

依頼論文

Ca²⁺ ポンプメカニズムとその異常による病態

鈴木 裕*

【要 旨】

Ca²⁺ ポンプは細胞膜および小胞体膜に存在し、ATP 分解に共役して Ca²⁺ を細胞質から細胞外および小胞体内腔に能動輸送し、細胞質 Ca²⁺ 濃度を（細胞休止状態の）きわめて低いレベルに設定する。これにより Ca²⁺ 貯蔵庫としての小胞体機能、すなわち刺激に応じた Ca²⁺ 放出、新規合成タンパク質の折りたたみなどの翻訳後修飾やゴルジ体への輸送などの機能を可能にし、細胞の生存と Ca²⁺ による機能調節に必須の機能を果たす。本酵素の異常は、細胞接着異常による皮膚異常角化症、発がん、糖尿病、骨格筋弛緩異常、心機能異常、アルツハイマー病、など細胞及び Ca²⁺ ポンプアイソフォーム特異的な様々の重篤な細胞異常や病態発症の原因となり、また密接に関係している。我々は、Ca²⁺ ポンプについて、酵素学・タンパク質化学・構造学的研究を展開してその作動機構を明らかにし、さらに、得られた基本的理解に基づき、細胞 Ca²⁺ ホメオスタシス異常とそれによる細胞異常・病態の発症機序理解のための分子基盤を与えることを目的に研究を進めている。本総説では、これまでの成果、さらに本学平成 21 年度「独創性のある生命科学研究」助成金により得られた新知見を含め、現在の本分野における展開を紹介したい。

キーワード Ca²⁺ ポンプ、小胞体、エネルギー変換、Ca²⁺, Mn²⁺ ポンプ、ダリエー病

1 はじめに

Ca²⁺ ポンプ、Na⁺, K⁺ ポンプ、H⁺, K⁺ ポンプ、Cu ポンプ、Ca²⁺, Mn²⁺ ポンプは共通の ATP 分解反応機構でそれぞれの特異的カチオンを能動輸送する。その過程で ATP の γ - リン酸を特異的 Asp 残基に転移して自己リン酸化中間体（auto-Phosphorylated intermediate）を形成するので P-type ATPase と呼ばれている。この代表的メンバーである Ca²⁺ ポンプすなわち Ca²⁺-ATPase は形質膜と小胞体膜に存在し、ATP 加水分解に共役して、Ca²⁺ を数千倍の濃度勾配に逆らい細胞外あるいは小胞体内腔にくみ上げる¹⁻¹¹⁾（図 1）。これらのポンプは基本的に 10 回膜貫通蛋白であり、大きな細胞質領域は 3 つのドメイン（N, P, A）を形成する。ATP アデノシン部分の結合ポケットは N ドメインに、自己リン酸化部位は P ドメインに存在し、輸送され

る Ca²⁺ の結合部位は膜貫通ヘリックス M4, M5, M6, M8 上の残基から形成される。50Å も離れた触媒(ATP 分解) 部位（細胞質領域）とカチオン結合部位（膜貫通領域）の間でのエネルギー共役は大きな構造変化、すなわち 3 つの細胞質ドメインの大きな動きと膜貫通ヘリックスの再配置を介した相互応答による（図 2）。

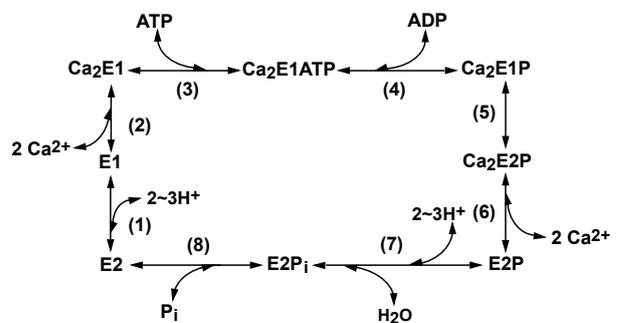


図 1 Ca²⁺-ATPase による Ca²⁺ 輸送反応サイクル

*生化学講座機能分子科学分野

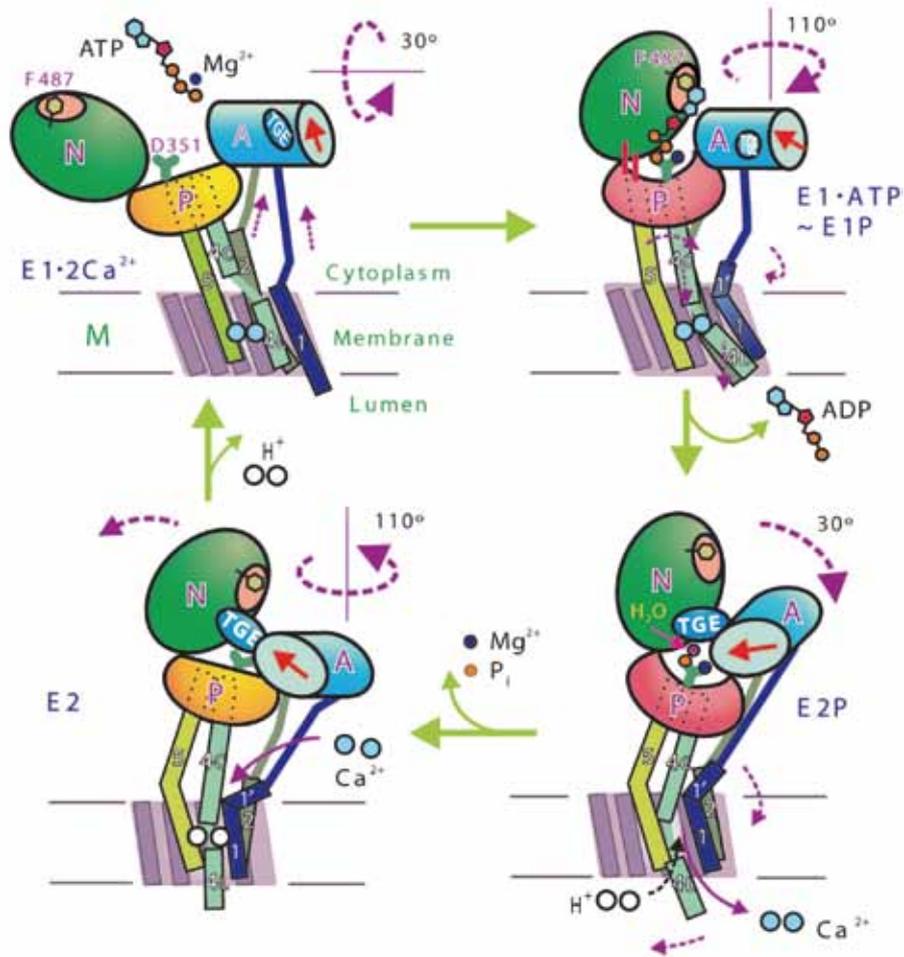


図2 Ca²⁺ 輸送反応サイクルにおける Ca²⁺-ATPase 構造変化³⁵⁾

Ca²⁺ ポンプは他の Ca²⁺ 排出系（例えば Na⁺, Ca²⁺ 交換輸送系）に比べて、Ca²⁺-ATPase は輸送する Ca²⁺ に対する親和性が顕著に高く、従って細胞休止時の低い細胞質 Ca²⁺ 濃度を厳密に設定する。小胞体 Ca²⁺-ATPase はまた、Ca²⁺ シグナル形成のための Ca²⁺ ストアとしての小胞体機能や小胞体内腔で起こる様々な Ca²⁺ 依存性プロセスを可能にする。1962 年、江橋とリップマンにより筋弛緩因子として機能する筋小胞体 Ca²⁺ ポンプが発見されて以来、普遍的な細胞内プロセス制御因子としての“カルシウム説”が発展した¹²⁾。我々は迅速に分解してしまうリン酸化中間体についてその安定なアナログを開発し、その構造特性を明らかにするとともに結晶構造解析に供してきた¹³⁻¹⁸⁾。また部位特異的の変異による構造-機能連関の解明に貢献している¹⁹⁻³¹⁾。そして豊島らにより次々に解かれている筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の原子レベルの反応中間体アナログの立体構造³²⁻³⁷⁾ とこれまでに蓄積してきた酵

