

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 17 年度博士課程 入学  
氏名 篠田 雄大  
指導教官名 豊島 近

論文題目 サメ直腸腺  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の三次元結晶化とX線結晶解析

P型イオンポンプは ATP の加水分解エネルギーを利用し、能動輸送を行うことで細胞内イオン組成の維持を担う、生命活動にとって最も重要な蛋白質群のひとつである。

代表的なP型イオンポンプのひとつである  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase はほぼすべての動物細胞に発現している膜貫通型膜蛋白質で、 $\alpha$  サブユニット(触媒サブユニット)、 $\beta$  サブユニットおよび FXYP 蛋白質から構成されている。ジギタリスやウアバインなど心不全治療薬の標的分子としても良く知られており、古くから研究されてきた代表的な膜蛋白質のひとつでもある。

$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase は1分子の ATP 消費による細胞内の3つのナトリウムイオンと細胞外の2つのカリウムイオンの対向輸送が主な機能ある。さらに、心筋等ではジギタリス様ステロイドホルモン受容体として機能し細胞内情報伝達に関与することが知られており、イオン輸送以外の機能も注目されている。したがって、 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の原子構造を得ることはイオン輸送機構の解明に留まらず、細胞内情報伝達や創薬にも多くの知見を与えると考えている。

P型イオンポンプの触媒サブユニットの原子構造はすでにウサギ筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase で得られているが、 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase には巨大な糖鎖を持つ $\beta$  サブユニットと $\alpha$  サブユニットの制御分子として機能する FXYP 蛋白質の存在など固有の特徴がある。2007 年に Morth らによって報告されたブタ腎臓  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の結晶構造は分解能が 3.5 Å と低く主鎖や側鎖間の相互作用が不明瞭であること、さらに $\beta$  サブユニット/FXYP 蛋白質については膜貫通ドメイン以外構造のモデリングに成功していないなど不十分なものであった。

本研究は X 線結晶構造解析による  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の  $\alpha / \beta / \text{FXYP}$  プロトマーの高分解能構造の決

定を目的とし、共同研究者であるデンマーク Aarhus 大学の Flemming Cornelius 博士より提供された、*Squalus acanthias* (和名アブラツノザメ、以下サメと省略)直腸腺  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の三次元結晶化を行った。サメ  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase のアミノ酸配列は、 $\alpha$  サブユニットでヒト  $\alpha 1$  と 94% と非常に高い類似性を持ち、 $\beta$  サブユニットでもヒト  $\beta 1$  と 80% の高い類似性をもつ。さらに、このサメ固有の FXYP 蛋白質である FXYP10 は、細胞質側にプロテインキナーゼ A およびプロテインキナーゼ C のリン酸化部位を持っており、ヒト FXYP1 と類似性がある。したがって、サメ  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の結晶構造から得られる情報はヒトをはじめとしてほとんどの生物種に有効である。

## 1 サメ $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の可溶化条件検討

膜蛋白質の結晶化は、通例界面活性剤で可溶化した試料を用いて行われるが、膜蛋白質と界面活性剤の組み合わせが適当でないと失活や変性を生じる。したがって、膜蛋白質の可溶化に際して最も重要なことは目的蛋白質の活性・構造を保持して可溶化できる界面活性剤を見つけ出すことである。特に結晶化では長期間構造を安定させておく必要があるため界面活性剤の選択は実験の成否に直結する。

本研究では膜蛋白質の可溶化によく用いられる octaethyleneglycol dodecyl ether ( $\text{C}_{12}\text{E}_8$ )、dodecylmaltoside (DDM)、3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)、および lauryldimethylamine-*N*-oxide (LDAO) を使用し、可溶化遠心上清に回収された蛋白質量と  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性の収量を比較した。その結果、 $\text{C}_{12}\text{E}_8$  を用いて可溶化した試料に非常に高い収量を示した(図1左)。さらに、 $\text{C}_{12}\text{E}_8$  を用いて可溶化した試料について、長期間(47日間)4°Cで放置したときの活性の安定性を調べたところ、100 mM KCl 存在下で 60%以上の活性が残存しており、高い長期安定性を示した(図1右)。

