

特集：ソフトな相互作用による膜インターフェイスの機能制御

カルシウムポンプの機能制御機構

杉田 有 治

筋小胞体カルシウムポンプは、ATP加水分解によるエネルギーを利用して約10,000倍もの濃度勾配に逆らって、細胞質中に放出されたCa²⁺を筋小胞体内腔へと輸送する膜タンパク質である。近年、九つの反応中間体のX線結晶構造が明らかになり、カルシウムポンプの大規模な構造変化の能動輸送に果たす役割が明らかになった。我々は、この立体構造を用いた全原子分子動力学計算を行うことにより、Ca²⁺の輸送と対抗するプロトン輸送の機能的意義を明らかにした。また、カルシウムポンプの機能と構造変化を制御している52残基の膜タンパク質であるフォスフォランバンに関する分子動力学計算を行い、リン酸化前後の構造変化とそれによる制御機構を考察した。さらに長時間のカルシウムポンプの分子運動を調べることにより、X線結晶構造解析で明らかになった大規模な構造変化とランダムな熱運動の関係を調べていくことが今後の課題である。

1. はじめに

細胞の内と外では生体に存在する主なイオン(Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻など)の濃度は異なっている¹⁾。例えば、Na⁺は細胞外に多く存在するが、K⁺は細胞質内に数十倍多く存在する。筋細胞中では筋小胞体(sarcoplasmic reticulum; SR)と呼ばれる細胞内オルガネラ中にCa²⁺は高濃度で蓄えられている一方で、細胞質中のCa²⁺濃度はその10,000倍も少ない。また、イオンは水溶液中では安定に存在できるが、疎水的な環境である生体膜の中心部を通過することは通常不可能であるため、細胞内外に股がるイオン輸送を行っているのはチャネルやポンプと呼ばれる膜タンパク質である。チャネルはイオンの濃度勾配に従った輸送(受動輸送)を行うのに対して、ポンプは濃度勾配に逆らった輸送(能動輸送)を実現する。例えば、筋肉が収縮する際にはCa²⁺放出チャネルを通して筋小胞体中に蓄えられたCa²⁺が細胞質中に放出されるのに対して、筋肉が弛緩する際には放出されたCa²⁺は筋小胞体カルシウムポ

ンプ(Ca²⁺-ATPaseあるいはsarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 1; SERCA1)によって小胞体中に汲み戻される²⁾。イオン能動輸送を実現するためには、外部エネルギーとしてATP加水分解によって供給されるエネルギーを必要とする。反応サイクル中にATP加水分解で生じたリン酸が膜タンパク質に結合した状態(リン酸化中間体)が存在するため、カルシウムポンプやナトリウムカリウムポンプなどはP型イオンポンプ(P-type ATPase)と呼ばれる。

P型イオンポンプの反応機構は古くから調べられており、Post-AlbertらによるE1/E2機構が有名である^{3,4)}(図1)。古典的なモデルでは、E1状態における結合部位はCa²⁺と強い親和性を持ち、細胞質側からアクセス可能な状態であり、一方E2状態では結合部位はCa²⁺と親和性が低く、小胞体側(カルシウムポンプ)あるいは細胞外側(ナトリウムカリウムポンプ)に露出している状態として定義されている。ATP1分子の加水分解によるエネルギーを用いて、ナトリウムカリウムポンプは細胞質中から三つのNa⁺を細胞外へ輸送し、二つのK⁺を逆の方向に輸送する^{5,6)}。一方、カルシウムポンプは、ATP1分子の加水分解によって二つのCa²⁺を細胞質中から小胞体内腔へと輸送し⁷⁾、二つあるいは三つのプロトンを逆方向に輸送する⁸⁾(プロトン対抗輸送)。このモデルは、輸送サイクル中でイ

独立行政法人理化学研究所基幹研究所(〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1)

Structural and functional relationships in Ca²⁺-pump
Yuji Sugita (Advanced Science Institute, RIKEN, 2-1 Hiro-sawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan)

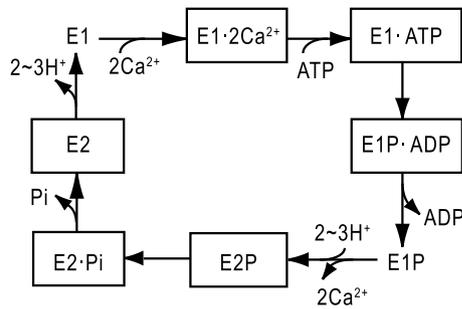


図1 E1/E2モデルに基づくカルシウムポンプの反応機構
四角で囲んだ六つの反応中間体に相当するX線結晶構造が既に得られている。

オンポンプ自身に大きな構造変化が生じることを予測しており、その後の生化学あるいは分子生物学的な実験はその予測が正しいことを示した⁹⁻¹²⁾。そして、近年X線結晶構造解析によって解かれた立体構造¹³⁻²⁵⁾により、カルシウムポンプの構造変化がイオン能動輸送に果たす役割が明らかになった^{26, 27)}。

2. カルシウムポンプの結晶構造解析

カルシウムポンプの立体構造

筋小胞体カルシウムポンプに関しては、表1にまとめた九つの反応中間体に対応する立体構造¹³⁻²⁵⁾がX線結晶構造解析により明らかにされている。最も初期に解かれたのは膜貫通部位に二つのCa²⁺を結合したE1·2Ca²⁺であり、P型イオンポンプとしては初めての立体構造であった¹³⁾。その後、約20個の結晶構造が解かれており、図1に示した反応サイクル中で、(Ca²⁺非存在下における)E1状態と(ADPが脱離した後の)E1P状態の構造を除いて全ての立体構造が明らかになった。E1·ATP状態とE1P·ADP状態の構造は反応部位を除くとほぼ同じ構造であった^{15, 20)}、E2P状態からE2状態における反応経路では、反応の始状態であるE2P状態からの構造変化が最も大きかった^{16, 19, 20, 23)}。従って、反応サイクル中に生じた構造変化を説明するためには、E1·2Ca²⁺、E1P、E2P、E2の四つの状態の立体構造が用いられている(図2)。

