

# イオンポンプ (P 型 ATPase) の構造生物学

豊島 近 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

**要旨** イオンポンプ蛋白質は生体膜 (脂質二重膜) に埋め込まれた「膜蛋白質」であり, ATP を加水分解する ATP 分解酵素でもある。筆者らはイオンポンプ蛋白質を代表する筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA1a) の原子構造の決定とその結果に基づく分子動力学計算に取り組んできた。現在, 反応サイクル全体をカバーする 9 つの中間状態の構造が決定され, 能動輸送の分子機構の概略は理解できたといえる。また, ATP や磷酸化が何をしているのか, 100% 近いエネルギー変換効率が何故可能なのか, どうしてポンプ蛋白質はこのような構造をとっているのか, といった本質的疑問にも答えられるようになってきた。本稿では特にイオン通路のゲートの閉閉機構に焦点を絞って解説する。

## 1. P 型 ATPase とその構造解析の現状

よく知られているように, 細胞の内外 (或いは細胞内小器官の内外) 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う過言ではない。その著しい例は, 神経細胞の興奮からの回復, 筋肉の収縮からの回復 (弛緩) である。

イオンポンプの歴史は Skou による  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase の発見 (1957年) に始まるが, 1960年代初頭には筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Sarco(Endo)plasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase1, SERCA1) が発見され, Post-Albers サイクルと呼ばれる反応サイクルは60年代後半に確立した (Fig. 1)。反応サイクルの途中でポンプ蛋白質は磷酸化されることから, P 型 ATPase の名がある。筆者らは  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の X 線結晶構造解析に初めて成功し ( $\text{E1} \cdot 2\text{Ca}^{2+}$  状態, 2000年) 2003年までは独走していると思っていたが, 2004年からはデンマークグループと熾烈な競争を行うこととなり, 現在に至っている。2007年からは, 医学的・生物学的にはより重要ともいえる  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase や植物  $\text{H}^+$ -ATPase も競争の対象となっている<sup>2-5)</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase に関しては既に20以上の構造が PDB に登録され, 易しいものはやられ尽くした感がある<sup>1)</sup>。しかし, まだ重要な中間体は残されており, 変異体の構造解析も本格的競争に突入しつつある。また, 反応サイクルほぼ全体をカバーする 9 つの中間状態の構造決定に成功したので (Fig. 1), イオン

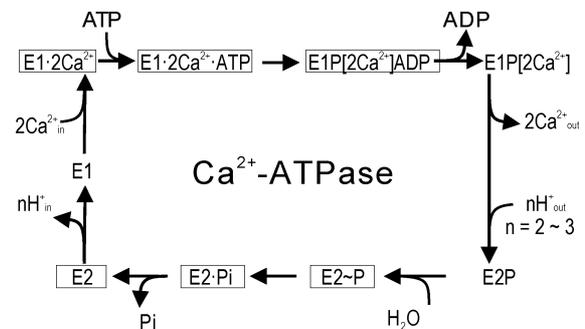


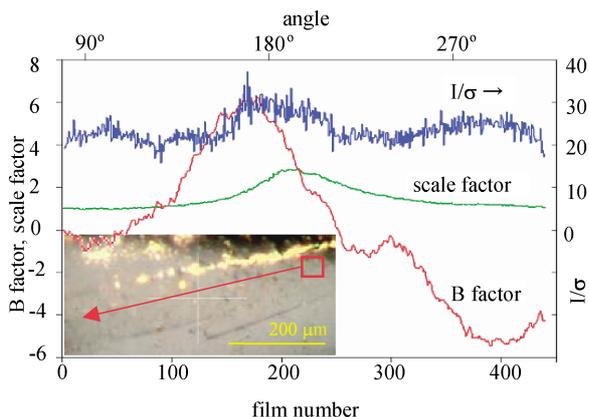
Fig. 1 Reaction cycle of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum. A simplified version. Boxed states show that the corresponding crystal structures have been published. [ $\text{Ca}^{2+}$ ] indicates occlusion of  $\text{Ca}^{2+}$ .

能動輸送機構の大略は理解できるようになったともいえるが, どうして構造がそうでなければならないのか, ATP のエネルギーはどう使われているのか, といった本質的問題に十分答えられているとはいえない。

本稿では  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase を中心にイオン能動輸送機構の本質, 特に gating の機構を解説したい。ひとつの蛋白質がこれだけ複雑な運動をすること, しかもおよそありえないと考えられていたヘリックスの滑り運動とか  $90^\circ$  を超えるドメインの回転運動とかを含んでいること, しかも, その運動は, たった一分子の水によって制御されていることには驚異としか言いようの無いものを感じる。

## 2. 技術的進歩

2000年に  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の最初の構造を発表した時点で SPring-8 はようやく立ち上がった状態であり, データ収集も初期には BL44B2 で bending magnet の光学系, 検出器は R-Axis IV であった。従って 1 フレームのデータ取



