

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03216

研究課題名（和文）クライオ電子顕微鏡による膜輸送体の動的機構解明

研究課題名（英文）Structural study of biological membranes by Cryo-EM

研究代表者

西澤 知宏（Nishizawa, Tomohiro）

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：80599077

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：膜輸送体は、脂質膜を越えた輸送を行うだけでなく、外界の環境の変化などに応じてその輸送活性を変化させることで、ヒトを含む生命活動において、多くの必須な役割を持つ。本研究では、クライオ電子顕微鏡による構造解析によって複数の膜輸送体の構造解析を行い、その分子機構の解明を行った。特に、P型輸送体ファミリーに属するポリアミン輸送体ATP13A2に関しては、輸送サイクルにおける複数中間体の構造から、他のP型輸送体には見られない独自の仕組みを持つことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATP13A2はリソソームではたらくポリアミン輸送体であり、細胞外からのポリアミン取り込み経路において重要な役割を持つ。ATP13A2はパーキンソン病の原因遺伝子としても同定されており、これは老化にともなって細胞内のポリアミン合成が減少すると、ATP13A2のはたらきが相対的に重要になるためであると考えられている。今回の研究から、ATP13A2はNTDと呼ばれる独自のドメインが脂質と相互作用して、特定のコンフォメーションを安定化することで、輸送活性を制御していることが示された。これらの成果は、将来的には、ATP13A2を標的とした、新たなパーキンソン病の治療薬の開発などへつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Membrane transporters play many essential roles in biological activities, including humans, by transporting various substrates across lipid membranes. In this study, we investigated the molecular mechanisms of several membrane transporters by using cryo-EM. In particular, for the polyamine transporter ATP13A2, which belongs to the P-type transporter family, we revealed the structures of multiple intermediates in the transport cycle, which highlighted its unique mechanism of the N-terminal domain that stabilizes a specific conformation of ATP13A2 and facilitates transport cycle.

研究分野：構造生物学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 膜タンパク質 輸送体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜輸送体は、脂質膜を越えて物質を伝搬することで細胞の恒常性維持や細胞間でのコミュニケーションなどに関わる。これらの輸送体は、基質結合部位が細胞内外に開いた二つの異なる状態を含む、複数の中間体を遷移することで機能する。したがって、その輸送機構を理解するためには、動的挙動を含めた解析が必要である。X線結晶構造解析は、高分解能の構造解析が得られる一方で、タンパク質を阻害剤などで安定化した、いわば静的な構造情報しか得ることができなかった。クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析では、結晶化を必要としないという大きな利点があるが、単粒子解析法はリボソームやウイルス粒子のように分子量の大きな標的にしか用いられてこなかった。電子を直接検出するカメラの登場と、計算アルゴリズムの開発によって分解能が大幅に向上したことで、現在では膜タンパク質を含む生体高分子の構造解析における主要な技術となりつつある。また、単粒子構造解析では、構造が不均一な状態の試料であっても、画像解析によって分類することで、それぞれの状態の構造を明らかにすることができる。しかしながら、標的分子が複雑な平衡状態にある場合、このような動的解析を行うために必要となる粒子数は膨大であり、数週間以上の測定日数を要する。このため、現実的には非常に限られた環境でしか行うことができなかった。近年になり、読み込み速度の向上した新型検出器 (Gatan 社、K3 カメラ) の登場により、状況は大きく変わりつつある。この高速検出器とイメージシフト法を併用した撮影法を用いることで、これまでの 10 倍近く of 速度で撮影することが可能となった。これにより、わずか数日の測定で、ダイナミクスを含めた解析を行うために十分な粒子数を得ることができるようになっている。本研究では、この「分子ダイナミクスにおける革命」ともいえる第二の技術革新を用いることで、分子の動的挙動を含めた機能解明を目指す。本研究では、クライオ電子顕微鏡と、高速読み出しが可能な電子直接検出器を駆使することで、膜輸送体がはたらく過程を動画として描写することで、これらの分子がどのようにして膜を越えて物質輸送を行うのかを理解することを目的としている。