四つの立体構造において、A (actuator), N (nucleotide-binding), P (phosphorylation) と呼ばれる三つの細胞質ドメイン内の構造変化は小さかった。このうちリン酸化部位であるAsp351を含むPドメインは多くのヌクレオチド結合タンパク質に見られるRossmann foldをとっており、Mg²⁺結合の有無によって若干、構造が変化していた。その他のドメインに関しては、ループ領域などの局所的な構造変化を除いて大規模な構造変化はしていなかった。一方、膜貫通ドメインはM1からM10の10本の膜貫通ヘリックスからなる。このうち、M7からM10に至る領域の構造と配置はそれぞれの立体構造を通じてほとんど同一で

表1 SERCA1aの結晶構造の現状¹³⁻²⁵⁾

状態	リン酸化部位基質	膜貫通部位基質	PDB ID
E1·2Ca ²⁺	—	2Ca ²⁺	1SU4
E1·ATP	AMPPCP	2Ca ²⁺	1T5S, 1VFP
E1~P·ADP	Mg ²⁺ -ADP, AlF ₄ ⁻	2Ca ²⁺	2ZBD, 1T5T
E1P·ADP	AMPPCP	2Ca ²⁺	3BA6
E2P	BeF ₃ ⁻	Mg ²⁺	3B9B
		—	2ZBE
		TG	2ZBF
E2~P	AlF ₄ ⁻	TG	2ZBG, 1XP5
E2P·ATP	AlF ₄ ⁻ , AMPPCP	—	3B9R
E2·Pi	MgF ₄ ²⁻	TG	1WPG
		CPA	2O9J
E2	—	TG	2IWO, 2C8L
		TG+BHQ	2AGV
		CPA	2OAO, 2EAS
		CPA+TG	2EAT
		CPA(+CC)	2EAU
E2·ATP	Mg ²⁺ -AMPPCP	TG	2C8K
			2DQS

1) 文献より改変。

2) 膜貫通部位の阻害剤は以下の分子の略語を使用した。TG (thapsigargin), CPA (α -cyclopiazonic acid), BHQ (2,5-di-tert-butyl-1,4-dihydroxybenzene)

3) ~と・はそれぞれ、反応の遷移状態と終状態を示す。

あった。特にM7に含まれるGxxxGモチーフ(Gly841とGly845)とM5に含まれるGly770との間の密な接触は、膜貫通部位全体の構造安定性を高めるのに役立っていると考えられている¹³⁾。一方、M1からM6に至る6本の膜貫通ヘリックスの構造と相対的配置は、それぞれの立体構造において大きく異なっていた。また、E1·2Ca²⁺の立体構造で明らかになったようにイオン結合部位は、M4~M6とM8の4本の膜貫通ヘリックスを含む領域に形成されていた¹³⁾。また、M5は小胞体内腔からPドメイン上端まで貫通する60Åの長いヘリックスであり、膜貫通ドメインと細胞質ドメインの運動を共役させる働きがある。すなわち、図2に示したカルシウムポンプの細胞質ドメインの大規模な構造変化がM1~M6の再配置を制御し、それによってイオン結合部位におけるCa²⁺に対する親和性と溶媒露出性(イオン侵入と排出の経路)を変化させているのである。

最も低いエネルギー状態であるE2状態(図2左下)では、三つの細胞質ドメインは寄り集まった構造をとっており、M5は大きく湾曲している¹⁴⁾。Ca²⁺非存在下でカルシウムポンプの結晶を得るためには、膜貫通部位における熱運動を抑えるためにTG(Thapsigargin)など膜貫通部位に特異的に結合する阻害剤を必要とする。実際、表1に示した異なる阻害剤を加えた結晶構造の比較からE2状態における熱運動の存在が明らかになった¹⁸⁾。Ca²⁺が結合してE1·2Ca²⁺状態になるために、M4は細胞質側へ上昇し、M6

