

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	刘 晓 宇
<p style="text-align: center;">学位論文題目</p> <p style="text-align: center;">Roles of Interaction between Actuator- and Nucleotide Binding-domains of Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase as Revealed by Single and Swap Mutational Analyses of Serine¹⁸⁶ and Glutamate⁴³⁹</p> <p>(小胞体 Ca²⁺-ATPase のセリン 186 とグルタミン酸 439 の単一および交換変異解析により明らかになったアクチュエータードメイン—ヌクレオチド結合ドメイン間相互作用の役割)</p> <p style="text-align: center;">共 著 者 名 大保貴嗣、山崎和生、王国 麗、Stefania Danko、鈴木裕</p> <p style="text-align: center;">未 公 表</p> <p style="text-align: center;">研 究 目 的</p> <p>筋小胞体Ca²⁺-ATPase (SERCA1a) は994アミノ酸残基からなる分子量約11万のタンパクで、ATP加水分解に共役してCa²⁺を細胞質から小胞体内腔に汲み上げるCa²⁺ポンプであり、Ca²⁺による細胞機能制御に必須の役割を果たす。本酵素はM1～M10のヘリックスで10回膜を貫通し、三つの大きな細胞質ドメイン (N, P, A)を形成する (引用文献1)。これらドメインは、ATPのアデニン部分を結合するNドメイン (ヌクレオチド結合ドメイン)、反応過程で自己リン酸化されるAsp³⁵¹を含むPドメイン、およびA (actuator) ドメインである。Ca²⁺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る。Ca²⁺輸送反応サイクルでは、先ず非活性型酵素 (E2) の輸送部位に細胞質Ca²⁺が結合し、酵素が活性化される (E2→E1Ca₂)。次にATPからリン酸基がAsp³⁵¹に転移し、リン酸化中間体 (EP) が形成し、Ca²⁺は輸送部位に閉塞される (E1Ca₂→E1PCa₂)。このEPはADPと反応してATPを再生できるので、ADP感受型EP (E1P) と呼ばれる。次にこのE1PCa₂からADP非感受型EP (E2P) への構造転換と小胞体内腔へのCa²⁺放出 (E1PCa₂→E2P+2Ca²⁺) が起こり、最後にE2Pが加水分解されて酵素は非活性型に戻る (E2P→E2)。Ca²⁺輸送過程、特にEP構造転換で、細胞質3ドメインは大きく動きそれらの集合状態を顕著に変化させる。この変化により膜貫通領域のCa²⁺輸送部位の構造が変化してCa²⁺が小胞体内腔に放出される。従って、細胞質3ドメインの動きと相互作用に必須な残基を同定し、それらの機能を解明することがCa²⁺輸送のエネルギー共役機構を理解するために必須である。我々はこれまでA-Pドメイン間相互作用およびAドメインとM1を連結するリンカーの機能を明らかにした (参考文献1, 2)。一方、A-Nドメイン間相互作用の役割は未だ明らかではなく、Glu⁴³⁹の重要性が指摘されているのみである (引用文献2)。E1PCa₂アナログ結晶構造では互いにかかなり離れて存在するSer¹⁸⁶ (Aドメイン) とGlu⁴³⁹ (Nドメイン) は、E2Pアナログ結晶構造では水素結合しA-Nドメイン間相互作用を形成する。そこで本研究では、このA-Nドメイン間相互作用の機能解明を目的とした。このため各残基のアラニン置換体S186A, E439Aと二残基置換体S186A/E439A、また単一変異体S186EとE439S、およびS186E/E439Sの交換二残基変異体を作製し、各変異体について、Ca²⁺-ATPase活性と各ステップの速度論的解析、さらに高濃度の (非基質) ATPによる促進効果解析を実施した。他方、Swiss-PdbViewerプログラムにより各変異体における残基間水素結合形成をシミュレートし、速度論的解析結果とあわせ、Ser¹⁸⁶とGlu⁴³⁹の各機能および水素結合形成によるA-Nドメイン間相互作用の役割を検証した。</p>			

材 料 ・ 方 法

Quick Change 法で作成した 6 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 細胞で発現させ、ミクロソーム画分を調製して解析に用いた。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

Ser¹⁸⁶ と Glu⁴³⁹ の変異体の Ca^{2+} -ATPase 活性を野生型と比較した。交換変異体の S186E/E439S を除き、全ての変異体で活性は阻害されていた。しかし、S186E/E439S における二残基の交換変異により、野生型の高い活性が回復した。この結果により Ser¹⁸⁶ と Glu⁴³⁹ の水素結合の重要性が示唆されたので、さらに下記の各素反応ステップについての解析を実施した。

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正常な速度で起こった。また、 Ca^{2+} に対する輸送部位の親和性についても、全ての変異体は野生型 (0.15 μM) に匹敵する高い親和性を保持していた。