2. 研究の目的

ATP13A2 は P 型輸送体ファミリーに属しており、このファミリーの構成メンバーには筋小胞体ではたらくカルシウムポンプ (SERCA) や、ナトリウム-カリウム ATPase (Na, K-ATPase) など、カチオン輸送体が多く知られており、ATP13A2 も重金属の輸送体であると考えられていた。しかし、その基質に関して多くの議論があり、研究開始当時には決着がついていなかった本研究では、この ATP13A2 を標的として、クライオ電子顕微鏡による解析、および生化学的な解析から、輸送基質と分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 蛍光ゲルろ過法と呼ばれる方法を用いて、いくつかの種に由来する ATP13A2 遺伝子のスクリーニングを行ったところ、ヒトのもつ ATP13A2 の安定性が十分高く、構造解析に適していることが分かった。HEK293 細胞でヒト ATP13A2 を発現させ、界面活性剤 GDN を用いて可溶性化、精製を行ったところ、高純度の精製タンパク質を得ることに成功した (図 1)。精製した ATP13A2 タンパク質溶液は、vitrobot と呼ばれる装置で急速凍結を行い、直接検出器 K3 カメラを搭載してクライオ電子顕微鏡 Titan Krios による観察を行った。撮影した電顕画像は RELION3 によって解析を行った。MotionCorrection による動き補正、CTF 見積り後の、目的粒子のピックアップ、粒子画像の切り出し、および 2D、3D クラス分けを行い、試料の性情を評価した。しかしながら、阻害剤等を加えていない状態では、タンパク質の流動性が高く、三次元構造を得ることが難しかったため、ATP の非加水分解アナログである AMPPCP、ATP 加水分解中間体を模倣する ADP-AIF₃、および二種類のリン酸アナログ AIF₃、BeF₃ を添加して構造を安定化することを試みた。また、同じタイミングで、ATP13A2 をはじめとする 5 型の PgataATPase メンバーはポリアミンを輸送することが報告されたことから、基質としてスペルミンも添加して構造解析を行った。三次元構造を得ることに成功した。FSC=0.143 を基準として分解能の見積りを行ったところ、約 3.5 ~ 3.8 程度であった (図 2)。

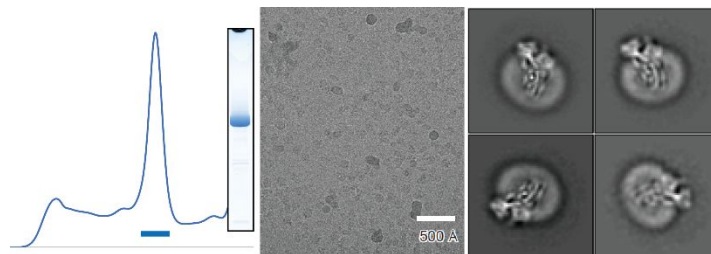


図1 ATP13A2 の精製

ゲル濾過クロマトグラフィーのチャートと SDS-PAGE (左)、電子顕微鏡撮影像 (中央)、および二次元平均化像 (右)

4. 研究成果

(1) クライオ電子顕微鏡によって得られた構造を精査したところ、AMPPCP、および ADP-AIF3 を添加した条件では、E1-ATP、E1P-ADP に相当する中間体を、リン酸アナログである AIF3、BeF3 を加えた条件では E2P を呼ばれる中間体に相当する構造をそれぞれ取っていることが分かった。これらの構造の比較から、E1 と E2 では、A ドメインの動きに伴って二本の膜貫通ヘリックス (TM1-2) が大きく構造変化をすることが明らかになった。この動きに伴って、E2 状態では細胞質側に細長いトンネル状のくぼみが生じており、このくぼみの周囲にはカルボニル側鎖を持つ負電荷性のアミノ酸 (Asp, Glu) および芳香族環側鎖を持つアミノ酸 (Phe, Tyr) が多く存在していたことから、基質であるポリアミンの結合に適した環境となっていた (図3)。さらにクライオ電子顕微鏡マップにおいても、基質として加えたスペルミンの密度が観察されたことから、このトンネル状のくぼみが基質結合部位であると考えられた。このトンネル周辺のアミノ酸に関して変異体解析を行ったところ、いずれの変異体もスペルミン輸送活性を大きく低下させることがわかった。したがって、それぞれのアミノ酸がいずれも基質認識、輸送に関わっており、単一の変異だけでも基質結合能に大きな影響を与えることが分かった。ATP13A2 はスペルミン以外にも分枝のない線状のポリアミンに対して幅広く輸送することが報告されており、今回明らかになった認識機構は、それらの結果とも合致する。

