

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26711005

研究課題名(和文) 最大級のイオン濃度勾配を形成する胃プロトンポンプ作動機構の解明

研究課題名(英文) Investigation for the mechanism of the gastric proton pump that generates the steepest cation gradient

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) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：胃プロトンポンプは胃酸分泌を担う膜タンパク質であり、故に胃酸抑制剤のターゲット分子である。本研究課題では、胃プロトンポンプを対象とした、電子線結晶学による立体構造解析、及び変異体による機能解析や高分解能構造解析を見据えた哺乳動物細胞発現系の構築を行った。胃酸抑制剤結合状態における構造を6.5 Åで決定し、変異体及び胃酸抑制剤の類縁化合物を組み合わせた機能解析と併せて、胃酸抑制剤の結合部位を推定した。哺乳動物細胞による大量発現系を構築し、三次元結晶を得ることに成功した。X線結晶構造解析によって、H⁺を胃の中に輸送するメカニズムが理解できた。

研究成果の概要(英文)：Gastric proton pump is a membrane protein responsible for the gastric acid secretion, therefore it is a molecular target for the anti-ulcer drug. In this research, we attempt to determine its structure by both electron and X-ray crystallography, and establish a large-scale expression system using mammalian cells for the functional analysis and X-ray crystallography. We proposed the binding model of acid suppressants to the gastric proton pump, by using electron crystallographic structure analyzed at 6.5 Å resolution, which is conformed by the mutagenesis and derivatives of acid suppressants. Furthermore, we successfully established the mammalian cell expression system, which allow us to generate 3D crystals for X-ray. Determined structure reveals the mechanism of proton extrusion to the highly acidic solution of the stomach.

研究分野：膜輸送体

キーワード：P型ATPase 膜タンパク質 電子顕微鏡 膜輸送体 胃プロトンポンプ

1. 研究開始当初の背景

形質膜を隔てた物質不均衡を担う能動輸送体、中でも P-type ATPase の研究は、古くからの反応速度論や変異体における解析、および Ca^{2+} -ATPase や Na^+, K^+ -ATPase の原子分解能の構造によって、非常に良く理解されてきた。しかしながら、P-type ATPase の中でも最大のカチオン濃度勾配 (H^+ 濃度勾配にして $10^6 =$ 百万倍) を形成することができる胃プロトンポンプ、 H^+, K^+ -ATPase (図 1) の構造情報は、申請者の行ってきた二次元結晶による 7-10 Å 程度に制限されていた。

2. 研究の目的

P-type ATPase のメンバーの中でも、熱力学的に限界に近い H^+ 濃度勾配を作り出すことができる H^+, K^+ -ATPase の作動機構の理解が目的である。この為には高分解能の構造解析、輸送反応サイクルにおける異なる中間体の構造、および様々な手法を駆使した機能解析が必要である。

また、哺乳動物細胞による大量発現系の構築も目標に掲げた。これは、変異体による機能解析に利用できることは勿論、高分解能構造解析にも重要である、天然物 (ブタ胃) から調製するサンプルに特有の不均一な翻訳後修飾が高分解能構造解析を妨げているのであれば、発現系による組み替え体は結晶化に適したサンプルの調製に重要であると考えられるからである。

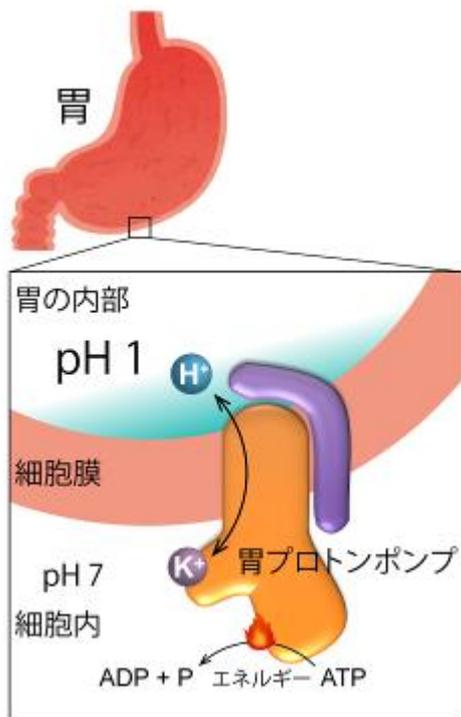


図 1 胃プロトンポンプ H^+, K^+ -ATPase

3. 研究の方法

(1) 電子線結晶学

ブタ胃より精製したタンパク質サンプルを用いて、脂質膜に再構成することで得られる

二次元結晶を極低温電子顕微鏡で撮影し解析した。

(2) 動物細胞発現系

胃プロトンポンプ高分解能構造解析の達成を妨げているものは何か? 至った結論はナチュラルソースからの精製、である。豚の胃壁細胞からは一度に大量の H^+, K^+ -ATPase が調整できるという大きな利点があるが、これらは生体内で様々な修飾をうけている。特に問題となるのが糖鎖修飾である。βサブユニットには N 型糖鎖付加サイトが 6 つ存在し、コア分子量が 35 kDa であるにも関わらず、電気泳動上では 70-90 kDa に渡って不均一な分布を示す。