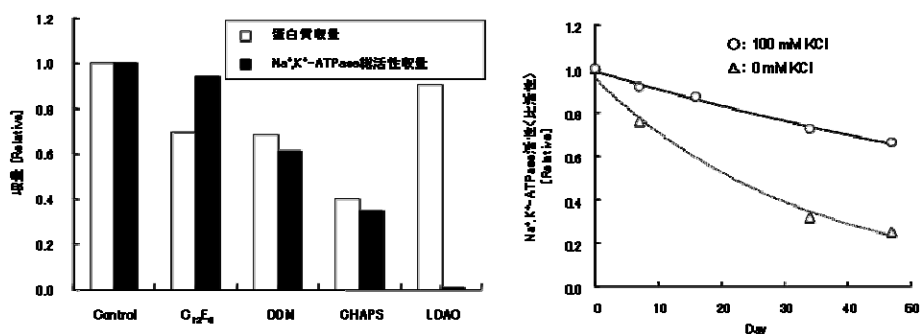


図1 各種界面活性剤の検討(左)および  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  で可溶化した試料の長期安定性の検討(右)

## 2 阻害剤の検討

蛋白質の結晶化では蛋白質を特定の構造に安定に保つ目的で阻害剤がしばしば用いられる。F と特定の多価金属イオンの錯体はリン酸の類似体として  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase や  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の細胞質ドメインに結合し強力な阻害剤として作用する。この際、用いる多価金属イオンに応じて異なるリン酸化中間体を模倣することができ、 $\text{MgF}_4^{2-}$  の結合した  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase はカリウムイオンを膜貫通領域内に結合した  $\text{E}2 \cdot 2\text{K}^+ \cdot \text{Pi}$  状態を模倣するとされている。

本研究ではサメ Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 結晶化での MgF<sub>4</sub><sup>2-</sup>の必要量を見積もる目的で 100 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 25°C下、2.50 mg/ml サメ Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase の活性阻害に必要なフッ化カリウム (KF) 量を調べた。図2に反応時間ごとの KF 量と残存する Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 活性を示したが、8 mM KF では反応時間 10 min で残存活性が1%未満にまで阻害可能で、90 min ではほぼ完全に阻害することが可能であることがわかった。この結果から、結晶化での MgF<sub>4</sub><sup>2-</sup>処理は 2.50 mg/ml サメ Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, 100 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 mM KF で行うことにした。

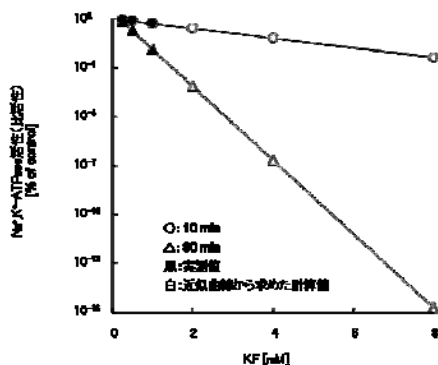


図2 各反応時間での KF 濃度と残存する Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 活性の関係

### 3 サメ Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase の三次元結晶化

サメ Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase の結晶化は透析ボタンによる微量透析法を用いて行った。

結晶化溶液(透析液)は各条件に調製後十分に脱気し、使用直前に還元剤を添加して用いた。

あらかじめ蛋白質濃度と脂質濃度(phosphatidylcholine (PC)および cholesterol 濃度)を定量した 2.50 mg/ml 可溶化サメ Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase に 100 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 mM KF, PC 溶液, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 溶液を添加し、25°C、90 分間反応させた。反応後この蛋白質溶液を透析ボタンに移し、用意した結晶化溶液中に沈め、25°C下、1~2か月間放置して結晶化を行った。

蛋白質溶液の条件検討は脂質/蛋白質重量比 [mg/mg] ( $\alpha$  値)および界面活性剤/脂質モル比 [mol/mol] ( $\gamma$  値)を指標に、添加する PC 溶液と C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 溶液を調節して行った。また、結晶化溶液は始めに沈殿剤の検索を行い、微小結晶を得た PEG3000 に沈殿剤条件を固定して以降の条件検討を進めた。その結果、蛋白質溶液条件が  $\alpha = 1.15$ ,  $\gamma = 6.50$ , 結晶化溶液条件が 18 % PEG3000, 2.75 M glycerol, 5 % 2-methyl-2,4-pentanediol, 100 mM potassium acetate, 10 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM KF, 10 mM glutathione, 2  $\mu$ g/ml 2,6-di-*t*-butyl-*p*-cresol, 20 mM MES-Tris, pH 7.0, 25°Cで図3左に示したような良質な三次元結晶を再現良く得ることに成功した。この条件で得られる結晶の空間群は C2、格子定数は  $a = 270 \text{ \AA}$ ,  $b = 55 \text{ \AA}$ ,  $c = 175 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 115^\circ$  と大きく、6  $\text{\AA}$  程度の分解能しか得られなかったが、結晶凍結直前に高濃度の沈殿剤で処理することで結晶格子が縮小し、SPring-8 (ビームライン BL41XU) で分解能 2.6  $\text{\AA}$  の回折データを得ることができた(図3右)。この結晶の空間群は C2、格子定数は  $a = 224.0 \text{ \AA}$ ,  $b = 51.0 \text{ \AA}$ ,  $c = 163.7 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 105.3^\circ$  であった。

