# 長期利用課題報告 1 イオンポンプ蛋白質の結晶構造解析

東京大学 分子細胞生物学研究所 豊島 近

## 1. はじめに

2006B期から3年間「膜輸送体作動メカニズムの結晶学的解明」という長期課題を、東工大・村上グループとともにアンジュレータービームラインBL41XUを用いて遂行した。筆者(東大・豊島)グループはイオンポンプ蛋白質を、村上グループはバクテリアの多剤耐性に関係する薬剤排出トランスポーター(特に大腸菌AcrBとその類似体)を研究対象とした。本稿では、筆者がほぼ20年間取り組んでいるCa<sup>2+</sup>ポンプ<sup>[1,3]</sup>と2005年以来取り組んでいるNa+, K+ポンプ<sup>[4,5]</sup>の結晶構造解析を簡単に紹介したい。

よく知られているように、細胞の内外でイオンの組成は異なっており、平衡にはない。それは、細胞がイオンを通さない脂質二重膜で外界から仕切られており、ポンプ蛋白質が常にイオンを汲み出し、汲み入れているからである。ポンプ蛋白質はATPを加水分解する酵素(ATPase)であり、ヒトは一日にその体重と同程度のATPを消費するが(もちろんリサイクルするので、排出するわけではない)、その1/4をポンプ蛋白質が使うとされる。つまり、ポンプ蛋白質が生命活動の基盤を維持しているといって過言ではない。

イオンの濃度差は膜電位を生み出し、細胞膜の内側の電位は外側より20~120 mV低く保たれる。神経が興奮するという現象は、イオンがチャネル蛋白質を通して流入し、電位差が失われることに他ならない。この目的のためには 1 価の陽イオン( Na+や K+ )が使われる。一方、2 価の陽イオン( 特にCa<sup>2+</sup> )は生体反応の制御に使われる。人体には約1.4 kgのカルシウムがあるが、大部分は骨や歯であり、制御に使われるカルシウムは10 gほどといわれる。しかし、この10 gは、生理的に極めて重要であり、筋肉の収縮と弛緩はその著しい例である。筋原繊維の周りには袋状の構造があり、カルシウムの貯蔵庫となっている。筋肉の収縮のために放出されたCa<sup>2+</sup>を貯蔵庫に汲み戻し、弛緩をもたらすのがCa<sup>2+</sup>ポンプの

働きである。Ca<sup>2+</sup>の濃度差は実に1万倍にもなる。

#### 2.技術的なこと

このような構造研究において、最大の難関はもちろん結晶化である。特に、膜蛋白質の場合は、本来 脂質二重膜にあるものを界面活性剤で可溶化し、結 晶化するわけで、界面活性剤の選択、脂質を加える かどうか、加えるなら界面活性剤との比をどうする か、といった、水溶性蛋白質には無い問題がある。

膜蛋白質結晶化の初期には、脂質二重膜を構成す る燐脂質は結晶化用試料から除くべきものとされ た。それは、一つには脂質二重膜の中のような疎水 的環境で蛋白質間の相互作用を強くするのと、膜外 ドメインのように親水的な部分の相互作用を同時に 強くするのは困難であるからだし、そもそも均一で はないからである。しかし、イオンポンプ蛋白質の 場合は、燐脂質が無いと蛋白質が活性を失ってしま う。筆者らはCa<sup>2+</sup>ポンプ (Ca<sup>2+</sup>-ATPase)の最初 の結晶構造を2000年に発表したが<sup>[1]</sup>、これは、三 次元結晶化において燐脂質を外から添加した最初の 例となった。結晶化手法にしても、中間状態によっ ては、透析法、蒸気拡散法のどちらかでしか出来な いものもあり、試すべきパラメータは非常に多いと 言わざるを得ない。しかも、膜蛋白質の場合、大き な結晶が出来ても、ろくに回折しないということは よくある。我々も二つの場合でそれを経験した。特 に著しかったのはNa+, K+-ATPaseの場合である。

このNa+, K+-ATPase結晶は、 $Ca^{2+}$ -ATPase結晶と遜色ない大きさ( $1000\times100\times20~\mu m$ )に成長したが、そのままでは分解能は $7~^{\rm A}$ 程度で、そこまでは回折強度は強いが、そこから先はパタリと無くなってしまうというものであった。分解能の改善のために試みられる方法として脱水和があり、膜蛋白質結晶での成功例もある。そのためには、通常沈殿剤の濃度を上げる。この場合、沈殿剤はPEG3000であり、透析法で結晶化しているため、結晶化溶液の他

