酸化時にはβシートを構成する7つのβストランドは整列し（図3b）、P_N P_Cともに磷酸化残基Asp351に接近するように折れ曲がる（図2、3a）。

E2・ATP状態でATPは磷酸化部位に正しく配達されていると書いた。確かに、ATPの3つの磷酸基はE1・ATP・2Ca²⁺状態と同様伸展しており（図3a挿入図）、Mg²⁺を取り囲むような立体配座にはなっていない。すなわち、γ磷酸はPドメインにある保存された625TGDモチーフ中のGlyのアミド基と水素結合を作っているが、肝心の磷酸化残基Asp351のカルボキシル基とは遠い。それは、これもP型ATPaseに絶対的に保存されているLys684によってAsp351の側鎖の向きが制御されており、非磷酸化状態、すなわちPドメインが折れ曲がっていないときにはγ磷酸の方ではなく、それと120°違う方向を向いているからで

ある（図4）。このLys684はP_N側にあるが、P_C側にあるAsp707（これも保存されている）と塩橋を作っている。Pドメインの折れ曲がり、Mg²⁺がγ磷酸からAsp351への磷酸転移を触媒できるようにAsp703を正しい位置に持ってくるだけではなく、Asp707がLys684を介してAsp351側鎖の配向を変えてカルボキシル基がγ磷酸の方を向くように、つまりは磷酸転移を可能にする働きを持っている。要するに、ATPからの磷酸転移はMg²⁺が正しく配位しない限り起きないよう、二重に保護されているわけだ。

非磷酸化状態（折れ曲がりの無い状態）でヘリックス同士（この場合はP5とP6）は側鎖で噛み合っているわけだから、その噛み合いをはずす、βシートに垂直な方向（「横方向」）の運動がない限り、Pドメインの折れ曲がりは起こり得ないはずである（図3）。さらに、Mg²⁺が来ない限り、Asp703とAsp351のカルボキシル基、γ磷酸、この三者間の静電的反発は大きすぎて接近できないであろう。その横方向の運動の実体が、中央βシートの整列であり、それはβシートの水素結合ネットワークに参加するのが5番目のβストランドのC末端（図4では上端）にあるThr701の主鎖カルボニル基なのか側鎖の水酸基なのかで制御されている（図4）。興味深いことに、このThrはNKAでは保存されているが、磷脂質のflippaseなど細胞質側gatingを必要としない他のP型ATPaseでは保存されていない。その場合、折れ曲がった状態が標準であり、直ちに磷酸化が起こる。

ここまではまあ理解できた。一方、Mg²⁺が結合しさえすれば、Pドメインの折れ曲がり（すなわち磷酸化）はCa²⁺結合によらず熱運動だけで起こりそうである。実際、無機磷酸による磷酸化はCa²⁺を必要としない。では「何故、ATPによる磷酸化のためには、2個のCa²⁺の結合が必須」なのか。

5. E2・ATPでAドメインがE1位置にあることの意味

この問題を考えるために、E2・ATP状態の構造から出発して磷酸化が起こった状態（Pドメインは折れ曲がり、Aドメインはそれによって膜面に対し31°傾斜し、M1/M2はAドメインとともに剛体として移動する）の仮想的構造を構築した（図5中央）。膜面に対するAドメイン、Pドメインの傾斜角はE1・ATP・2Ca²⁺

状態とは大きく異なっており、M2, M4 ヘリックスは膜面に対して低い位置に固定されたままであった。この状態では、M1/M2 ヘリックスは Ca^{2+} ポンプ本体からほぼ完全に離れている。それに対し、E1·ATP·2 Ca^{2+} 状態では、M1/M2 ヘリックスは E1·2 Ca^{2+} 状態よりもさらに密に本体と接触し、4つの水素結合が形成され

ている (図5右)。膜貫通ヘリックス間の密な接触による自由エネルギーはヘリックスペアー組当たり〜10 kcal/mol であるとされる。このエネルギーは ATP 加水分解で放出される標準自由エネルギーが 7.3 kcal/mol であることを考えると、なかなか大きなエネルギーである。もし、10 kcal/mol のエネルギー

