

学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	王 国 麗
学 位 論 文 題 目 Critical Hydrophobic Interactions between Phosphorylation and Actuator Domains of Ca^{2+}-ATPase for Hydrolysis of Phosphorylated Intermediate (Ca^{2+}-ATPaseのリン酸化中間体加水分解に必須なリン酸化ドメイン/アクチュエータードメイン間疎水性相互作用) 共 著 者 名 山崎和生、大保貴嗣、鈴木 裕 The Journal of Biological Chemistry 平成 17 年 10.1074/jbc.M503789200 研 究 目 的 筋小胞体 Ca^{2+}-ATPase (SERCA1a)は ATP 加水分解に共役して Ca^{2+}を細胞質から小胞体内腔に汲み上げ、Ca^{2+}による細胞機能制御に必須の役割を果たす。994 個のアミノ酸残基からなる本酵素は M1～M10 のヘリックスで 10 回膜を貫通し、大きな細胞質領域は三つのドメイン (P, N, A)を形成する。Ca^{2+}輸送部位 (高親和性結合部位)は M4,M5,M6,M8 上の残基で形成され、自己リン酸化部位 Asp³⁵¹は細胞質のドメイン P (リン酸化ドメイン)に、ATP のアデノシン部分の結合ポケットはドメイン N (ヌクレオチド結合ドメイン)に存在する。SERCA1a による Ca^{2+}輸送の反応サイクルでは、先ず非活性型の酵素 (E_2) の輸送部位に細胞質 Ca^{2+}が結合し、酵素は活性型 ($E_1\text{Ca}_2$)に転換する ($E_2 \rightarrow E_1\text{Ca}_2$)。次に ATP のリン酸基が Asp³⁵¹に転移しリン酸化中間体 (EP) が形成し、これに伴い Ca^{2+}は輸送部位に閉塞される ($E_1\text{Ca}_2 \rightarrow E_1\text{PCa}_2$)。このリン酸化中間体は ADP と反応して ATP を再生できるので ADP 感受型 EP (E_1P) と呼ばれる。続いて $E_1\text{PCa}_2$ から ADP 非感受型 EP (E_2P) への転換と小胞体内腔への Ca^{2+}放出が起こり ($E_1\text{PCa}_2 \rightarrow E_2P$)、最後に E_2P が加水分解されて酵素は非活性型に戻る ($E_2P \rightarrow E_2$)。Ca^{2+}輸送は、細胞質の 3 つのドメインの大きな動きと相互作用の変化が輸送部位に伝達されることによると予想されている。これまでドメイン A (アクチュエータードメイン)の機能は明確でなかったが、我々のグループでは最近このドメインが 90° 以上も大きく回転しドメイン P へ結合すること、この変化はリン酸化中間体の構造転換と小胞体内腔への Ca^{2+}放出 ($E_1\text{PCa}_2 \rightarrow E_2P + 2\text{Ca}^{2+}$) に必須であろうこと、さらにドメイン A 中の Tyr¹²²が正常な E_2P の構造形成に重要な役割を担うことを明らかにした。Tyr¹²²は E_2P に相当する結晶構造ではドメイン A と P の六つの疎水性残基の中心に位置し、両ドメインの接合面で疎水性クラスターを形成する。これらの残基は Ile¹⁷⁹/Leu¹⁸⁰/Ile²³² (ドメイン A)、Val⁷⁰⁵/Val⁷²⁶ (ドメイン P)、および Leu¹¹⁹/Tyr¹²² (ドメイン A-M2 連結領域)である。一方、Ca^{2+}結合型の $E_1\text{Ca}_2$ および $E_1\text{PCa}_2$ に相当する結晶構造では、これらの残基は離れて存在する。本研究では、Tyr¹²²疎水性クラスター形成とそれによるドメイン A-P 間相互作用の役割を明らかにするため、クラスターを形成する 7 残基それぞれをアラニンおよびセリンで置換した変異体を作成し、それらについて速度論的に解析した。また Tyr¹²²疎水性クラスターのごく近傍に存在するドメイン A-M3 連結ループ上の Ile²³⁵およびドメイン A 先端に存在する T¹⁸¹GE ループの機能も同時に解析した。			