**Fig. 2** Data collection in the gradual mode and variation of statistics provided by Scalepack of a plate-like crystal of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. Inset shows the mounted crystal. The red square indicates the start position of data collection and the beam size ( $50 \mu\text{m}$  square). The arrow shows the direction of translation of the specimen. The spindle axis is parallel to the horizontal axis of the figure. The angle of  $90^\circ$  means that the incident X-ray beam is perpendicular to the plate-like crystal. The wave length used was  $0.9 \text{ \AA}$ , camera distance =  $300 \text{ mm}$ , oscillation angle =  $0.5^\circ$ , exposure time =  $0.7 \text{ sec}$  (no attenuator), total number of frames =  $440$ . The crystal belongs to the space group  $C2$ , and has unit cell dimensions of  $a = 225.8$ ,  $b = 51.0$ ,  $c = 164.3 \text{ \AA}$  and  $\beta = 105.4^\circ$ . The resolution was  $2.6 \text{ \AA}$ , and the mosaic spread  $0.9\text{--}1.3^\circ$ . The specimen was cooled to  $100 \text{ K}$  by cold nitrogen gas. The detector used was Rayonix MX225HE. The data were collected on June 25, 2008.

集に約4分を要し、実験室でのスクリーニングはビームタイムの有効活用のために極めて重要であった。現在はBL41XUでCCD検出器を用いてデータ収集を行っている。この10年間にビームラインの光学的性質、実験環境は著しく改善され、データ収集の方法も変わった。

膜蛋白質結晶の場合、X線照射による損傷は非常に大きい。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った。

**Fig. 2**に実際のデータ収集の例を示す。ここでは、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPaseの板状結晶を用い、 $50 \mu\text{m}$ 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 $5 \mu\text{m}$ 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、1フレームあたりの振動角 $0.5^\circ$ 、440フレームで $220^\circ$ の方位をカバーする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る。平行入射の場合一方向にやや伸び、回折強度の積分範囲からはずれる部分が高分解能領域ほど増加するために、Scalepackは温度因子で補正するものと考えられる。)すなわち、温度因子で

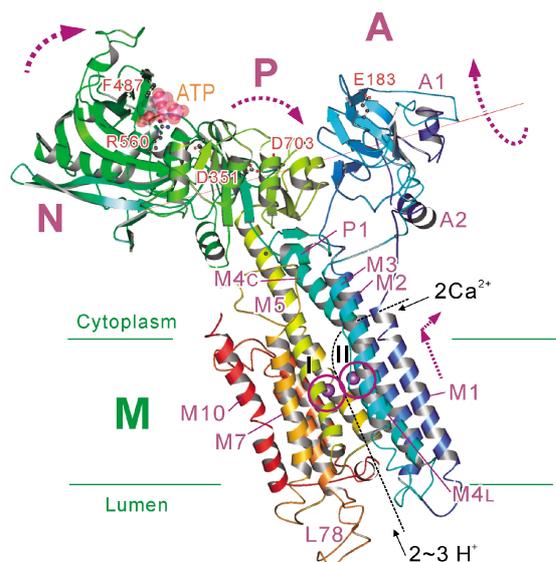
判断する限り、照射損傷は問題にならない、という結論になった。

一方、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、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、 $\text{Ca}^{2+}$ 非結合時の $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseの結晶のように、一軸(c軸)が極端に長い( $\sim 600 \text{ \AA}$ )場合、問題は深刻であった。このような場合、ゴニオメーターヘッドに $90^\circ$ アームを装着し、c軸が回転軸とほぼ一致するようにしてデータ収集を行うが、試料冷却のための窒素ガスがアームに当たることによる試料位置の移動は、結晶の厚さをはるかに超えるからである。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。その最適化のためには、結晶の方位は変えず、水平・垂直方向に一定間隔( $5\sim 20 \mu\text{m}$ )で試料を移動させて露光し、最も良い場所を探せばよい。これは、diffraction scanという名前で実装され、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. イオンポンプの全体構造

さて、本題に入ろう。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(細胞の内側)を向いている状態をE1、低親和性で反対(SERCA1の場合、小胞体は細胞内小器官であるから、その内腔)を向いている状態をE2と呼ぶ(**Fig. 1**)。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(SERCA1の場合Asp351)にATPからリン酸が渡され、リン酸化される(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(E1P→E2P)、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。リン酸化アスパラギン酸の加水分解反応によってリン酸が外れ(E2P→E2)、ゲートは閉じる。すなわち、イオンの運搬はE1P→E2Pで成される<sup>1)</sup>。

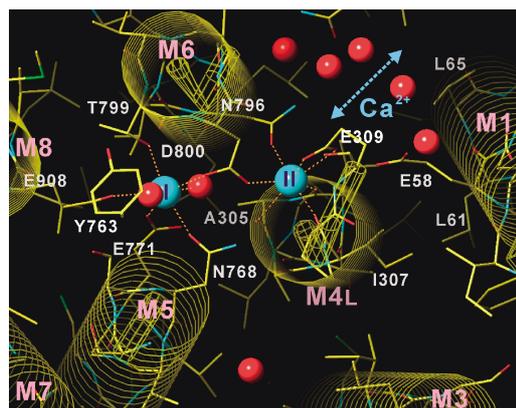
濃度勾配に逆らったイオン輸送を行うためには、(i)イオン結合部位はイオンに対する親和性を変化させ得ること、(ii)細胞質側(イオンを取り込む側)ゲート、細胞外側(或いは小胞体内腔側、イオンを放出する側)ゲートと2つのゲートを持ち、2つのゲートは協調して働く(同時に開くことはない)こと、また、(iii)イオン親和性の変化とゲートの開閉は、はるか( $\sim 50 \text{ \AA}$ )離れたリン酸化部位における化学反応と連携することが必要である。実際には、それに加えて、(iv)運搬するイオンを積極的に離す(放出する)機構が存在する。それではgating機構は細胞質側、細胞



**Fig. 3** Ribbon representation of the crystal structure of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in a  $\text{Ca}^{2+}$  bound form ( $\text{E1}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$  state). Broken arrows indicate movements that occur in transition into E1P.