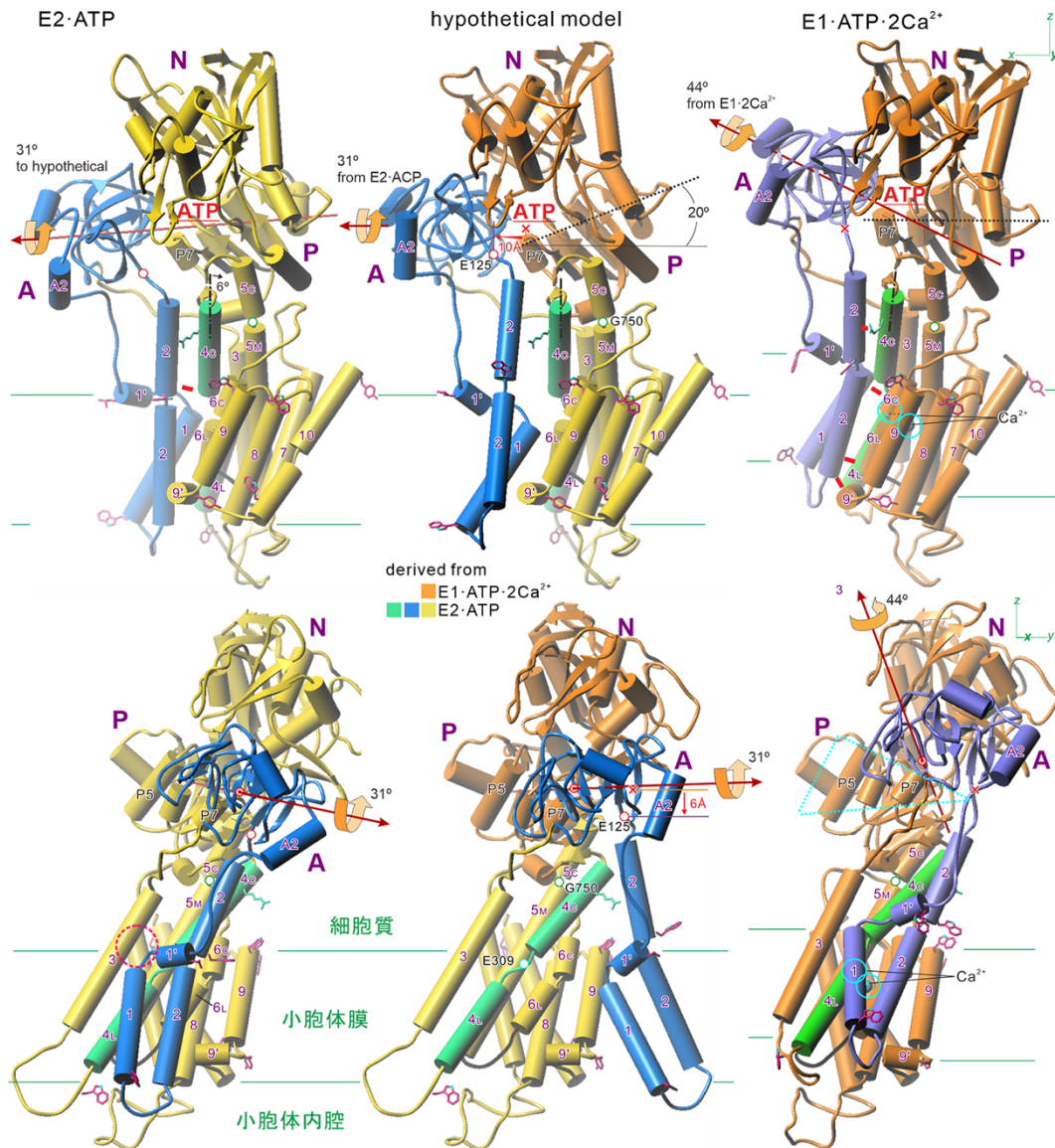


図5 Ca^{2+} 非存在下で ATP を結合した E2·ATP 状態でリン酸化が起こったときに形成されるであろう (仮想的) 構造のモデル (中央)^[2]。その左 (E2·ATP^[2]) と右 (E1·ATP·2 Ca^{2+} ^[1]) は結晶構造。E1·ATP·2 Ca^{2+} における水色の円は結合した Ca^{2+} を示す。E309 は Ca^{2+} 結合のゲートとなり、E125 は A ドメインと M2 の接手、G750 は M5C と M5M を繋ぐヒンジとなる残基。赤色の長い矢印は A ドメインの膜面にほぼ平行な軸の周りの回転の軸。二重の円盤はその支点の位置 (P7 ヘリックス上) を示す。赤の短い棒は水素結合を示す。左下の破線赤丸は細胞質側イオン通路の出入口を、右下の水色三角は P ドメインの概形を示す。3 つの構造は M7-M10 ヘリックスが同じ位置に来るように表示しているが、状態によって膜面の位置 (緑色の水平線で示す) は異なり、E1·ATP·2 Ca^{2+} では細胞質側に持ち上がった M1/M2 ヘリックスが膜外に飛び出さないように、膜表面にある Trp や Tyr 残基 (赤い棒で表示) が「浮き」の役割をするため、分子全体の傾きが変わる (rocking 運動)^[3]。

差があれば存在確率は $1/10^7$ となり、ほぼ存在し得ないことを意味する。一方、最初に述べたように、ATP による Asp のリン酸化そのものはエネルギー的に不利な過程であり、蛋白質側のエネルギーをそれに見合うように下げることによってバランスされ、リン酸化が可能になっていると考えられる。