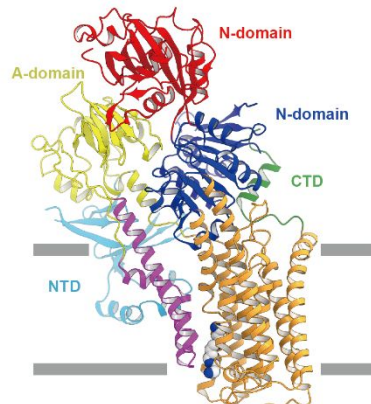


図2 ATP13A2, E2 状態の全体構造

ATP13A2 は N 末端側に他の P 型 ATPase には見られないドメインをもっており、NTD (N-Terminal Domain) と名付けたこのドメインは、クライオ電子顕微鏡のマップから脂質膜に突き刺さるようになっていることがわかった。この NTD の密度は E2 状態では明確に観察されたが、一方で E1 では非常に弱く、フレキシブルになっていることが分かった。このドメインには正電荷アミノ酸が多く存在しており、PIP2 などの脂質と相互作用して ATP13A2 の輸送活性を向上させることが報告されていた。過去に報告されている生化学実験とあわせると、NTD は脂質膜と相互作用して E2 状態を特異的に安定化していると考えられた。本研究開始後、他のグループによる報告から、ATP13A2 がポリアミン恒常性において重要な役割を持っており、老化に伴って細胞内でのポリアミン合成が低下すると、この輸送体の役割が特に重要になることから、この輸送体における遺伝性変異パーキンソン病のような神経変性疾患につながると考えられている。したがって、ATP13A2 を標的とした、特異的な活性向上薬はこれらの病気の治療につながることが期待されている。本研究によって明らかになった NTD の機能、構造的役割は、将来的にはこのような治療薬の開発につながる可能性が期待される。

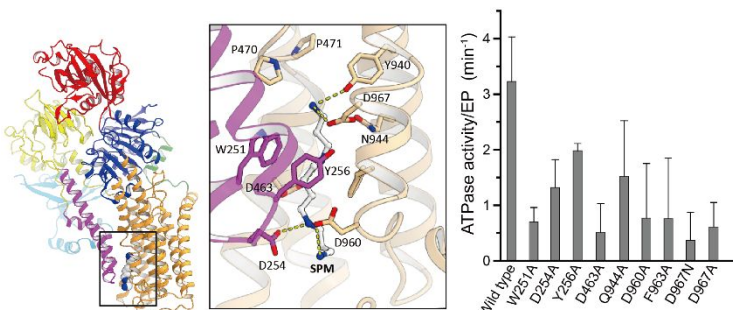


図3 ポリアミン結合部位(左)と周辺のアミノ酸の変異体解析の結果(右)

< 引用文献 >

A Tomita *et al.* *Mol. cell* 81, 4799-4809

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Futamata Haon, Fukuda Masahiro, Umeda Rie, Yamashita Keitaro, Tomita Atsuhiko, Takahashi Satoe, Shikakura Takafumi, Hayashi Shigehiko, Kusakizako Tsukasa, Nishizawa Tomohiro, Homma Kazuaki, Nureki Osamu	4. 巻 13
2. 論文標題 Author Correction: Cryo-EM structures of thermostabilized prestin provide mechanistic insights underlying outer hair cell electromotility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34985-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomita Atsuhiko, Daiho Takashi, Kusakizako Tsukasa, Yamashita Keitaro, Ogasawara Satoshi, Murata Takeshi, Nishizawa Tomohiro, Nureki Osamu	4. 巻 81
2. 論文標題 Cryo-EM reveals mechanistic insights into lipid-facilitated polyamine export by human ATP13A2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 4799 ~ 4809.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2021.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi Hanayo, Hayashida Kenichi, Nishizawa Tomohiro, Oshima Atsunori, Abe Kazuhiro	4. 巻 298
2. 論文標題 Cryo-EM of the ATP11C flippase reconstituted in Nanodiscs shows a distended phospholipid bilayer inner membrane around transmembrane helix 2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101498 ~ 101498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101498	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Abe Kazuhiro, Yamamoto Kenta, Irie Katsumasa, Nishizawa Tomohiro, Oshima Atsunori	4. 巻 12
2. 論文標題 Gastric proton pump with two occluded K ⁺ engineered with sodium pump-mimetic mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26024-1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kise Yoshiaki, Kasuya Go, Okamoto Hiroyuki H., Yamanouchi Daichi, Kobayashi Kan, Kusakizako Tsukasa, Nishizawa Tomohiro, Nakajo Koichi, Nureki Osamu	4. 巻 599
2. 論文標題 Structural basis of gating modulation of Kv4 channel complexes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 158 ~ 164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-021-03935-z	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi Hanayo, Nishizawa Tomohiro, Segawa Katsumori, Nureki Osamu, Fujiyoshi Yoshinori, Nagata Shigekazu, Abe Kazuhiro	4. 巻 32
2. 論文標題 Transport Cycle of Plasma Membrane Flippase ATP11C by Cryo-EM	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108208 ~ 108208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oda Kazumasa, Lee Yongchan, Wiriyaerkmul Pattama, Tanaka Yoko, Takemoto Mizuki, Yamashita Keitaro, Nagamori Shushi, Nishizawa Tomohiro, Nureki Osamu	4. 巻 29
2. 論文標題 Consensus mutagenesis approach improves the thermal stability of system x _c [?] transporter, <sc>xCT</sc> , and enables <sc>cryo EM</sc> analyses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 2398 ~ 2407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3966	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西澤知宏
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡によって見えてきた P4-ATPaseによる脂質輸送メカニズム
3. 学会等名 第15回トランスポーター研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西澤知宏
2. 発表標題 Time-resolved serial femtosecond crystallography reveals early structural changes in channelrhodopsin
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------