の成分は変化させずにPEGの濃度のみを上昇させる ことが出来る。この実験の結果、(i)格子長の変 化はPEG濃度に応じて連続的である、(ii) PEG濃 度の変化は余り遅いとうまくいかない、(iii)最終 濃度が高すぎると格子はさらに縮まるが分解能は落 ちることが判明した。

この結晶の場合、脂質二重膜に蛋白質が埋め込ま れているため、二次元結晶が積み重なった形の三次 元結晶となっている(型結晶と呼ばれる。図1)。 このような結晶の場合、脂質二重膜が蛋白質を横方 向につなぐ効果を持つので、蛋白質間の接触は必ず しも必要ない。そのため、多数の紐が横に並んだよ うなもの(紐を束ねているのは脂質二重膜)になり、 脂質二重膜の柔軟性のために、分解能は低くなるの が通例である。

PEG3000の濃度を結晶化条件の13%から40%に上 げることによって、a軸の格子長が275 Åから224 Åま で50 Åも短くなり、分解能は2.4 Åまで向上した[4]。 この方向は結晶の最も薄い方向に相当するが、予想 に反し脂質二重膜の膜面に沿った方向であり、脂質 二重膜間の距離は変化しなかった。一方、さらに短 く217 Åまで縮めても分解能の向上はみられなかっ た。この結果、格子長はばらついたが、重原子置換 体によって位相を決定する際に、逆に同型性の良い ものを選ぶことができ、有効ともいえた。

さて、分解能が向上した原因であるが、この結晶 の場合は、Na+, K+-ATPaseの サブユニットが糖鎖 修飾を受けているためということも考えられる。し かし、格子の収縮は膜面に沿った方向に起こってい

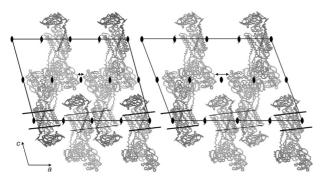


図1 Na+, K+-ATPaseのE2·2K+·MgF<sub>4</sub><sup>2-</sup>結晶における脱 水和の効果。左、40% PEG3000による脱水和後。 右、25% PEG3000。矢印は、分子間の隙間を示す。 線は膜貫通ヘリックスの配置から予想される脂質二 重膜の境界を示す。本結晶の空間群はC2であり、 2回回転軸と2回螺旋軸の位置も示した。

ることから、脂質二重膜の歪みが重要である可能性 が高い。実際、Na+, K+-ATPaseの膜貫通へリックス の位置からは、分子はab面に対し10°程度傾いてい る。この結晶の空間群はC2であるからab面中にb軸 と平行に2回螺旋軸が存在するが(図1) この傾き によって膜の高さが軸に沿って上下することを意味 する。これは脂質二重膜に歪みをもたらすわけで、 それがa軸方向のパッキングを緩くしている原因で はないだろうか。この点に関しては、本研究課題に おいて新しい溶媒コントラスト変調法(溶媒の電子 密度を変え、回折強度の変化から位相情報を得る手 法 )を開発し、脂質二重膜を可視化することに成功 しているので、この結晶にも是非適用してみたい。

一方、データ収集も水溶性蛋白質以上に重要なス テップである。X線照射による損傷は非常に大きい 型結晶の場合、薄い板状になる可能性は高い。 本長期課題の期間中に、試料を連続的に移動しなが らデータ収集をすることによって照射損傷を大幅に 低減できるようになり、またdiffraction scanによっ てデータ収集の最適化を図ることができるようにな った(我々の希望に応えて長谷川和也博士がビーム ラインの測定ソフトウェアBSSにこの機能を追加し てくれた)。この結果、この結晶からはこれ以上は 不可能というqualityでデータを収集できるように なった。実際、結晶の質はほぼ同一であるが、 Ca<sup>2+</sup>-ATPaseのE1・2Ca<sup>2+</sup>結晶に関しては、これま での2.4 Åから1.9 Åまで、分解能を向上させること が出来た。(これには、もちろん、清水伸隆博士を 始めビームライン担当者や光源・光学部門のスタッ フがBL41XUでのビームの質を格段に向上させたこ とによる効果も大きいと考えられる)。

図2に実際のデータ収集の例を示す。ここでは、 Na+, K+-ATPaseの板状結晶を用い、50 μm角のビ ーム、gradual mode (何フレームかを露光する毎 に試料を一定方向に5 μm移動させるモード。この 場合、5フレーム毎に移動)で、板状結晶に対しほ ぼ垂直にX線が入射する方位からスタートし、平行、 垂直と220°、440フレームのデータ収集を行った。 Scalepackが吐き出す温度因子(B factor)は、板 状結晶に平行にビームが入射する時やや高くなる が、2回目の垂直入射時(380フレーム付近)の温 度因子は1回目よりもむしろ低くなった。この温度 因子の変化は、この場合、回折点の形状の変化の反 映と考えられ、平行入射の場合一方向にやや伸びる ために、Scalepackは温度因子で補正するものと考