素学的情報とに基づき、ポンプ作動機構の理解が急速に深まり、これにより Ca²⁺-ATPase のみならず P-type ATPase ファミリーが担う細胞イオンホメオスタシス制御の分子機序の理解が進んでいる。

細胞の生存と機能に必須である Ca²⁺-ATPase の異常はアイソフォーム依存的に、発がん、糖尿病、高血圧、皮膚異常角化（細胞分化異常）、筋弛緩障害、神経細胞異常、アルツハイマー、平滑筋細胞過増殖、心機能異常など様々な重篤な病態に密接に関連する。そのうち特に、非筋細胞タイプの SERCA2b アイソフォーム変異による皮膚異常角化症（グリエー病）で遺伝子解析が進んでいる^{25, 27, 38-43)}。これまでに世界 150 以上の家系で原因変異が明らかとなった。変異は各家系に依存して分子の様々な領域に存在しており、いわゆる hot spot はない（図3）。従って、病態とその発症機序を分子レベルから理解するには、Ca²⁺ ポンプの構造と機能を残基レベルで深く理解すること、そしてそれ

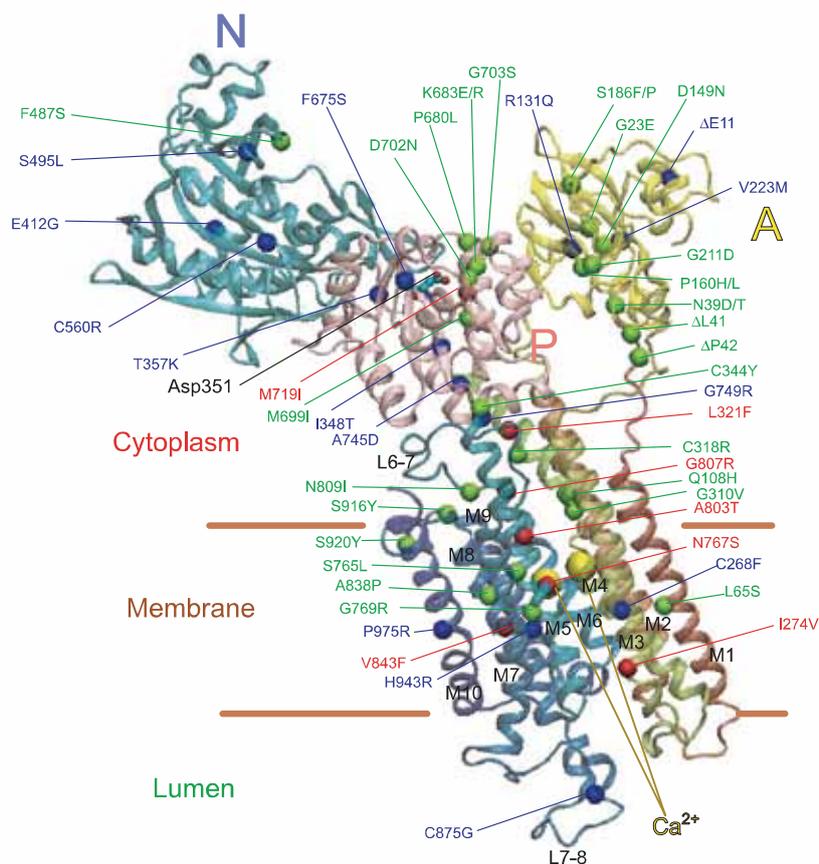


図3 解析したダリエー病51家系の変異箇所²⁷⁾

に基づき各家系の変異がどのような異常を Ca^{2+} ポンプタンパクに与えるかを解明することが必要である。我々は、報告されたミスセンス変異のほとんどすべてについて、それぞれが Ca^{2+} ポンプタンパクに与える異常を解析した。そして各家系の変異に依存して、タンパクの発現と機能において様々な内容と程度の異常が起こること、さらに、ごく僅かな Ca^{2+} 動態異常が発症をもたらすであろうことを明らかとした。本稿では、 Ca^{2+} ポンプ作動の分子機構をまず概説し、 Ca^{2+} ポンプ異常と様々な病態、ダリエー病の原因となるポンプ分子異常、ハイリー・ハイリー病の原因となるゴルジ体 Ca^{2+} , Mn^{2+} -ATPase についての基本的知見⁴⁴⁾を紹介する。

2. アイソフォーム

形質膜 Ca^{2+} -ATPase (Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) ; 127-145kDa) と小胞体 Ca^{2+} -ATPase (sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) ; 105-115kDa) はそれぞれ4つおよび3つの異なる遺伝

子群によりコードされ、さらに組織・分化段階に依存した alternative splicing により多数のアイソフォームを形成する²⁾。PMCA は長いC末端細胞質領域にカルモジュリン結合部位を有しており、カルモジュリンによる制御を受ける。PMCA 1bと4bは全ての細胞で発現する house-keeping アイソフォームで、PMCA2と3の特にa型は脳、骨格筋、心筋など興奮性の細胞で発現する。b型はC末端にPDZ結合ドメインを有する。SERCA1a(成体型)と1b(新生児型)は骨格筋の速筋で発現し、2a(997残基)は心筋と骨格筋遅筋の主要なアイソフォームで平滑筋でも発現する。2bはほとんど全ての細胞で発現し、非筋細胞や平滑筋では主要な (house-keeping) アイソフォームである。骨格筋と心筋における1aと2aの発現量はきわめて高く筋小胞体蛋白全量の50-70%であり、迅速な筋弛緩を可能にしている。SERCA2bではN末端から993残基までの配列は2aと共通であるが、さらにヒトで45残基長い。この長いC末端領域は疎水性が高く11番目の膜貫通ヘリックスを形成する。2bは、1aや2aに比

べ、Ca²⁺ 結合部位の Ca²⁺ 親和性が 2 倍ほど高く従って僅かに低く細胞質 Ca²⁺ 濃度を設定する。また Ca²⁺ 輸送速度は 1/2 程度と遅い。非筋細胞アイソフォームとしてのこれら 2b の機能特性は、2b のみが有する 11 番目の膜貫通ヘリックスの影響である⁴²⁾。SERCA3 には C 末端の長さが異なる 5 種 (a~e) のアイソフォームがあり、N 末から 993 残基は同一であるが、それに続く C 末端領域の配列と長さ (5-50 残基) は異なる。SERCA3 は常に 2b と共に非筋細胞で発現するが、発現レベルは顕著に組織に依存し、小脳プルキンエ細胞、結腸上皮細胞、肺及び気管上皮細胞、リンパ系細胞、膵β細胞など活発な Ca²⁺ 動態を持つ細胞などでのみ発現する。SERCA3 は 1 と 2 に比較して 1.5 倍程度高い比活性を持つが、Ca²⁺ 親和性は 5 倍程度低い。おそらく活発な Ca²⁺ 動態に迅速に対応するための特性であろう。SERCA3 はまた、小胞体内腔に蓄積した Ca²⁺ による阻害に対して極めて感受性が低く、従って内腔 Ca²⁺ をより高いレベルに設定し、特定細胞プロセスを可能にすると考えられている。SERCA2b と 3 がどのように役割を分担するのか、局在・小胞体の区画化と共に重要な問題である。

