

令和2年8月21日

報道機関 各位

東北大学
京都産業大学

クライオ電子顕微鏡によるヒト由来カルシウムポンプの 高分解能構造の決定

～細胞内カルシウム恒常性維持機構の破綻が引き起こす疾病の原因解明に光～

【発表のポイント】

- クライオ電子顕微鏡による構造解析により、細胞中のカルシウムの恒常性維持に重要な小胞体膜局在カルシウムポンプ SERCA2b の高分解能構造を世界で初めて明らかにした。
- SERCA2b に特徴的な C 末端テール領域による、構造・活性制御機構を世界で初めて明らかにし、小胞体カルシウムポンプの新しい活性制御機構モデルを提唱した。

【概要】

細胞小器官の一つである小胞体は、カルシウムを取り込むことで細胞内カルシウムイオン濃度を適切に維持しています。SERCA2b はこのカルシウムの取り込みを担い、全組織に広く発現している膜タンパク質です。東北大学多元物質科学研究所の張 玉霞博士課程学生、渡部 聡助教、稲葉 謙次教授（生命科学研究科、理学研究科化学専攻 兼任）、および東京大学医学研究科の包 明久助教、吉川 雅英教授、京都産業大学の永田 和宏名誉教授（現 JT 生命誌研究館館長）らを中心とした共同研究グループは、筋収縮の制御、神経伝達、アポトーシスの誘導、タンパク質の品質管理など、様々な生命現象において重要な役割をもつ細胞内カルシウムイオンの恒常性を保つ上で必須のカルシウムポンプ SERCA2b の高分解能構造を、クライオ電子顕微鏡単粒子解析^{注1}という技術を用いて、世界で初めて明らかにしました。

本研究成果は、2020年8月12日14時（アメリカ東部時間）に米国科学誌 Science Advances に掲載されました。

【お問い合わせ先】

（研究に関すること）
東北大学 多元物質科学研究所 教授
稲葉 謙次（いなば けんじ）
〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1
Tel: 022-217-5604
E-mail: kenji.inaba.a1@tohoku.ac.jp

（報道担当に関すること）
東北大学 多元物質科学研究所 広報情報室
伊藤 智恵（いとう ともえ）
Tel: 022-217-5198
E-mail: press.tagen@grp.tohoku.ac.jp
京都産業大学 広報部
増村 尚人（ますむら なおと）
〒603-8555 京都市北区上賀茂本山
Tel: 075-705-1411
E-mail: kouhou-bu@star.kyoto-su.ac.jp

【研究の背景】

小胞体は膜たんぱく質や分泌たんぱく質の生合成やカルシウムの貯蔵を行う細胞内小器官です。小胞体膜局在の ATP 駆動型カルシウムポンプである SERCA2b は、細胞質から小胞体内へカルシウムを取り込むことで、カルシウムの制御や細胞内のカルシウム濃度の恒常性維持において重要な役割をもつことが知られています。ハウスキーピングたんぱく質^{注2}である SERCA2b は、組織特異的に発現するアイソフォーム^{注3}の SERCA1a や SERCA2a とは異なり、C 末端に 11 番目の膜貫通ヘリックス (TM11) と約 10 アミノ酸からなるテール領域 (C 末端テール) が存在します (図 1)。TM11 と C 末端テールからなる C 末端領域によって SERCA2b の活性やカルシウムに対する結合能が制御されることは報告されていましたが、その詳しい機構については分かっていませんでした。

SERCA2b のアイソフォームである SERCA1a については、様々な中間状態で構造が決定されていますが、SERCA2b の構造については、我々が昨年報告した一つの間状態の結晶構造のみでした。そこで、全組織において細胞内のカルシウムイオン恒常性維持に関わる SERCA2b の活性制御メカニズムを原子レベルで理解するため、SERCA2b の複数の中間状態の構造を決定することを試みました。