外側（小胞体内腔側）どちらでも同じかというそうではない。 $\text{Ca}^{2+}$  ポンプは正確には  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  ポンプであり (Fig. 1), 2 個の  $\text{Ca}^{2+}$  に対し 2-3 個の  $\text{H}^+$  を対向輸送する (つまり  $\text{Ca}^{2+}$  とは反対方向に輸送する) がせきかく運搬した  $\text{H}^+$  はおそらくは  $\text{H}^+$  チャンネルを通して, 元に戻ってしまう。従って  $\text{H}^+$  濃度勾配は生じず, 本質的には  $\text{Ca}^{2+}$  のポンプである。また,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ポンプにあっては  $\text{K}^+$  の代わりに  $\text{Na}^+$  だけがあっても反応は進行する (この場合 3 個の  $\text{Na}^+$  を細胞外に, 2 個の  $\text{Na}^+$  を細胞内に運ぶと考えられる) ので, 本質的に  $\text{Na}^+$  ポンプである。このことは, 細胞質側と細胞外側では gating の機構は大きく違ってよいことを意味しよう。実際, 得られた結晶構造から, そのメカニズムは本質的に違うことがわかる。それを理解して貰うために, まずは, 全体構造から説明しよう。

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA1a) は分子量 11 万, 994 個のアミノ酸残基よりなる膜内在型膜蛋白質である。3 つの明瞭に分離した細胞質ドメイン (A, N, P) と 10 本の膜貫通ヘリックス (M1-M10) より成る (Fig. 3)。A ドメインはイオン通路のゲートの actuator として働く。このドメインには P 型 ATPase の共通配列である  $^{181}\text{TGES}$  モチーフがある。P (phosphorylation) ドメインには磷酸化されるアスパラギン酸残基 Asp351 や  $\text{Mg}^{2+}$  結合サイトがあり, 保存性の非常に高い領域である。N (nucleotide) ドメインは P ドメインと  $\beta$  ストランド様のヒンジで結ばれ, ATP のアデニン環部分の結合部位を有する。P 型 ATPase で最も保存性の低いドメインである。膜貫通ヘリックス M1-M3 は A ドメインと結ばれている。M1 と M3 が長いループで結ばれているのに対し, M2 は状態にも寄るが, 長いヘリックスが直結している。 $\text{Ca}^{2+}$ -



**Fig. 4** Details of the transmembrane  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites. Viewed from the cytoplasmic side approximately perpendicular to the membrane. Small spheres represent bound  $\text{Ca}^{2+}$  (cyan), and crystallographic water molecules (red). Cylinders show  $\alpha$ -helices.

ATPase の膜貫通ヘリックスには標準的  $\alpha$ ヘリックスは少なく, M4, M6, M10 は途中でほどけている。M1 は状態によって N 末側 (細胞質側) 両親媒性ヘリックス (M1') と C 末側 (内腔側) に分かれて折れ曲がり, M2 は状況によって巻き方が変化する (後述の M2 スイッチ)。M4, M6 は  $\text{Ca}^{2+}$  結合に直接関与する (Fig. 4)。M5 は内腔側の表面から P ドメインの端まで到達する約 60 Å の長いヘリックスである。P ドメインの一部となっており, 磷酸化サイト Asp351 の近傍に位置する。 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase では M5, M7 も明瞭にほどけており, これはイオンの選択性に関与している。 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase では M7-M10 は大きな構造変化を起こさず, 単なる membrane anchor と考えられたが,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase では M9 は調節蛋白質 FXYP の, M10 は  $\beta$  サブユニットとの相互作用部位であり,  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  の結合に依存して大きく配置を変える可能性がある。内腔側ループは M7-M8 間以外はごく短い。M6-M7 間ループ (L6/7) は P ドメインの下を走っており,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase は分子全体の背骨となっている M5 の運動を制限している。 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase の L6/7 には疾病に関与する残基も存在し, もっと複雑な機能を持つ可能性もある。

#### 4. $\text{Ca}^{2+}$ の結合と細胞質側ゲートの作動機構

さて,  $\text{E1}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$  状態において, 2 個の  $\text{Ca}^{2+}$  は膜内の細胞質側表面に比較的近いところに (膜中央から 5 Å ほどずれた位置に) 横に並んで結合している (Fig. 3, 4)。ともに 7 個の酸素原子が配位しているが, その性質は大きく異なっていると考えられる。サイト I は側鎖と水の酸素原子のみから成り, 特異性は低いだろう。サイト II は水溶性  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白質で最もよく見られる  $\text{Ca}^{2+}$  結合モチーフ EF ハンドによく似たヘリックス・コイル・ヘリックス