3. 反応機構

小胞体 Ca²⁺-ATPase の輸送反応サイクルでは、先ず輸送される 2 個の細胞質 Ca²⁺ が協同的に高親和性部位 (輸送部位, Kd= ~ 0.5 μ M) へ結合することによって ATPase が活性化され (ステップ 1-2、図 2)、次いで MgATP (Kd= ~ 5 μ M) からリン酸基が Asp351

に転移し自己リン酸化中間体 (EP) が形成する (ステップ 3-4)。この EP は ADP と反応して ATP を再生できる ADP 感受型 (E1P) で、この E1P 形成に伴い輸送部位の Ca²⁺ は膜の両側からアクセスできない閉塞された状態となる (E1PCa₂)。次に大きな構造変化が起こり E1P は ADP 非感受型の E2P に異性化する (図 1)。これに伴い輸送部位は内腔側を向き親和性が数千分の 1 に低下し Ca²⁺ が内腔に放出される (ステップ 5-6)。E2P では特異的水分子によるアシルリン酸結合への攻撃が起こり加水分解される (ステップ 7-8)。このサイクルは 1 秒あたり最大 ~50 回転し、EP 異性化 (ステップ 5) が律速である。なお、Ca²⁺ 放出に伴い内腔側から H⁺ が Ca²⁺ 配位子に結合し、次のサイクルで細胞質側に放出されるので厳密に言えば Ca²⁺-ATPase は Ca²⁺,H⁺ ポンプである。形質膜 Ca²⁺ ポンプでは、高親和性 Ca²⁺ 結合部位が 1 つであるため輸送される Ca²⁺ は ATP 1 分子あたり 1 個であり、カルモジュリン結合により活性化される。

4. Ca²⁺ 結合型および非結合型リン酸化中間体構造アナログの開発

我々は筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の各リン酸化中間体の安定な構造アナログを、メタルフッ素を用いて開発した (Table 1)¹³⁻¹⁸⁾。Ca²⁺-ATPase のリン酸化および加水分解反応はともに "in-line-associative" な機序による。AlF_x (AlF₃ あるいは AlF₄⁻) ではその配位化学的性質として、アルミニウムにフッ素が平面状に、その両 apical 側から酸素 (リン酸化部位 Asp351 側鎖と、

Table 1 Ca²⁺-ATPase 反応中間体の安定な構造アナログの開発

	Intermediate states in Ca ²⁺ transport cycle								
	E2 (no Ligands)	E1Ca ₂	E1Ca ₂ ·ATP	E1PCa ₂ ·ADP [±] E1PCa ₂ ·ADP	E1PCa ₂	E2PCa ₂	E2P	E2P [±]	E2·P _i
Stable analog	E2 or E2(TG)	E1Ca ₂	E1Ca ₂ ·AMPPCP	E1Ca ₂ ·AlF ₄ ⁻ ·ADP E1PCa ₂ ·AMPPN	E1Ca ₂ ·BeF ₃ ⁻	E2Ca ₂ ·BeF ₃ ⁻	E2·BeF ₃ ⁻	E2·AlF ₄ ⁻	E2·MgF ₄ ²⁻
Reference	13, 14, 33	13, 14, 32	14	14, 47	17	18	16	16	13, 16
References for Crystal structures	33	32	34, 45	34, 45, 47	(—)	(—)	37, 47	37, 46, 47	35

TG; thapsigargin

ADP β リン酸あるいは H_2O) が配位して反応遷移状態に相似な bipyramidal 構造を形成する。 BeF_3^- のベリリウムは三つのフッ素のほかにもう一つの配位子、例えばアスパラギン酸残基側鎖の酸素を直接配位した tetrahedral 構造 $-O-BeF_3^-$ を形成する。そこでアシルリン酸 (Asp351 に共有結合したリン酸) の相似構造となる。開発した Ca^{2+} 結合型 $E1Ca_2 \cdot BeF_3^-$ および非結合型の $E2 \cdot BeF_3^-$ は、それぞれリン酸化反応生成物 $E1PCa_2$ および Ca^{2+} 放出直後の $E2P$ 基底状態のアナログであることが、これら複合体の特性解析からも明確に帰属された^{16,17)}。 MgF_4^{2-} は tetrahedral 構造をとるが、マグネシウムはベリリウムとは異なり、酸素 (例えば Asp351 側鎖酸素) には直接配位できないので非共有結合型リン酸 Pi の相似構造となる。実際、 MgF_4^{2-} は Ca^{2+} 非結合型の $E2$ と複合体を形成して加水分解生成物複合体 ($E2 \cdot Pi$) のアナログ $E2 \cdot MgF_4^{2-}$ 形成するが、 Ca^{2+} 結合型の $E1Ca_2$ とは複合体を形成できない。 $E1Ca_2$ の ATP による Asp351 リン酸化反応 ($E1PCa_2$ 形成) には Pi との非共有結合状態が存在しないことと一致する。これらメタルフッ素と Ca^{2+} -ATPase の複合体は 1 ヶ月保存しても崩壊しない極めて安定な複合体である¹⁵⁾。

開発した各アナログを用いて、ミリ秒オーダーで迅速に遷移・分解してしまうがゆえにこれまで解析できなかった各リン酸化反応中間体の構造-機能特性を生化学的に解明した¹³⁻¹⁸⁾。その結果、まず、 Ca^{2+} 輸送過程で細胞質の3つのドメインは顕著に異なる4種の集合状態を変化することが明らかとなった^{13,14)}。 $E1PCa_2$ では3つのドメインは離れているが、ATP が結合すると N-P ドメインが閉じて (ATP で架橋され) リン酸基転移が起こる (ステップ 3-4)。EP 異性化と Ca^{2+} 放出 (ステップ 5-6) ($E1PCa_2 \rightarrow E2PCa_2 \rightarrow E2P + 2Ca^{2+}$) という Ca^{2+} 輸送において最も重要なプロセスの実態は、A ドメインが 90 度以上も大きく回転し P ドメインに強く結合して最もコンパクトな集合状態を形成すること、それにより Ca^{2+} 輸送部位の構造 (すなわち膜貫通ヘリックス配置) が大きく変化して Ca^{2+} の脱閉塞と放出が引き起こされる、というものであることが分かった。 $E2P$ 加水分解 (ステップ 7-8) 過程では、3 ドメインは弱い集合結合状態となる。これらの成果により、細胞質ドメインの大きな動きとそれに共役した Ca^{2+} 輸送部位の変化、というエネルギー変

