

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02426

研究課題名(和文)物質不均衡分布を司る能動輸送体P型ATPaseの構造機能生理学

研究課題名(英文)Structural physiology of P-type ATPases

研究代表者

阿部 一啓 (ABE, Kazuhiro)

名古屋大学・細胞生理学研究センター・准教授

研究者番号：60596188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：胃プロトンポンプの複数の胃酸抑制剤の構造を解析(Tanaka et al., 2022, J Med Chem)、薬剤結合構造とAIを利用した新規阻害剤の開発に成功した(Abe et al., 2023, Commun Biol)。輸送イオンの特異性を明らかにする為に、K⁺を2つ結合したプロトンポンプを作成し(Abe et al., 2021, Nat Commun)、ナトリウムポンプを創り出すことに成功した(Young et al., 2022, Nat Commun)。死海に生息する川エビの特殊なナトリウムポンプの構造解析に成功した(Artigas et al., 2023, PNAS)

研究成果の学術的意義や社会的意義
構造とAIを駆使したドラッグデザインの枠組みは、胃プロトンポンプだけでなく、薬剤結合構造既知のタンパク質一般に広く応用が期待される。
プロトンポンプの輸送イオンを変換することに成功したことによって、近縁のカチオンポンプの作動機構の理解に大きく貢献した。

研究成果の概要(英文)：We determined binding mode of several inhibitors/drugs (Tanaka et al., 2021, J Med Chem). Using these drug-bound structures as template, we developed De novo inhibitors employing AI-driven platform (Abe et al., 2022, Commun Biol). To clarify the specificity of cation transport among closely-related isoforms, we generate a mutant proton pump in which two K⁺ is bound (Abe et al., 2021, Nat Commun) and a mutant that behave like sodium pump (Young et al., 2022, Nat Commun). We also determined cryo-EM structure of a sodium pump isoform expressed in brine shrimp living in dead sea (Artigas et al., 2023, PNAS)

研究分野：生化学 構造生物学

キーワード：P-type ATPase membrane protein Cryo-EM gastric proton pump Flippase biochemistry structural biology

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

『生命』が負のエントロピーを得ることで熱的平衡を逃れ恒常性を維持するものと定義されるのであれば (Schrödinger E., 1948, What is life?) 細胞膜を隔てた物質不均衡とは正に生命の根幹である。この不均衡は、P 型 ATPase に代表される一次能動輸送体によって形成される。従って P 型 ATPase の作動機構の理解は、生命を分子レベルで理解するために欠くことのできないピースである。

P 型 ATPase は ATP の加水分解と共役した、主としてイオンの能動輸送を、E1 (inward-facing)、E2 (outward-facing) という異なる状態をサイクルすることで達成する膜タンパク質の一群である。例えば、細胞膜電位は Na^+, K^+ -ATPase によって形成され、筋収縮には SR Ca^{2+} -ATPase の駆動が欠かせない。これらの中でも非常に特徴的かつ生理的に重要である分子が胃プロトンポンプ H^+, K^+ -ATPase とリン脂質フリッパーゼ ATP11C である。

2. 研究の目的

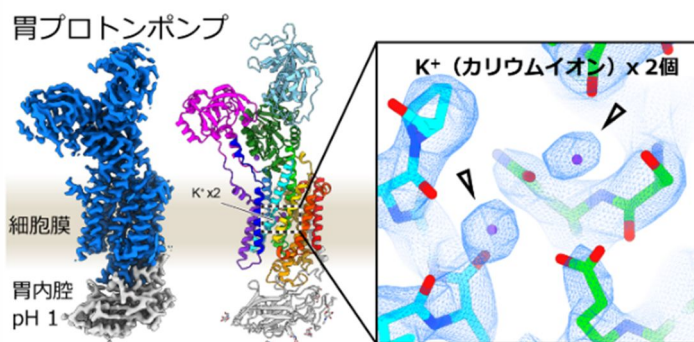
H^+ とリン脂質という対照的な基質の輸送に関わるこれらのポンプが、それぞれが担う顕著な生命現象 (胃酸分泌とアポトーシス) の発露の為に、どのようにユニークに作られていて、一方で共通の仕組みを持つのか。特異的と共通項を理解することを目的とする。分子の構造、機能から生命現象を理解する『構造機能生理学』によって、なぜ、これらの能動輸送体はそのようにできていなければならないのか? という本質的な問いに答える。

3. 研究の方法

哺乳類の P 型 ATPase に最適化した動物細胞発現系によって、機能解明のカギとなる変異体を発現、X 線結晶学と Cryo-EM 単粒子解析によって詳細かつダイナミック、また Nanodisc への再構成によって脂質環境での構造情報を得る。反応速度論、電気生理学、分子動力学によりその機能を解析・検証する。