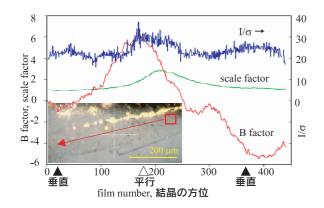


図2 Gradual modeによるNa+, K+-ATPase板状結晶の データ収集とScalepackによる統計値の変化。写真 はマウントされた結晶。赤四角はデータ収集開始点 とビームサイズ(50 μm角)を示す。矢印は試料を移 動させて照射領域を変化させた方向を示す。試料の 回転軸は図の横軸と平行。「垂直」はX線が板状結晶 の広い面に垂直に入射することに対応紙面に垂直)。 波長0.9 Å、カメラ長300 mm、振動角0.5°、露光時 間0.7 秒(アッテネーター無し)、440フレーム。結 晶の空間群: C2、格子定数: a=225.8、b=51.0、c= 164.3 Å; =105.4°。分解能: 2.6 Å。モザイク幅: 0.9~1.3°。試料は100 Kに窒素ガスで冷却し、 Rayonix MX225HE検出器を使用。2008年6月25日 のデータ。

えられる。すなわち、温度因子で判断する限り、照 射損傷は問題にならない、という結論になった。

第2に、diffraction scanの実装である。これは、 結晶の方位は変えず、水平・垂直方向に一定間隔で 試料を移動させて露光し、結晶の位置や照射範囲を 最適化しようというものである。ビームが細くなる に従い、結晶の位置精度に対する要求も厳しくなる。 筆者らが扱っている結晶は、脂質二重膜に埋まった 蛋白質(二次元結晶)が積層しているごく薄い板状結 晶であるため、板に平行にX線が入射した場合、結 晶にまったく当たらなくなる可能性があった。特に、 E2(TG)結晶のように一軸が極端に長く(~600 Å) 90°アームを使ってデータ収集を行う場合、窒素ガ スによる冷却のためアームの収縮は避けられず、深 刻な問題であった。また、我々の結晶の場合、板状 結晶のためか、場所・方位による差が大きく、デー タ収集範囲・順序の設定は得られるデータに多大な 影響を与えた。そのため、現在は、データ収集その ものよりも設定の方に(すなわちdiffraction scanに) 時間がかかる。

## 3. Ca<sup>2+</sup>ポンプの結晶構造解析

2000年にCa<sup>2+</sup>結合時の構造[1]を発表して以来、 本長期課題を開始した時点では6つの反応中間体の 構造が決定されていた(図3)。ポンプ蛋白質は、運 搬するイオンに対する結合部位の親和性と向きを変 えて濃度勾配に逆らった輸送を実現する。高親和性 で細胞質を向いている状態をE1、低親和性で反対 (この場合、小胞体内腔)を向いている状態をE2と 呼ぶ。また、反応サイクル中でポンプ蛋白質の保存 されたアスパラギン酸残基(この場合Asp351)に ATPから燐酸が渡され、燐酸化される(Pで表わす)。 E1P状態では運搬されるイオンは膜のどちら側から もアクセスできず、隔離状態となる。ポンプ蛋白質 からADPがはずれることによって構造変化が起き、 運搬イオンに対する親和性が低下するとともに内腔 側ゲートが開いてイオンが放出される。燐酸化アス パラギン酸の加水分解反応によって燐酸が外れ E2 )、ゲートは閉じる。すなわち、イオン E2Pで成される[3]。 の運搬はE1P

残された中間体のうち重要なものの一つはE2P基 底状態であった。既にE2~P遷移状態とE2・Pi product stateの構造は決定され、蛋白分解酵素によ る限定分解では基底状態と差がないものの、小胞体 内腔側ゲートは基底状態でのみ開いていることがわ かっていた。この構造はどのようなものか、また、何 故、基底状態と遷移状態という、おそらくは極めて 僅かな違いによってゲートの開閉が制御され得るの かを解明することが眼目であった[2]。基底状態の 燐酸アナログは $BeF_3$ であり、その複合体の構造解 析をE2( Ca<sup>2+</sup>に対し低親和性 )状態を強力に安定化 する阻害剤thapsigargin(TG)の有り無しで行った。

