

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770098

研究課題名（和文） プロトン輸送性ピロホスファターゼの作動機構の結晶学的解明

研究課題名（英文） Structural analysis of H<sup>+</sup>-translocating inorganic pyrophosphatase

研究代表者

三村 久敏（HISATOSHI MIMURA）

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30463904

研究成果の概要（和文）：

プロトン輸送性ピロホスファターゼは、ピロリン酸を分解し、プロトンを輸送する膜タンパク質である。植物に広く分布し、真正細菌や古細菌の一部、マラリア原虫等の原生動物にも存在する。一方、ヒトを含む高等動物には存在しない。本研究では、植物の液胞膜に由来するタンパク質を対象として、X線結晶解析による構造解析を行なった。その結果、ピロリン酸のアナログ物質の中で最も強い阻害活性をもつ化合物を結合した状態の構造決定に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Proton-translocating inorganic pyrophosphatase is an electrogenic proton pump that uses inorganic pyrophosphate as the substrate. The members of this protein family are widely distributed in most plants, but only some protozoa, bacteria, and archaeobacteria. Although its importance in membrane transport systems, its coupling mechanism between the pyrophosphate hydrolysis and the active proton transport is still unknown. Here, structural study of the plant-derived enzyme was carried out.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析、膜タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

基本的な生命現象の一つに、膜を隔てた物質の輸送がある。細胞は膜輸送体の機能により様々な物質を輸送し、それらの濃縮や排出を行うことで、自らのエネルギー生産や変換、イオン恒常性の維持を行っている。膜輸送体は、ポンプ、キャリアー、チャネルに分類されるが、このうちポンプにはATP等の加水分

解によりイオンの能動輸送を行うものが含まれる。そのようなポンプの機能の一つは、プロトン等の濃度勾配によって電気化学ポテンシャルを形成し、キャリアーによる二次能動輸送系に駆動力を供給することである。膜を隔てて形成される物質の濃度勾配はチャネルによる受動輸送をも引き起こす。このため、膜輸送体の中でもとりわけポンプは、

膜輸送系の基盤を成す分子とも言える。その作動機構の解明は、学術的にはもとより、それを標的とした種々の感染症の治療薬開発という点からも重要な課題である。

## 2. 研究の目的

本研究で対象としたポンプは、ピロリン酸 (PPi) を基質として分解し、そのエネルギーを利用してプロトン ( $H^+$ ) を能動輸送するプロトン輸送性ピロホスファターゼ ( $H^+$ -PPase) である。 $H^+$ -PPaseはこれまでに詳しく研究が進められているP<sup>-</sup>、F<sup>-</sup>、V-ATPaseとは異なるイオンポンプである。その分子構造は、16本の膜貫通ヘリックスを含む分子量8万の単一ポリペプチドが二量体を形成すると考えられている。 $H^+$ -PPaseは植物に広く存在し、真正細菌や古細菌の一部、マラリア原虫等の原生動物にも存在する。一方、ヒトを含む哺乳類には存在しない。植物では主に液胞膜に局在し、V-ATPaseと共に液胞内腔の酸性化に寄与している。 $H^+$ -PPaseの生理機能は大きく二つに分けて考えることができる。第一は、膜を隔てた $H^+$ 勾配を形成し、二次能動輸送体に $H^+$ 駆動力を供給することである。第二は、DNA、RNA、蛋白質、ショ糖等の生合成過程で副産物として生じるPPiの分解除去である。細胞質へのPPiの蓄積は、これらの反応を阻害するため、細胞にとって有害に働くことが知られている。そのため、PPiは動物では可溶性PPaseによって分解されるが、植物では主に $H^+$ -PPaseによって分解される。応用面においては、 $H^+$ -PPaseを過剰発現させた植物体の耐塩性や耐乾燥性が大きく向上することが知られている。さらに、細胞代謝に阻害的に作用するPPiの除去効果により、成長促進やバイオマスの増大が期待されている。また、マラリア等の寄生性原生動物に対する薬剤の標的分子としての可能性についても言及されている。 $H^+$ -PPaseとこれまでに立体構造が明らかにされた膜蛋白質の間にアミノ酸配列上の類似性は見出されていない。そのため、 $H^+$ -PPaseは全くの新規構造とメカニズムをもつことが予想される。本研究では、 $H^+$ -PPaseの作動機構の解明を目指し、X線結晶解析による原子構造の決定を目的とした

