

トピックス

筋小胞体カルシウムポンプの構造決定

豊島 近, 中迫 雅由, 野村 博美, 小川 治夫

東京大学分子細胞生物学研究所*

Structure Determination of Calcium Pump of Sarcoplasmic Reticulum

Chikashi TOYOSHIMA, Masayoshi NAKASAKO, Hiromi NOMURA and Haruo OGAWA

Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo

Structure of the calcium pump of muscle sarcoplasmic reticulum was determined at 2.6 Å resolution by X-ray crystallography. This is the first atomic structure of the cation pumps called P-type ATPases. Because the crystals were very thin, the use of SPring-8 was vital to this work. The structure of the Ca²⁺-pump is overviewed very briefly with emphasis on the X-ray diffraction experiments.

1. はじめに

生体はイオンを非常に巧みに使っている。Na⁺は細胞外に多くK⁺は細胞内に多い。その結果として、筋細胞を例にとると、細胞の膜電位は内側が外側よりも約90 mV低く保たれている。細胞が興奮するというのは、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0 mV近く(或いはそれ以上)になってしまうことである。つまり、イオンの流入が神経細胞などの興奮の実体である。筋肉が収縮する時には、神経細胞の興奮によってカルシウムの放出チャネルが開き、貯蔵庫(筋小胞体と呼ばれる袋状のもの)からカルシウムが筋細胞中に放出される。そのカルシウムがアクチンフィラメント上のトロポニンに結合し、ミオシンがアクチンと結合できるようになって、筋収縮が起こる。さて、このままでは筋肉は収縮したまま、神経細胞も興奮したままである。もとの状態にイオン環境を戻してやらなければならない。そのためには、濃度勾配に従って流入してきたものを、もう一度貯蔵庫に運び入れなければならないわけで、イオンを濃度勾配に逆らって輸送する(能動輸送と呼ばれる)必要がある。ATPの持つ化学エネルギーを消費して、この過程を担うものがイオンポンプと呼ばれる蛋白質である。イオンチャネルは、要するに孔であるが、ポンプははるかに複雑なことをしていると考えられる。

イオンポンプは脂質二重膜に埋まった膜蛋白質であり、膜の片側から反対側へ特定のイオンを運ぶ。Na⁺とK⁺の濃度差を保つポンプはNa⁺K⁺-ATPaseと呼ばれ、カルシウムを運ぶポンプはCa²⁺-ATPaseと呼ばれる。いずれも運搬するイオンによってスイッチがONになるATP分解酵素である。他にも胃のpHを維持しているH⁺K⁺-ATPaseや、銅などの重金属を排出するポンプがあり、総称してP型ATPase(あるいはP型イオンポンプ)と呼ばれる。運搬の過程で、ATPのγリン酸によって、酵素それ自体がリン酸化されるのでその名前がある。いずれも、機能しなくなったら細胞は生存不可能となる、重要な機能を持った蛋白質群であり、Na⁺K⁺-ATPaseの発見(1957年)によって、1997年度のノーベル賞がデンマークのJ. C. スコウに授与されたほどのものである。P型ATPaseはまたの名をE1E2型ATPaseとも呼ばれる。Ca²⁺-ATPaseの場合、細胞内から外部(小胞体内腔)へカルシウムを運ぶわけだが、カルシウムに対して高い親和性を持ち、結合部位が細胞内を向いているのがE1状態であり、細胞外を向いて低親和性の状態がE2状態である。親和性の変化と結合部位の向きの変化がリン酸化が行っていることであり、能動輸送の実体と考えられている。

私達が構造決定に成功し¹⁾Natureの表紙(SPring-8のあちこちにも貼ってある)にもなった蛋白質(Fig. 1)は、

* 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

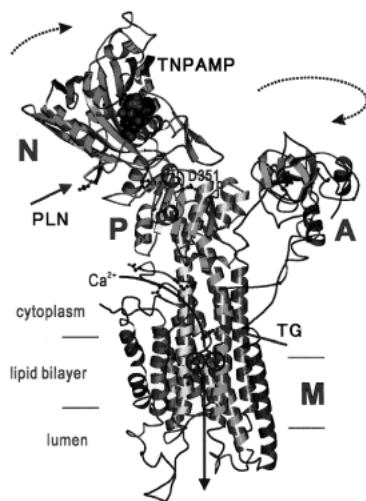


Figure 1. Architecture of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Two spheres in the membrane domain represent bound Ca^{2+} ions. Three cytoplasmic domains are well separated and labelled A, N and P. TNP-AMP (an analogue of AMP), in CPK model, is located on domain N and far distant ($>25 \text{ \AA}$) from the phosphorylation site (D351), suggesting that domain N will approach domain P when phosphorylation occurs (arrows in broken line). The binding sites for thapsigargin (TG, a potent inhibitor) and phospholamban (PLN, a regulatory protein in cardiac muscle) are also marked.