材 料 ・ 方 法

Quick Change 法で作成した 18 種類の変異体および野生型の SERCA1a cDNA を発現ベクター pMT2 に組み込み COS-1 で発現させ、ミクロソーム画分を調製して解析に用いた。発現量は sandwich ELISA 法、ATP 分解活性は遊離したリン酸の定量、また「 γ - ^{32}P 」ATP 或いは $^{32}\text{P}_i$ によるリン酸化中間体 (EP) の形成とその分解の解析は SDS-PAGE と放射活性測定により実施した。

成 績

1. Ca^{2+} -ATPase 活性に対する残基置換の影響

Tyr¹²²疎水性クラスター、Ile²³⁵、および T¹⁸¹GE の変異体の Ca^{2+} -ATPase 活性を 25°C で測定し、野生型と比較した。全ての変異体で、活性は極めて強くあるいは完全に阻害されていた。Tyr¹²²疎水性クラスター中の 7 残基それぞれでは、セリン置換のほうがアラニン置換よりさらに強い阻害を引き起こし、疎水性の重要性が示された。次に、各反応ステップについて解析した。

2. E2 から E1Ca₂ への転換

非リン酸化酵素の Ca^{2+} による活性化 (E2→E1Ca₂) は、全ての変異体で野生型に匹敵する (あるいはわずかに遅い) 速度であり、阻害されていなかった。また、 Ca^{2+} に対する親和性も全ての変異体で野生型に匹敵する高い親和性を示した。

3. ATP からの EP 形成および蓄積した EP の ADP 感受性

どの変異体も野生型に匹敵する量の EP を ATP から迅速に形成した。蓄積した EP の ADP 感受性について解析した結果、Tyr¹²²疎水性クラスターの変異体では、ADP 非感受型 (E2P) の量は野生型よりむしろ高かった。一方、Ile²³⁵ と T¹⁸¹GE の変異体では、蓄積した EP のほとんど全てが ADP 感受型 (E1P) であり、ADP 感受性の喪失 (E1P→E2P 転換) が阻害されていることが示唆された。

4. ATP から形成した EP の分解

Tyr¹²²疎水性クラスターの変異体、Ile²³⁵ および T¹⁸¹GE の変異体の全てで、ATP から形成した EP の分解は野生型に比較し著明に遅くなっていた。上記 3 の結果と合わせ、Tyr¹²²疎水性クラスターの変異体では E1P→E2P 転換の後の E2P 分解が阻害されていること、一方、Ile²³⁵ および T¹⁸¹GE の変異体では E1P→E2P 転換が阻害されていることが明らかとなった。

5. Pi から形成した E2P の加水分解

E2P の加水分解の速度を、 Ca^{2+} 非存在下 P_i から (加水分解の逆反応により) E2P を形成させて直接検証した。Tyr¹²²疎水性クラスターの変異体の全てで E2P 加水分解が著明に遅くなっていた。それぞれの残基では、アラニン置換よりもセリン置換による阻害のほうが強い阻害を示した。Ile²³⁵ の変異体および Glu¹⁸³ の変異体でも E2P 加水分解がブロックされていた。一方、T¹⁸¹GE 中の Thr¹⁸¹ および Gly¹⁸² の変異体では E2P 加水分解はむしろ促進されていた。

6. Tyr¹²²疎水性クラスター変異体の E2P 分解の律速ステップ

Tyr¹²²疎水性クラスターの変異体では、 Ca^{2+} 存在下 ATP から形成した E2P の分解は、 Ca^{2+} 非存在下 P_i から形成した E2P の加水分解に比べ明らかに遅かった。この結果は、今まで同定されていなかった E2PCa₂ (Ca^{2+} を結合した E2P) が中間体として存在すること、および小胞体内腔への Ca^{2+} 放出は E1PCa₂ からではなく E2PCa₂ から起こること (すなわち E1PCa₂→E2P+2 Ca^{2+} ではなく、E1PCa₂→E2PCa₂→E2P+2 Ca^{2+} , そして E2P+H₂O→E2+ P_i) を強く示唆している。そして、この Ca^{2+} 放出に Tyr¹²²疎水性クラスターの形成が重要であることがさらに示唆された。