そこで本研究では、胃プロトンポンプの発現系として動物細胞発現系 (図 2, BacMam system, Goehring A. et al., 2014, Nat Protocol) を活用した。特に哺乳類の P-type ATPase は活性発現にコレステロールを要求するものが多く、これを持たない酵母や昆虫細胞では実際に高発現が得られない。ベクターとしてプロモーター領域を改変したバキュロウイルスを用いることで、目的分子だけを一過的に効率よく発現させることができる。スケールアップも容易であり、リッター単位の培養にも適応できる。糖鎖成熟過程に関与する酵素 (GnT1) をノックアウトした細胞株を利用することで、すべての糖鎖が High Mannose 型にプロセスされた状態になり、これらは容易に糖鎖切断酵素によって除去することが可能である。この動物細胞発現系の有用性はまた、他のイオンポンプの発現にもその威力を如何なく発揮する。事実、他のプロジェクトで推進している哺乳類の P4-ATPase は、同様に昆虫細胞では発現が困難であるが、動物細胞発現系を用いた大量精製に成功している。

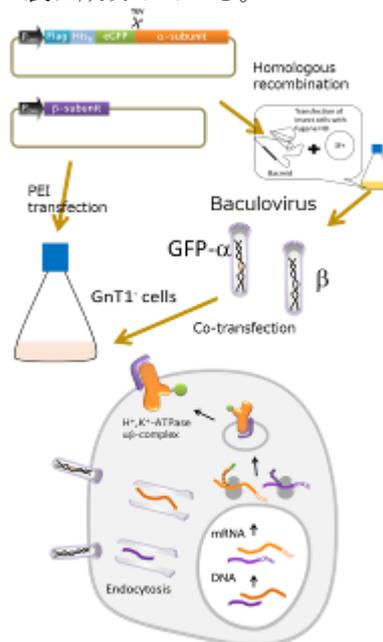


図 2 BacMam expression system

(3) X線結晶構造解析

上述(2)の発現系によって得られた均一なタンパク質標品を用いることで、三次元結晶を得ることができた。脂質存在下で結晶化することで、分子が脂質二分子膜に再構成された二次元結晶が重なったような、いわゆる Type I の三次元結晶が得られた。

4. 研究成果

(1) イオン輸送サイクルの構造解析

輸送イオンを胃内腔へと放出した後、イオン輸送ゲートを閉じる際に起こる構造変化を、いくつかの異なるコンフォメーションの二次元結晶を解析することで明らかにした(図3, Abe et al., 2014 J Biol Chem)。

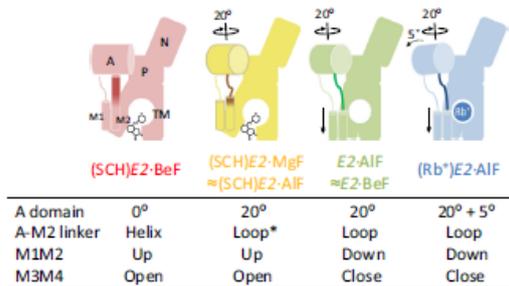


図3 Luminal gatingに伴う構造変化

(2) 電子線結晶学と変異体による胃酸抑制剤結合状態の推定

電子線結晶学により、胃酸抑制剤の類縁化合物が結合した構造を6.5 Å分解能で解析した(図4)。得られた構造中、胃内腔側へ向け開かれた窪みに化合物が結合していることが判明したが、この分解能では、化合物の詳細な結合状態を決定することができなかった。そこで、得られた構造にホモロジーモデルをフィッティングし、化合物の結合位置を限定したドッキングシミュレーションを行

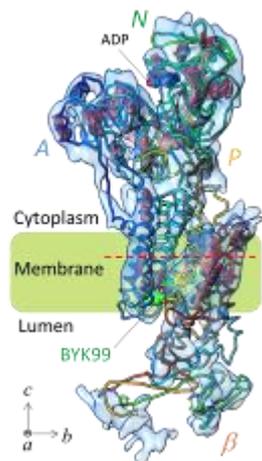


図4 BYK99結合構造

った。結合部位付近に変異導入を行い、薬剤に対する親和性の影響を検討することで、結合状態を絞り込むことに成功した(Abe et al., 2017 Sci Rep)。

(3) X線結晶学による高分解能構造解析

これまでに得られた H,K-ATPase の二次元結晶は、結晶格子中における分子同士の相互作用が全て細胞質ドメイン間に存在し、膜貫通領域や糖鎖修飾を受ける細胞外ドメインは関与していない、非常に疎なものであった。阻害剤や基質アナログによって酵素活性を完全に阻害(つまりタンパク質の動きを止める)しても、分解能が制限されるのは、このような疎な crystal packing に起因するという作業仮説に基づき、糖鎖の除去が可能である組み替え体を上述の発現系によって取得することで三次元結晶の作製を試みた。他の P-type ATPase において実績のある、脂質存在下における結晶化の結果、良質な三次元結晶が得られ、2.8 Å 分解能で構造解析することができた(図5, Abe et al., 2018 Nature)。三次元結晶が得られ、高分解能構造解析の見通しがたったので、以降の研究を再構築するために、期間中に基盤研究 B へと応募、採択された。従って、これ以降の研究結果は基盤研究 B の成果ということになるが、その礎は若手研究 A で培われたものである。