筋小胞体のカルシウムポンプであり、分子量11万、994個のアミノ酸残基から成る。P型ATPaseとして初めての構造決定というだけでなく、輸送するイオンがカルシウムであるところがこの仕事の意義を大きいものになっている。なぜなら、カルシウムは生体の機能を制御するためにもっともよく使われているイオンであり、国際カルシウム学会なるものが(欧州カルシウム学会も)あるほどなのだ。なぜカルシウムなのかというのは面白い問題であるが、教科書的には①2価イオンであり、アミノ酸と程々強く結合する(1価では弱すぎ、3価では強すぎる)、②程々の大きさがあるため配位の仕方はかなりゆがんでいても良い(Mg^{2+} などはごく安定な6配位になる傾向が著しい)ため、蛋白質の側が選択性を持たすことが出来るからである²⁾。この事についてはあとで少しだけ触れる。

もう一つの生物学的に重要なことは、進化の過程でのP型ATPaseの位置が明らかになったことであろう。P型ATPaseのリン酸化部位付近(Fig. 1のPドメイン)のアミノ酸配列は他のATPaseやGTPaseと違っており、進化上の類縁関係は長いこと謎であったが、一昨年になって、アミノ酸配列からハロ酸脱ハロゲン化酵素との相同性が主張された³⁾。 Ca^{2+} -ATPaseの三次元構造は、この主張が正しいことを示しており、P型ATPaseはATPとは一見何の関係もありそうにない他の酵素をも含む、大きなファミリーの一部を形成することが確実になった。

Ca^{2+} -ATPaseの構造に関しては既に何カ所かに解説記事を書いたので、本稿では、実験の実際について多少詳しく書いてみたい。

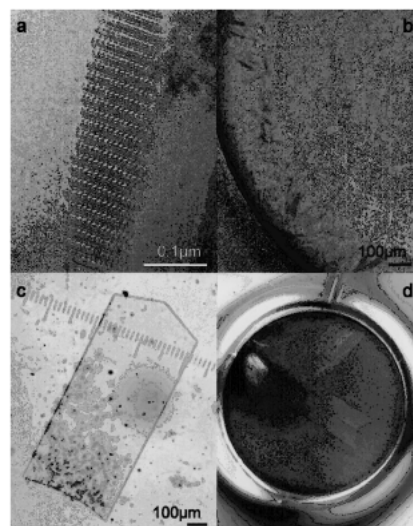


Figure 2. Crystals of Ca^{2+} -ATPases in various stages of the project. a, Electron micrograph of a microcrystal consisting of stacks of 2D crystals; the two leaflets of lipid bilayer are clearly resolved (black parallel lines). b, Phase-contrast micrograph of ultra-thin 3D crystals induced by sodium propionate. c, Polarisation micrograph of a plate-like crystal formed with sodium butyrate; some amorphous material sticking to the crystal is also seen. d, Polarisation micrograph of crystals within the dialysis button; the diameter of the hole corresponds to 3 mm.

2. 結晶化とここまでの道のり

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPaseはその名の通り、ATP分解酵素であり、一個のATPあたり最高2個のカルシウムを運搬できる。一秒間にサイクルは約30回(37°C)回れるので、高々60個のカルシウムが運搬されることになる。この速さは、筋収縮時に使われるチャンネルのそれ(一千万個/秒)に比べて圧倒的に遅い。そのため、小胞体膜の膜蛋白質の半分以上はこのポンプによって占められている。そのような高い割合で存在するため、可溶性・精製しなくても、適当な条件(Ca^{2+} 非存在下、デカバナジン酸存在下)にすれば、この蛋白質は自然な膜に入ったままで二次元的に並び、チューブ状結晶が得られる。このようなチューブ状結晶から電子顕微鏡を用いて三次元構造が8 Å分解能で得られていた⁴⁾。この分解能では、膜貫通 α ヘリックスが密度の高い棒状のものとしてどうにか認識できる程度であった。また、精製標品からは高濃度のカルシウム(10 mM)存在下で三次元微結晶が得られ(Fig. 2a)、投影像から、カルシウム無しの状態とは大きな構造変化が起こっていることはわかったもの⁵⁾、解析の十分な手段が無かった。このような微結晶から出発してX線結晶解析にかかるまでに結晶を成長させることが出来たわけである。

結晶化条件を捜しているうちに、平面的に大きくすることは文献⁶⁾に従ってすぐ出来た。しかし、これは二次元結晶が何層か積み重なっただけのごく薄い三次元結晶というどうしようもなく中途半端なものであった(Fig. 2b)。しかし、電子線回折では3.5 Å分解能を越えるスポットが観