直前の状態であるE1P状態のアナログ(E1·2Ca<sup>2+</sup>・

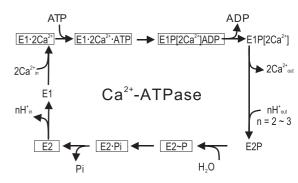


図3 Ca<sup>2+</sup>-ATPaseの反応サイクル(簡略版)。四角で 囲んである状態は2006年10月には構造が発表され ていたもの。[ Ca<sup>2+</sup> ] は閉塞状態を示す。

AIF₄ · ADP )とE2 ~ P状態の間で、3 つある細胞質 ドメインの一つ、Aドメインは脂質二重膜に垂直な 軸のまわりに115°回転する。これがゲートの開閉に 変換されるはずである。一方、同じBeF<sub>3</sub>-との複合体 でも、TGが有るとゲートは閉まってしまう。しかし、 細胞質ドメインの構造は、TG有り無しでほとんど同 じであることが生化学的にわかっていた。どうして、 細胞質ドメインの構造は同じなのにゲートは開閉で きるのか。ゲートの開閉とは、ごく小さな変化なの か。それともこの状態の構造は2つのかなり異なっ たコンフォメーションを許すような柔軟なものなの か。分子動力学のシミュレーションで明らかになっ た熱運動の大きさを考えると、ゲートの開閉という のは相当に大きな構造変化であると考えられた。そ れなら、2つのコンフォメーションを許すスイッチ があるはずだろうが、それは何なのか。

得られた構造は、このような疑問にみごとに答え るものであった。カルシウムに対する親和性を下げ、 内腔側に押し出すためには、結合サイト を作って いるM4ヘリックスを ヘリックスの約一巻き分(~ 5.5 Å)下げる、つまり、Aドメインの回転をM4へリッ クスの運動に変換する必要がある(図4)。構造からこ のメカニズムを理解するのには相当の時間を要した。

110 °の回転によってAドメインはPドメインの上 にのり上げるような形になる。Pドメインはくさび のような形をしているので、もしPドメインが空間 的に固定されているならAドメインの高さ(膜表面

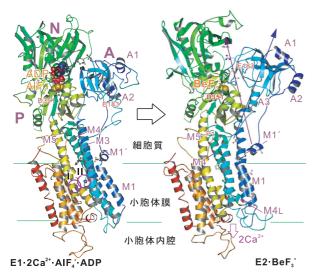
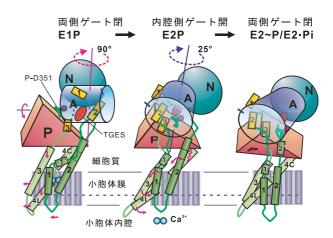


図4 筋小胞体Ca<sup>2+</sup>-ATPaseのE1·2Ca<sup>2+</sup>·AIF<sub>4</sub>··ADP(両 方のゲート閉でCa<sup>2+</sup>閉塞)状態とE2·BeF<sub>3</sub>(内腔側 ゲート開)状態の結晶構造。 は結合したCa<sup>2+</sup>。



Ca<sup>2+</sup>-ATPase内腔側ゲートの開閉機構の模式図

からの距離)は高くなるはずである。この結果、A ドメインの一端につながっている膜貫通へリックス M1は持ち上がるはずである。しかし、M1へリック スは膜内から出られないため、実際にはPドメイン を傾けてM1ヘリックスが膜から出ないようにする (図5)。一方、M4ヘリックスは、Pドメインに組み 込まれているため、この傾斜によって大きく(内腔 側へ)下がる。これが膜内に結合したカルシウムを 押し出す運動となる。すなわち、Pドメインがくさ び形をしていることとM1ヘリックスが脂質二重膜 におろした錨のように働くことが事の本質である。

このとき、Aドメインに直接つながっているM1-M3ヘリックスには、力がかかるはずで、Pドメイン を傾斜させるのにかかる力(従って、M5を曲げる力) と競争になると予想される。Aドメインは、E2~P 遷移状態ではE2P基底状態よりさらに25°ほど回転 している。この回転によってM1 - M3へリックスを さらに上に持ち上げようとする力が働き、耐え切れ なくなったM2ヘリックスは部分的にほどける。そ の結果、M1 - M2で構成されるV字型構造が下がり、 M4ヘリックスが横に開く隙間をなくし、M4ヘリッ クスの向きを変えることでゲートを閉める、という のがメカニズムである(図5)。 つまり、M2ヘリック スの螺旋の巻き方がスイッチの役目を果たす。