構造をとっており、 $\text{Ca}^{2+}$  は内腔側ヘリックスの上端のっかる形で結合する。M4 ヘリックスのほどけた部分にある Glu309 が、結合した  $\text{Ca}^{2+}$  に上からフタをしている (Fig. 4)。ここも EF ハンドと同様である。2 個の  $\text{Ca}^{2+}$  の結合は協動的 (ヒル係数 2) である。結合には順番があり、サイト I に最初に結合する。実際、部位特異的の変異によってサイト I で  $\text{Ca}^{2+}$  を配位している酸素原子を一つでも除いてしまうと  $\text{Ca}^{2+}$  結合能は完全に失われるが、サイト II からは側鎖の酸素原子 2 個を除いても 50% の結合は保たれる。サイト II への結合によって ATP から Asp351 へのリン酸の転位が可能となり、反応サイクルは進行する。

$\text{Ca}^{2+}$  運搬直後は、 $\text{Ca}^{2+}$  の配位に使われていた膜貫通領域のアミノ酸残基のカルボキシル基には  $\text{H}^+$  が結合している ( $\text{E2} \cdot \text{nH}^+$  状態、普通は単に  $\text{E2}$  状態 (Fig. 1)<sup>6)</sup>)。このとき、 $\text{Ca}^{2+}$  通路の入口に位置する Glu309 は膜の内側、 $\text{Ca}^{2+}$  結合サイトの方を向いている。 $\text{H}^+$  がはずれ、 $\text{Ca}^{2+}$  に対し高親和性になると ( $\text{E1}$  状態)、Glu309 を含む M4 ヘリックスは細胞質側に持ち上がり、Glu309 はカルボキシル基を細胞質に露出させるであろう。そこに  $\text{Ca}^{2+}$  が来て、2 個の  $\text{Ca}^{2+}$  が結合し、Glu309 はサイト II  $\text{Ca}^{2+}$  に細胞質側から蓋をするのであるが、それだけではゲートは閉まらない。この状態では、Glu309 の側鎖周辺には十分なスペースがあり、水分子で埋まっている。Glu309 の側鎖が構造変化を起こせば、すなわち蓋が外れれば、サイト II  $\text{Ca}^{2+}$  と細胞質中  $\text{Ca}^{2+}$  との置換が起こる<sup>1)</sup>。

細胞質側ゲートは ATP から蛋白質側にリン酸が渡されること (phosphoryl transfer)、すなわち  $\text{E1P}$  状態の実現によって初めて閉まるのである。このリン酸は  $\text{Mg}^{2+}$  と共に細胞質側ゲートの押さえとなる部分を引張り上げる働きを持つ (Fig. 5)。化学反応に伴って蛋白質が構造変化を起こす場合、発元での変化はごく小さいが、それを拡大する機構が備わっていることが多い。つまり「てこ」の逆である。この場合、リン酸と  $\text{Mg}^{2+}$  は P ドメインの 2 つの部分を引き張ることによって折り曲げる (角度的には  $20^\circ$  くらい)。一方、A ドメインはくさび型をしており、 $\text{E1} \cdot 2\text{Ca}^{2+}$  状態では、一方の端で P ドメインの先端部のヘリックス (P7) の上の上のっかっている。従って、P ドメイン上の A ドメインの支点部分の傾きが変わり、それがさらに A ドメインの長さを利用することで拡大され、M1 ヘリックスの上向きの大きな運動 ( $\sim 11 \text{ \AA}$ ,  $\alpha$ ヘリックス 2 巻き分) が作り出される (Fig. 5)。M1, M2 ヘリックスによる V 字型構造では、2 つのヘリックスは側鎖が噛み合わさっており、剛体として運動する。その結果、今まではイオン通路よりも下にあった M1 の押さえ (蓋) の部分がイオン通路の入口を塞ぐように持ち上がるのである。この押さえの部分は疎水的でがっちりしたアミノ酸残基 (Leu, Val) から成り、自由度の大きい Glu309 の側鎖が構造変化を起こせないよう、また水を排除するように周囲を埋めてしまうのである。M1, M2 ヘリックスのどちらも A ドメイン

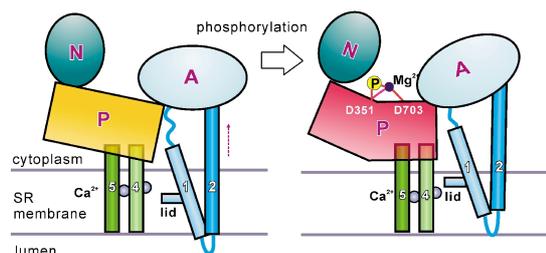
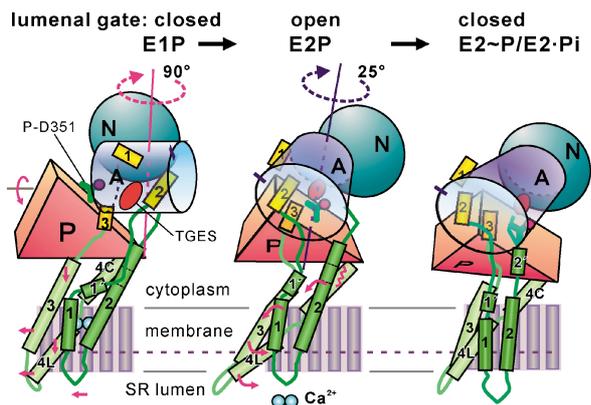


Fig. 5 A cartoon illustrating the mechanism for closing the cytoplasmic gate by phosphorylation. The P-domain consists of 2 parts and is bent by binding of  $\text{Mg}^{2+}$  and phosphate. The A-domain sits on one end of the P-domain. The V-shaped structure consisting of the M1 and M2 transmembrane helices is attached to the other end of the A-domain. The change in inclination of the P-domain is amplified by the A-domain and pulls the V-shaped structure towards the cytoplasm to close the ion pathway.