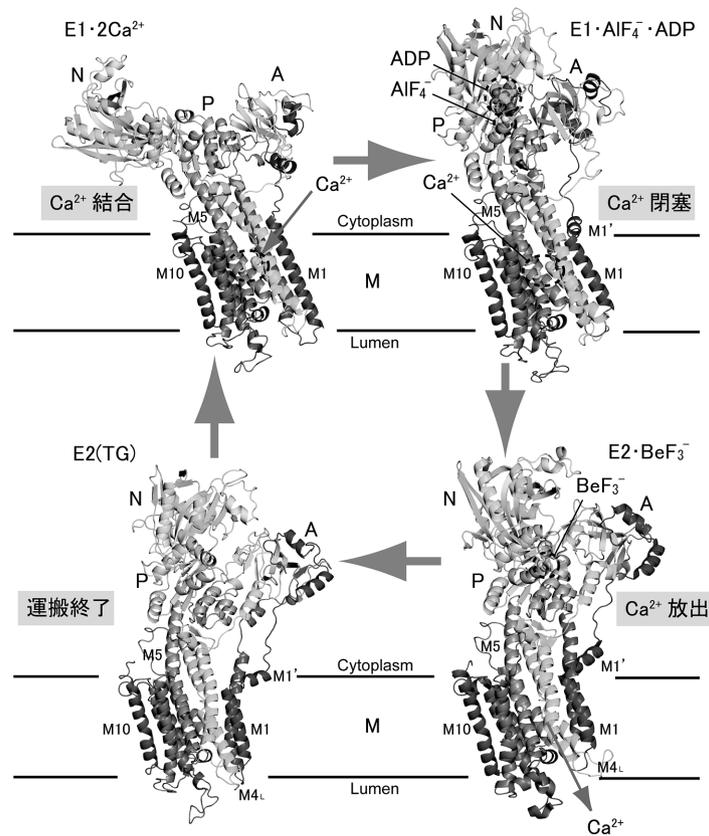


図2 筋小胞体カルシウムポンプの反応サイクルにおける四つの基本構造

は反時計周りに回転し、M5はまっすぐな構造になる(図2左上)。この変化により Ca^{2+} 結合に直接関わる酸性アミノ酸側鎖が凝集し、結合部位における Ca^{2+} 親和性が高くなるが、結合部位はまだ細胞質側に露出している。細胞質ドメインは大きく開いた構造をとり、ATPの結合を可能とする。NドメインにATPが結合すると、ATPがNドメインとPドメインの架橋となり、再び三つのドメインは閉じた構造をとる(図2右上)^{15,20}。その際、 Mg^{2+} 結合によりPドメインの構造は変化し、Aドメインが30度傾くことによりM1が上昇して折れ曲がり、イオン結合部位が閉塞された状態が実現する。結晶構造解析では、過剰の Ca^{2+} が存在しているためPドメインにおける Mg^{2+} 結合部位は Ca^{2+} が結合していた^{28,29}。

E2P状態の結晶構造解析を行うためには、異なるリン酸化アナログが用いられた。鈴木らは Be^{2+} 、 Al^{3+} 、 Mg^{2+} と F^- が形成するリン酸化アナログを結合させたE2Pアナログを開発し、反応中間体への構造帰属を生化学的に行った³⁰。その結果、 $\text{E2} \cdot \text{BeF}_3^-$ のリン酸化部位近傍はE2Pに特徴的な強い疎水性を示し、小胞体内腔から Ca^{2+} が結合部位に侵入できる状態であるが、 $\text{E2} \cdot \text{AlF}_4^-$ と $\text{E2} \cdot \text{MgF}_4^{2-}$ のリン酸化部位は親水性であり、結合部位への小胞体内腔からのゲートが閉じた状態であることが示された。E2・

MgF_4^{2-} と $\text{E2} \cdot \text{AlF}_4^-$ の構造解析^{16,21})に続いて、昨年末について $\text{E2} \cdot \text{BeF}_3^-$ の立体構造解析^{19,23})に東京大学豊島研究室とデンマークのAarhus大学P. Nissen研究室が相次いで成功し、小胞体内腔への Ca^{2+} 輸送経路が明らかになった(図2右下)。この構造では、M3とM4が小胞体側に大きく押し出されることにより、M1、M2、M4、M6によって囲まれた大きな空洞が生じていた。この経路上には疎水的なアミノ酸残基が並び、小胞体側に酸性アミノ酸が集まることで Ca^{2+} の小胞体内腔への輸送を促進していた。 $\text{E2} \cdot \text{AlF}_4^-$ と $\text{E2} \cdot \text{MgF}_4^{2-}$ は、それぞれ脱リン酸化反応の遷移状態と終状態であり、リン酸の脱離により最もエネルギーの低いE2状態へと戻る。

3. カルシウムポンプの分子動力学計算

このようにカルシウムポンプの結晶構造解析は、イオンポンプの機能を理解するための本質的な問いである、(i) ATPは能動輸送にどのような働きをしているのか、(ii) イオンポンプの構造変化は何故必要かという問いに対する直接的な解答を与えた^{27,28}。即ち、ATPの結合と加水分解反応は三つの細胞質ドメインを会合させるリンカーとして働き、各反応中間体における相互作用の変化を利用して別々のインターフェイスを用いてAドメインの位置を制御し

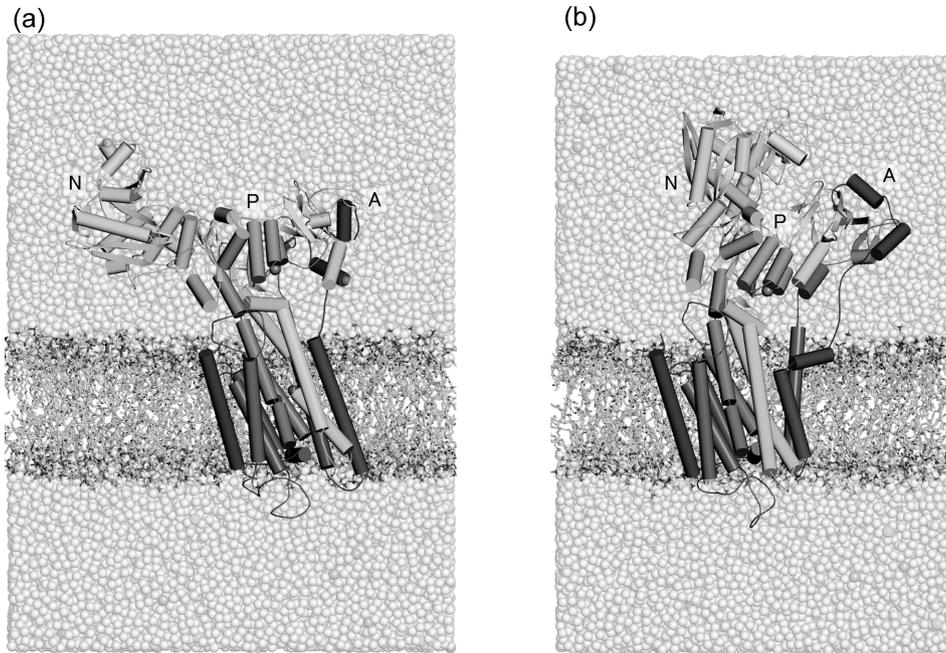


図3 分子動力学計算に用いた脂質二重膜中でのE1・2Ca²⁺ (a)とE2(b)状態におけるカルシウムポンプの構造

ている。そして、Aドメインの位置がアミノ酸レベルではなく、膜貫通部位におけるM1～M6の配置という大きな構造変化を実現して、Ca²⁺の親和性と溶媒露出性を決定しているのである。

