



図1 筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の P-N ヒンジ領域の拡大図と今回注目した荷電側鎖 (右上は Ca^{2+} -ATPase の全体図。)

3) 筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の P-N hinge に位置する 静電的相互作用の役割についての研究

研究代表者 山崎 和生

[研究目的]

結晶解析による結果から筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (SERCA1a) は Ca^{2+} 輸送反応サイクルに伴って細胞質領域の3つのドメインの集合状態がダイナミックに変化し、それに伴い TM 領域の配列が変化していることが見てとれる。しかしながら、結晶構造の比較から分かることはあくまでも構造変化の枠組みであり、どのような力が加わることによりそのような構造変化が起こるのかということはまったく分からない。P-N ドメインは A ドメイン側に対して、1回の反応サイクル中に少なくとも2度の開閉を繰り返している。私はこの動きには P-N ドメインの間に働く力が関与し、バネ要素のように働いているのではないかと推測し P-N ドメインのヒンジ部分に着目し解析を行った。図1は今回着目した領域の拡大図 (E1Ca2, pdb code: 1SU4) である。P ドメインと N ドメインとの間は2本のループで直接結びついているが、このループ自体には特に力を発生させるような構造は見取れない。このループのそばに P ドメインと N ドメインから互いに電荷を持った側鎖が伸びて近接している領域が存在する。この部分はあたかも両ドメインから符号の異

なる側鎖が伸びてペアを組んでいるように見える (Arg556-Glu644, Asp557-Arg638)。またこの側鎖間の距離は反応中間体によって大きく変わる。以上のことから、これらの残基には P-N ドメインの動きになんらかの役割があるのではないかと予測し、これらの残基に変異を導入し、その影響を調べた。

[結果と考察]

着目した残基をアラニンあるいは逆の電荷を持つ残基に置換した変異体を COS-1 細胞に発現させて、そのミクロソーム画分を調製し反応速度論的解析に用いた。いずれの変異体の発現量も野生型と同等であり、ATP からの EP 形成能も正常に保持していた。また、 E1Ca_2 からの EP 形成速度もすべて、野生型と同等であった。次に ATP から形成したリン酸化中間体の分解を測定したところ、アルギニン残基を置換した変異体で、EP の分解速度の強い抑制が見られた。これに対し負電荷を持つ側鎖を置換しても EP 分解の速度はほとんど変化しなかった。面白いことにアルギニンの位置に負の電荷を導入しても、その対となる側鎖をアルギニンに置換することにより、抑制を打ち消すことが出来た。この結果はこの領域にある程度の正電荷が存在することが、EP 分解に重要であることを示している。さらに E2P 分解への変異影響を解析したところ、R556E, R638D では E2P 分解が促進され、逆に D557R, E644R では E2P 分解が抑制されていた。またこの場合も同じように電荷の交換は互いの影響を打ち消すよ

うな効果があることが分かった。

次に変異導入によってどのように静電場が変化するか調べるため、E1Pのアナログの結晶構造を元にP-Nドメインの部分の野生型及び変異体の構造モデルを作成し、その周りの静電場をPoisson-Boltzmannの式に従って計算した。その結果、野生型では今回着目したヒンジを挟んでPドメインとNドメインの間を結ぶような電気力線が描かれたが、E1P-E2Pが遅くなった変異体ではこの電気力線の流れが大きく乱されていた。またE1P-E2Pの速度に影響を及ぼさない変異体では野生型と同じようにPとNを結ぶ電気力線は保持されており、E1P-E2Pの速度が回復した交換変異体(R556E/E644R, 557R/R638D)ではP-Nを結ぶ電気力線が復活していた。このようにE1P-E2P転換の速度とP-N間の電気力線の流れは非常に強い相関を示し、E1PからE2Pが形成する過程において電場がP-Nの動きのガイドラインを果たしている可能性が示唆された。さらに、E2Pアナログの構造を用いた解析では、E2Pの加水分解を促進されている変異体で、P-N間の静電的反発が強まっていることが確認された。このことはP-N間の静電的反発がE2P分解に重要である可能性を示している。

[結 論]

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase では 1) E1P-E2P 転換過程において、P-N ドメイン間の静電的相互作用がドメインの動きを制御している（電気力線がガイドとなる）。
2) P-N ドメイン間の静電的な反発は、E2P の加水分解の促進を引き起こす。P ドメインを歪ませる力を発生している可能性がある。