察されたので、次の3本立てで研究を進めることにした。すなわち、①薄くして2次元結晶を作り、手法としては既に確立した電子線結晶解析技術を使う。②このままの厚さのものでも解析する技術を開発する。③X線結晶解析にかかるまでに結晶を厚くする。①に関しては透析時の温度と蛋白濃度を最適化すれば、3層程度までは薄くできることが判った。実際このような結晶から収集した位相情報はX線結晶解析の過程で大変役に立った。②に関しては電子線回折でもX線回折で確立しているデータ収集技術が使えるはずという考えのもとに、電子線回折用回転カメラを開発し、予備的データが収集・解析できるようになった。

しかし、結局最も成功したのは③のX線回折にかけられる迄に結晶を厚くすることであった。すなわち、非常にうまくいった場合には約30 μm (2000層相当)まで厚くすることができた (Fig. 2c)。もっと厚く出来れば分解能はより向上すると思うが、SPring-8のような大型放射光施設の進歩によって薄いことによる問題ははるかに小さくなった。実際にはC₁₂E₈で可溶化し、リン脂質と混合した試料を透析外液 (0.8 M 酪酸ナトリウム, 2.75 M グリセロール, 10 mM 塩化カルシウム, 3 mM 塩化マグネシウム, 2.5 mM アジ化ナトリウム, 0.2 mM DTT, 20 mM MES, pH 6.1) に対して透析する。結晶成長は2ヶ月は続くようである。

厚みを増やすことが出来た原因には色々のものがあるが、酪酸ナトリウムが鍵であったことは確かである。この

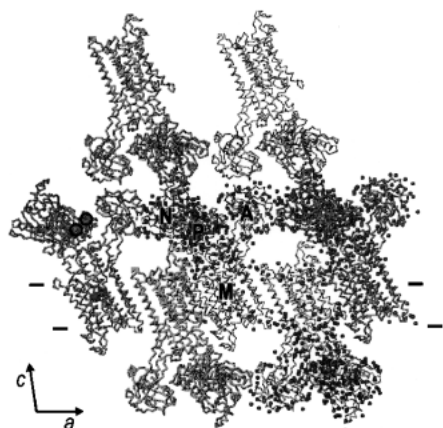


Figure 3. Crystal packing of Ca^{2+} -ATPase in the plate-like crystals. $C\alpha$ traces with the a -axis horizontal and the b -axis normal to the plane of the paper. Thin lines are used to represent the molecules offset by half unit cell along the b -axis due to the crystal symmetry (C2). Because the crystal is made of stacks of membranes, the lipid bilayers extend parallel to the ab plane (normal to the plane of the paper) but may well be distorted around the protein molecules. Horizontal bars show rough estimates of the positions of the membrane surface from the distribution of hydration water (small spheres). Three cytoplasmic domains (A, N and P) are identified. Locations of two Ca^{2+} ions are indicated by spheres in the transmembrane domain (M). Those of lanthanide (La^{3+} and Tb^{3+}) in derivative crystals are marked by circles. The distance between adjacent layers measures 145.7 Å.

塩が何をやっているかは良くわからない。それとはっきり認識できる電子密度がマップの中にあるわけでもない。120 mM KClでも電子顕微鏡レベルの結晶はできる (Fig. 2a, 格子定数は $a=168.4$, $b=56.4$, $c=186.8$ Å; $\beta=83.9^\circ$)。しかし、分子のパッキングは大きく違っており (空間群はともに C2), 酪酸がある場合 (Fig. 2c, $a=166.01$, $b=64.38$, $c=147.14$ Å; $\beta=98.00^\circ$) c 軸方向には40 Åも短く、 b 軸方向には8 Å広がっている (Fig. 3)。従って、0.8 Mの酪酸ナトリウムによってパッキングが c 軸方向に密になっていることは明らかである。 c 軸方向が結晶成長のもっとも悪い方向であるから、これによって結晶性が改善されたことは明らかだが、どのような力によってそれが起こったかは今のところわからない。

3. 実験室でのX線回折実験

結晶は厚いものでも通常20 μm 程度とごく薄かったし、結晶化のためにはグリセロール20%, 高イオン強度 (0.8 M 酪酸ナトリウム) を必要としたために、特に凍結防止剤を新たに加えなくても、通常のクライオストリーム (リガク) による急速凍結で非晶質の氷が得られた。そのため、すべての実験はクライオ条件下で行った。急速凍結のためにはまず、結晶をナイロンループで拾い上げる必要がある (Fig. 4)。結晶化は透析法によったのであるが、かなり粘性のあるバックグラウンドがあり、結晶はそれからまわって得られた (Fig. 2c, d)。そのため、結晶をまず depression glass に移し、ナイロンループでほぐす操作が必要であった。この過程は低温室で行った。また、結晶は薄いが大きかったため、1 ϕ のループでも入らないものもあり、大きいまま無理にすくうより (ループに引っかかったまま凍った場合は確実に駄目である)、カミソリで切った方が良い結果が得られた。最も良かった結晶はそのようにして得られたものである。特に1 ϕ のループを使った場合、液体窒素中のハンドリングやゴニオヘッドに装着するときにループからはずれてしまうことを何度か経験したの



Figure 4. A plate-like crystal of Ca^{2+} -ATPase mounted in a nylon loop. The width of the crystals measures ~ 400 μm ; the thickness is approximately 20 μm . Note that the specimen was examined with laboratory source and stored in liquid nitrogen for more than one year prior to the diffraction experiment at BL41XU and that no severe frosting was observed.