に繋がっているのであるが、M2 は長いヘリックスが「棒」として直接 A ドメインと繋がっているのに対して、M1 の方は M1'-A ドメインリンクという長い柔軟なループで繋がっている。従って、A ドメインの膜に平行な軸の周りの回転 (A ドメインの傾斜の変化) が、M2 ヘリックスを介して、M1 ヘリックスを引き上げ、押さえの部分で通路を塞ぐのが、細胞質側のゲートを閉じる機構である。

## 5. $\text{Ca}^{2+}$ の放出と内腔側ゲートの作動機構

こういう gating の方法が可能であるのは、イオン通路が言わば蛋白質の側面についており細胞質側の膜表面に比較的近いところに結合部位があるためである。ということは細胞外への通路は膜に垂直な方向に長くならざるを得ない。実際、細胞外側にはこのような蓋となる構造はなく、イオン通路は疎水的な残基同志が噛み合わさることによって閉じられている。この噛み合せがくずれるとそこから水が進入し、イオン通路は開く。すなわち、内腔側のイオン通路は固定部分とそれに zipper のように噛み合う可動部分から成るはずである。かつ、 $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性を下げ、内腔側に押し出すために、サイト II を作っている M4 ヘリックスは  $\alpha$ ヘリックスの約一巻き分 ( $\sim 5.5 \text{ \AA}$ ) 下がることが  $\text{E1} \cdot 2\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{E2}(\text{TG})$  の構造比較から判明していた。勿論、 $\text{E2}(\text{TG})$  では内腔側ゲートは閉まっており、ヘリックス同士は噛み合っている。従って、一時的に噛み合わせをはずし、ヘリックスを押し下げ、また噛み合わせるといった複雑な運動が必要となる。しかも、この開閉はリン酸化サイトにおける加水分解反応と連動していなければならない。実際、異なったリン酸アナログ ( $\text{BeF}_3^-$ ,  $\text{AlF}_4^-$ ,  $\text{MgF}_4^{2-}$ ) を用いた実験から、ゲートが開くのは  $\text{E2P}$  基底状態 ( $\text{BeF}_3^-$  を使用) のみであり、 $\text{E2} \sim \text{P}$  遷移状態 ( $\text{AlF}_4^-$  を使用) では既にゲートは閉じた位置にあることが判っていた。何故、基底状態と遷移状態という、おそら

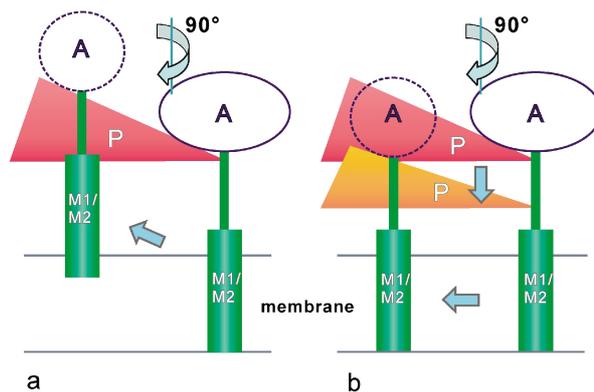


**Fig. 6** A cartoon illustrating two-step rotation in gating of the ion pathway during hydrolysis of aspartylphosphate. Small arrows indicate the movements of the transmembrane helices.

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るのか。実際、デンマークグループは加水分解反応が associative であることが本質である（つまりは、そのわずかな違いがゲートの開閉まで拡大される）と主張したが<sup>7)</sup>、筆者は分子動力学シミュレーションによって示された熱運動の大きさから<sup>6)</sup>、そんなことはありえないと考えていた。実際、生化学的データは E2P 基底状態のアナログに強力阻害剤 thapsigargin (TG) を加えると、細胞質側構造は変わらないが内腔側ゲートは閉まることを示しており、膜貫通領域と細胞質領域の間には剛体でつながっているような連結はない。つまりポンプ蛋白質は柔軟なのである。ここに本質があると筆者は考える。

さて、結晶構造解析の結果、E2P の直前の状態である E1P (2 個の  $\text{Ca}^{2+}$  が閉塞された状態) から E2P の間で A ドメインは膜にほぼ垂直な軸の周りに  $90^\circ$ 、さらに E2P から E2~P の間では別の膜に垂直な軸の周りに  $25^\circ$  回転することがわかった<sup>8)</sup>。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 II を作っている M4 ヘリックスを  $\alpha$  ヘリックスの約一巻き分 ( $\sim 5.5 \text{ \AA}$ ) 下げる、つまり、A ドメインの回転を M4 ヘリックスの運動に変換する必要がある (Fig. 6)。構造からこのメカニズムを理解するには相当の時間を要した。