このような大きな構造変化が必要である理由は、カルシウムポンプが本来生体膜中で大きな構造揺らぎをしており、図1に示した反応サイクルを一方に進めるために大きな構造変化を必要としているからだろう。また、別のタンパク質では、基質結合による構造変化は、基質結合前の熱運動と大きく相関した方向に生じているという報告がある³¹⁾。カルシウムポンプにおいても同様の可能性もあり、各反応中間体における熱運動の詳細を理解する必要が生じた。そこで、我々は結晶構造を出発構造とし、カルシウムポンプを脂質二重膜に埋め込み、周囲に溶媒分子を配置して全原子分子動力学計算を実行することにした³²⁾。この系は原子数で約30万原子の巨大な系であり、長時間の分子動力学計算は不可能であるが、近年の並列計算機の性能向上と超並列分子動力学計算ソフトウェア³³⁾の開発により、数10 ns程度の構造揺らぎを観測することができた。

X線結晶構造解析で直接得られるのは、主に膜タンパク質の原子座標であり、周囲に存在する溶媒や脂質分子の立体構造に関しては限られた情報しか得ることができない。そのためカルシウムポンプの周囲に存在する脂質二重膜の立体構造は、X線や中性子による散乱実験や核磁気共鳴による実験結果を満足するようにモデリングを行った。脂質分子の種類としては、カルシウムポンプの機能が最大に発現することが実験的に調べられているDOPC (dioleoylphos-

phatidylcoline)を用いた³⁴⁾。脂質二重膜の分子動力学計算に関しては、その圧力の制御が本質的に重要であることがFellerらによる研究によって明らかになってきたため、水溶性タンパク質に関して用いられる通常の圧力の制御ではなく、表面積を一定にした条件での圧力の制御を行った³⁵⁾。その結果、脂質二重膜の厚さや密度プロファイルに関して、実験データを非常によく満たす立体構造を構築することに成功した。この脂質二重膜に、カルシウムポンプのX線結晶構造を埋め込み、さらに周囲に溶媒を満たすことによって図3に示すカルシウムポンプの初期モデルを作成した。カルシウムポンプの構造を脂質二重膜に埋め込む際には、カルシウムポンプの膜貫通部位に存在する原子と重なりを持つ脂質分子に関しては初期モデルから取り除いた。その際、脂質分子を取り除く前後で系の密度が変化しないように考慮することが重要であった。初期の計算では、取り除く脂質分子の数が多すぎたためにせっかく平衡化されたDOPC脂質二重膜がひしゃげた形になってしまったことがあったが、系の密度が変わらないように考慮して脂質分子を取り除いた場合には、長時間の分子動力学計算において安定な脂質二重膜が存在し続けた。

3.1. イオン結合部位におけるプロトンの役割

カルシウムポンプの分子動力学計算の初期モデルが構築できたので、膜貫通部位に存在するCa²⁺結合部位の立体構造安定性を詳細に検討した³⁶⁾。Ca²⁺結合部位には二つのCa²⁺が結合しており、それぞれ、site I, site IIと呼ばれている。site IはAsn768, Glu771, Thr799, Asp800, Glu908

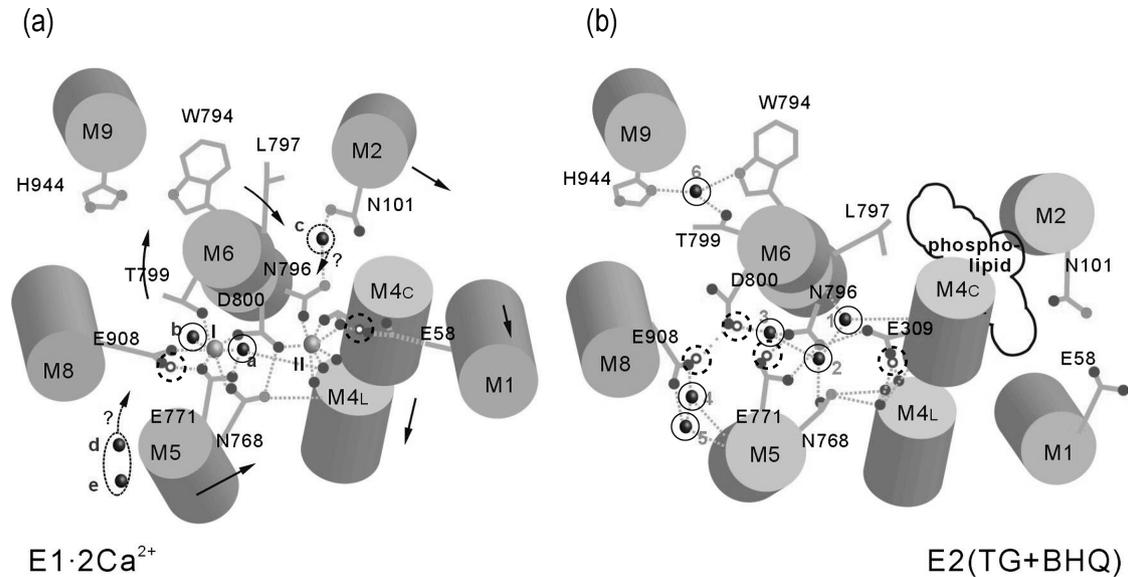


図4 E1·2Ca²⁺(a)とE2(b)におけるイオン結合部位近傍のプロトンと水分子の配置
イオン結合部位近傍に存在する重要な水分子とプロトンを黒丸(直線と点線)で囲んだ。

