

論文内容の要旨

論文題目 銅イオン輸送 ATPase CopA のドメイン運動と
イオンポンプ機構
(Domain movements and ion pumping mechanism
in CopA, a Cu^{+} -translocating ATPase)

氏名 羽鳥 勇太

イオン濃度の恒常性はすべての生物に不可欠であり、それを適切な範囲に維持するのに P 型 ATPase (イオンポンプ) は最重要の役割を担っている。P 型 ATPase は 5 つの系統 (I-V) に分類されるが、重金属イオンを輸送する PIB 型 (PI 型のサブグループ) は細菌からヒトまで普遍的に存在し、ヒトの遺伝性銅代謝疾患 (ウィルソン病、メンケス病) とも深く関わっている。

P 型 ATPase のイオン輸送サイクルは一般に E1/E2 理論によって説明される。膜内イオン結合部位は輸送イオンに対して E1 では高親和性で細胞質側に開いており、一方 E2 では低親和性で内腔側または細胞外に開いている。輸送イオンはリン酸化状態 (E1P) で膜内イオン結合部位にとじこめられ、つづく E2P への状態変化に伴って内腔 (細胞外) 側へと放出される。PII 型に属する筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (SERCA1) の 7 つの異なる中間体の原子モデルから、イオン輸送には 3 つある細胞質ドメイン (A、N、P) の大きな運動と膜貫通ヘリックスの再配置を伴うことがわかった。PIB 型は他のサブグループとは膜貫通領域のトポロジーや細胞質ドメインの構成に明確な差があり、N 末端金属結合ドメイン (NMBD) を持つが、その数は不定 (1~6 個) であり役割も不明である (図 1)。従ってイオン輸送機構にも相違があるかもしれない。

本研究では、PIB 型 ATPase のイオン輸送機構の解明を目指して、その代表である Cu^{+} -ATPase の解析を行った。これまでの研究では複数の NMBD を持つ分子のみが対象となっていたが、我々は鎖長がより短く NMBD が一個の好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来 CopA を新たにクローニングし、大量発現・精製を行った。 Cu^{+} 依存性 ATPase 活性を指標として

CopA の生化学的特性を検討した後、蛋白質限定分解によって全長 CopA と NMBD の欠損変異体 (Δ NMBD) のドメイン運動の検出を試みると共に、部分反応の検討を行った。

1. 好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来 CopA の大量発現・精製

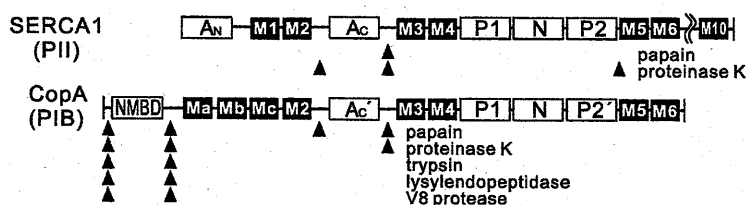
His タグを付加した組み換え蛋白質として CopA を大腸菌で発現し、膜画分中の Cu^+ 依存性 ATPase 活性を検討した。次に最適な界面活性剤の選択、熱処理によって活性を維持した状態で 80%以上の純度で CopA を可溶性画分に回収し、さらに Co^{2+} 親和性クロマトグラフィーによって 90%以上の純度まで精製できた。

精製した CopA は DTT および磷脂質によって活性化され、特に磷脂質は活性の長期安定性に重要であることがわかった。さらに、CopA の ATPase 活性について様々なパラメータ (Cu^+ 濃度、 Ag^+ 濃度、cysteine 濃度、塩濃度、ATP 濃度、温度、pH、磷脂質の種類と濃度、界面活性剤の種類と濃度、磷酸アナログの阻害効果) を検討した。