で、0.8 ϕ 程度までにとどめておく方が安心である。また、重原子のソーキング実験の時は(脂質の酸化やイオン環境の変動等を考えて)空気との接触を最小にするためループで拾った結晶を100 μl のガラスキャピラリーに詰め、1時間行った。このように、重原子ソーキングの場合は、1)結晶を透析ボタン (Fig. 2d) から depression glass に移す、2)結晶をきれいにする(付着物を除く)、3)大きすぎたら切る、4)ループで結晶を拾う、5)キャピラリーに詰める、6)キャピラリーから出して再びループですくい、7)急速凍結する、と多くの操作が必要であり、結晶にダメージを与える可能性がある。当然、熟練を要するので、常に、1)~5)は豊島が、6)~7)は中迫が行った。

急速凍結の際は幾つかの点に注意した。すなわち、ループですくった直後に、ループと接触していないことを顕微鏡で確かめた。凍結の際ループの向きは、いつも気流と平行になるようにした(効率が上がり場所による違いが少なくなる)。また、クライオストリームの中の位置は実験期間中動かさなかった。これによって、結晶が薄いせいもあったと思うが、結晶間の格子定数の違いは無視できた。試料を拾う際は実体顕微鏡からクライオストリームまでが物理的に最短になるようにし、depression glass は氷水で冷やしながら行った(実体顕微鏡にも赤外線フィルターを入れた)。この結晶は高イオン強度で成長しているせいか、イオン環境や温度の変化に比較的強く、急速凍結の操作は室温でできた。現在取り組んでいる Ca^{2+} -ATPase の別の生理的状態の結晶は環境変化に弱く、低温室内で凍結する必要がある。

さて、放射光での実験を効率よく行うためには、実験室での予備実験が肝心である。急速凍結した試料はすべて実験室で露光し、結晶性の良いもののみを回収・保存し放射光での実験に用いるようにした。我々が開発したトング⁷⁾(現在リガクから入手可能)を用いれば、この過程での失敗や霜の付着はほとんどなく、長期保存も可能である (Fig. 4)。特に、重原子置換体の検索にあたっては実験室でのデータ収集をあらかじめ行い、有効であると確かめられた結晶のみを回収し、放射光実験に用いた。結晶の空間群は $C2$ であり、 180° のデータを収集する必要があったため、当初はフルデータ収集に2週間かかった。効率化の為、R-Axis IV の Yale ミラーを標準の Pt-Ni から Pt-Pt に変更した(110万円かかった)。この結果、強度は約2倍になり、振動角 0.6° 露光時間20分 (RIGAKU Ultrax 18, 45 kV, 90 mA で運転) で $1/3.5 \text{ \AA}^{-1}$ 程度迄のデータを実験室でも収集できた。(振動角を小さくしたのは、 c 軸が 150 \AA 近くと大きいこととバックグラウンドを下げるためである。)

また、重原子の検索においては、結晶が非常に薄いことを利用し、電子顕微鏡像から得た位相が大変役に立った⁸⁾。(hk0) 面一面だけかつ低分解能 (6 \AA) ではあったが、最初から差フーリエ法が使えたため、(hk0) 面を

含む比較的狭い範囲のデータを収集すればよいので、時間の節約にもなった。電子顕微鏡の方が試料に関する制限がきついが(結晶の厚さは $0.2 \mu\text{m}$ 以下、グリセリン濃度は5%以下であって欲しいとか)、 6 \AA 分解能程度までは特に難しいこともないので、板状結晶の場合は試みるに値すると思う。溶媒平滑化がうまく行っているかの検定にも有用だった。

重原子として最初は Pt_2I_2 (通称 PIP) やリンタングステン酸のような大きなものを試したが、54種試したうち、うまく行ったのは Pt とランタノイド (La, Tb) の5種であった。(特に、Tb は膜内のカルシウム結合部位に高親和性で結合したカルシウムを置換すべく、90時間行ったが、置換は起こらなかった。重原子置換体としては有用であった。)水銀系は全滅であり(濃度を下げても駄目)、Ir 等では結晶が曲がった。結晶のハンドリングの問題があるため、うまく行かないと確信できるためには数回の試みが必要であった。その結果、native 結晶も含めると450個以上の結晶を凍結・露光したことになる。重原子が結合したアミノ酸残基は、モデル完成後、確認の意味もあって確かめたが、Pt の場合はすべてメチオンンであった。