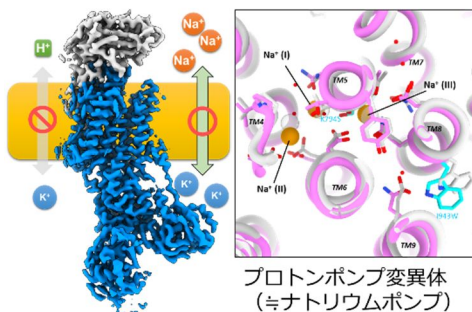
4. 研究成果

自身の研究 (2019, eLife) によって、胃プロトンポンプは $\text{H}^+:\text{K}^+ = 1:1$ の起電性の無い輸送を行うことを証明したが、近縁のナトリウムポンプは 2 つの K^+ を輸送する。そこでナトリウムポンプを模した変異体を作製することで、2 つの K^+ を輸送できるプロトンポンプをエンジニアリングできないであろうかという発想に至った。段階的な変異導入、変異体の構造解析を繰り返し、最終的に 2 つの K^+ が結合した胃プロトンポンプ変異体の作成に成功、これを cryo-EM による構造解析によって証明した。この研究は、構造に基づいた論理的な変異導入によりタンパク質の基質結合数を変化させた初めての成果であり、応募者の今後の研究展開の 1 つの柱である「創り出すことでそれを理解する」研究の礎となるものである (Abe et al., 2021, Nat Commun)。

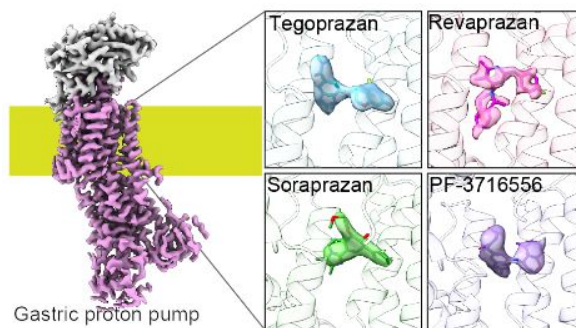


プロトンポンプとナトリウムポンプはアミノ酸配列の 60% 以上が同一である。にもかかわらず、これらは H^+ と Na^+ を厳密に区別し、輸送カチオンの個数、輸送起電性に関して厳密に異なる性質を持つ。能動輸送体のアンデシティティーに関わるこれらの違いを化学のレベルで理解するために、プロトンポンプの変異体をデザインしてナトリウムポンプを創り出すことでそれを証明する必要がある。鍵となる単変異体の構造機能解析を経て、最終的にたった 4 つの変異導入によって、起電性の無い輸送を行うプロトンポンプ ($\text{H}^+:\text{K}^+ = 1:1$) を、起電的な輸送 ($\text{Na}^+:\text{K}^+ = 3:2$) を行うナトリウムポンプに変換することに成功した。起電的な対向輸送を電気生理学によって確認し、 Na^+ と K^+ の結合数を cryo-EM 構造解析によって証明した。

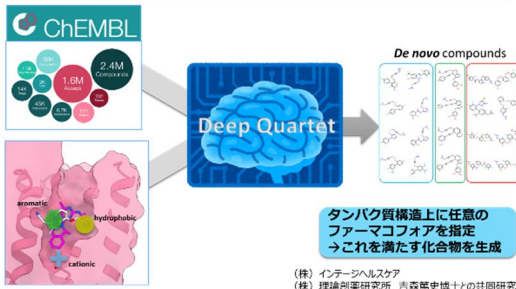
この研究は、これまで多くの研究者が挑んで達成できなかった一次能動輸送体の基質特異性をタンパク質の構造に基づいた論理的なデザインによって変換した世界で初めての例である (Young et al., 2022, Nat Commun)。



胃酸抑制剤は胃酸に起因する疾病に苦しむ多くの人々に利用され、その世界市場規模は2兆円とも言われる。既存の薬剤はすべてフェノタイプスクリーニングによって開発されており（我々の構造解析以前は）それらの結合構造は未知であった。従って構造情報を得ることは、論理的なドラッグデザインに基づいた薬剤開発に繋がる。この研究では、異なる4つの薬剤/阻害剤の結合構造を解析し、これらのファーマコフォアを同定した。中でも revaprazan は他の化合物結合モードと比してユニークであり、後述のAIを用いた de novo 創薬のカギとなった (Tanaka et al., 2022, J Med Chem)。