換の本質が明らかとなった。

さらに、 Ca^{2+} 非結合型安定構造アナログ $E2 \cdot BeF_3^-$ 、 $E2 \cdot AlF_4^-$ 、 $E2 \cdot MgF_4^{2-}$ の特性解析¹⁶⁾ からは、 $E2P$ 加水分解反応 ($E2P + H_2O \rightarrow E2P^\ddagger \rightarrow E2 \cdot Pi \rightarrow E2 + Pi$) 過程で、触媒部位における僅かな構造変化に伴い Ca^{2+} 放出路が閉じて内腔 Ca^{2+} の細胞質への漏れ出しを防ぐ構造が獲得されることが分かった。すなわち $E2P$ 基底状態 ($E2 \cdot BeF_3^-$) では内腔 Ca^{2+} ゲートは Ca^{2+} 放出直後の開いた状態であり、遷移状態 $E2P^\ddagger$ および $E2 \cdot Pi$ ($E2 \cdot AlF_4^-$ および $E2 \cdot MgF_4^{2-}$) では閉じた状態となり内腔 Ca^{2+} の輸送部位へのアクセス (漏れ出し) を防ぐ構造が形成されるのである。生化学的解析により予測されたこれら各中間体構造特性は、実際各アナログの結晶構造により原子レベルで解明されている。

5. 結晶構造解明：中間体の原子構造モデルから明かされた Ca^{2+} 輸送の仕組み

東京大学・分子細胞生物学研究所の豊島らにより各中間体の安定構造アナログの結晶化と原子構造解明が次々になされ、輸送機能の理解が大きく進展した³²⁻³⁷⁾。P-type ATPase 研究のみならず、膜蛋白結晶化と構造解明、生体エネルギー転換機構解明、細胞イオンホメオスタシスとその異常による病態発症機序理解の分子基盤、といった観点からも画期的成果である。反応ステップごとの細胞質ドメインの動きとそれに共役した Ca^{2+} 輸送膜貫通ヘリックスの再配置の実態、リン酸化および加水分解反応とそれらに共役した Ca^{2+} 閉塞と脱閉塞、内腔放出路開閉の仕組みが原子レベルで解明された。そして豊島らはこれら膨大な原子レベル情報に基づき、 Ca^{2+} 輸送とエネルギー変換機構について見事な解釈を行なっている¹⁰⁾。図 2 はそれらを包括したモデルであるが、さらに詳細については、原著や総説だけでなく豊島研究室のホームページ情報をぜひ参照されたい。構造変化の様子が連続したムービーとして紹介されている。また豊島らの原子レベルの情報は、 Ca^{2+} 配位、ATP 結合およびリン酸基転移、アシルリン酸加水分解と攻撃水分子の配位、さらに触媒補因子 Mg^{2+} の結合について、残基および原子レベルの情報を与えたことは言うまでもない。さらに豊島らは、心筋および骨格筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase を制御するホスホランバンおよびサルコリピンの Ca^{2+} -ATPase への結合構造を解明し、制御とその異常による病態の

分子基盤を確立している^{48,49)}。また Ca^{2+} -ATPase・脂質二重膜・溶媒の全体の系についてのナノ秒オーダーでの分子動力学シミュレーション研究も発展させ、新たな観点からポンプ機構の理解を深めているだけでなく、この手法が遺伝子変異と病態発症を理解するための極めて強力なツールであることを明確に示している⁵⁰⁾。他方、 Na^+ , K^+ -ATPase や Cu -ATPase の結晶構造解明も進め、P 型 ATPase の共通性と相違について原子レベルの理解を深めている⁵¹⁻⁵³⁾。

6. Ca^{2+} -ATPase の部位特異的変異と $E1\text{PCa}_2$ アナログおよび $E2\text{PCa}_2$ アナログ開発によりさらに深まる理解

$E1\text{PCa}_2$ アナログとして $E1\text{Ca}_2\cdot\text{BeF}_3^-$ の開発と安定化に我々は成功した¹⁷⁾。この結晶構造解析は現在待たれるところであるが、我々の構造特性解析によれば、リン酸化反応遷移状態 $E1\text{PCa}_2\cdot\text{ADP}^\ddagger$ ($E1\text{Ca}_2\cdot\text{AlF}_4^- \cdot \text{ADP}$) から $E1\text{PCa}_2$ ($E1\text{Ca}_2\cdot\text{BeF}_3^-$) が形成する過程で、A および P ドメインの配置がかなり変化すること、それに伴い輸送部位は Ca^{2+} 閉塞状態を保ちながらその構造を変化させることが明らかとなった。これらの変化により、次の EP 異性化における大きな変化を生起させるための構造が $E1\text{PCa}_2$ に備わるのである。

さらに我々は、 $E2\text{PCa}_2$ の構造アナログとして $E2\text{Ca}_2\cdot\text{BeF}_3^-$ の開発に成功した¹⁸⁾。 Ca^{2+} 放出直前の $E2\text{PCa}_2$ という中間状態の存在は仮定されていたのみでありその実体は不明であった。 Ca^{2+} 放出 ($E2\text{PCa}_2 \rightarrow E2\text{P} + 2\text{Ca}^{2+}$) がきわめて迅速であるためである。我々は、このプロセスに必須な残基領域を見出し、部位特異的変異によりこの $E2\text{PCa}_2$ 状態を安定化し同定した²²⁻²⁹⁾。特に、A/M1 リンカー (A ドメインと M1 を連結するループ) にアミノ酸を挿入して長くすると、 Ca^{2+} 放出が完全にブロックされることを発見し、これにより $E2\text{PCa}_2$ を始めてトラップすることに成功した²⁸⁾。そこで A/M1 リンカーを長くした変異体に BeF_3^- を結合させることにより、 $E2\text{PCa}_2$ アナログの $E2\text{Ca}_2\cdot\text{BeF}_3^-$ を開発したのである。これらの成果により、適切な長さの A/M1 リンカーを持つ野生型では Ca^{2+} 放出のための構造変化 ($E1\text{PCa}_2 \rightarrow E2\text{PCa}_2 \rightarrow E2\text{P} + 2\text{Ca}^{2+}$) がどのような仕組みで生起するかが分かった。すなわち、 $E1\text{PCa}_2 \rightarrow E2\text{PCa}_2$ で A ドメインが大きく回転して P ドメインの上に動きドッキングする

ことにより A/M1 リンカーは引っ張られ“緊張”した状態になること、この緊張により次の $E2\text{PCa}_2 \rightarrow E2\text{P} + 2\text{Ca}^{2+}$ では A ドメインと P ドメインが引き下げられて傾き、それにより膜貫通ヘリックスにも傾きが生じて Ca^{2+} 結合部位の親和性が低下するとともに内腔放出路が開くのである。さらに、この構造変化の結果、A-P ドメイン間に新たな特異的相互作用が形成してコンパクトな集合状態となつて、 Ca^{2+} を放出した $E2\text{P}$ 基底状態構造が安定化されることを明らかとした²²⁻²⁹⁾。 $E1\text{Ca}_2\cdot\text{BeF}_3^-$ とともに $E2\text{Ca}_2\cdot\text{BeF}_3^-$ の結晶構造解明が待たれるが、これらにより我々の予測が検証され、能動輸送の仕組みが原子レベルでさらに深く理解されるであろう。