上に述べたように、A ドメインの一端は P ドメインの P7 ヘリックスにはほぼ 1 点で接触している。この点の近くを通る膜に垂直な軸の周りの  $90^\circ$  の回転によって A ドメインは P ドメインの上の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<sup>1)</sup>、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 (膜表面からの距離) は高くなるはずである (Fig. 7)。この結果、A ドメインの端につながっている膜貫通ヘリックス M1/M2 は持ち上がるはずである。しかし、M1/M2 ヘ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/M2 ヘリックスが膜から出ないように



**Fig. 7** Mechanism for converting A-domain rotation into P-domain inclination. The A-domain sits on the P-domain (wedge shaped) at one end and climbs up the P-domain when it rotates by  $\sim 90^\circ$ . If the P-domain were spatially fixed, the M1/M2 helices would come out from the membrane (a). This is energetically very unfavourable as the transmembrane parts of the M1/M2 helices are hydrophobic. In reality, the P-domain comes closer (actually inclines) to the membrane to keep the M1/M2 helices in the membrane (b).

する。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る。さらに、P ドメインの底に横に走っている P1 ヘリックスが M3 の上部を押し、M3-M4 ヘリックスを連動させて下げる。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/M2 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。

さて、それでは噛み合わせをはずす方のメカニズムはどうなっているか。M4 の内腔側半分 (M4L) は比較的独立したヘリックスであり、M1 の下半分とはかなり離れている。M5 の Val772, Phe776 との接触くらいしかないので、M4-M1 方向に対し直角に回転する限りは実は大きな障碍は無い。従って、M4L が膜面と平行に近くなれる隙間がありさえすれば、つまりは M3 の向きが変われば、噛み合わせは外れ得る。それでは、M4L の向きを積極的に変えている力は働いているのか。ここは複数の力が働いているようであり、そのメカニズムの理解はまだ十分とは言いがたいが、M3 を通して向きを変えているらしい (Fig. 6)。すなわち、M1 の Leu60 と Leu61 は M3 の Gly257 の主鎖を挟み込むようなかたちで、支点を作っている。M1-M2 で構成される V 字型構造は M3 を M7 へ押し付ける。従って、M3 は横に開くしかない。一方、P ドメインが傾くため、P ドメインの下を走っている P1 ヘリックス (Fig. 3) が M3 の上端を押し。ここは E1P と E2P の大きな違いである。従って、この短辺 (Gly257 より上) を P1 が押すので、長辺側は大きく開くことになる。

さて E1P  $\rightarrow$  E2~Pi での A ドメインの回転運動によって、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-M2 ヘリックスをさらに上に持ち上げようとする力が働き (Fig. 7), 耐え切れなくなった M2 ヘリックスは部分的にはどける。その結果, M1-M2 による V 字型構造は下がる (Fig. 6)。或いは, M1 ヘリックスは既に M3 ヘリックスに押し付けられているために, A ドメインの更なる回転は V 字型構造を回転させようとし, その結果 M2 を折る力が強く働くのかもしれない。いずれにせよ, P1 ヘリックスの傾斜の変化はこのとき小さいので M3 の上端部分は下がらないが, てこの支点部分が下に移動する結果, M3 の向きはより垂直に近くなる。従って, M4L が横に開く隙間が無くなるためヘリックスの向きが変わって, ヘリックスの側鎖が再び噛み合い, ゲートが閉まる, というのがメカニズムである (Fig. 6)。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。

## 6. 加水分解反応との連携

それでは, 基底状態と遷移状態間の25°の回転は何に依存しているのか。基底状態では磷酸化部位から水は完全に排除されている (Fig. 8a)。TGES 中の Gly 残基の主鎖 Cα が磷酸 (アナログ) と van der Waals 接触している。この構造を安定化し, 内腔側ゲートが十分長い時間開いているようにするため, TGES ループの主鎖と P ドメインの間で水素結合が形成される。ところが, A ドメインがさらに回転すると, 水が1分子だけ入る隙間が磷酸の上に見える (Fig. 8b)。そこに導入された水分子 (Fig. 8b の赤丸) が A ドメインにある TGES モチーフ中の Glu 残基により活性化され (水素を奪われる), 磷酸化アスパラギン酸を

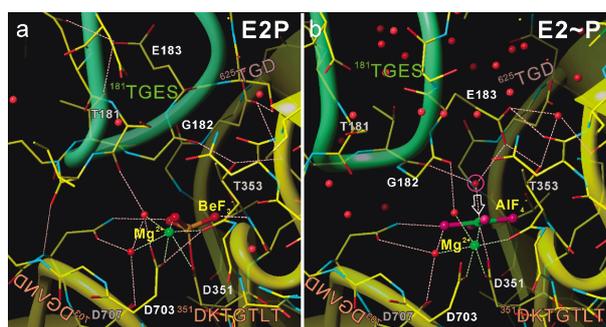


Fig. 8 Details in the phosphorylation site in the E2P ground and E2~P transition states. The luminal gates is opened in the stable analogue of the ground state (E2•BeF<sub>3</sub><sup>-</sup>, a) and closed in that of the transition state (E2•AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>, b). Note that water molecules (small red spheres) are totally removed around BeF<sub>3</sub><sup>-</sup> because Gly182 in the TGES loop (green) blocks access of water (a). In the transition state (b), a further rotation of the A-domain moves the TGES loop to accommodate only one water molecule (red circle), which is activated by Glu183 and attacks (white arrow) the aspartylphosphate.