【研究の内容と成果】

本研究ではまず、SERCA2b の高分解能構造をクライオ電子顕微鏡単粒子解析法により決定するために、十分に精製された SERCA2b の試料を調製しました。その試料を用いて電子顕微鏡測定のためのグリッドを作製し、東京大学医学研究科に設置されているハイエンドクライオ電子顕微鏡装置 Titan Krios (ThermoFisher 製)を用いて、データ収集を行いました。その結果、カルシウムイオンと ATP 分子が結合している状態については 2.9 Å 分解能で、ATP が加水分解しリン酸基のみが結合している状態については 2.8 Å 分解能でそれぞれ構造決定しました。得られた構造から、SERCA2b は A ドメイン (駆動ドメイン)、N ドメイン (ATP 結合ドメイン)、P ドメイン (リン酸化ドメイン) の三つの細胞質ドメインと、11 個の膜貫通ヘリックス (N 末端から TM1~TM11 と呼ぶ)、そして C 末端テールからなることを確認しました (図 2)。SERCA2b に特徴的な C 末端テールは、従来の研究で予想されていた位置とは大きく異なり、C 末端テールは、TM11 から膜と液面の境界領域に沿って水平方向に伸び、SERCA2b 分子内で L7/8 ループの一部と相互作用することが分かりました (図 3)。さらに、C 末端テールを欠失させた変異体についても、クライオ電子顕微鏡による高分解能構造解析を行ったところ、SERCA2b は三つの細胞質ドメインの位置が異なる複数のコンフォメーションをとることも分かりました。この結果から、C 末端テールによって SERCA2b の全体構造は制御され、この構造制御によって SERCA2b のカルシウム輸送活性が制御されていることが示唆されました (図 4)。以上の結果は、細胞のカルシウム恒常性維持機構を分子構造レベルで理解する大きな一助となると解釈できます。

【今後の展開】

本研究成果として、SERCA2b の反応サイクルにおいてカルシウムと ATP が結合した状態、およびカルシウムが解離しかつ ATP の加水分解が起こった後の状態について、これまで最も高分解能の構造解析に世界で初めて成功しました。その結果、C 末端テールを介した活性制御メカニズムを提唱することができました。クライオ電子顕微鏡は、試料を結晶化する必要がないため、溶液状態の構造をおよそ正確に反映していると解釈できます。

今後は、他の複数の中間状態での SERCA2b の構造解析をクライオ電子顕微鏡により行うことで、反応サイクル全体における SERCA2b の C 末端領域を介した活性制御機構の全容を解明したいと考えています。小胞体内でのカルシウムイオンが枯渇すると、小胞体内でのタンパク質品質管理がうまくいけなくなり、小胞体ストレスを誘導することが知られています。またそのことが神経変性疾患、糖尿病などの疾患を引き起こすことも報告されています。さらに、SERCA2b の遺伝子変異による機能不全が、ダリエ病という皮膚病を引き起こすことも広く知られています。したがって、本研究で得られた知見は、細胞内カルシウムに関わる種々の生命現象の解明のみならず、細胞のカルシウム恒常性維持機構の破綻が引き起こす様々な疾病の原因解明および治療戦略の開発につながることを期待されます。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 チーム型研究（CREST）

研究領域：「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」

（研究総括：田中 啓二 東京都医学総合研究所 理事長兼所長）

研究課題名：「小胞体恒常性維持機構：Redox, Ca²⁺, たんぱく質品質管理のクロストーク」

研究代表者：永田和宏（京都産業大学タンパク質動態研究所 所長 兼 生命科学部 教授）

研究期間：2013 年 10 月～2019 年 3 月

JST は本領域で、先端的ライフサイエンス領域と構造生物学との融合により、ライフサイエンスの革新に繋がる「構造生命科学」と先端基盤技術の創出を目指します。上記研究課題では、ERdj5 を中心として、たんぱく質恒常性（ホメオスタシス）・レドックス（酸化還元）恒常性・カルシウム恒常性の 3 つの主要な恒常性のクロストーク分子基盤を、静的（X 線結晶構造解析^{注4}）および動的（FRET 解析）な構造解析によって解明します。