4. SPring-8 での X 線回折実験

実験室で評価した試料のみを持ち込んで回折実験を行ったため、SPring-8 (BL44B2, BL41XU) での実験効率は極めて良かった (Fig. 5)。実験室での予備実験の結果と SPring-8 得られたデータとは非常に良く相関しており、薄いか小さいとかの理由により、実験室で良い回折パターンが得られなかったものは、放射光でも S/N 比が悪く役に立たなかった。結局、厚いものほど良い傾向にあった。

BL41XU での実験では 2.5 \AA 分解能を超える点がイメージングプレート上でそこそこ見える程度だったが、一応のデータになったのは 2.6 \AA 分解能までであった。この原因

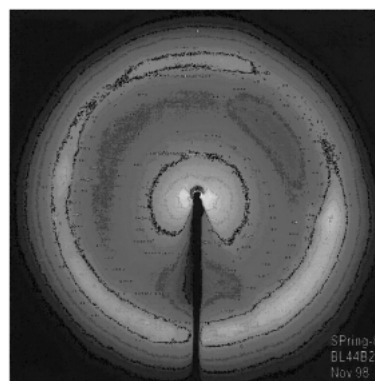


Figure 5. X-ray diffraction pattern from a plate-like crystal of Ca^{2+} -ATPase. Recorded on an imaging plate using RIGAKU R-Axis IV at BL44B2 in early days of this work. Wavelength, 0.990 \AA . Diffuse ring near the edge of this figure is originated from amorphous ice and located at $1/3.7 \text{ \AA}^{-1}$.

の一つは、データ収集を行ったのが、BL41XUにMAR社 CCD 検出器が導入された直後であり、電源ラインからの雑音のっていたこと、mosaicityが高く対称性も低かったためか、DPS/MOSFLM⁹⁾による格子定数の決まりが悪かったことがあげられよう。イメージングプレートで収集した時には、使い慣れた Denzo がビームラインで使えず、露出の最適化ができなかった（とんでもなく過剰の露出をした）。また、ダイナミックレンジをかせぐために使っている2個の光電子増倍管間のマッチングの問題もあった。結局のところ、BL41XUでイメージングプレートで得たデータは残念ながら merging できなかった。結局、native 結晶の最も良いデータは BL44B2 でイメージングプレートで得たものであった。これは結晶が良かったこともあるが露光の条件がダメージとの兼ね合いからも適当であったためと考えられる。S/Nの点からはイメージングプレートの方が良い可能性が高いので、近い将来 R-AXIS でデータ収集をし直したいと考えている。

また、照射損傷は歴然としており、BL41XUでも200 μm のコリメータを用いて、単位体積あたりの負荷を減らすようにした。200 μm のコリメータを用いたもう一つの理由は、ゴニオメーターの回転中心とビームの中心が必ずしも一致していないことにくわえて、結晶が薄いことと、ループ中の結晶をとりまく溶液（氷）のレンズ効果のために結晶がどこにあるかよくわからなかったからでもある。これも、回折強度を直ちに評価でき、且つ試料の移動をハッチの外から定量的にできれば原理的には解決可能な問題であるが、実験を行った当時はそのどちらも現実的ではなかった。従って、このような薄い結晶に対しては氷からの余計な散乱を防ぐためにも、スリットでビームを整形して至適化したい。また、このように薄くて大きい結晶の場合、場所による結晶性の違いは相当あると予想される。データ収集の最適化という観点からは、まず細いビームで場所による違いを評価し、best の位置と大ききでデータ収集を行いたい。現在、BL41XUの試料の微動機構は大幅に改善され、試料位置の移動は外部からごく簡単にできる。しかし、回折強度の評価の為に、回折パターンを目で見て推測するだけしかないのは残念である。また、これだけ結晶の形が扁平だと、吸収による回折データの異方性が問題になるかもしれない。そう思って、波長0.8 Åと1.0 Åで得たデータの比較を行ってみたが、異方性温度因子によって補正できる効果はほとんどなかった。放射損傷の波長や強度、照射時間依存性など定量的実験が必要であることはまだ数多い。

5. 解析

解析は CCP4¹⁰⁾を用いて、異常分散効果を取り入れた多重同型置換法で行った。初期位相の決定には MLPHARE を用いた。SHARP¹¹⁾も試みたが、この場合には良いことはなかった。溶媒平滑化には SOLOMON¹⁰⁾を用いた。

DM¹⁰⁾に比べて圧倒的に良いマップが得られた。但し、flipping factor は色々試して、標準値よりも小さくした。重原子として、精密化には XPLOR¹²⁾と CNS¹³⁾を用い、最終的には CNS を使った。結局、大量に存在するはずのリン脂質はまったく同定できなかった。