それでは、E1-ATP-2Ca²⁺状態、つまり、E2-ATP 状態に Ca²⁺が結合することによって、M1/M2 ヘリックスが密に本体と接触できるようになるのは何故か？ 顕著な違いは P ドメインの傾きである。E1-ATP-2Ca²⁺状態の P ドメインは仮想モデルよりも 20° 持ち上がっている (図 5 中央・右)。これは、Ca²⁺の結合によって、M4 ヘリックスが持ち上がる (～5 Å) とともに、M4C (M4 ヘリックスの細胞質側半分) の傾きが変わり (6°; 図 5 左上)、それに伴って、M5 ヘリックスが真っ直ぐになるためである (図 5 右)。M4C、M5C は短い β ストランドで連結されているとともに P ドメインに組み込まれており (図 3b)、細胞質頭部は閉じているから P ドメインとともに、N ドメインも A ドメインも -x 方向 (図 5 では右) に移動する (A ドメイン-P ドメインの接点がある P7 ヘリックスで 10 Å; 図 5 中央上)。傾きの変化の支点 (この場合 M5C と M5M の境界に位置する Gly750) から遠く離れた A ドメインは z 方向にも大きく移動する。それに従って、A ドメインに直接連結されている M1/M2 ヘリックスは本体側に大きく引っ張り上げられ (A ドメインと M2 ヘリックスの接合点 (Glu125) で 6 Å; 図 5 中央下)、本体と接触する。M1 ヘリックスはイオン通路の出入口を塞いで occluded 状態を作り出す¹¹⁾。この位置で、M2 の内腔側の端はストッパーの役割をする M9' と水素結合を作って安定化され、M2 細胞質側は M4C と相補的な接触面を持つことになる。

E2-ATP 状態では、Ca²⁺に配位する Glu771 のプロトン化のために、M5 ヘリックスは湾曲した状態で固定されている (図 5 左)。その状態で A ドメインが E1 位置にあるために、N ドメインは E2(TG)状態よりもさらに深く傾斜する必要があった。その結果、A ドメインを膜面に近づけ、M1/M2 を本体から離すことになっていたのである。つまり、プロトンの放出によって M5 ヘリックスが真っ直ぐになり、さらに Ca²⁺結合によって M2, M4 ヘリックスが解放されて高い位置

に来ることがリン酸化に必須であることが理解された。つまり、ポンプ作動機構に関する最も根本的な問いの一つに対する答えが得られたことになる。

要するに E2-ATP の A ドメインは E1 位置にあることが肝心なのである。この位置では上述のように、Ca²⁺が結合しない限り、ATP からのリン酸転移は起こらない。一方、無機リン酸によるリン酸化も起こらない。無機リン酸によるリン酸化のためには、E2P 状態で実現されているように、リン酸化部位は溶媒から隔離されている必要がある¹⁰⁾。つまり、A ドメインにある signature motif 181TGES ループが静電的に特別な環境をアスパラギン酸のカルボキシル基の周りに形成することが必須なのであるが、そのためには、A ドメインは E2 位置にある必要がある。E2-ATP における A ドメインの位置 (E1 位置) ではリン酸化部位 (Asp351) は溶媒に露出している。なるほど、この位置に固定されている限り、リン酸化はどちらの方向からも (ATP からも無機リン酸からも) 起こらない。実に strategic な位置ではないか。

6. A ドメインの回転の役割

PNAS 誌に論文を発表した 2020 年の理解²⁾はここまでであった。実は、この A ドメインの位置にはもっと生理的な意味がある。「何故に A ドメインをここまで回転させる必要があるのか」ということである。P ドメインは楔形をしている。そのため A ドメインは E2 位置では膜表面から離れた高い位置にあり、E1 位置では膜に接近する。実際の高さは P ドメインの位置、傾きに依存し、Ca²⁺結合状態では M5 ヘリックスが真っ直ぐになる結果 P ドメインは持ち上がる。その結果、A ドメインも持ち上がるので膜から離れることになる。このような P ドメインによる補正効果はあるが、A ドメインは E1 位置で膜に接近し、M1, M2 ヘリックスも小胞体内腔側に下がる。その結果、何が起こるかということ、細胞質側ゲートが大きく開くのである。このことは、今までよく認識されていなかった。

A ドメインには M1, M2 ヘリックスが直結している。そのため、NKA の E1-Mg²⁺状態と E1-3Na⁺状態の構造研究¹⁴⁾を行って初めて理解できたことなのだが、細胞質側ゲートの開閉は M1 ヘリックスの上下運動が行っている。SERCA の E1-2Ca²⁺状態では M1 ヘリッ