日本医療研究開発機構（AMED）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（BINDS）

研究課題名：クライオ電顕による細胞内ネイティブ複合体構造解析

研究代表者：吉川 雅英（東京大学 医学系研究科 教授）

【参考図】

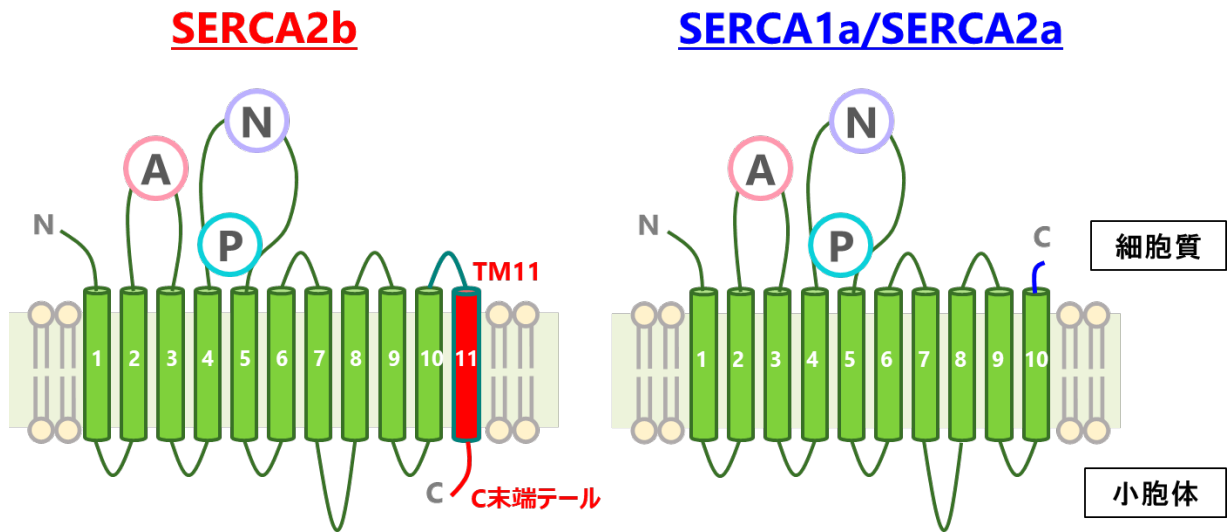


図1 SERCA2b とそのアイソフォーム SERCA1a/SERCA2a の簡略図

SERCA2b は 11 個の膜貫通ヘリックス (TM1~TM11) を有しており、C 末端は小胞体内腔側に位置する。一方、アイソフォームの SERCA1a や SERCA2a は、10 個の TM ヘリックス (TM1~TM10) を有するため、C 末端は細胞質側に存在する。11 番目の TM ヘリックス (TM11) とそれに続く C 末端テール領域が、SERCA2b の活性制御において重要な役割をもつと考えられている。