7. Ca^{2+} ポンプ異常と病態

Ca^{2+} ポンプは細胞質と小胞体内腔の Ca^{2+} 動態を整えることによりそれぞれの区画で起こる様々な細胞プロセスに必須の役割を果たし、また細胞質 Ca^{2+} 過増大によるアポトーシスを未然に防ぐ。従って当然ながらその異常はアイソフォーム特異的に重篤な病態をもたらす。SERCA1 変異による機能欠損はプロデュー病 (常染色体劣性遺伝、運動後の骨格筋弛緩障害)⁵⁴⁾ を、SERCA2 の変異は 2b 型を発現する皮膚表皮角化細胞の細胞間接着異常によるダリエー病 (常染色体優性遺伝角化異常症)^{25,27,38-43)} を発症させる (8 章)。なお、心筋では SERCA2 遺伝子から 2a 型アイソフォームが形成・機能するにもかかわらず、ダリエー病患者は心機能異常を伴わない。ダリエー病モデル SERCA^{2+/+} ノックアウトマウスモデルでは、やはり心筋収縮・弛緩機能は僅かに低下するだけだが、一方、皮膚・胃・食道・口腔粘膜・舌・などの扁平上皮では (異常角化ではなく) 加齢と共に細胞がん化が極めて多く観察され、 Ca^{2+} 動態異常とがん化の直接の関連性が指摘されている⁵⁵⁾。

ヒトがんでは、組織依存的に PMCA や SERCA の各アイソフォーム、各種 Ca^{2+} チャネルの発現量が大きく変動していることが観察され、やはり Ca^{2+} 動態変化による細胞周期・アポトーシス・増殖の制御異常とがん化との関連が指摘され、ポンプやチャネルの発現調節を指針としたがん治療が検討されている⁵⁶⁾。またペプチドを結合した SERCA 阻害剤ダプシガージン誘導体が開発され、前立腺がんではその細胞内特異

的プロテアーゼにより阻害剤を活性化させてアポトーシスを引き起こすという戦略の治療が検討されている^{57, 58)}。

ヒトで SERCA2a の発現量の大きな変化は心機能異常と、また SERCA2b の発現量変化は平滑筋組織・血管の過増殖と密接に関連していることが観察され、これら病態の治療戦略としてやはり SERCA2a および 2b の発現量調節が検討されている^{56, 58-60)}。心筋では、特に SERCA2a とその制御蛋白ホスホランバンの量比に注目し、遺伝子導入により SERCA2b の発現量を増大させてホスホランバンのポンプ抑制を相対的に弱める、あるいはアンチセンス DNA / RNA によりホスホランバンの発現量を低下させることにより、心機能を改善できることが培養細胞や動物モデルで示されている⁵⁹⁾。

一酸化窒素 NO は、SERCA2b の Cys674 のグルタチオン修飾を介して Ca^{2+} ポンプ機能を活性化し平滑筋弛緩を促進するとともに、平滑筋細胞遊走を抑制すると指摘されている⁶¹⁾。NO のこの作用は cGMP / PKG 依存性カスケードとは異なる仕組みである。高血糖、高コレステロール血症、アテローム性動脈硬化などの病態では、蓄積した酸化物により Cys674 の（不可逆的）酸化が起り、NO による平滑筋遊走の抑制が阻害されて病態を悪化させると考えられている。

早期発症型家族性アルツハイマーの大部分は、小胞体膜蛋白プレセニン（プロテアーゼ）の変異を原因としたアミロイド β 蛋白の異常凝集によるが、このプロテアーゼ機能欠損に加え、プレセニン変異による Ca^{2+} 動態異常がアルツハイマー発症に関わっていることが、最近指摘されている⁶²⁻⁶⁴⁾。すなわち正常プレセニンは小胞体からの Ca^{2+} リークを惹起させて小胞体の Ca^{2+} オーバーロードを防ぎ Ca^{2+} ホメオスタシス維持に機能すること、従ってその機能欠損は小胞体 Ca^{2+} オーバーロードと細胞質への過剰 Ca^{2+} 放出を招いて Ca^{2+} 動態異常によるアミロイド β 蛋白の異常凝集促進をはじめとする様々な異常を悪化させ、さらにアポトーシスを引き起こす、というものである。正常プレセニンのこの機能は、SERCA2b との直接相互作用により⁶⁵⁾、 Ca^{2+} ポンプを Ca^{2+} リークチャネルとして機能させることによると予想されている^{66, 67)}。

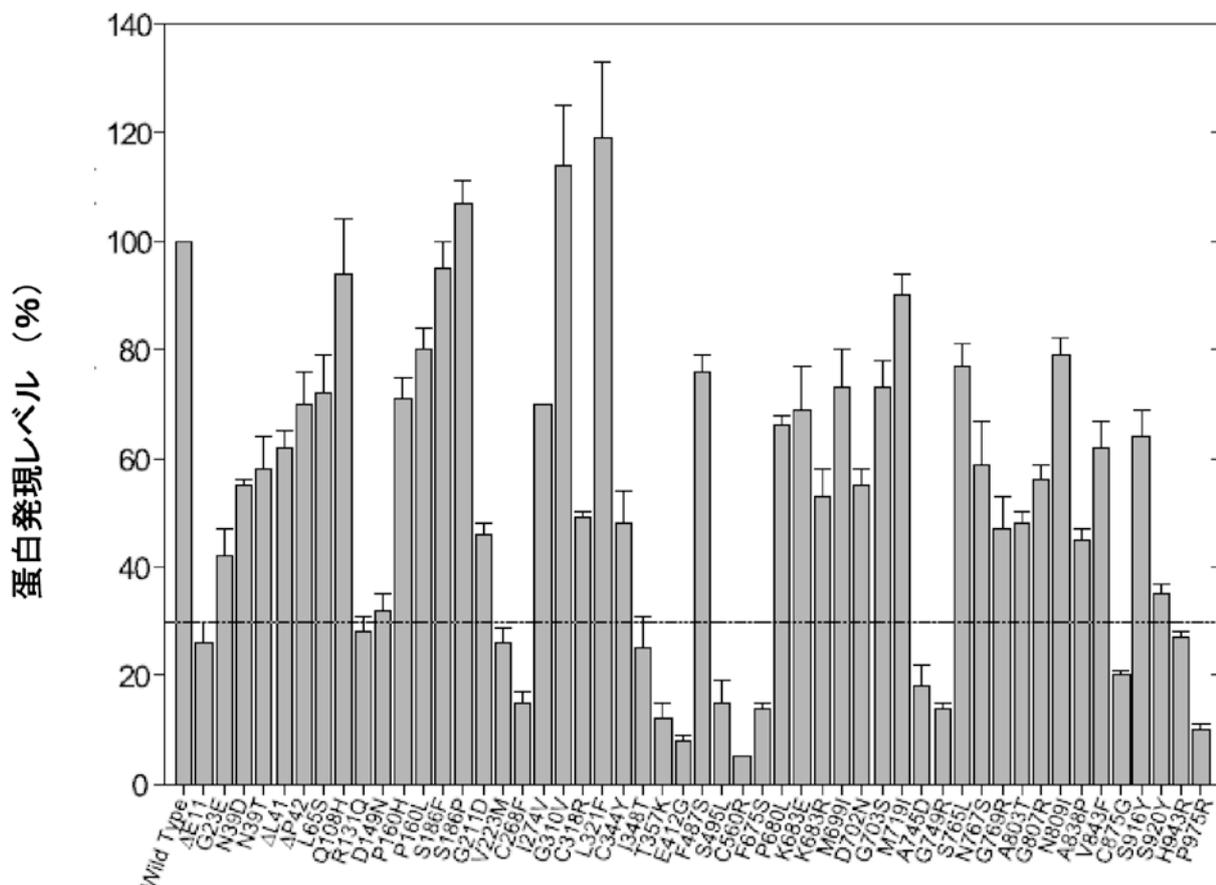
限られた非筋細胞でのみ発現する SERCA3 の発現異常は、組織依存的に発がん、インスリン非依存型糖