それでは、基底状態と遷移状態間の25°の回転が 何に依存しているかというと、Aドメインの回転に よって、基底状態では燐酸化部位から完全に排除さ れていた水分子が1分子だけ入る隙間ができ、そこ に導入された水分子がAドメインにあるTGESモチ フ中のグルタミン酸残基により活性化され、燐酸 化アスパラギン酸を攻撃することによって加水分解

反応が進行することである[3]。実際、基底状態でTG を加えるとゲートは閉まるので、基底状態のAドメ インの位置でゲートの開閉は起こりえると考えられ る。それが、加水分解反応の進行によって閉まった 状態(すなわち構造変化)が安定化されるのである。

### 4. ナトリウム・カリウムポンプの結晶構造解析

ほとんどの動物細胞で、細胞内のK+濃度は細胞外 より50倍近く高く、Na+は10倍ほど低く保たれてい る。これは前述のようにNa+, K+-ATPaseの働きに よるものだが、Na+, K+-ATPaseは単なるポンプで はなく、細胞間接着や高血圧、多くの癌にも深く関 わることが判ってきている。Na+, K+-ATPaseは、

サブユニットと調節蛋白質であるFXYD蛋白質か ら成る。我々は、鮫直腸腺由来酵素の結晶化に取り 組み、E2・2K+・MgF<sub>4</sub><sup>2</sup>- 状態(E2・2K+・Pi状態のア ナログ)のほぼ全構造を2.4 Å分解能で初めて決定で きた(図6 ) <sup>4</sup> 。この結果、K+の配位に関する詳細が 判明し、ほとんど同じ残基が使われているにもかか わらず、どうしてCa<sup>2+</sup>-ATPaseではK<sup>+</sup>を結合できな

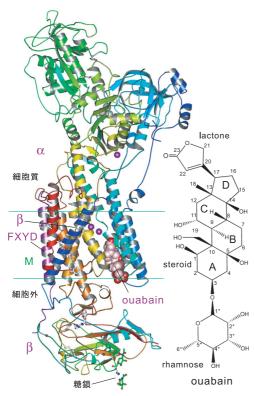


図6 Na+, K+-ATPase - ウアバイン複合体の結晶構造と ウアバインの化学構造。E2・2K⁺・MgF₄² - 状態。 結合しているK+(紫色の小さい玉)とウアバインは 空間充填モデルで示した。

いのか、また、K+結合に何故 サブユニットが必要 かも本研究により解明できた。さらに、FXYD蛋白 質のFXYDモチーフの構造的意味も明らかになっ サブユニットの細胞外ドメインは細胞接着に 関わる分子と良く似た構造をとっており、4箇所で 糖鎖修飾を受けている可能性があるが、結晶化のた めに糖鎖を切断する必要は無く、そのうちの2箇所 で1~2残基を解像できた。図1、6から、糖鎖は分 子間の間隙に収納されていることが分かる。

Na+, K+-ATPaseは心臓病との関係でも極めて重 要な蛋白質であり、医学的影響も絶大である。特に、 ジギタリスやウアバインに代表される強心配糖体は 2世紀以上に渡って治療薬として使われているが、 Na+, K+-ATPaseの強力な阻害剤であるため危険で もある。E2・2K<sup>+</sup>・MgF<sub>4</sub><sup>2-</sup>結晶を用いて、ウアバ インの結合様式とそれに伴う構造変化を決定できた (図6)50 ウアバインは サブユニットの細胞外側 表面に結合するというモデルが流布していたが、実 際は、膜貫通領域の奥深くまで挿入されており、細 胞外側ゲートを閉じられなくすることが事の本質で あることが判明した。この構造は、K+が結合して いるために低親和状態ではあるが、高親和状態も結 合の本質的な部分は同一と考えられるので、医学的 にも大きな貢献が出来るであろう。

#### 参考文献

- [1] C. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura and H. Ogawa: Nature 405 (2000) 647-655.
- [2] C. Toyoshima, Y. Norimatsu, S. Iwasawa, T. Tsuda and H. Ogawa: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 104 (2007) 19831-19836.
- [ 3 ] C. Toyoshima: *Arch. Biochem. Biophys.* **476** (2008)
- [4] T. Shinoda, H. Ogawa, F. Cornelius and C. Toyoshima: Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* **459** (2009) 446-450.
- [5] H. Ogawa, T. Shinoda, F. Cornelius and C. Toyoshima: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 106 (2009) 13742-13747.

## <u> 豊島 近 TOYOSHIMA Chikashi</u>

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 FAX: 03-5841-8491

e-mail: ct@iam.u-tokyo.ac.jp