の側鎖の酸素原子と二つの水分子の酸素原子によって構成されている。site IIはCa²⁺結合タンパク質によく見られる構造モチーフであるEF-ハンドとよく似た構造を持っており、Val304, Ala305, Ile307の主鎖の酸素原子とGlu309, Asn796, Asp800の側鎖の酸素原子によって構成されている(図4a)¹³⁾。いずれの結合部位においても、Ca²⁺の配位数は7である。

E1·2Ca²⁺状態の立体構造を検討すると、Glu58とCa²⁺結合アミノ酸残基であるGlu309の側鎖の酸素原子間の距離が2.44Åであり、Glu771とGlu908の側鎖の酸素原子間の距離も2.66Åと非常に近かった。このような負に帯電した酸素原子間の距離が非常に近いことは、いずれかのアミノ酸残基がプロトン化しており水素結合が存在することを示唆していた。

タンパク質内に存在するプロトン化されたアミノ酸残基の存在は、連続体モデルを用いた静電エネルギー計算を実行することにより、多くの場合簡単に見積もることができる。我々は、Bashfordらによって開発されたMEAD³⁷⁾というプログラムを用いることによって、Ca²⁺結合部位近傍のアミノ酸残基のプロトン化状態を検討した。得られた結果はE1·2Ca²⁺状態においてGlu58とGlu908が中性条件下においてもプロトン化していることを示していた。さらに、我々はGlu58とGlu908をプロトン化したモデルと、プロトン化しないモデルの二つに関して全原子分子動力学計算を実行することにより、Ca²⁺結合部位近傍の立体構造安定性を検討した。その結果、Glu58とGlu908の両方をプロトン化しないとX線結晶構造解析で明らかになった結合部位の立体構造は安定に保たれないことが明らかになった(図4a)。

我々は同様の計算を、Ca²⁺非結合状態の立体構造にも適用した¹⁷⁾。Ca²⁺非結合状態に関して最初に解けたE2(TG)¹⁴⁾はX線結晶構造の分解能が低いため、結晶水の位置が特定されていなかったが、次に解かれたE2(TG+BHQ)¹⁷⁾に関しては分解能が向上しており多数の水分子の位置も決定されていた。興味深いことにCa²⁺非結合状態においては、Ca²⁺が脱離した後の結合部位の空孔を埋めるように五つの水分子が入り込んでいた。

連続体モデルを用いた静電エネルギー計算を適用した結果³⁷⁾、Glu309, Glu771, Asp800, Glu908の側鎖がプロトン化されていることが明らかになった。Ca²⁺結合部位に存在する水分子とプロトン化された側鎖の間で図4bに示すような強固な水素結合ネットワークが形成されており、Ca²⁺が結合部位に存在しない状態での負に帯電したアミノ酸による静電エネルギーの反発を抑える働きをしていることが分かった。

カルシウムポンプは、ATP1分子の加水分解によるエネルギーを用いて、細胞質中から二つのCa²⁺を筋小胞体内腔へと濃度勾配に逆らって輸送するが、その反対の方向へ(すなわち、筋小胞体内腔から細胞質中へ)、2個あるいは3個のプロトンを輸送する(プロトン対抗輸送)⁸⁾。しかし、立体構造に基づいた詳細な議論はこれまでに存在しなかった。本研究によって初めて、対抗輸送されたプロトンが、Ca²⁺非結合状態において果たす役割が明らかになった。

E2状態からE1·2Ca²⁺状態に至る過程で、イオン結合部位における脱プロトン化は重要な役割を果たしている。即ち、E2状態で結合しているプロトンは熱運動によって、細胞質中に放出される。それによって、Ca²⁺が結合する以前にCa²⁺に対して親和性が高い状態が実現している(E1

状態)^{38,39}。我々の行った分子動力学計算においても、脱プロトン化による構造変化が観測されており、Ca²⁺親和性を高めるための構造変化の分子機構が明らかになりつつある (Sugita, Y. et al. 未発表)。

3.2. フォスフォランバンによる機能制御機構

さらに、我々は筋小胞体カルシウムポンプによるイオン能動輸送を制御するタンパク質であるフォスフォランバン (PLN) に関する分子動力学計算を行った⁴⁰。PLNは、52残基の1回膜貫通タンパク質であり、PLNがカルシウムポンプに結合するとイオン能動輸送を阻害する効果がある⁴¹。カルシウムポンプとPLNの複合体に関する結晶構造は未だに解かれていないが、クロスリンクの実験結果を元に図5に示すような構造モデルが得られている⁴²。この構造は、近年の固体NMRによる結果もよく説明する⁴³。イオン能動輸送の阻害効果は、cAMP依存型タンパク質キナーゼによるPLNのSer16のリン酸化あるいはカルモジュリン依存型キナーゼによるThr17のリン酸化により解除される^{44,45}。しかし、どのような分子機構でこの阻害効果の解除が行われるのか明らかではなかった。実験的にはNMR⁴⁶および蛍光共鳴エネルギー移転 (FRET)⁴⁷などを用いて、PLNのリン酸化前後の構造変化が調べられていたが、その解釈は矛盾するものであった。NMRのデータによる解釈⁴⁶は、PLNはリン酸化することにより不安定な構造へ変化し、それによりカルシウムポンプとの安定な複合体を形成できなくなるというものであるのに対して、FRETのデータはリン酸化することによりPLNはよりコ

