

【目的】代表的イオンポンプである筋小胞体 Ca^{2+} ポンプに関し、X線結晶解析によって15の反応中間体の原子構造を決定した。その結果、作動機構の大略は理解できるようになったが、最重要ともいえる「膜内に結合したイオンを放出する過程」($\text{E1P} \cdot \text{ADP} \cdot 2\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{E2P}$) に関してはよくわからないままである。この過程における構造変化は非常に大きく、且つ幾つもの場所で起こるため、何が原因で何が結果かも判然としない。この問題の解決には「人工的反応中間体を創出する」しかないと考えた。この過程では、3つある細胞質ドメインの大規模な再配置が起こるが、特に重要なのはAドメインの 90° に及ぶ回転である。それを途中で止めたい。そのために、ポンプ蛋白質に立体障害となる「コブ」を導入する。コブの大きさを変えれば、系統的に幾つもの人工的反応中間体を生み出せるはずである。その構造を決定することによって「イオンポンプ作動機構の原子構造に基づく理解」の完成を目指す。

【方法】要件としては、導入するコブによってATPによるリン酸化は阻害されないことが必須である。従って、コブの導入場所としてはAドメインのどこかでありE1P状態で溶媒に露出している必要がある。一方でE2P状態の成立は阻止されなければならないから、E1PとE2Pで構造が変わらない「硬い」領域との接触面の近くにコブをつくるべきである。そうすると、導入部位は限定され、Pドメインと接触するAドメインの領域ということになる。コブとしては側鎖レベルから二次構造要素等広く考えられるが、まずは点変異体から始める。その設計には急速に進歩しているフォールディングソフトウェアを、構造の安定性の評価には分子動力学計算が利用できよう。実験的には蛋白質分解酵素による部分分解が有効であることを経験している。高等動物の大型膜蛋白質ではあるが、変異体の生産・X線結晶解析技術は既に確立済みである。本研究では、まずクライオ電顕による単粒子解析によって構造を検討することにした。

【結果】現時点で4つの変異体を大量生産し、そのうち2つについてはクライオ電顕による予備的検討を終えた段階にある。作製した変異体は、E2P状態でPドメインとの接触面に位置するAドメインの一残基と二残基に変異を入れたものに加え、Rosettaソフトウェアを利用してヘリックスを導入したもの、AドメインにあるすべてのP型ATPaseで保存されているTGESループを伸ばしたもの、の4つである。4つめの「TGESループを伸ばしたもの」が系統的に大きさを変えられることから有望と考え、分子動力学計算による安定性評価でも優れていた。しかし、蛋白質分解酵素による部分分解では、精製前の膜標品で既に分解産物が認められ、この変異体は正しくfoldしていないだろうという結論になった。分子動力学計算で検討できるのはあくまでも作製した原子モデルの安定性であり、発現蛋白質がその構造をとるかは別問題であるとはいえ、この結果は驚きであった。また、構造解析の手法としては、クライオ電顕による単粒子解析を予定していたが、ここでも問題が生じた。 Ca^{2+} ポンプとは同族の Na^+ ポンプ(Na^+ , K^+ -ATPase)に関して実績を積み上げており、特段の問題はあるまいと考えていた。ところが、 Na^+ ポンプと同様の条件で電顕試料を作製した場合、 Ca^{2+} ポンプは単量体から三量体のゆるい集合体を作るため、高分解能での解析が著しく困難であることが判明した。このように、2つのステップで予想外の困難に直面したため、研究の完成にはまだ時間を要することになった。

Ca^{2+} ポンプの反応サイクルと障害物の導入による人工的反応中間体の創生