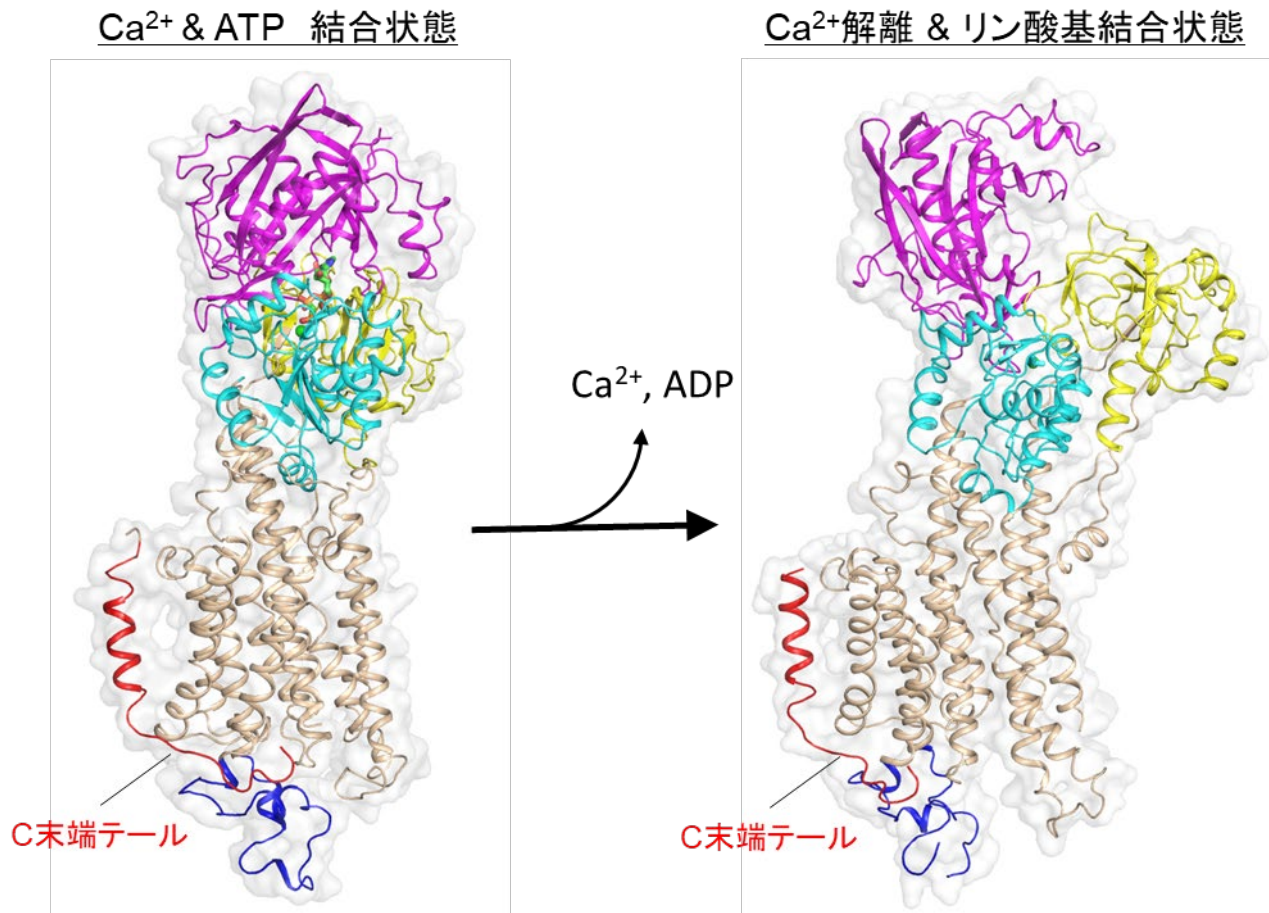


図 2 SERCA2b の二つの中間状態のクライオ電子顕微鏡構造

クライオ電子顕微鏡単粒子解析により、SERCA2b のカルシウムと ATP が結合した状態 (左) とカルシウムは解離しリン酸基が結合した状態 (右) について、それぞれ 2.9 Å、2.8 Å 分解能で構造決定した。これにより、SERCA2b の C 末端テールの位置と構造に関する情報が得られた。