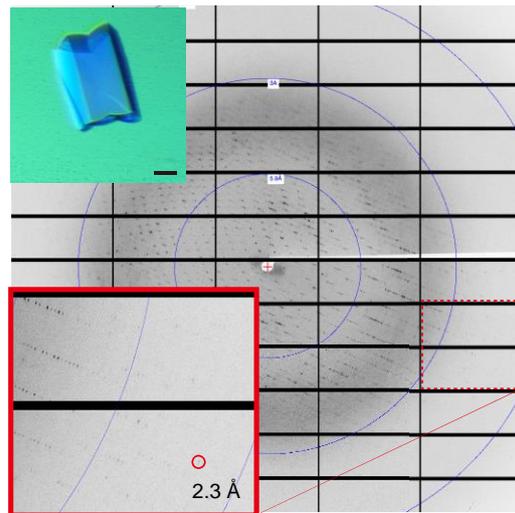


図5 H⁺,K⁺-ATPase の三次元結晶とその X 線回折像

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Abe K., Irie K., Nakanishi H., Suzuki H., Fujiyoshi Y. Crystal structures of the gastric proton pump. Nature 2018 in press (査読有)
- ② Abe K. et al. The cryo-EM structure of gastric H⁺,K⁺-ATPase with bound BYK99, a high-affinity member of K⁺-competitive, imidazo[1,2-a]pyridine inhibitors. Sci. Rep. 7, 6632, 2017 (査読有)

- ③ Abe K. and Fujiyoshi Y. Cryo-electron microscopy for structural analyses of membrane proteins in the lipid bilayer. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 39, 71-79, 2016 (査読無)
- ④ Abe K. Two-dimensional crystallization of gastric H⁺,K⁺-ATPase for structural analysis by electron crystallography. *Methods in Mol. Biol.*, 1377, 433-458, 2016 (査読有)
- ⑤ Abe K., Olesen C. Isolation of H⁺,K⁺-ATPase-enriched membrane fraction from pig stomach. *Methods in Mol. Biol.*, 1377, 19-28, 2016 (査読有)
- ⑥ Abe K., Tani K., Fujiyoshi Y. Systematic comparison of molecular conformations of H⁺,K⁺-ATPase reveals an important contribution of the A-M2 linker for the luminal gating. *J. Biol. Chem.*, 289, 30590-30601, 2014 (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

- ① Abe K. Structural and functional analysis of gastric proton pump and acid suppressants. ConBio2017, Kobe, Japan, 2017 (invited)
- ② Abe K. Structural and functional analysis of gastric H⁺K⁺-ATPase. The 15th international conference on Na,K-ATPase and related transport ATPases. Otsu, Japan, 2017 (invited)
- ③ 阿部一啓 胃プロトンポンプの構造生理学 千里ライフサイエンスセミナー 大阪 2016(招待講演)
- ④ Abe K. Electron crystallographic analysis of gastric proton pump. IPR seminar "Introduction and overview of cryo-electron microscopy" Osaka, Japan, 2016
- ⑤ Abe K. Antagonist-bound structure of gastric proton pump. 生物物理学会年会, 2015(招待講演)
- ⑥ Abe K. Structural physiology of gastric proton pump. Denmark-Japan joint workshop on ion transport proteins. Riken, Yokohama, 2015 (invited)
- ⑦ 阿部一啓 systematic comparison of the molecular conformation of gastric H⁺,K⁺-ATPase in E2P state analogs. 日本生体エネルギー研究会, 愛媛大学, 2014 (招待講演)
- ⑧ 阿部一啓 胃プロトンポンプ H⁺,K⁺-ATPase の構造生理学. 九州地区生理薬理研究会, 福岡医科大学, 2014 (招待講演)
- ⑨ 阿部一啓 胃プロトンポンプの構造生理

- 学. 第9回トランスポーター研究会, 名古屋市立大学, 2014 (招待講演)
- ⑩ Abe K. Structural and biochemical analysis of gastric H⁺,K⁺-ATPase in E2P analogue conformation. 14th International conference NaK-ATPase and related ATPases, Lunteren, Netherlands, Sep. 2014 (invited)
- ⑪ Abe K. Electron crystallographic analysis of gastric proton pump. JEM Next-Generation Microscopy Sciences. Awaji, Japan, 2014 (invited)

[その他]
 ホームページ等
<http://www.cespi.nagoya-u.ac.jp/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 阿部一啓 (Abe Kazuhiro)
 名古屋大学 細胞生理学研究室
 准教授
 研究者番号 : 60596188