クスは Asp59 のところで折れ曲がることなく、真っ直ぐなヘリックスとなる。E1·2Ca²⁺では Glu309 が 2 番目の Ca²⁺に配位することによって Ca²⁺に蓋をしているが、その Ca²⁺は細胞質にある Ca²⁺と交換可能である。その通路は、M1 ヘリックスが真っ直ぐになることによって M2 ヘリックスとともに形成された大きな V 字型の上部であると考えられた。このこと自体は正しいのだが、本来、細胞質側のイオン通路は Ca²⁺が結合する前に開かれているはずである。一番大きく開いている必要があるのは、Ca²⁺を受け入れる直前の状態、即ち、E1·Mg²⁺状態のはずである。実際、SERCA でも E1·Mg²⁺状態では M1 は Asp59 のところで折れ曲がっており、且つ、A ドメインの大きな回転のために、E2 状態よりもさらに内腔側に下がっている⁷⁾。その結果、細胞質側イオン通路は最も大きく口を開けているのであった。

2013 年に E1·Mg²⁺状態の構造⁷⁾を発表した時にはどうして M1 ヘリックスが折れているのか、その必要性が分からなかった。M5 ヘリックスは E1·Mg²⁺状態で一番真っ直ぐであり、E1·2Ca²⁺になるとむしろ M10 側に傾く。これは、結合した Ca²⁺が M5 ヘリックスを引っ張るためであり、P ドメインは A ドメインに近い側が一番持ち上がる (図 2)。従って、M1/M2 ヘリックスは E1 では E1·Mg²⁺状態で最も下がっている。これによって、イオン通路の入り口は大きく開かれる。また、M2 ヘリックスは、E2 では部分的にほどけていたが、A ドメインの回転によって、A ドメインの M2 ヘリックスとのつなぎ目は膜に近づくため、M2 ヘリックスに許される長さは短くなり連続的なヘリックスになる。こうして初めて、次の段階 (図 2 のステップ 1) で M2 ヘリックスを引き上げ、細胞質側ゲートをロックすること¹¹⁾が可能になる。これだけの仕事を A ドメインの回転はしていたのである。

E2·ATP 状態は E2 であるからプロトンはまだ放出されてはいないが、細胞質側イオン通路を開けて、ゲート残基である Glu309 (M4C と M4L を繋ぐループに位置する; 図 5 中央下) の側鎖が変化してプロトンが解放されるのを待っていないのではなるまい。それが、E2·ATP 状態なのである。また、Ca²⁺を受け入れるために別の通路を開けるのは不経済だから、その通路は開けたまま待っている。それが、E1·Mg²⁺状態なのだ。

だから E2→E1 で A ドメインの大きい回転が起こるのだ。

それを理解するのに 10 年かかってしまった。NKA の対応する構造¹⁴⁾を研究しなかったらきっと一生 (私以外に SERCA の構造を極めようという偏屈はいないかもしれないので、そのときは永久に) 理解されなかったに違いない。結局のところ、得られる結論 (教訓) はいつも同じである。①蛋白質はあまりにも良くできている。②構造の意味を理解するにはとんでもなく時間がかかる。③似て非なるものは役に立つ (こともある)。④だから、実験はやってみるものだ!

参考文献

- [1] Toyoshima C and Mizutani T: *Nature* **430** (2004) 529-535.
- [2] Kabashima Y, Ogawa H, Nakajima R and Toyoshima C: *Proc Natl Acad Sci USA* **117** (2020) 18448-18458.
- [3] Kanai R, Cornelius F, Vilsen B and Toyoshima C: *FEBS Lett.* **596** (2022) 2513-2524.
- [4] Kanai R, Vilsen B, Cornelius F and Toyoshima C: closes the cytoplasmic gate. *FEBS Lett.* (2023) In Press.
- [5] Norimatsu Y, Hasegawa K, Shimizu N and Toyoshima C: *Nature* **545** (2017) 193-198.
- [6] Toyoshima C, Yonekura SI, Tsueda J and Iwasawa S: *Proc Natl Acad Sci USA* **108** (2011) 1833-1838.
- [7] Toyoshima C, Iwasawa S, Ogawa H, Hirata A, Tsueda J and Inesi G: *Nature* **495** (2013) 260-264.
- [8] Tsunekawa N, Ogawa H, Tsueda J, Akiba T and Toyoshima C: *Proc Natl Acad Sci USA* **115** (2018) 12722-12727.
- [9] Toyoshima C, Norimatsu Y, Iwasawa S, Tsuda T and Ogawa H: *Proc Natl Acad Sci USA*. **104** (2007) 19831-19836.

豊島 近 TOYOSHIMA Chikashi

東京大学 定量生命科学研究所
〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1
TEL : 03-5841-8492
e-mail : ct@iqb.u-tokyo.ac.jp