3. ATP からの EP 形成および蓄積した EP の ADP 感受性

全ての変異体は野生型と同様に正常な量の EP を ATP から形成した。そこで次に、定常状態における ADP 感受型 EP (E1PCa₂) と ADP 非感受型 EP (E2P) の蓄積を解析した。変異体 S186E と S186E/E439S は野生型に匹敵する量の E2P を正常な速度で E1PCa₂ から形成し蓄積した。他の変異体 (S186A, E439A, E439S, S186A/E439A) では ADP 非感受型 (E2P) が蓄積せず、蓄積した EP のほとんどすべては E1PCa₂ であった。従って、これらの変異体では ADP 感受性の喪失 (即ち E1P→E2P 構造転換) 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

E2P を蓄積しない変異体について E1P→E2P 構造転換速度を、E1PCa₂ の decay を測定することにより解析した。E1PCa₂ の decay は E2P への構造転換と E2P 加水分解からなるが、通常、EP 構造転換が圧倒的に遅く rate-limit (律速) であるからである。EP decay (EP 構造転換) は実際、全てのアラニン変異体 (S186A, E439A, S186A/E439A) で、野生型に比べ著明に遅くなっていた。また、S186E および E439S でもかなり遅くなっていたが、交換変異 S186E/E439S により野生型の速度が回復した。

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。E2P 加水分解は全てのアラニン変異体 (S186A, E439A, S186A/E439A) と E439S で、野生型に比べ顕著に速くなっていた。S186E では野生型に近い速度であり、交換変異体 S186E/E439S では、E439S で顕著に促進された加水分解を野生型に近い速度に戻した。

6. Ca^{2+} -ATPase 活性と EP 構造転換の ATP による促進

全てのアラニン変異体 (S186A, E439A, S186A/E439A) と E439S では野生型に匹敵して、sub-mM ~ mM ATP により Ca^{2+} -ATPase (ATP 分解) 活性とその律速である EP 構造転換が強く促進された。S186E では ATP による促進がほとんど消失していた。交換変異 S186E/E439S は野生型に近い ATP 促進効果を回復させた。

7. E2P 加水分解の ATP による促進

アラニン変異体 (S186A, E439A, S186A/E439A) は E2P 分解の ATP による促進効果を保持していた。しかし S186E/E439S を含む他の変異体では、促進効果が消失していた。従って EP 構造転換の ATP による促進とは、かなり異なる様相を示した。

考 案

Ser¹⁸⁶ と Glu⁴³⁹ 間水素結合による A ドメイン-N ドメイン間相互作用の機能

上記 1 - 5 の結果から、Ser¹⁸⁶ と Glu⁴³⁹ の水素結合およびそれによる A-N ドメイン間相互作用の機能は E2P の構造を安定化することであると結論された。Swiss-PdbViewer プログラムを用いた、各変異体における導入残基とパートナー残基との水素結合形成のシミュレーションでは、交換変異体 S186E/E439S および S186E では水素結合が形成され、E439S でも極性相互作用が可能であることが示された。このシミュレーション結果は、従って上記結論を完全に支持していた。Ser¹⁸⁶-Glu⁴³⁹ 水素結合形成の生理的意義は次のように考えられる。すなわち、E2P 構造を安定化することは、E1P→E2P 構造転換を迅速に行ない、また E2P 加水分解速度を適切に遅く設定することであり、この速度論的効果により E2P からの小胞体内腔への Ca²⁺放出が適切に起こるように、E2P の存在時間を適切に長くしていることである。この構造的仕組みにより、Ser¹⁸⁶ と Glu⁴³⁹ の水素結合形成は、Ca²⁺を放出することなしに E2P が分解してしまうことを防ぎ、ATP 分解と Ca²⁺輸送のエネルギー共役の成立に必須に貢献していると考えられる。

Ca²⁺-ATPase 活性、および EP 構造転換、E2P 加水分解の ATP による促進

上記 6, 7 の結果から、Ser¹⁸⁶ と Glu⁴³⁹ は、促進のための ATP 結合には直接関与しないが、ATP 結合部位のごく近傍に存在すること、S186E ではより大きなそして負に荷電したグルタミン酸導入がおそらく ATP のリン酸グループの結合に立体的あるいは静電的障害を引き起こすことが明らかとなった。EP 構造転換および Ca²⁺-ATPase 活性の ATP による促進の S186E における阻害効果は交換変異体 S186E/E439S では野生型に回復した。従って Ser¹⁸⁶-Glu⁴³⁹ 水素結合はこれら残基側鎖の configuration を適切に設定し、ATP 促進効果を出現させると考えられる。また、交換変異体 S186E/E439S の ATP 促進における ATP 親和性は野生型（即ち細胞内 ATP 濃度）に比較し著明に高くなっていた。従って、野生型における Ser¹⁸⁶-Glu⁴³⁹ 水素結合形成の生理的意義は、促進のための ATP 親和性を適切に設定し、エネルギー荷が低いときには ATP の消費を抑えることにあると考えられる。E2P 加水分解の ATP による促進解析結果と EP 構造転換のそれとの違いは、促進のための ATP の結合部位の構造が反応の進行とともに変化していくことを意味する。