考 案

Tyr¹²² 疎水性クラスターの機能

Tyr¹²² 疎水性クラスターを形成する残基 (Ile²³²/Ile¹⁷⁹/Leu¹⁸⁰、Val⁷⁰⁵/Val⁷²⁶、Tyr¹²²/Leu¹¹⁹) の疎水性側鎖は全て、E1P → E2P 転換後の迅速な E2P 分解に必須であることが明らかとなった。実際、P_i から形成した E2P の加水分解は、これら 7 残基のいずれへ変異を導入しても著明に抑制された。Tyr¹²² 疎水性クラスターの形成は、従って E2P の触媒部位 (加水分解部位) の立体構造を形成・安定化させる役割を担うと考えられる。アシルリン酸結合の加水分解には、攻撃 H₂O 分子とそれを補助する Mg²⁺ が適切な位置に配置されなければならない。攻撃 H₂O 分子は T¹⁸¹GE ループ上の Glu¹⁸³ に配位され、Mg²⁺ は D⁷⁰³GVND⁷⁰⁷ ループに配位されると予想されている。T¹⁸¹GE ループは Tyr¹²² 疎水性クラスターの Ile¹⁷⁹/Leu¹⁸⁰ に直接連結し、また、D⁷⁰³GVND⁷⁰⁷ ループ中の Val⁷⁰⁵ は本クラスターに含まれる残基である。従って、Tyr¹²² 疎水性クラスターの形成はこれら二つのループを適切な位置に配置・安定化させることにより、E2P の迅速な加水分解を可能にしていると考えられる。

本研究の速度論的解析はさらに、Tyr¹²² 疎水性クラスターが E2PCa₂ からの Ca²⁺ 放出に必須であることを強く示唆した。おそらくクラスター形成によって得られるドメイン A とドメイン P の強い結合エネルギーが、分子内を長距離にわたって Ca²⁺ 輸送部位に伝達されその構造を変化させて Ca²⁺ を放出させるのであろう。本論文受理後、我々はさらにこの予想を証明すべく Ca²⁺ の結合と放出を実際に解析している。

Ile²³⁵ および T¹⁸¹GE の機能

Ile²³⁵ と T¹⁸¹GE は E1P → E2P 転換に必須であることが明らかとなった。E1P → E2P 転換 (ADP 感受性の喪失) は、ドメイン A が 90° 以上にわたり大きく回転しドメイン P のリン酸化部位近傍にドッキングすることにより起こると構造的に予測されている。我々の結果はドメイン A 先端に位置する T¹⁸¹GE ループが、ドメイン P とのドッキングに必須に貢献することを示している。他方、ドメイン A-M1 連結ループ上の Ile²³⁵ は、このループをドメイン A に固定し、E1P → E2P 転換におけるドメイン A の回転の原動力 (E1P における構造的歪み) を伝達することに寄与していると予想される。なお本研究の成果はさらに、ドメイン A と P のドッキングにより Tyr¹²² 疎水性クラスターを形成する 7 残基が近接し、次のステップでそれらの相互作用が形成され Ca²⁺ 放出が起こることを示唆したものである (上述)。

Ile²³⁵ と Glu¹⁸³ はさらに E2P 加水分解にも必須であることが示された。Ile²³⁵ は E2P 加水分解に必要なドメイン A の動きを可能にすると予想され、他方、Glu¹⁸³ はアシルリン酸結合を攻撃する H₂O 分子の配位を担うという構造予測に我々の結果は一致している。

結 論

本研究により、リン酸化中間体の構造転換と小胞体内腔への Ca²⁺ 放出がどのような構造因子の貢献によりどのように逐次的に進行するか、その詳細が明らかになった。Tyr¹²² 疎水性クラスター、Ile²³⁵、および T¹⁸¹GE の 3 つの近接した構造因子は、それぞれ独自の構造的および触媒的機能を果たすことにより全体として協調しこの逐次的プロセスを可能にしている。本研究により、Ca²⁺ 輸送における最も重要なプロセスについての理解が顕著に進み、これによりエネルギー共役機構の解明に大きく貢献した。