ンパクトな構造を取ることを示していた⁴⁷。その解釈としては、リン酸化部位とPLNのArg13が塩橋を形成しより強固なヘリックス構造を形成し、それによってカルシウムポンプから脱離するというものであった。

そのような矛盾を解決するために、我々は分子動力学計算を用いてSer16がリン酸化される前 (PLN) と後 (pPLN) の立体構造の解析を行った。PLNの構造モデルとしては、NMRによって解かれた構造を用いることができた⁴⁸が、pPLNに関しては構造モデルが存在しなかった。そこで、我々はPLNのSer16を計算機上でリン酸化されたアミノ酸残基 (pSer16) に置換し、レプリカ交換分子動力学法 (REMD)⁴⁹を用いることにより、初期構造に依存しない広い構造空間のサンプリングを実現した。REMDはタンパク質折れ畳み計算で近年よく用いられるアルゴリズムであり、複数の温度の分子動力学計算を並列に実行し、ある頻度で隣り合うレプリカの温度を交換することによって温度空間における一次元酔歩 (random walk) を実現する⁵⁰。高温では高いエネルギー領域を、低温では通常低いエネルギー領域をサンプルしているため、温度空間における一次元酔歩はエネルギー空間における一次元酔歩を実現することになる。エネルギー空間上での一次元酔歩を実現することにより、タンパク質の自由エネルギー曲面に無数に存在する極小値に留まることなく広い構造空間のサンプリングが可能になるのである。この方法の問題点としては、複数の温度の分子動力学計算を同時に実行するため通常分子動力学計算と比較してどうしても計算量が多くなってしまふことが挙げられる。そのため、今回の計算ではPLNの水溶性ドメイン (N末端からMet20まで) のみを切り出して水中に浸した構造を用いて計算した。

60レプリカを用いたPLNとpPLNのREMD計算から図6に示すような室温 (310K) での安定構造を得ることができた。一見して分かるように、リン酸化前のPLNは細胞質部分に安定なヘリックス構造が保たれている。一方で、リン酸化後 (pPLN) においては、ヘリックス構造も存在するもののその存在確率は下がっておりリン酸化部位近傍がほどけている構造の存在確率が増えている。PLNの実験データとの対応を考えると、NMRの実験結果をよく再現しているように見える。興味深いことにFRETで測定した距離に相当するTyr6とMet20の距離の平均値を計算すると実はリン酸化前 (PLN) において20Å付近に大きなピークが見られた。この結果は、リン酸化後 (pPLN) においてむしろコンパクトな構造に変化したことを示しており、FRETで得られた実験結果を再現していた。従って、REMDの計算結果はNMRとFRETの一見矛盾する実験結果の両方とよく一致していたのである。その理由を考察すると、今回計算したPLNの細胞質ドメインは基本的には1本のヘリックスで構成されており、PLNで見られたヘ

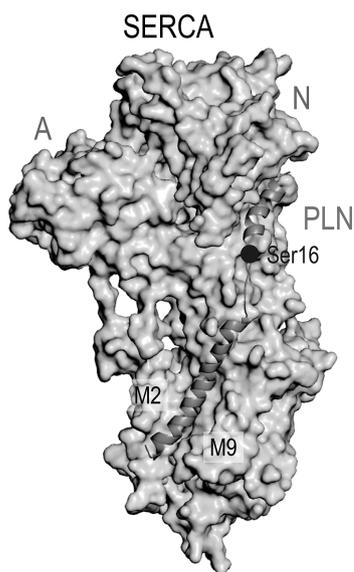


図5 フォスフォランバンとカルシウムポンプの複合体の構造モデル

カルシウムポンプのE2構造に対して、クロスリンクを満たす距離拘束を用いてフォスフォランバン (PLN) を結合させたモデル構造。リン酸化部位であるSer16をマークしてある。