尿病 (NIDDM)、高血圧の発症要因の一つであると示唆されている⁵⁶⁾。聴覚・平衡感覚受容器である有毛細胞不動毛には PMCA2 が多量に発現するが、この遺伝子変異により実際、聴覚と平衡感覚・運動に重篤な障害が起こることが動物モデルで観察されている^{68, 69)}。老化と共に発現が減少する SMP30 蛋白は PMCA の活性化因子であり、従って PMCA の活性低下が細胞老化の一因であると示唆されている⁷⁰⁾。また老化促進因子として SERCA のシステイン残基酸化によるポンプ機能低下が指摘されている⁶¹⁾。

8. グリエー病解析

グリエー病は SERCA2b 異常により発症する常染色体優性遺伝性角化異常症で、皮膚表皮角化細胞間の接着異常による異常角化と棘融解という組織学的変化を呈する（皮膚症例については、例えば DermIS (Dermatology Information System) の Web site 参照)。発症期は小児期から思春期と遅い。興味深いことに精神遅滞などの症状を伴う場合がある。1999 年にグリエー病原因遺伝子として SERCA2b が同定されて以来、グリエー病家系の遺伝子解析が世界各国で進められている³⁸⁻⁴¹⁾。SERCA を原因とする病態の中ではグリエー病の解析が顕著に進んでおり、現在までにヨーロッパ・アジアの約 150 家系以上で解析され、 Ca^{2+} ポンプ分子の全域に渡り、家系毎に異なる変異が存在することが明らかとなった。日本人における異常は我々が始めて報告した⁴⁰⁾。150 家系のうち約 6 割程度ではミスセンス変異であり、しかも ATP 分解や Ca^{2+} 結合に必須ではない残基の変異がほとんどであった。そこで我々はミスセンス変異の 51 家系（図 3）について、それぞれの変異が Ca^{2+} -ATPase 蛋白の発現と機能に与える影響を解析した^{25, 27)}。ポンプ蛋白のどのような内容の、そしてどの程度の異常が細胞病態を引き起こすか、細胞 Ca^{2+} 動態異常と病態を理解するためのよいモデルとなるからである。各家系の変異を導入した SERCA2b cDNA を培養動物細胞に transfect し、ポンプ蛋白発現と発現したポンプの機能を野生型と比較解析した。

結果は次のようなものであった。15 の変異体蛋白は mRNA レベルが野生型にほぼ等しいにもかかわらず殆ど発現せず、品質管理システムにより迅速に分解されている可能性が示唆された（図 4）。発現し



ダリエー病変異体

図 4 ダリエー病変異体の発現レベル²⁷⁾

た他の 36 変異体のうち、29 変異体ではその ATPase 活性がほぼ完全に阻害されていた (図 5)。高い ATPase 活性を示した 7 変異体のうち 4 変異体 (N767S, A803T, G807R, V843F) では Ca^{2+} 輸送活性がほぼ完全に消失しており、ATP 分解と Ca^{2+} 輸送が脱共役していた (図 6)。51 家系のうちのこれら 48 家系の変異体では、このように Ca^{2+} 輸送活性が完全に消失しており、従ってこれらの家系では haploinsufficiency により病態に陥ることが分かった。興味深いことに残りの 3 つの変異体 I274V、L321F、M719I は、一見正常な Ca^{2+} 輸送活性と蛋白発現量を保持し、正常に小胞体に局在していた。これら 3 変異は偶然ではあるが、我々が日本で始めて行なった遺伝子解析で見出されたダリエー病 3 家系のものであった^{25, 27, 40)}。詳細な速度論的解析の結果、これらの 3 変異体は、 Ca^{2+} 輸送における 1) Ca^{2+} 親和性の 2~3 倍程度の僅かの低下 (L321F, M719I)、2) ~20-30% 程度の僅かの速度低下 (I274V、

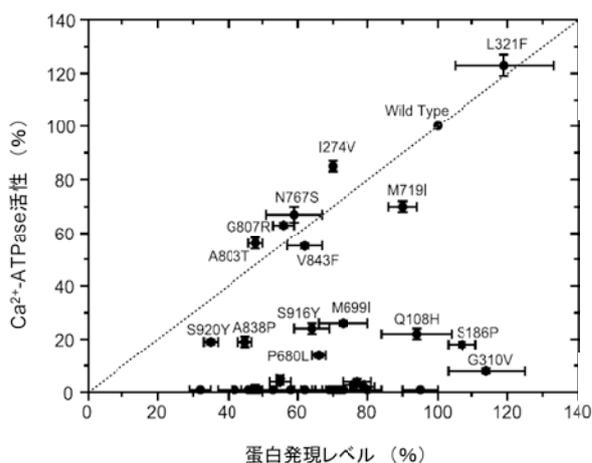


図 5 ダリエー病変異体の Ca^{2+} -ATPase activity 活性と発現レベル²⁷⁾

M719I)、3) 高濃度 Ca^{2+} による阻害に対する感受性低下 (L321F)、のいずれかあるいは複合的な異常を保持していた²⁵⁾ (Table 2)。1) の異常は細胞質 Ca^{2+} の設

定レベルが僅かに高くなることを意味し、2) は Ca^{2+} シグナルへの対応速度が僅かではあるが不十分であることを意味する。3) の変異体は小胞体内腔に蓄積された Ca^{2+} によるポンプのフィードバック阻害に対して感受性が低く、従って内腔 Ca^{2+} レベルを異常に高く設定してしまうことを意味する。51 家系変異の解析から、このように全く異なる内容と程度の Ca^{2+} 動態異常が病態を引き起こすであろうことが分かった。細胞は極めて厳密な Ca^{2+} 制御、微妙な Ca^{2+} 動態のチューニングを必要としている。さらに我々は上記 3) の異常、すなわち小胞体内腔の異常な高 Ca^{2+} レベル設定とこの変異 L321F を有するダリエー病家系の特異的付随症状である重篤な精神症状との関連を指摘し

た。これら 51 のミス変異による異常の速度論的機能解析はまた、 Ca^{2+} ポンプにおけるエネルギー共役機構の理解に深く貢献した。

9. ゴルジ体 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mn}^{2+}$ ポンプ

ダリエー病によく似た皮膚症状を呈するヘイリー・ヘイリー病は、P 型 ATPase メンバーのゴルジ体 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mn}^{2+}$ ポンプ遺伝子 ATP2C1 の変異を原因とする。このポンプは Ca^{2+} だけでなく Mn^{2+} をゴルジ体に汲み上げるが、一方、皮膚組織における局在や細胞における役割など、このポンプについては基本的理解がなされていなかった。そこで我々はヒト正常表皮について解析し、ゴルジ体 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mn}^{2+}$ ポンプは表皮基底層細胞に局在して発現しており、その分化 (角化) により形成した有棘層には発現していないことを発見した⁴⁴⁾。さらに、培養ヒト角化細胞に分化刺激を与えて分化させてもゴルジ体 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mn}^{2+}$ ポンプの発現は低下しないが、RNA-interference によりゴルジ体 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mn}^{2+}$ ポンプ発現を抑制すると細胞が分化 (角化) することを証明した。これらにより、表皮基底層角化細胞に発現するゴルジ体 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mn}^{2+}$ ポンプは、細胞分化開始シグナル (すなわちゴルジ体 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mn}^{2+}$ ポンプ発現抑制シグナル) が現れるまで、角化細胞を未分化の状態に保つ役割を果たすことを始めて明らかにした⁴⁴⁾。さらに、高い Mn^{2+} 特異性を有するイオノフォアを用いて、ゴルジ体内腔の特に Mn^{2+} レベルの低下が角化の開始に重要であることを示した。これらの発見は、細胞分化プロセスとその異常の分子機序について全く新しい観点からの理解を与えたものであり、今後の研究展開が