引用文献

1. Toyoshima, C., Nomura, H., and Tsuda, T. (2004) Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature* 432, 361-368
2. MacLennan, D. H., Rice, W. J., and Green, N. M. (1997) The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *J. Biol. Chem.* 272, 28815-28818
3. Yamasaki, K., Daiho, T., Danko, S., and Suzuki, H. (2004) Multiple and distinct effects of mutations of Tyr¹²², Glu¹²³, Arg³²⁴, and Arg³³⁴ involved in interactions between the top part of second and fourth transmembrane helices in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* 279, 2202-2210

参考文献

1. Daiho, T., Yamasaki, K., Wang, G., Danko, S., Iizuka, H., and Suzuki, H. (2003) Deletions of any single residues in Glu⁴⁰-Ser⁴⁸ loop connecting A domain and the first transmembrane helix of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase result in almost complete inhibition of conformational transition and hydrolysis of phosphoenzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* 278, 39197-39204
2. Kato, S., Kamidochi, M., Daiho, T., Yamasaki, K., Wang, G., and Suzuki, H. (2003) Val²⁰⁰ residue in Lys¹⁸⁹-Lys²⁰⁵ outermost loop on the A domain of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase is critical for rapid processing of phosphoenzyme intermediate after loss of ADP sensitivity. *J. Biol. Chem.* 278, 9624-9629

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	王 国 麗
<u>審査委員長</u> 吉 田 成 孝 ㊞ <u>審査委員</u> 飯 塚 一 ㊞ <u>審査委員</u> 加 藤 剛 志 ㊞ <u>審査委員</u> 鈴 木 裕 ㊞			
学 位 論 文 題 目			
Critical hydrophobic interactions between phosphorylation and actuator domains of Ca^{2+}-ATPase for hydrolysis of phosphorylated intermediate （Ca^{2+}-ATPase のリン酸化中間体加水分解に必須なリン酸化ドメイン／アクチュエータードメイン間疎水性相互作用）			
小胞体 Ca^{2+}-ATPase は ATP 加水分解によって取り出したエネルギーを利用して Ca^{2+} を細胞質から小胞体内腔に汲み上げ、Ca^{2+} による細胞機能制御に必須の役割を果たす。本酵素の ATP 分解部位は細胞質領域の 3 つのドメイン（N, P, A）から形成され、Ca^{2+} 輸送部位は 10 本の膜貫通ヘリックスのうちの 4 本のヘリックスから形成される。輸送反応では、細胞質側から Ca^{2+} が輸送部位に結合すると ATPase が活性化され、ドメイン P の特定アスパラギン酸残基がリン酸化された自己リン酸化中間体を形成する。結合している Ca^{2+} の小胞体内腔への放出は、リン酸化中間体の異性化に伴って起こる。輸送部位と ATP 分解部位の間のエネルギー共役は、構造変化を介した両部位の相互応答によると考えられているが、本論文はその実態、特に輸送のためのエネルギー変換に最も本質的なプロセスであるリン酸化中間体の異性化とそれによる Ca^{2+} 放出がどのような構造因子の機能により生起するかを解明することを目的としている。そのため本論文では部位特異的変異と詳細な反応速度論的解析を展開し、結果を結晶構造に基づき解釈している。その結果、Ca^{2+} を放出したリン酸化中間体の正常な構造が形成されるには、ドメイン P とドメイン A との境界面で七つの疎水性残基が Tyr122 を中心に強い疎水結合を形成することが必須であることを明らかにした。そして本論文ではさらに、この P-A ドメイン間相互作用による変化が Ca^{2+} 輸送部位に伝達			

され、その構造を変化させることにより Ca^{2+} を内腔に放出させるというエネルギー変換の仕組みを提示している。

本論文では、このように Ca^{2+} 輸送におけるエネルギー共役がいかにして成立するか、その理解のための基本的な知見を提出したものであり、生体におけるさまざまな能動輸送システム全体の理解にとってもきわめて重要な貢献をしている。

また、口頭試問に対しても論文提出者からは適切な回答が得られ、提出者は十分な知識と論理能力、ならびに優れた実験技術を有することが示されている。

以上の審査結果から本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものであると判定した。