攻撃することによって加水分解反応が進行する<sup>1,8)</sup>。実際, E2P 基底状態で強力阻害剤 thapsigargin を加えるとゲートは閉まるので, この A ドメインの位置でゲートは確率的に開いたり閉じたりしていると考えられる。それが, 加水分解反応の進行によって閉まった状態が安定化される (すなわち, 構造変化が確定される) のである<sup>8)</sup>。

一方, 遷移状態 E2~P と産物状態 E2•Pi (product state ; MgF<sub>4</sub><sup>2-</sup> を使用) の構造はほぼ同一である。また, A ドメインの回転を安定化するために, electric catch とでも呼ぶべき構造が用意されている<sup>9)</sup>。この回転によって, 異なった A ドメインと P ドメインのインターフェースが形成される。ここには長い側鎖を持った Arg198 がいて, P ドメイン側の Asp660 と塩橋を作るほか, 複数の静電的相互作用によって, 正しい位置に界面が固定されるようになっている。さらに, TGES ループはこの状態では ADP のアデニン環があった場所を塞いでおり, ADP が再結合し逆反応が起こるのを防いでいる<sup>9)</sup>。

## 7. 対向輸送の必要性と E1 状態

上述のように, Ca<sup>2+</sup>-ATPase は実質的に Ca<sup>2+</sup> ポンプであるし, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase は Na<sup>+</sup> ポンプである。Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase の場合, このことは特にはっきりしている。すなわち, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase は 3 個の Na<sup>+</sup> を細胞外へ, 2 個の K<sup>+</sup> を細胞内へと運び, electrogenic であるが, 細胞膜では常にある程度の K<sup>+</sup> チャネルが開いており, 膜電位は K<sup>+</sup> の平衡電位になっている。つまり折角 K<sup>+</sup> を運んでもチャネルを通して余分は戻ってしまう。対向輸送で 2 個の K<sup>+</sup> を運ぶわけだが, 同様のことは Ca<sup>2+</sup>-ATPase にもあり, H<sup>+</sup> を対向輸送するが, それはおそらくは H<sup>+</sup> チャネルを通して元に戻ってしまう。従って, 筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase は 2 個の Ca<sup>2+</sup> に対し 2~3 個の H<sup>+</sup> を対向輸送するので electrogenic であるのだが, H<sup>+</sup> の勾配は生じないのである。どうしてこのように一見無駄な対向輸送が必要なのか。

そもそも Ca<sup>2+</sup> を放出したあとの Ca<sup>2+</sup> 結合サイトにはカルボキシル基が固まって存在しており, そのままでは静電的な反発が強く不安定と考えられる。それを防ぐために構造変化が起こるのであるが, それだけでは不足であり, H<sup>+</sup> を導入することで安定化を図っている。つまり, H<sup>+</sup> の対向輸送は言わば必要悪で, 出来ることならなしですませたいのである, というのが2005年に発表した論文の骨子であった<sup>6)</sup>。この考えは残念ながら不十分であったと言わざるを得ない。

このような H<sup>+</sup> を結合した状態 (E2•nH<sup>+</sup>) は pH 6 では安定であるが, pH 7 では不安定なのである。自然に H<sup>+</sup> を放出した E1 状態になってしまう。これは電荷移動の測定から明瞭に示されている<sup>10)</sup>。すなわち「Ca<sup>2+</sup> 非結合時の状態は Ca<sup>2+</sup> に対し低親和性の E2 である」と言う

記述は誤りで、pH 7では「Ca<sup>2+</sup> 非結合時の安定な状態はCa<sup>2+</sup> に対し高親和性のE1である」と言う記述が正しいのである（ここは多くの文献に混乱がある）。すなわち、H<sup>+</sup>の輸送、細胞質への放出はCa<sup>2+</sup>結合サイトを高親和性にするために必要であり、そのメカニズムにはCa<sup>2+</sup>-ATPaseのみならずH<sup>+</sup>チャンネルによるリークまでが含まれているということなのである。

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseの場合、上述のようにK<sup>+</sup>チャンネルが同様の役割を果たすであろう。しかし、この場合、事はさらに複雑である。つまり、E2·2K<sup>+</sup>状態は安定であり、自発的にK<sup>+</sup>を放出することではなく、ATPの結合を必要とする。この加速メカニズムはわかっていなかったが、結晶構造からはA-Nドメイン間に存在する唯一の塩橋がATPが破壊することが示唆された<sup>4)</sup>。Ca<sup>2+</sup>-ATPaseの場合もATPが存在すれば反応は加速される。Ca<sup>2+</sup>-ATPaseのE2(TG)には容易にATPを結合させることが出来、構造も高分解能で求まる。このときのATPは低親和性であるが、それはA, N, Pドメインから成る細胞質側headpieceが閉じていて、A-Nドメイン間が複数の水素結合で安定化されており、それがアデニン環にスタックするPhe487付近の構造を歪めているからである。headpieceが開けばこの歪みは解消されATPの結合は強くなるのであるから、開いた状態が安定化されることになる。

headpieceが閉じていることの意義の一つにはAドメインPドメインの位置を安定化し、その結果、膜貫通ヘリックスの動きを抑えることである。従って、E1への移行ではheadpieceが開いて、H<sup>+</sup>やK<sup>+</sup>を放出することが必要なのであろう。それがE1·2Ca<sup>2+</sup>で細胞質側ドメイン間が離れていることの意味と考えられる<sup>1)</sup>。