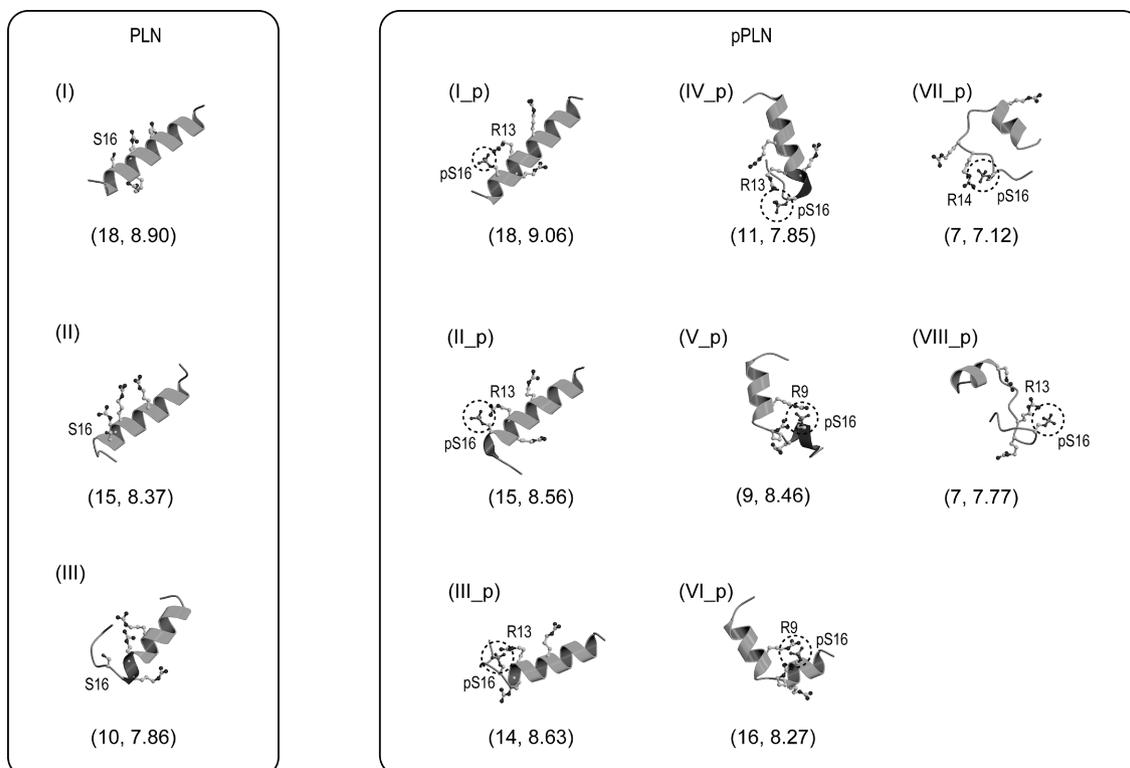


図6 リン酸化前後のフォスホランバンの細胞質ドメインの構造変化

REMD 計算によって得られたフォスホランバンの細胞質ドメインの構造. リン酸化前 (PLN) とリン酸化後 (pPLN) でそれぞれ計算を行い, 得られた代表的な構造を示した. 括弧の中の数字は, α -ヘリックス構造をとるアミノ酸残基の数と Tyr6 と Met20 の間の距離を示す. 安定なヘリックスほどこの距離が長い. リン酸化部位 (Ser16) を点線で囲んである.

リックス構造の方が pPLN における解けた構造と比較して, より伸びた構造を持つからだろう. すなわち, NMR と FRET の実験結果は矛盾するものではないが, FRET の実験データの解釈が正しくなかったと考えられる.

REMD 計算によって得られた PLN の構造変化をもとに, cAMP 依存性タンパク質キナーゼによる PLN のリン酸化によるカルシウムポンプの制御の分子機構を考察した. まず, リン酸化前には PLN の細胞質ドメインはヘリックス構造を形成しており, カルシウムポンプと安定な複合体を形成しイオン能動輸送を阻害する. 次に, cAMP 依存性タンパク質キナーゼが PLN に結合し複合体を形成することによりリン酸化反応が起こり, リン酸化部位と PLN の Arg9, Arg13, Arg14 らとの相互作用などの影響により PLN のヘリックス構造が部分的に壊れる. その結果, カルシウムポンプと安定な複合体をもちや形成できなくなり, カルシウムポンプは X 線結晶構造解析で見られたような大規模な構造変化を行うことが可能になり, イオン能動輸送が復活するのだろう.

4. おわりに

イオン結合部位から小胞体側へのゲートの開いた立体構

造が明らかになった衝撃が冷めやらぬ間に, ナトリウムカリウムポンプ⁵¹⁾と植物由来のプロトンポンプ⁵²⁾の立体構造が明らかになり, P 型イオンポンプの研究は新たな時代に突入した. これらのイオンポンプに関しても, カルシウムポンプの場合と同じく, 異なる反応中間体の立体構造が次々に明らかになっていくことは間違いのないだろう. しかし, 明らかになったイオンポンプの立体構造は極めて類似したものであり, それぞれのポンプがどのようにして輸送するイオンを認識しているのか自明ではない⁵³⁾. より高い分解能の立体構造の出現が望まれる. 理論計算に関しては, ここで紹介した全原子モデルに基づく計算のみならず, より詳細な量子化学計算や粗視化モデルを用いた分子動力学計算などのマルチスケールなシミュレーション法を組み合わせることによって, 構造変化の全貌を明らかにしていきたい.

謝辞

カルシウムポンプの構造解析は, 東京大学の豊島近教授の研究グループで行われた. 理論計算に関しては豊島教授, 横浜市立大学の木寺詔紀教授, 池口満徳准教授, 理化学研究所の宮下尚之博士, 長浜バイオ大学の依田隆夫博士