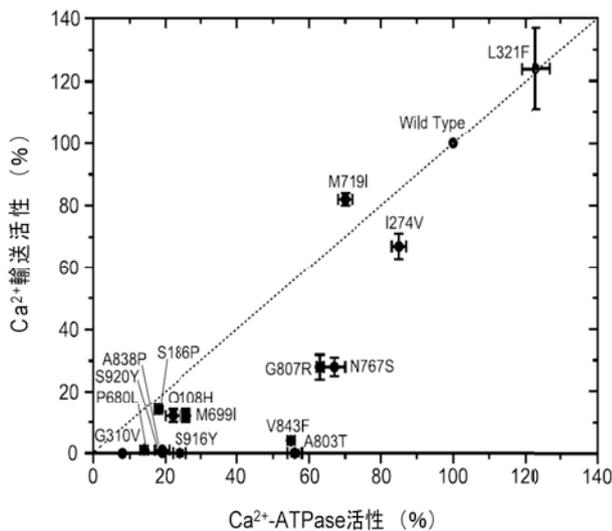


図 6 ダリエー病変異体の Ca^{2+} 輸送活性と Ca^{2+} -ATPase activity 活性²⁷⁾

Table 2 3つのダリエー病変異体の反応速度論的機能異常特性と症状^{25, 27)}

	Kinetic properties of Darier's mutant					Symptoms in Pedigree	
	Expression level (%)	ATPase activity (%)	Ca^{2+} transport activity (%)	$K_{0.5}$ for cytoplasmic Ca^{2+} activation (μM)	$K_{0.5}$ for luminal Ca^{2+} -induced feedback inhibition (mM)	Skin	Neuropsychiatric manifestations
Wild type	100	100	100	0.12	4		
I274V	97.4	63.7	65.0	0.11	4	Mild, onset at age 20, eruption mainly on frontal chest. No DD symptoms in his children.	non
L321F	81.8	100.4	94.8	0.27	>50	Severe, onset at age 20, eruption diffusely on central trunk. Nearly the same symptoms in her daughter.	Neuropsychiatric disorder and behavior problems, also in her daughter.
M719I	88.2	69.4	68.4	0.31	6	Moderate, onset at age 20, eruption mainly on central trunk. No DD symptoms in his children.	non

期待されている。

10. 終わりに

Ca²⁺ ポンプや Ca²⁺, Mn²⁺ ポンプについての理解がこのようなに進み、これらの異常による多様な病態を分子レベルから理解するための基盤が確立してきている。もちろん今後細胞レベル、組織・臓器レベルで知見を集積する必要がある。他方、PMCA や SERCA の細胞内局在機序、非筋細胞内での SERCA2b と SERCA3 の機能分担、各 Ca²⁺ ポンプと他蛋白との相互作用およびその役割、など今後明らかにすべき細胞レベルの基本的課題が多く残されている。また P 型 ATPase ファミリー全体の基本的課題として、輸送カチオン特異性のみならず、各ポンプの速度論的特性とそれを与える構造基盤を比較・解明することが必須である。何故なら、これらの各分子特性により各カチオンの濃度勾配が適切に設定され、細胞全体のイオンホメオスタシスが形成・維持されるからである。

謝 辞

共同研究者の旭川医科大学生化学講座機能分子科学分野・大保貴嗣、山崎和生、Danko Stefania、Wang Guoli (現、中国医科大学)、Liu Xiaoyu (現、大連医科大学)、吉田雅紀 (現、同志社大学) の各氏、ならびに旭川医科大学皮膚科学講座・飯塚一教授、佐藤克彦氏、宮内勇貴氏 (現、花王 (株)) に御礼申し上げます。本研究の一部は、旭川医科大学・平成 20 年度「独創性のある生命科学研究」、ならびに日本学術振興会・学術創生研究「P 型イオンポンプによる能動輸送機構の構造的解明」(研究代表者・東京大学分子細胞生物学研究所・豊島近教授) により可能となったものであり、ここに深く感謝いたします。

文 献

- 1) 鈴木裕 (2002) シリーズ・バイオサイエンスの新世紀 (感覚器官と脳内情報処理) **12**, 121-128
- 2) 鈴木裕 (2003) 生化学 **75**, 1215-1224
- 3) 鈴木裕 (2005) 生物物理 **45**, 16-21
- 4) 鈴木裕 (2006) 膜 **31**, 120-126
- 5) 鈴木裕、山崎和生、大保貴嗣、Stefania Danko (2010) YAKUGAKU ZASSHI **130**, 179-189
- 6) 鈴木裕 (1998) 蛋白質核酸酵素 **43**, 1610-1621

- 7) 鈴木裕 (2002) 蛋白質核酸酵素 **47**, 1947-1948
- 8) 鈴木裕 (2010) 膜 **35**, 印刷中
- 9) Toyoshima, C., and Inesi, G. (2004) *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 269-292
- 10) Toyoshima, C. (2008) *Arch. Biochem. Biophys.* **476**, 3-11
- 11) Toyoshima, C. (2009) *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 941-946
- 12) Ebashi, S. and Lipmann, F. (1962) *J. Cell Biol.* **14**, 389-400
- 13) Danko, S., Daiho, T., Yamasaki, K., Kamidochi, M., Suzuki, H., and Toyoshima, C. (2001) *FEBS Lett.* **489**, 277-282
- 14) Danko, S., Yamasaki, K., Daiho, T., Suzuki, H., and Toyoshima, C. (2001) *FEBS Lett.* **505**, 129-135
- 15) Yamasaki, K., Daiho, T., and Suzuki, H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 13615-13619
- 16) Danko, S., Yamasaki, K., Daiho, T., and Suzuki, H. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 14991-14998
- 17) Danko, S., Yamasaki, K., Daiho, T., and Suzuki, H. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 22722-22735
- 18) Daiho, T., Danko, S., Yamasaki, K., and Suzuki, H. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 24538-24547
- 19) Daiho, T., Suzuki, H., Yamasaki, K., Saino, T., and Kanazawa, T. (1999) *FEBS Lett.* **444**, 54-58
- 20) Daiho, T., Suzuki, H., Yamasaki, K., Saino, T., and Kanazawa, T. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 23910-23915
- 21) Daiho, T., Yamasaki, K., Saino, T., Kamidochi, M., Satoh, K., Iizuka, H., and Suzuki, H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 32771-32778
- 22) Kato, S., Kamidochi, M., Daiho, T., Yamasaki, K., Gouli, W., and Suzuki, H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 9624 - 9629
- 23) Daiho, T., Yamasaki, K., Wang, G., Danko, S., Iizuka, H., and Suzuki, H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 39197-39204
- 24) Yamasaki, K., Daiho, T., Danko, S., and Suzuki, H. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 2202-2210
- 25) Sato, K., Yamasaki, K., Daiho, T., Miyauchi, Y., Takahashi, H., Ishida-Yamamoto, A., Nakamura, S., Iizuka, H., and Suzuki, H. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 35595-35603