6. 構造の概略

Nature に発表した論文¹⁾の要点をかいつまんで述べてみよう。

- ① カルシウムが2個結合した状態の構造であり、分解能は2.6 Åである (Fig. 1)。
- ② アミノ酸配列から予想されたとおり膜貫通領域は10本の α ヘリックス (M1-M10) から成る (Fig. 6)。細胞質領域は3つの明瞭に分離したドメインよりなり、その役割からA (actuator 或いは anchor), N (nucleotide binding), P (phosphorylation) ドメインと命名した。NドメインにはATPの類似体 (TNPAMP) のアデノシン部分が結合する。また、Pドメインにはリン酸化部位 (Asp351) が存在する (Fig. 1)。
- ③ 膜貫通領域とPドメインはM4, M5ヘリックスで結ばれ、リン酸化部位はM4の先に位置する。特にM5はリン酸化部位の近傍までのびている。また、Pドメインの底を走るM6-M7を結ぶループ (L67) があり、重要な役割を持つらしい。AドメインはM1-M3と結ばれている (Fig. 1)。
- ④ 2個のカルシウムは横に並んで膜の中央より細胞質側に結合している (Fig. 3)。これ迄はイオン通路にそって縦に並んでいると考えられていた。
- ⑤ カルシウムを高い親和性を持って結合するために、膜貫通ヘリックスのうち2本 (M4, M6) は結合部位付近でほどけている (Fig. 7)。2個のカルシウム結

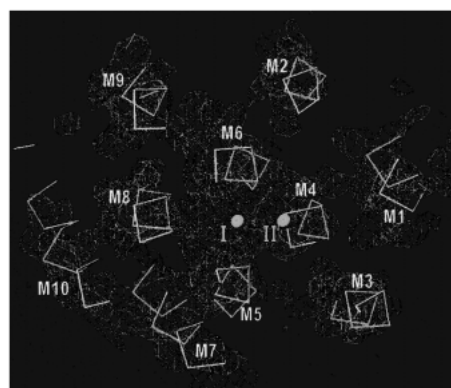


Figure 6. Arrangement of transmembrane helices of Ca^{2+} -ATPase. A view roughly normal to the membrane. 10 α -helices are identified. M1-M6 and M7-M10 are clearly segregated. M7-M10 are lacking in bacterial type I P-type ATPases. A solvent flattened map, contoured at 1.2σ (blue net), is shown. Two spheres represent bound Ca^{2+} ions (I and II).

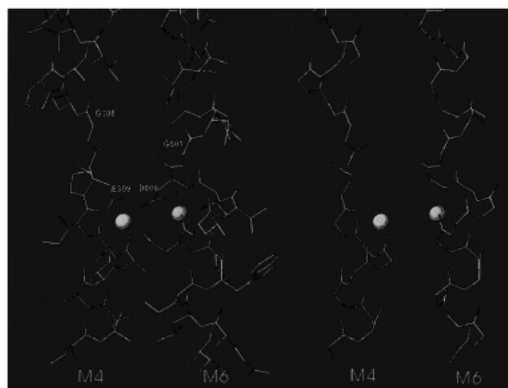


Figure 7. Two transmembrane α -helices (M4 and M6) that are unbound for efficient co-ordination of Ca^{2+} (left). Right, backbone of the two helices. Spheres represent bound Ca^{2+} ions.

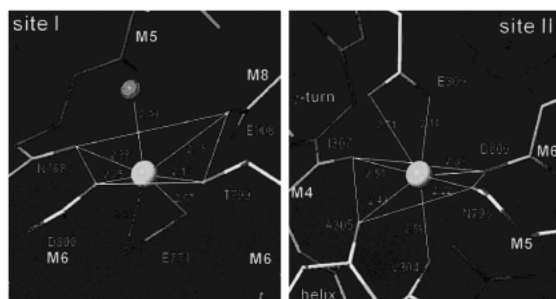


Figure 8. Details of the transmembrane Ca^{2+} -binding sites. Note that the two sites have very different co-ordination geometry. All the co-ordinating oxygen atoms are from side chains (plus water) in site I; 3 main chain carbonyl oxygen atoms are used in site II, in which much more regular co-ordination geometry is realised. The numbers show the distances between Ca^{2+} ion and the co-ordinating oxygen atoms (in Å). Valence value calculated from the distances are 1.9 (including water) for site I and 2.2 for site II.