2. 蛋白質限定分解による CopA のドメイン運動の検出

ATP および磷酸のアナログとしてそれぞれ AMPPCP および AlF_x を用いて、CopA の 5 つの中間体 (E2、 $\text{E1}\cdot\text{Cu}^+$ 、 $\text{E1}\cdot\text{Cu}^+\cdot\text{ATP}$ 、 $\text{E1P}\cdot\text{Cu}^+\cdot\text{ADP}$ および E2P) またはそのアナログ状態の限定分解を行った。papain、proteinase K、trypsin、lysyl endopeptidase および V8 protease を用いた限定分解で生じた断片のマスマスペクトルと N 末端アミノ酸配列から CopA の切断部位を決定した (図 1)。各中間体の差は papain でもっとも明確であった。そのうち、M2 と A ドメインの間のループ (M2-A リンク) は E2 および E2P で特異的に切断されること、A ドメインと M3 の間のループ (A-M3 リンク) は $\text{E1P}\cdot\text{Cu}^+\cdot\text{ADP}$ および E2P では保護されることがわかった。SERCA1 の A-M3 リンクも、E1P では A ドメインによって伸張され、E2P でもそれが維持されることにより proteinase K による切断から保護される。また、M2-A リンクは E2 で特異的に切断される。従って限定分解の結果は CopA でも SERCA1 のような A ドメインの運動が起きていることを示す。また、いずれの蛋白質分解酵素についても、NMBD と最初の膜貫通ヘリックスの間の領域 (NMBD-Ma リンク) は A-M3 リンクと同様

図 1. P 型 ATPase の代表的な分子であり PII 型に属す SERCA1 と、PIB 型に属す *T. maritima* CopA の一次構造。A、N、P ドメインおよび M2-M6 は互に対応するが、PIB 型 ATPase は M7-M10 を持たず、



NMBD と Ma-Mc が持つ。SERCA1 の蛋白質分解酵素切断部位と、本研究で明らかになった CopA の切断部位の位置も示した。

E1P-Cu⁺-ADP と E2P でのみ保護された。このことは、NMBD が E1P→E2P で A ドメインと共に運動することを示唆する。

SERCA1 の N 末端から M1 までの領域は A ドメインの一部 (A_N) を構成し、細胞質ドメインの運動を膜貫通ドメインに伝達するという重要な役割を持つ。CopA では一次構造上 NMBD および Ma だけが SERCA1 の A_N および M1 に対応しうることから (図 1)、これらは相同の役割を担っている可能性が高い。実際 NMBD-Ma リンクの切断によって CopA は Cu⁺依存性 ATPase 活性を失った。

3. N 末端金属結合ドメインの欠損が CopA の反応サイクルに与える影響

NMBD を欠損したコンストラクト(ΔNMBD)を調製し解析を行った。限定分解による p70 断片と同様、ΔNMBD にも Cu⁺依存性 ATPase 活性は検出されなかった。papain を用いた限定分解で E1P および E2P の細胞質ドメインの配置の変化は検出されなかったので、ΔNMBD では E1P→E2P が阻害されていると予想された。

次にリン酸化中間体 (EP) の形成を調べた。一般に P 型 ATPase では ATP の γ-リン酸の転移反応 (E1ATP→E1P) の他、無機リン酸によるリン酸化 (E2→E2P) も可能である。実際、無機リン酸によって ΔNMBD は WT と同程度のリン酸化レベルに達した。一方、ATP によるリン酸化では、WT ではリン酸化レベルが 51%に達した後に、他の非リン酸化状態も形成されることを反映して、定常状態では 33%に低下した。これに対し ΔNMBD では EP が蓄積し、リン酸化レベルは 87%に達した。

一方、E2P の脱リン酸化速度は ΔNMBD の方が WT よりも遥かに速かった(11 倍)。この結果は ΔNMBD では E1P→E2P が阻害されていることを示す。SERCA1 では E1P→E2P で A ドメインが大きく運動し、A_N-M1 リンクを介して分子全体にわたる構造変化が誘起される。リン酸化・脱リン酸化実験の結果は E1P→E2P における NMBD の重要性を示しており、「NMBD と A_N が相同の役割を持つ」という考えを支持する。さらに ΔNMBD では Cu⁺の有無によって脱リン酸化速度は影響を受けなかったのに対し、WT では Cu⁺添加によって ΔNMBD と同程度まで上昇した。このことは、Cu⁺が NMBD に結合することによって E2P→E2 が促進されることを示唆する。E2P における A ドメインの配置の制御が SERCA1 では脱リン酸化に重要であり、NMBD と Cu⁺による調節が CopA では重要であると考えられる。