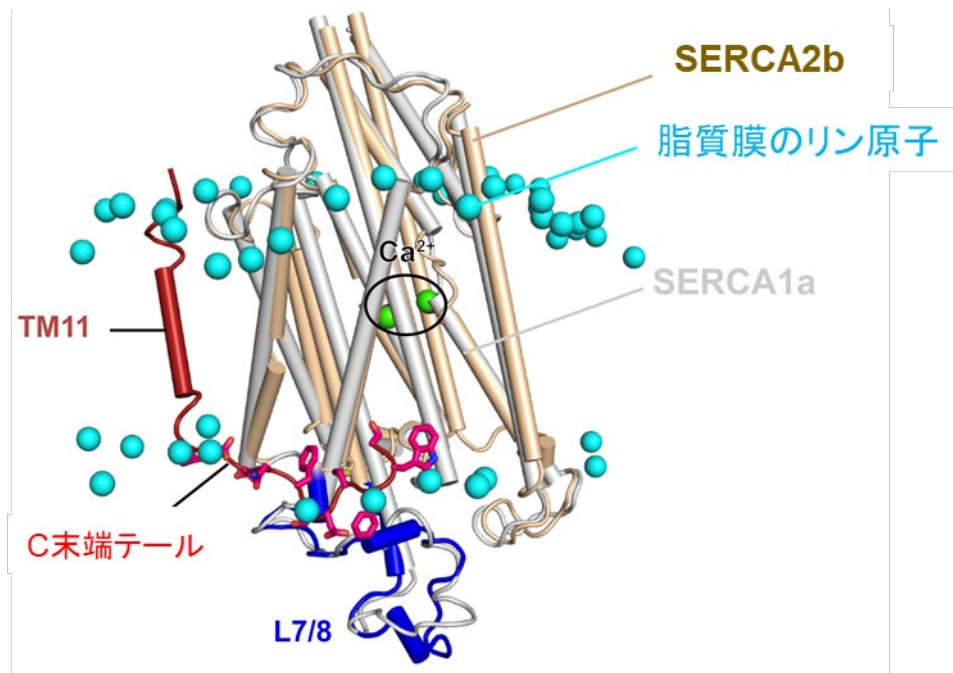


図3 SERCA2b の C 末端テールの位置と構造

C 末端テールは TM11 から脂質膜と液面の境界で水平方向に伸び、L7/8 ループの一部と相互作用する。

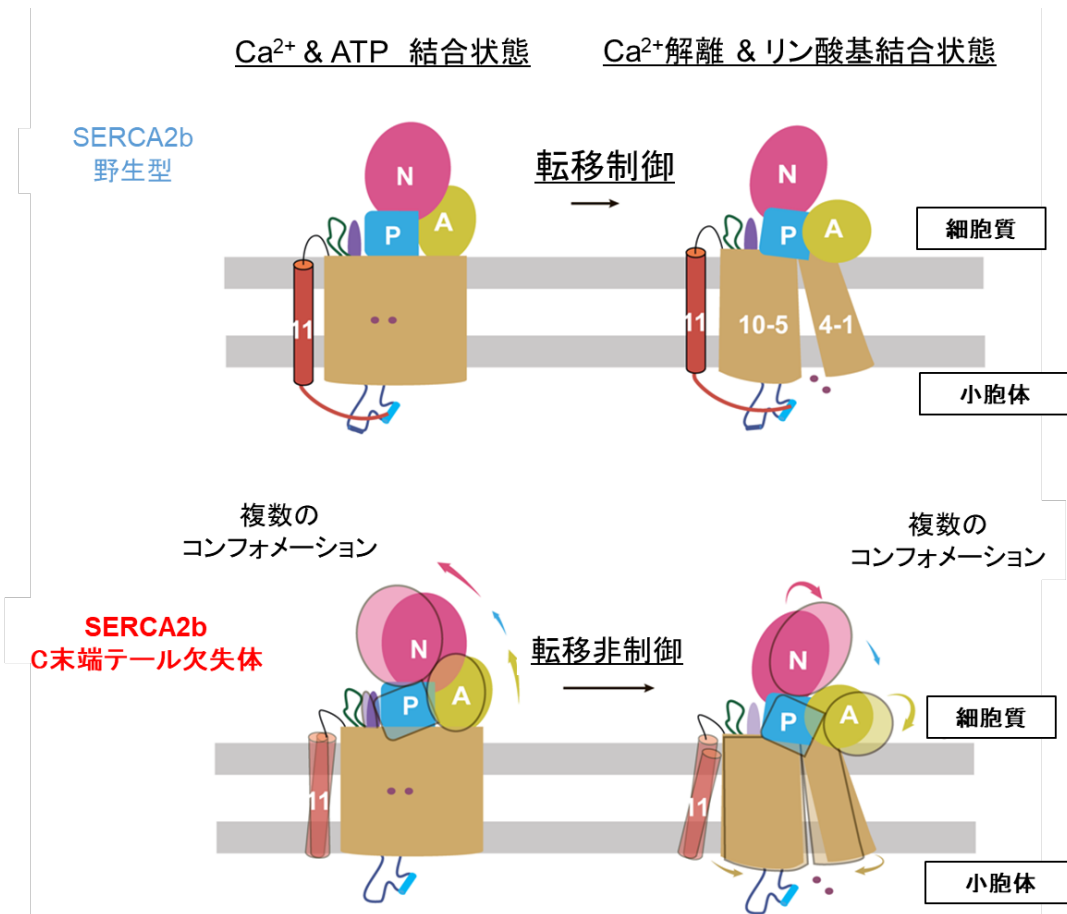


図4 C末端テールによるSERCA2bのコンフォメーション制御

C末端テールによりSERCA2bのコンフォメーションは安定化され、中間状態間の構造転移も制御される。C末端テールの欠失によりSERCA2bは複数のコンフォメーションをとり、構造制御が弱まる。

【用語解説】

注1) クライオ電子顕微鏡単粒子解析

タンパク質の立体構造を高分解能で決定するための手法の一つ。電子線照射による分子の振動や損傷を抑えるために、観測対象のタンパク質を氷薄膜中に包埋し、極低温で電子顕微鏡像を観測する。個々の分子像は、様々な向きで氷薄膜に包埋された分子の投影像であり、投影方向毎に分類した分子像の平均像を組み合わせることで高分解能の三次元構造を構築する。

注2) 하우스キーピングたんぱく質

細胞の生存に必須で、組織によらず全ての細胞で発現しているたんぱく質の総称。

注3) アイソフォーム

基本的な機能に関する構造またはアミノ酸配列は同じだが、一部が異なっているたんぱく質。異なる遺伝子から発現する。

注4) X線結晶構造解析

分子の構造を高分解能で決定する手法の1つ。分子が規則正しく並んだ結晶に強いX線を照射すると回折という現象が起こり、回折データを解析することで、結晶を構成する分子の構造を原子レベルで決定することができる。

【発表論文】

著者：Zhang Y., Inoue, M., Tsutsumi, A., Watanabe, S., Nishizawa, T., Nagata, K., Kikkawa, M. and Inaba, K.*

タイトル：Cryo-EM structures of SERCA2b reveal the mechanism of regulation by the luminal extension tail

雑誌名：Science Advances

DOI：10.1126/sciadv.abb0147