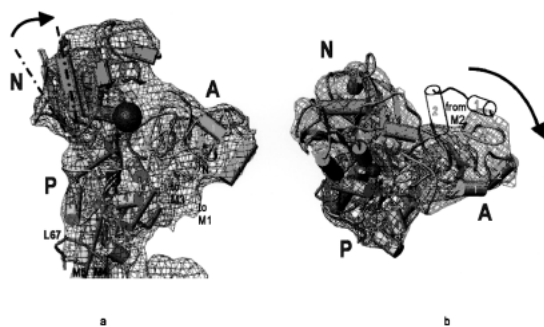


Figure 9. Fitting the atomic model obtained for the Ca^{2+} -bound state (arrows and cylinders) to an 8 Å resolution map (net) obtained from tubular crystals [3] formed in the absence of Ca^{2+} and presence of decavanadate (large sphere in a). Overall orientation of the molecule in a is the same as in Fig 1. In b, it is viewed from the cytoplasmic side normal to the membrane. The black arrows show the direction of movements from the Ca^{2+} -bound to unbound state.

合は協同的であるが、それに対応して2個の結合サイトの構造は相当異なっている (Fig. 8)。

- ⑥ カルシウム非存在下、デカバナジ酸存在下ではチューブ状結晶が得られるが、その電子顕微鏡による低分解能の三次元像⁴⁾と比較した結果、3つの細胞質側領域、特にAドメインは $\sim 90^\circ$ 回転するという非常に大きなドメイン運動を示した (Fig. 9)。

7. 膜貫通領域の構造

ここでは特にカルシウム結合サイトの構造について述べよう。上に述べたように、 Ca^{2+} -ATPaseの膜貫通ヘリックスはアミノ酸配列からの予測どおり10本 (M1-M10) であった。2つのカルシウム結合サイトは膜貫通領域のほぼ中央に位置しM5, M6, M8ヘリックスが関与するサイトIと、ほとんどM4ヘリックスの上に出てくるサイトIIとで構成される (Fig. 6)。2つのカルシウム結合部位の構造は相当に異なっている (Fig. 8)。サイトIはすべてアミノ酸残基の側鎖の酸素原子5個から成り、水も少なくとも1分子が配位している (Fig. 8)。配位する原子の位置は理想的な形からは遠く、原子間距離から計算した価電子数 (valence) も水分子を入れても1.9とやや小さい (理想的には2.0である)¹⁴⁾。サイトIIの方では主鎖のカルボニル基の酸素原子3つが配位しており、 Ca^{2+} 結合モチーフとして有名なEFハンドの変形と見なすことが出来、Glu309が上からカルシウムに蓋をするような形になっている (Fig. 8)。配位の形も良く、安定な配位が実現されている。このアミノ酸配列はPro Glu Gly Leu (PEGL)であり、良く保存されている。プロリンがあるから、ヘリックスがほどけていることは十分考えられた。しかし、ほどけているとは言っても、turn構造が出来ており、ふらふらしているわけではない。いずれにしても、構造予測の際には α -ヘリックスが大きくほどけている可能性をも考えなければならないことが明らかになったわけで、その意義は大きいと思われる。また、M6もほどけていることがわかったが、2つのカルシウムに配位するAsp800の周りに限られている (Fig. 7)。

さて、サイトIに関与する残基とサイトIIに関与する残基は違った性質を持つことが部位特異的変異の結果から得られている。すなわちサイトIに加えられた変異はカルシウムの結合を完全に無くしてしまうのに対し、サイトIIでの変異は半分にするに過ぎない。サイトIIに関与する残基2つに同時に変異を導入してもやはり半分であるから、サイトIへの結合は保たれるものと考えられる¹⁵⁾。つまりサイトIへのカルシウムの結合がサイトIIへの結合を誘導することになる。これはよく知られたカルシウム結合の協同性を説明するものと考えられる。サイトIIへの結合が、コンフォメーション変化を引き起こし、ATPの加水分解が始まる (それ以外のスイッチは無い) のだが、カルシウムの結合に伴ってドメインNの運動 (熱運動) が誘起さ

れるという報告もあり、ATPによるリン酸化がPドメインにあるAsp351で起こりえるようになる(ドメインNに結合したATPがAsp351に接近できるようになる)ということがその実態であるらしい。