さて、生理的条件下ではmMのMg<sup>2+</sup>が存在する。この時Ca<sup>2+</sup>サイトIにはMg<sup>2+</sup>が結合しているという証拠が蓄積されている。実際、サイトIは側鎖と水だけでできており大きな自由度を持つと考えられる。特異性は低いに違いない。一方、サイトIIは水溶性Ca<sup>2+</sup>結合蛋白質によく見られるEFハンドとよく似た構造をとっており、Ca<sup>2+</sup>に対する特異性は高いだろう。サイトIに結合したMg<sup>2+</sup>はCa<sup>2+</sup>結合に必要な構造変化のかなりの部分を実現してしまっていると考えられる<sup>1)</sup>。実際、Mg<sup>2+</sup>の存在によって反応サイクルは加速される。このE1·Mg<sup>2+</sup>とはどのような構造なのか。この状態が次の結晶化の目標であり、サイトIIにCa<sup>2+</sup>が結合することにより励起される「活性化シグナル」（ATPからAsp351へリン酸の転移を許す）の構造的実体が明らかになるはずである。

## 8. 終わりに

1998年以来ほとんどのデータをSPRING-8のBL41XUを用いて収集してきた。Ca<sup>2+</sup>-ATPaseのE1·2Ca<sup>2+</sup>結晶

に関しては、2000年頃と結晶の質はほぼ同一であるが、分解能は2.4 Åから1.9 Åまで向上している。これには“gradual mode”と“diffraction scan”の実装（JASRIの長谷川和也博士による）に加え、ビームの質の向上による効果が大きいと考えられる。現在の実験環境は快適であり、この試料からこれ以上のデータ収集は無理だろうというレベルに達していると思う。なお、本研究は主に、文部科学省科学研究費・学術創成研究と特別推進研究により行われたものである。SPRING-8ビームラインBL44B2, BL41XUの歴代の担当者（特に清水伸隆博士）と私の研究室のメンバーにこの場を借りて感謝申し上げたい。

## 参考文献

- 1) C. Toyoshima: *Arch. Biochem. Biophys.* **476**, 3–11 (2008).
- 2) J. P. Morth, B. P. Pedersen, M. S. Toustrup-Jensen, T. L.-M. Sørensen, J. Petersen, J. P. Andersen, B. Vilsen and P. Nissen: *Nature* **450**, 1043–1049 (2007).
- 3) B. P. Pedersen, M. J. Buch-Pedersen, J. P. Morth, M. G. Palmgren and P. Nissen: *Nature* **450**, 1111–1114 (2007).
- 4) T. Shinoda, H. Ogawa, F. Cornelius and C. Toyoshima: *Nature* **459**, 446–450 (2009).
- 5) H. Ogawa, T. Shinoda, F. Cornelius and C. Toyoshima: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **106**, 13742–13747 (2009).
- 6) K. Obara, N. Miyashita, C. Xu, I. Toyoshima, Y. Sugita, G. Inesi and C. Toyoshima: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **102**, 14489–96 (2005).
- 7) C. Olesen, T. L.-M. Sorensen, R. C. Nielsen, J. C. Moller and P. Nissen: *Science* **306**, 2251–2255 (2004).
- 8) C. Toyoshima, Y. Norimatsu, S. Iwasawa, T. Tsuda and H. Ogawa: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **104**, 19831–19836 (2007).
- 9) C. Toyoshima, H. Nomura and T. Tsuda: *Nature* **432**, 361–368 (2004).
- 10) F. T. Buoninsegni, G. Bartolommei, M. R. Moncelli, G. Inesi and R. Guidelli: *Biophys. J.* **86**, 3671–3686 (2004).

## ● 著者紹介 ●



### 豊島 近

東京大学分子細胞生物学研究所 教授

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

専門：構造生物学

#### 【略歴】

1983年東京大学大学院理学系研究科物理学専攻博士課程修了，理学博士。東京大学理学部助手，米国スタンフォード大学細胞生物学教室博士研究員，英国MRC分子生物学研究所研究員，理化学研究所・国際フロンティア研究員，東京工業大学理学部（生命理工学部）助教授を経て，1994年5月より現職。2010年7月より高難度蛋白質立体構造解析センター・センター長。

# Structural Biology of Ion Pumps (P-type ATPases)

**Chikashi TOYOSHIMA** Institute of Molecular and Cellular Biosciences The University of Tokyo  
1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0032, Japan

**Abstract** Ion pump proteins are membrane proteins that are integrated into biological membranes (lipid bilayers). They are powered by ATP and are enzymes that hydrolyse ATP (ATPase). We have been working on crystal structure determination and molecular dynamics simulations of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (SERCA 1a). At present crystal structures are determined for 9 intermediates that approximately cover the entire reaction cycle. Thus, we can say that the mechanism of ion pumping is roughly understood and answer fundamental questions, for instance, what ATP and phosphorylation do, why nearly 100% efficiency of energy conversion is possible, why the structure of ion pump has to be so. The focus of this article is on the gating mechanism of ion pathway.

---