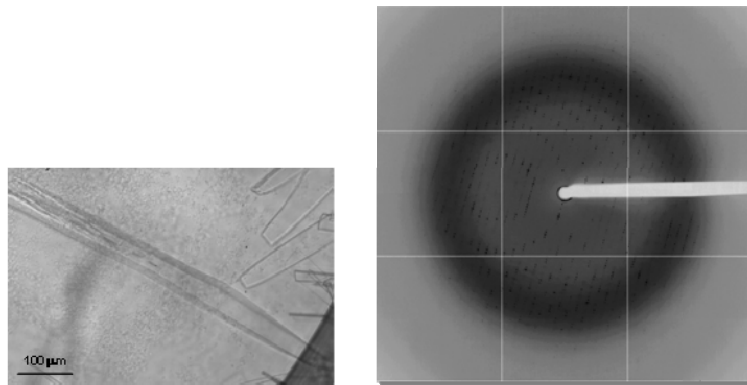


図3 サメ  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の結晶(右)とそのX線回折写真(左)

#### 4 多重同型置換法を用いた位相決定

X線回折データから電子密度分布を再構成するには各反射の位相角を決定しなければならない。

本研究では広く使用されている金(I)試薬の誘導体を作製したほかに、タリウム(I)塩やルビジウム塩を使用して膜貫通領域に結合したカリウムイオンを置換した重原子誘導体を作製し、多重同型置換法を用いて位相決定を試みた。溶媒平滑化の結果、図4に示す電子密度図が得られ、 $\beta$ サブユニットとFXYP 蛋白質の細胞外ドメインの構造も見ることができた。

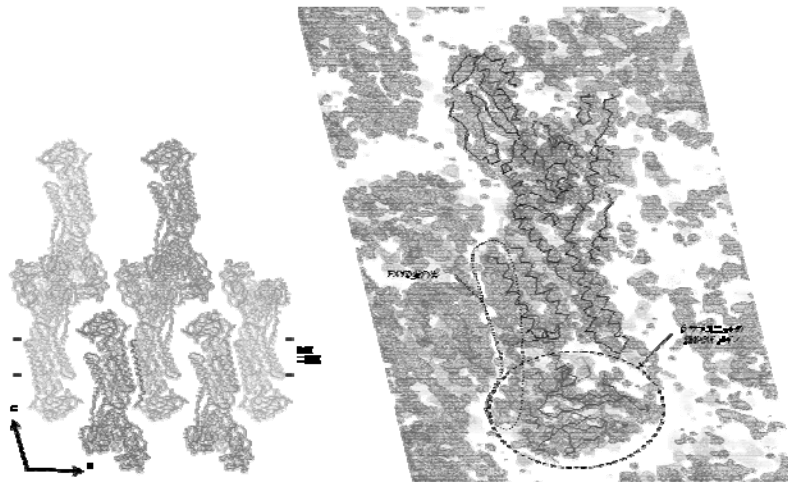


図4 サメ  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 三次元結晶のパッキングの様子(左)と多重同型置換法により得られた  $3.2 \text{ \AA}$  の電子密度図(右)

#### 5 まとめ

本研究はサメ  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha/\beta/\text{FXYP}$  プロトマーの  $\text{E}2 \cdot 2\text{K}^+ \cdot \text{MgF}_4^{2-}$  状態での三次元結晶化とX線結晶構造解析により、 $\beta$ サブユニットとFXYP蛋白質の細胞外ドメインを含む高分解能の電子密度図を得ることに初めて成功した。この結果は  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の対向イオン輸送機構と固有の特性を側鎖レベルで理解できるだけでなく、 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase を介する細胞内情報伝達の理解や  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase を標的にした薬物の開発に大きく貢献できると考えている。