8. 細胞質側領域の構造変化

細胞質側領域が3つの非常に良く分離した領域(A, N, Pと名付けた)から成る(Fig. 1)ことは既に述べた。Pドメインにはリン酸化されるアミノ酸残基であるAsp351がある。一方、ATPの類似物であり高い親和性を持つTNPAMPを結合させた結晶の構造を差フーリエ法で調べたところ、リン酸化部位とは大きく離れたNドメインに結合することが判明した。つまり、リン酸化が起こるためにはNドメインは大きく動き、Pドメインに近づかなければならぬはずである。このことは電子顕微鏡による解析で得られたチューブ状結晶中のCa²⁺-ATPaseの8 Å分解能の密度図⁴⁾(厳密にはクーロンポテンシャルのマップ)と比較することで確かめられた。このチューブ状結晶はカルシウム非存在下、デカバナジン酸存在下で形成されるものである。蛋白質分解酵素による実験結果からはリン酸化状態(E2Pと呼ばれる状態)に近い状態にあると考えられる。この結果はFig. 9に示したとおりであり、Nドメインは20°ほど傾きが変わっており、Pドメインに近くなっている。それでもまだATPがリン酸化残基に届くまでには足りないのであるが、バナジン酸の10量体であるデカバナジン酸(V₁₀O₈⁸⁻, Fig. 9の赤い球。チューブ状結晶を作るためにデカバナジン酸が使われる。バナジン酸自体はリン酸の類似体である。)がNドメインとPドメインの間に挟まった形になって、もっと傾くのを妨害しているように見える。この部分には実際デカバナジン酸と対になる塩基性のアミノ酸残基がちょうど集まっている。驚くべきなのはAドメインであり、90°近くもほぼ水平に回転している。この領域の役割はほとんど判っておらず、TGESというP型ATPaseの目印の一つである配列があって、ATPase活性に重要であることが判っていたにすぎない。M3との間のループを酵素的に切断すると、E2P状態に行く直前で止まってしまうと言う報告もあり、本質的な役割を持っていることは間違いない。現在、蛍光物質によるラベルをAドメインに入れようと、色々の人が試みているらしい。

さらに興味深いことは、このように細胞質側の三つの領域をチューブ状結晶の密度図にあわせてみるとM4, M5というカルシウム結合サイトを形成している大事なαヘリックスはそのままではマップと合わないこと、M6, M7を結ぶループ(L67)はPドメインの運動と連動して膜面からの高さが変わっていることである(Fig. 9a)。実際、細胞質側領域だけではなく分子全体のモデリング(PDBに1FQUとして登録)を行ってみると細胞質側ドメインの運動をM5-M6ヘリックスの運動に変換する機構が備

わっていることが判る。一方、M7-M10は動かないようである。M5, M6がM8に対して動けば、サイトIに結合していたカルシウムはずれるであろう。そうすると協同性からサイトIIに結合したカルシウムもはずれることになり、カルシウムの運搬が起こることになるのではないかと。

9. 今後の展望

イオンポンプの反応サイクルには少なくとも5つのステップがある。ここに記述したように、今のところ、そのうちの一つが詳しく、もう一つがごく大まかに判っただけに過ぎない。当然、他の状態の構造を高分解能で決定したいわけである。この方向での研究は順調に進んでおり、既にCa²⁺無しの2つの状態での結晶化に成功し、解析も順調に進行している。従って、構造変化のおおよそは近い将来に理解できるのではないかと考えている。

この解析の過程で、膜貫通ヘリックスは大規模な再配置を起こすことと膜に垂直な方向にも大きく動いているらしいことがわかってきた。そうになると、脂質二重膜を見なくなる。普通の結晶解析では捨てている低分解能領域の位相を求める必要がある。そのためには手管が必要で、臭素を結合した脂質をつかうとか、溶媒のコントラスト変調を行うとかの手段を考えている。当然放射光での実験が必要になるし、新しいことが出来そうなので大変楽しみにしている。なお、SPring-8での回折実験では理研の足立伸一博士、神谷信夫博士、JASRIの河本正秀博士の協力を頂いた。深く感謝するものである。

参考文献

- 1) C. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura and H. Ogawa: *Nature*. **405**, 647 (2000).
- 2) W. Kaim and B. Schwederski: "Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life". Wiley (1994).
- 3) L. Aravind, M. Y. Galperin and E. V. Koonin: *Trends Biochem. Sci.* **23**, 127 (1998).
- 4) P. Zhang, C. Toyoshima, K. Yonekura, N. M. Green and D. L. Stokes: *Nature*. **392**, 835 (1998).
- 5) H. Ogawa, D. L. Stokes, H. Sasabe and C. Toyoshima: *Biochem. Biophys. J.* **75**, 41 (1998).
- 6) M. Misra, D. Taylor, T. Oliver and K. Taylor: *Biochim. Biophys. Acta* **1077**, 107 (1991).
- 7) 中迫, 野村, 小川, 豊島: 日本結晶学会誌 **42**, 478 (2000).
- 8) 中迫: 日本結晶学会誌 **41**, 47 (1999)
- 9) A. G. W. Leslie: *CCP4 Newsletter on Protein Crystallography*. **35**, 118 (1998).
- 10) Collaborative Computational project, No. 4.: *Acta Crystallogr. D* **50**, 760 (1994).
- 11) E. De La Fortelle and G. Bricogne: *Methods Enzymol.* **276A**, 472 (1997).
- 12) A. T. Brünger, J. Kuriyan and M. Karplus: *Science*. **235**, 458 (1987).
- 13) A. T. Brünger, et al.: *Acta. Crystallogr. D* **54**, 905 (1998).
- 14) M. Nayal and E. Di Cera: *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 817 (1994).
- 15) Z. Zhang, D. Lewis, C. Strock, G. Inesi and C. Toyoshima: *Biochemistry*. **39**, 8758 (2000).