## 3. 研究の方法

X線結晶解析によって原子構造を決定するためには、対象とする蛋白質を高い純度で精製し、結晶化する必要がある。 $H^+$ -PPaseの精製は、植物体を材料として行った。まず、緑豆もやしから液胞膜を調製し、界面活性剤を用いて可溶化することにより、 $H^+$ -PPaseを抽出した。次に、 $H^+$ -PPaseを特異的に認識するリコンビナント抗体断片 (Fv) を結合させ、Fvに付加されたStrep-tagを利用し、

$H^+$ -PPase-Fv複合体としてアフィニティー精製を行った。 $H^+$ -PPaseとFvは、高濃度の塩とPPiのアナログ物質を含むバッファーで平衡化したゲル濾過クロマトグラフィーによって分離し、 $H^+$ -PPaseのみを単離した。 $H^+$ -PPaseの結晶化は、基質アナログの中で最も強い阻害活性をもつアミノメチレンビスホスホン酸 (AMBP) を加え、蒸気拡散法によって行った。結晶の回折データの測定は、大型放射光施設SPring-8 (播磨) のビームラインBL41XUにおいて行った。位相決定は、ソーキングにより重原子誘導体結晶を調製し、多重同型置換法 (MIRAS) によって行った

## 4. 研究成果

AMBPを結合した $H^+$ -PPaseを結晶化し(図1)、2.0 Å分解能で構造決定に成功した(図2)。 $H^+$ -PPaseの構造は予想どおり新規の構造であり、16本の膜貫通ヘリックス(TM)を含む単量体がホモ二量体を形成していた。しかし、TMは予想していたよりも遙かに長く、細胞質側まで伸びていた。結晶には脂質が多く含まれており、 $H^+$ -PPaseには多数の脂質が結合していた。これにより、膜貫通領域を正確に見積もることができた。基質結合部は酵素の中心にある6本のヘリックスで形成され、酸性残基に配位した $Mg^{2+}$ によってAMBPを結合していた(図3)。結晶を用いた $Mn^{2+}$ による置換実験からは、基質結合部に5箇所、液胞内腔側に1箇所の $Mg^{2+}$ 結合部位を同定した(図4)。本研究で得られた重要な成果の一つとして、AMBPの結合様式が明らかになった点が上げられる。AMBPは可溶性PPaseと比較すると $H^+$ -PPaseに特異的で、基質アナログの中でも最も強い阻害活性を示す。その理由は、AMBPの $\alpha$ -NH<sub>2</sub>がTM12に位置する保存されたアスパラギン及びアスパラギン酸残基と水素結合を形成し、ヘリックスを固定するように結合しているためであると理解された。得られた構造情報は、より強い阻害活性をもつ強力な阻害剤の開発にとっても有用であると考えられる。 $H^+$ 輸送に関係する残基としては、TM6の膜内領域に $H^+$ を直接結合すると考えられるグルタミン酸残基(E301)が見つかった(図5)。E301を挟み、細胞質側にはアスパラギン酸(D294)とアスパラギン(N738)によって形成されるゲートが存在し、液胞内腔側には疎水性残基のクラスター(L555、V746、V749)によって形成されるゲートが存在することも明らかになった。E301は両ゲートを境に蛋白質内部の水分子からは隔離された状態で存在し、周辺にはE301の負電荷を打ち消す塩基性アミノ酸残基も存在しないことから、本研究で得られた構造はE301に $H^+$ を結合した状態であると考えられる。 $H^+$ -PPaseはこれら2つのゲートの開閉を基質の結合や分解によって制御し、酸性残基と水分子の関係を適切

に調整することによって、H<sup>+</sup>の結合、閉塞、解離といったイオンポンプに求められる一連の反応を行っていると考えられる。今後は、基質アナログを結合していない状態や酸性pH等のこれまでとは異なる条件においても結晶化実験を行い、反応サイクルにおける異なる状態の構造を決定することによって、H<sup>+</sup>-PPaseの反応機構の解明を目指したい。