結 論

Ser¹⁸⁶-Glu⁴³⁹ 水素結合形成とそれによる A ドメイン-N ドメイン間相互作用の構造的機能は、Ca²⁺輸送反応リン酸化中間体 E2P の構造を安定化させることであり、さらに Ca²⁺-ATPase 活性とその律速である EP 構造転換の ATP による促進を細胞 ATP レベルに対応させて適切に生起させることである。

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. Clausen J.D., McIntosh D.B., Anthonisen A.N., Woolley D.G., Vilsen B., and Andersen J.P. (2007) ATP-binding Modes and Functionally Important Interdomain Bonds of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Revealed by Mutation of Glycine438, Glutamate439, and Arginine678. *J. Biol. Chem.* 282, 20686-20697

参考文献

1. Yamasaki, K., Wang, G., Daiho, T., Danko, S., and Suzuki, H. (2008) Roles of Tyr¹²²-hydrophobic Cluster and K⁺ Binding in Ca²⁺-releasing Process of ADP-insensitive Phosphoenzyme of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 283, 29144-29155
2. Daiho, T., Yamasaki, K., Danko, S., and Suzuki, H. (2007) Critical Role of Glu⁴⁰-Ser⁴⁸ Loop Linking Actuator Domain and First Transmembrane Helix of Ca²⁺-ATPase in Ca²⁺ Deocclusion and Release from ADP-insensitive Phosphoenzyme. *J. Biol. Chem.* 282, 34429-34447

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	刘 晓 宇
<p>審査委員長 <u>吉 田 成 孝</u></p> <p>審査委員 <u>高 井 章</u></p> <p>審査委員 <u>鈴 木 裕</u></p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Roles of Interaction between Actuator- and Nucleotide Binding-domains of Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase as Revealed by Single and Swap Mutational Analyses of Serine¹⁸⁶ and Glutamate⁴³⁹</p> <p>(小胞体 Ca²⁺-ATPase のセリン 186 とグルタミン酸 439 の単一および交換変異解析により明らかになったアクチュエータードメイン—ヌクレオチド結合ドメイン間相互作用の役割)</p>			
<p>小胞体 Ca²⁺-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 Ca²⁺を細胞質から小胞体内腔に汲み上げる細胞機能制御に必須の役割を果たす。Ca²⁺-ATPase のリン酸化中間体の異性化とそれによる Ca²⁺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がエネルギー共役機構理解の課題となっている。本論文では、Ca²⁺を放出したリン酸化中間体、E2P における A-N ドメイン間相互作用の機能を明らかにすることを具体的目的とした。</p> <p>そのため、E2P アナログ結晶構造で水素結合を形成する Ser¹⁸⁶ と Glu⁴³⁹ について、アラニン変異体、および swap 変異体と各残基変異体を作製し、反応速度論的解析および、ATP による Ca²⁺-ATPase の促進効果における両残基の役割についても検討した。これらの方法は、確立された手法で本研究の目的にかなったものである。</p> <p>その結果、下記の結論が得られた。</p> <p>1) Ser¹⁸⁶-Glu⁴³⁹ 水素結合形成とそれによる A ドメイン-N ドメイン間相互作用の構造的機能は、Ca²⁺輸送反応リン酸化中間体 E2P の構造を安定化させ、リン酸化中間体構造異性化を迅速に生起させて Ca²⁺を小胞体内腔に放出させることである。</p>			

2) **Ser¹⁸⁶-Glu⁴³⁹** 水素結合形成は、両残基側鎖の配向性を適切に設定することにより、促進効果を与える非基質 ATP の結合を可能にし、**Ca²⁺-ATPase** 活性とその律速であるリン酸化中間体構造異性化の ATP による促進を細胞 ATP レベルに対応させて生起させる。

これらの新知見により、**Ca²⁺-ATPase** 蛋白の A および N ドメインの大きな動きとそれにより形成される両ドメイン間の相互作用の役割が明らかとなり、**Ca²⁺**輸送機序の理解が大きく進展した。小胞体 **Ca²⁺-ATPase** (**SERCA2b**) 遺伝子変異は、細胞分化異常による皮膚角化異常症ダリエー病を発症させる。ダリエー病家系の中には、**Ser¹⁸⁶** の変異を原因として発症する二つの家系が存在する。従って、**Ser¹⁸⁶** の機能的な重要性は臨床的観点からも明らかであり、**Ser¹⁸⁶** の **native** 構造と **Glu⁴³⁹** との相互作用が厳密な **Ca²⁺**恒常性維持と細胞機能にいかに関与しているかが理解できる。

論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対しても適切な回答が得られ、論文提出者はこの領域において十分な知識を有することが示された。

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。