4. ウィルソン病変異が CopA の反応サイクルに与える影響

ヒトの銅代謝疾患であるウィルソン病は Cu⁺-ATPase の一種である ATP7B の変異によって引き起こされ、最も高頻度に認められる変異は H1069Q である。His1069 に対応する

His 残基はすべての PIB 型 ATPase に保存されており、CopA では His479 が対応する。そこで CopA に H479Q 変異を導入し、解析を行った。

H479Q では、E2→E2P が WT と同様に進行したのに対し、E1→E1P は殆ど起きなかった。papain を用いた限定分解からは、H479Q 変異はいずれの中間体のドメイン配置にも殆ど影響を与えないことが示された。さらに CopA の *p*-nitrophenylphosphate (pNPP) 分解活性と核酸の阻害効果を調べた。WT は pNPP を分解し、その活性は核酸によって阻害された。これに対し H479Q の pNPPase 活性に対する AxP の阻害効果はいずれも WT より低く (50-69%)、一方 GTP の阻害効果は WT と同等であった (89%)。すなわち、H479Q 変異はアデニン環の結合を阻害すると考えられる。

まとめ

本研究により Cu^+ -ATPase のイオン輸送機構が明らかになった (図 2)。CopA は SERCA1 と同様のイオン輸送機構を持つが、輸送イオンによる制御は大きく違っており、NMBD がその中心的役割を果たす。SERCA1 では E1P→E2P で A ドメインの運動が A_N および M1 を介して膜貫通ドメインに伝達されるのに対し、CopA では NMBD および Ma を介している。NMBD はまた Cu^+ 依存的な脱リン酸化速度の制御を担っており、 Cu^+ の結合は E2P→E2 を促進すると考えられる。

本研究における質量分析は真島英司博士[‡]と、CopA およびその変異体のリン酸化・脱リン酸化実験は Dr. Giuseppe Inesi[§]と共に行った。([‡]プロテノバ株式会社、[§]California Pacific Medical Center Research Institute)

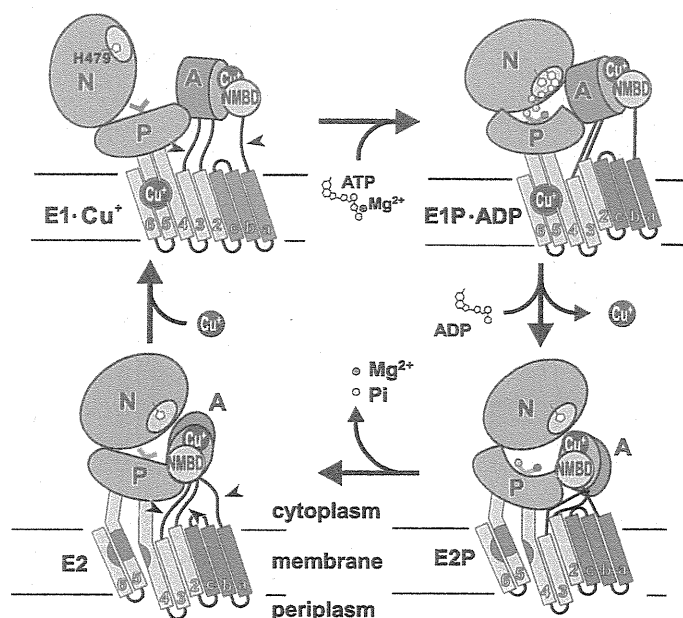


図 2. 予想される CopA のイオン輸送機構。NMBD および Ma は SERCA1 の A_N および M1 と相同の役割を持つ。また、NMBD の Cu^+ 結合状態は E2P→E2 の速度に影響し、 Cu^+ 非結合状態では著しく遅い。実際、 Δ NMBD では Cu^+ 非依存的に高速に E2P→E2 が進行する。矢頭は蛋白質分解酵素による切断部位を示す。