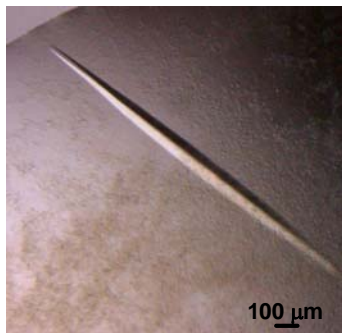


図 1. H<sup>+</sup>-PPaseの結晶

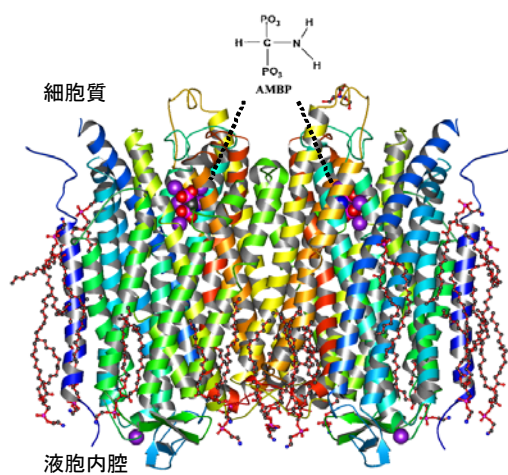


図 2. H<sup>+</sup>-PPaseの構造

Anomalous 3.0  $\sigma$   
 $|F_o(\text{Mn}^{2+})| - |F_o(\text{Mg}^{2+})|$  3.5  $\sigma$  (2.4 Å)

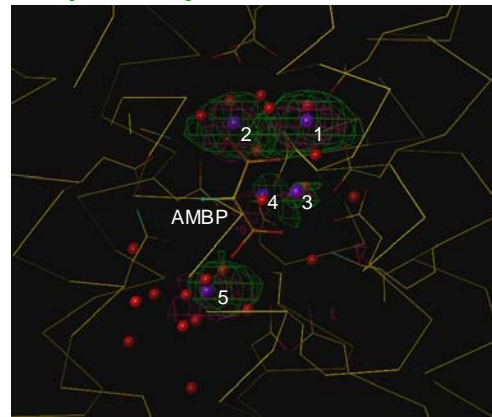


図 3. 基質結合部位

Anomalous 4.0  $\sigma$   
 $|F_o(\text{Mn}^{2+})| - |F_o(\text{Mg}^{2+})|$  5.0  $\sigma$  (2.4 Å)

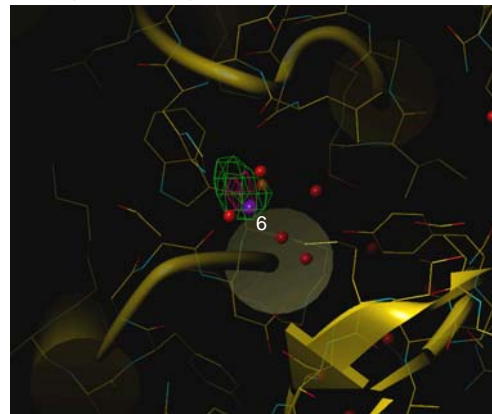


図 4. 液胞内腔側Mg<sup>2+</sup>結合部位

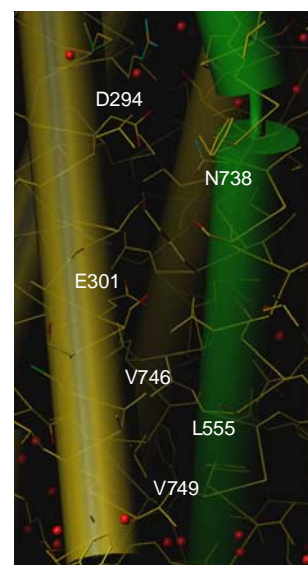


図 5. H<sup>+</sup>結合部位

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三村 久敏 ( HISATOSHI MIMURA )  
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
研究者番号：30463904

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：