- 26) Wang, G., Yamasaki, K., Daiho, T., and Suzuki, H. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 26508-26516
- 27) Miyauchi, Y., Daiho, T., Yamasaki, K., Takahashi, H., Ishida-Yamamoto, A., Danko, S., Suzuki, H., and Iizuka, H. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 22882-22895
- 28) Daiho, T., Yamasaki, K., Danko, S., and Suzuki, H. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 34429-34447
- 29) Yamasaki, K., Wang, G., Daiho, T., Danko, S., and Suzuki, H. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 29144-29155
- 30) Liu, X., Daiho, T., Yamasaki, K., Guoli, W., and Suzuki, H. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 25190-25198
- 31) Yamasaki, K., Daiho, T., Danko, S., and Suzuki, H. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, in press, doi:10.1074/jbc.M110.183343
- 32) Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. (2000) *Nature* **405**, 647-655
- 33) Toyoshima, C., and Nomura, H. (2002) *Nature* **418**, 605-611
- 34) Toyoshima, C., and Mizutani, T. (2004) *Nature* **430**, 529-535
- 35) Toyoshima, C., Nomura, H., and Tsuda, T. (2004) *Nature* **432**, 361-368
- 36) Obara, K., Miyashita, N., Xu, C., Toyoshima, I., Sugita, Y., Inesi, G., and Toyoshima, C. (2005) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **102**, 14489-14496
- 37) Toyoshima, C., Norimatsu, Y., Iwasawa, S., Tsuda, T., and Ogawa, H. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 19831-19836
- 38) Sakuntabhai, A., Ruiz-Perez, V., Carter, S., Jacobsen, N., Burge, S., Monk, S., Smith, M., Munro, C. S., O'Donovan, M., Craddock, N., Kucherlapati, R., Rees, J. L., Owen, M., Lathrop, G. M., Monaco, A. P., Strachan, T., and Hovnanian, A. (1999) *Nature Genet.* **21**, 271-276
- 39) Ruiz-Perez, V. L., Carter, S. A., Healy, E., Todd, C., Rees, J. L., Steijlen, P. M., Carmichael, A. J., Lewis, H. M., Hohl, D., Itin, P., Vahlquist, A., Gobello, T., Mazzanti, C., Reggolini, R., Nagy, G., Munro, C. S., and Strachan, T. (1999) *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1621-1630
- 40) Takahashi, H., Atsuta, Y., Sato, K., Ishida-Yamamoto, A., Iizuka, H., and Suzuki, H. (2001) *J. Dermatol. Sci.* **26**, 169-172
- 41) Wada, T., Shirakata, Y., Takahashi, H., Murakami, S., Iizuka, H., Suzuki, H., and Hashimoto, K. (2003) *Br. J. Dermatol.* **149**, 185-188
- 42) Dode, L., Andersen, J. P., Leslie, N., Dhitavat, J., Vilsen, B., and Hovnanian, A. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 47877-47889
- 43) Pani, B., and Singh, B. B. (2008) *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 205-211
- 44) Yoshida, M., Yamasaki, K., Daiho, T., Iizuka, H., and Suzuki, H. (2006) *J. Dermatol. Sci.* **43**, 21-33
- 45) Sørensen, L-M. T., Møller, J. V., and Nissen, P. (2004) *Science* **304**, 1672-1675
- 46) Olesen, C., Sørensen, L-M. T., Nielsen, C., Møller, J. V., and Nissen, P. (2004) *Science* **306**, 2251-2255
- 47) Olesen, C., Picard, M., Winther, A.-M. L., Gyrupe, C., Morth, J. P., Oxvig, C., Møller, J. V., and Nissen, P. (2007) *Nature* **450**, 1036-1042
- 48) Toyoshima, C., Asahi, M., Sugita, Y., Khanna, R., Tsuda T., and D.H. MacLennan (2003) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **100**, 467-472
- 49) Asahi, M., Sugita, Y., Kurzydowski, K., Leon, S. D., Tada, M., Toyoshima, C., and MacLennan D.H. (2003) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **100**, 5040-5045
- 50) Sugita, Y., Miyashita, N., Ikeguchi, M., Kidera, A., and Toyoshima C. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 6150-6151
- 51) Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F., and Toyoshima, C. (2009) *Nature* **459**, 446-450
- 52) Ogawa, H., Shinoda, T., Cornelius, F., and Toyoshima, C. (2009) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **106**, 5800-5805
- 53) Tsuda, T., and Toyoshima, C. (2009) *EMBO J.* **28**, 1782-1791
- 54) MacLennan, D.H. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 5291-5297
- 55) Liu, L.H., Boivin, G.P., Prasad, V., Periasamy, M., and Shull, G.E. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 26737-26740
- 56) Monteith, G. R., McAndrew, D., Faddy H. M., and Roberts-Thomson, S. J. (2007) *Nat. Rev. Cancer* **7**, 519-530
- 57) Christensen, S. B., Skytte, D. M., Denmeade, S. R., Dionne, C., Moller, J. V., Nissen, P., and Isaac, J. T. (2009) *Anti-Cancer Agent. ME.* **9**, 276-294
- 58) Yatime, L., Buch-Pedersen, M. J., Musgaard, M.,

- Morth, J. P., Winther, A.-M. L., Pedersen, B. P., Olesen, C., Andersen, J. P., Vilsen B., Schiøtt, B., Palmgren, M. G., Møller, J. V., Nissen, P., and Fedosova, N. (2009) *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 207-220
- 59) Periasamy, M., Bhupathy, P., and Babu, G. J. (2008) *Cardiovasc. Res.* **77**, 265–273
- 60) Lipskaia L., Hulot, J-S., and Lompre, A-M. (2009) *Eur. J. Physiol.* **457**, 673-685
- 61) Tong, X-Y., Evangelista, A., and Cohen, R. A. (2010) *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 133-138
- 62) Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S-F., Hao, Y-H., Serneels, L., De Strooper, B., Yu. G., and Bezprozvanny I. (2006) *Cell*, **126**, 981–993
- 63) Thinakaran, G., and Sisodia, S. S., (2006) *Nat. Neurosci.* **9**, 1354-1355
- 64) Demuro, A., Parker, I., and Stutzmann G. E. (2010) *J. Biol Chem*, **285**, 12463–12468
- 65) Green, K. M., Demuro, A., Akbari, Y., Hitt, B. D., Smith, I. F., Parker, I., and LaFerla, F. M. (2008) *J. Cell Biol*, **181**, 1107–1116
- 66) Green, K. N., and LaFerla, F. M. (2008) *Neuron* **59**, 190-194
- 67) Jin, H., Sanjo, N., Uchihara, T., Watabe, K., St George-Hyslop, P., Fraser P. E., and Mizusawa H. (2010) *J. Alzheimer's Dis.* **20**, 261–273
- 68) Street, V.A., McKee-Johnson J.W., Fonseca, R.C., Tempel, B.L., and Noben-Trauth, K. (1998) *Nature Genet.* **19**, 390-394
- 69) Takahashi, K., and Kitamura, K. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 773-778
- 70) Inoue, H., Fujita, T., Kitamura, T., Shimosawa, T., Nagasawa, R., Inoue, R., Maruyama, N., and Nagasawa, T. (1999) *Clin. Exp. Nephrol.* **3**, 261-267