らとの共同研究による成果であり、これらの方々に感謝します。

文 献

- 1) Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008) *Molecular Biology of THE CELL*. Fifth Edition, pp. 651–654, Garland Science, New York.
- 2) Ebashi, S. & Lipman, F. (1962) *J. Cell. Biol.*, **14**, 389–400.
- 3) Post, R.L., Hegyvary, C., & Kume, S. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 6530–6540.
- 4) Alberts, R.W. (1967) *Annu. Rev. Biochem.*, **36**, 727–756.
- 5) Glynn, I.M. (1993) *J. Physiol.*, **462**, 1–30.
- 6) Kaplan, J.H. (2002) *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 511–535.
- 7) Inesi, G., Kurzmack, M., Coan, C., & Lewis, D.E. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 3025–3031.
- 8) Yu, X., Carroll, S., Riguad, J.L., & Inesi, G. (1980) *Biophys. J.*, **64**, 1232–1242.
- 9) Inesi, G., Kurzmack, M., & Lewis, D. (1988) *Methods Enzymol.*, **157**, 154–190.
- 10) Moller, J.V., Jull, B., & LeMaire, M. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, **1286**, 1–51.
- 11) Danko, S., Yamasaki, K., Daiho, T., Suzuki, H., & Toyoshima, C. (2001) *FEBS Lett.*, **505**, 129–135.
- 12) Andersen, J.P. (2006) <http://www.fi.au.dk/jpa/smd>.
- 13) Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., & Ogawa, H. (2000) *Nature*, **405**, 647–655.
- 14) Toyoshima, C. & Nomura, H. (2002) *Nature*, **418**, 605–611.
- 15) Toyoshima, C. & Mizutani, T. (2004) *Nature*, **430**, 529–535.
- 16) Toyoshima, C., Nomura, H., & Tsuda, T. (2004) *Nature*, **432**, 361–368.
- 17) Obara, K., Miyashita, N., Xu, C., Toyoshima, I., Sugita, Y., Inesi, G., & Toyoshima, C. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 14489–14496.
- 18) Takahashi, M., Kondou, Y., & Toyoshima, C. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5800–5805.
- 19) Toyoshima, C., Norimatsu, Y., Iwasawa, S., Tsuda, T., & Ogawa, H. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19831–19836.
- 20) Sorensen, T.L., Moller, J.V., & Nissen, P. (2004) *Science*, **306**, 2251–2255.
- 21) Olesen, C., Sorensen, T.L., Nielsen, R.C., Moller, J.V., & Nissen, P. (2004) *Science*, **306**, 2251–2255.
- 22) Jensen, A.M., Sorensen, T.L., Olesen, C., Moller, J.V., & Nissen, P. (2006) *EMBO J.*, **25**, 2305–2314.
- 23) Olesen, C., Picard, M., Winther, A.M., Gyrupe, C., Morth, J.P., Oxvig, C., Moller, J.V., & Nissen, P. (2007) *Nature*, **450**, 1036–1042.
- 24) Moncoq, K., Trieber, C.A., & Young, H.S. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 9748–9757.
- 25) Inesi, G., Lewis, D., Ma, H., Prasad, A., & Toyoshima, C. (2006) *Biochemistry*, **45**, 13769–13778.
- 26) Toyoshima, C. & Inesi, G. (2004) *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 269–292.
- 27) Toyoshima, C. (2008) *Arc. Biochem. Biophys.* in press.
- 28) Picard, M., Jensen, A.M., Sorensen, T.L., Champeil, P., Moller, J.V., & Nissen, P. (2007) *J. Mol. Biol.*, **368**, 1–7.
- 29) Picard, M., Toyoshima, C., & Champeil, P. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 18745–18754.
- 30) Danko, S., Yamasaki, K., Daiho, T., & Suzuki, H. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 14991–14998.
- 31) Ikeguchi, M., Ueno, J., Sato, M., & Kidera, A. (2005) *Phys. Rev. Lett.*, **94**, 078102.
- 32) 杉田有治, 池口満徳 (2006) 物性研究, **86**, 157–197.
- 33) Ikeguchi, M. (2004) *J. Comp. Chem.*, **25**, 529–541.
- 34) Lee, A. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1376**, 371–390.
- 35) Zhang, Y.H., Feller, S.E., Brooks, B.R., & Pastor, R.W. (1995) *J. Chem. Phys.*, **103**, 10252–10266.
- 36) Sugita, Y., Miyashita, N., Ikeguchi, M., Kidera, A., & Toyoshima, C. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 6150–6151.
- 37) Bashford, D. & Gerwert, K. (1992) *J. Mol. Biol.*, **224**, 473–486.
- 38) Tadini-Buoninsegni, F., Bartolommei, G., Moncelli, M.R., Guidelli, R., & Inesi, G. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 37720–37727.
- 39) Inesi, G., Lewis, D., Toyoshima, C., Hirata, A., & de Meis, L. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 1189–1196.
- 40) Sugita, Y., Miyashita, N., Yoda, T., Ikeguchi, M., & Toyoshima, C. (2006) *Biochemistry*, **45**, 11752–11761.
- 41) MacLennan, D.H. & Karanias, E.G. (2003) *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, **4**, 566–577.
- 42) Toyoshima, C., Asahi, M., Sugita, Y., Khanna, R., Tsuda, T., & MacLennan, D.H. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 467–472.
- 43) Seidel, K., Andronesi, O.C., Krebs, J., Griesinger, C., Young, H.S., Becker, S., & Baldus, M. (2008) *Biochemistry*, **47**, 4369–4376.
- 44) Tada, M., Kirchberger, M.A., & Katz, A.M. (1976) *Recent Adv. Stud. Card. Struct. Metab.*, **9**, 225–239.
- 45) Tada, M., Inui, M., Yamada, M., Kadoma, M., Kuzuya, T., Abe, H., & Kakiuchi, S. (1983) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **15**, 335–346.
- 46) Metcalfe, E.E., Traaseth, N.J., & Veglia, G. (2005) *Biochemistry*, **44**, 4386–4396.
- 47) Li, J., Bigelow, D.J., & Squire, T.C. (2003) *Biochemistry*, **42**, 10674–10682.
- 48) Zmoon, J., Mascioni, A., Thomas, D.D., & Veglia, G. (2003) *Biophys. J.*, **85**, 2589–2598.
- 49) Sugita, Y. & Okamoto, Y. (1999) *Chem. Phys. Lett.*, **314**, 141–151.
- 50) Hukushima, K. & Nemoto, K. (1996) *J. Phys. Soc. Jpn.*, **65**, 1604–1608.
- 51) Morth, J.P., Pedersen, B.P., Toustrup-Jensen, M.S., Sorensen, T.L.M., Petersen, J., Andersen, J.P., Vilsen, B., & Nissen, P. (2007) *Nature*, **450**, 1043–1048.
- 52) Pedersen, B.P., Buch-Pedersen, M.J., Morth, J.P., Palmgren, M. G., & Nissen, P. (2007) *Nature*, **450**, 1111–1114.
- 53) Gadsby, D. (2007) *Nature*, **450**, 957–959.