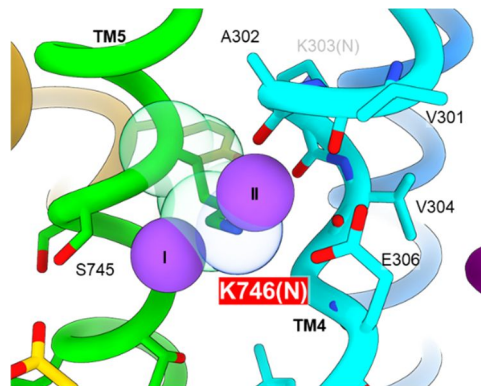


Deep Quartet AI-driven de novo compound design



複数の胃酸抑制剤の構造に基づいて、構造上の望みの座標に任意のファーマコフォアフィーチャーを設定することで、それらを満たす新規化学骨格を計算する機械学習のプラットフォームである Deep Quartet を駆使することで、de novo 化合物による新規阻害剤を開発した。実際にこれらを化学合成し、CryoEM による構造解析を経て、さらなる親和性の向上を達成することができた (Abe et al., 2023, Commun Biol)。この AI x 有機合成 x CryoEM による薬剤デザインの枠組みは、胃プロトンポンプだけでなく、薬剤結合構造が既知のタンパク質一般への応用が期待される。

死海に生息する川エビの一種は、周囲の塩濃度の上昇に合わせて特殊なナトリウムポンプのアイソフォーム (alpha2KK) の発現量を上昇させることが知られていた。Cryo-EM と電気生理学により、このアイソフォームの構造機能を明らかにし、高濃度の Na 溶液に対して Na を排出するメカニズムが明らかになった (Artigas et al., 2023, PNAS)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Gerle Christoph, Misumi Yuko, Kawamoto Akihiro, Tanaka Hideaki, Kubota-Kawai Hisako, Tokutsu Ryutaro, Kim Eunuchul, Chorev Dror, Abe Kazuhiro, Robinson Carol V., Mitsuoka Kaoru, Minagawa Jun, Kurisu Genji	4. 巻 1864
2. 論文標題 Three structures of PSI-LHCI from Chlamydomonas reinhardtii suggest a resting state re-activated by ferredoxin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 148986 ~ 148986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2023.148986	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Abe Kazuhiro, Nishizawa Tomohiro, Artigas Pablo	4. 巻 1870
2. 論文標題 An unusual conformation from Na ⁺ -sensitive non-gastric proton pump mutants reveals molecular mechanisms of cooperative Na ⁺ -binding	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 119543 ~ 119543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2023.119543	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 該当する
1. 著者名 Abe Kazuhiro, Ozako Mami, Inukai Miki, Matsuyuki Yoe, Kitayama Shinnosuke, Kanai Chisato, Nagai Chiaki, Gopalasingam Chai C., Gerle Christoph, Shigematsu Hideki, Umekubo Nariyoshi, Yokoshima Satoshi, Yoshimori Atsushi	4. 巻 6
2. 論文標題 Deep learning driven de novo drug design based on gastric proton pump structures	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-05334-8	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Madapally Hridya Valia, Abe Kazuhiro, Dubey Vikas, Khandelia Himanshu	4. 巻 300
2. 論文標題 Specific protonation of acidic residues confers K ⁺ selectivity to the gastric proton pump	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105542 ~ 105542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.105542	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 該当する

1. 著者名 Artigas Pablo, Meyer Dylan J., Young Victoria C., Spontarelli Kerri, Eastman Jessica, Strandquist Evan, Rui Huan, Roux Beno?t, Birk Matthew A., Nakanishi Hanayo, Abe Kazuhiro, Gatto Craig	4. 巻 120
2. 論文標題 A Na pump with reduced stoichiometry is up-regulated by brine shrimp in extreme salinities	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2313999120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2313999120	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 該当する

1. 著者名 Young Victoria C., Nakanishi Hanayo, Meyer Dylan J., Nishizawa Tomohiro, Oshima Atsunori, Artigas Pablo, Abe Kazuhiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Structure and function of H+/K+ pump mutants reveal Na+/K+ pump mechanisms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-32793-0	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, 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 Tanaka Saki, Morita Mikio, Yamagishi Tatsuya, Madapally Hridya Valia, Hayashida Kenichi, Khandelia Himanshu, Gerle Christoph, Shigematsu Hideki, Oshima Atsunori, Abe Kazuhiro	4. 巻 65
2. 論文標題 Structural Basis for Binding of Potassium-Competitive Acid Blockers to the Gastric Proton Pump	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 7843 ~ 7853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.2c00338	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 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 1~7
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 Young Victoria C., Nakanishi Hanayo, Meyer Dylan J., Nishizawa Tomohiro, Oshima Atsunori, Artigas Pablo, Abe Kazuhiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Structure and function of H ⁺ /K ⁺ pump mutants reveal Na ⁺ /K ⁺ pump mechanisms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1~15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-32793-0	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3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kazuhiro Abe
2. 発表標題 How to make a Na ⁺ pump
3. 学会等名 The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuhiro Abe
2. 発表標題 Structural Physiology of the Gastric Proton pump and the Lipid Flippase
3. 学会等名 P-Type ATPases in Health and Disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部一啓
2. 発表標題 ナトリウムポンプのつくりかた
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（招待講演）
4. 発表年 2023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		
米国	Texas Tech	University of Kansas	