

令和 3 年 4 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03653

研究課題名(和文) 胃プロトンポンプの構造生理学研究

研究課題名(英文) Structural physiology of the gastric proton pump

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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：胃プロトンポンプの高分解能構造を決定し、なぜ我々の胃の中が強い酸性になっているのかが分子レベルで理解できた(Abe et al., 2018, Nature)。K⁺結合構造も解析し、輸送するイオンの個数を明確に決定、限られたエネルギーによって胃に強酸を輸送する仕組みを明らかにした(Yamamoto et al., 2019, eLife)。
我々はまた、アポトーシスに関わる脂質フリッパーゼの構造解析に成功し(Nakanishi et al., 2020, JBC; Nakanishi et al., 2020, Cell Rep)、その分子メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

少なくともヒトの組織において最大のイオン濃度勾配を作り出すことのできる胃プロトンポンプの最も重要なメカニズム『どのようにしてpH1もの強酸(胃酸)に対してH⁺を輸送することができるのかが明らかになった。不快な胸焼けを伴う胃炎は、胃の中が強い酸性の為に引き起こされる。胃プロトンポンプの高分解能構造は、現在臨床利用される胃酸抑制剤の改良や、新たな作用機序をもった薬剤の論理的設計に資する。脂質フリッパーゼの構造解析によって、イオンポンプと近縁のタンパク質でありながら、どのようにイオンと比して巨大な基質(リン脂質)を輸送できるのか、その分子メカニズムを明らかにした。』

研究成果の概要(英文)：We determined high-resolution structures of the gastric proton pump, which provide molecular basis of how this pump acidify our gastric juice down to pH 1 (Abe et al., 2018, Nature). We also determined K⁺-bound form of the proton pump to show unequivocally its transport stoichiometry (Yamamoto et al., 2019, eLife).
We further determined crystal and cryoEM structures of phospholipid flippase, and revealed its molecular mechanisms.

研究分野：機能生物化学 構造生物角

キーワード：機能生物化学 膜タンパク質 P型ATPase 胃プロトンポンプ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜を隔てた物質不均衡とは生命の根幹である。この不均衡は、P-type 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-type 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-type 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触媒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な分子が『胃プロトンポンプ』 H^+ , K^+ -ATPase である。

胃プロトンポンプは胃酸分泌時の胃内腔を pH1 という強酸性に保つ。この生理現象は食物消化にとって重要であり、またこの分子が巨大なマーケットを持つ潰瘍治療薬の標的分子となる理由である。この時、細胞膜を隔てた H^+ の濃度差は 100 万倍にも達し、これは少なくとも哺乳類では最大のイオン濃度勾配である。他の ATPase には達成できない巨大なイオン濃度勾配を H^+ , K^+ -ATPase がどのように達成しているかに興味を持たれる。

申請者はこれまで、胃プロトンポンプを対象とした電子線結晶学による構造機能解析研究を展開してきた。ここまで幾つかの異なるコンフォメーションを 7Å 程度の分解能で解析し、この分子にユニークなメカニズムを発見してきた。しかしながら、100 万倍の H^+ 濃度勾配を作り出すメカニズムを理解する為には、高分解能の構造情報が必須である。

2. 研究の目的

細胞膜を隔てたイオンの能動輸送を触媒する P-type ATPase の中でも『最大のイオン濃度勾配』を形成できる胃プロトンポンプを理解する為の構造機能研究を行う。これまでに構築してきた哺乳類イオンポンプの大量発現に最適なシステムを利用し、X線結晶学により原子モデル構築を、クライオ電顕単粒子解析によりダイナミックな構造変化に迫る。発現系を利用することにより、変異体の構造解析は勿論、 H^+ の代わりに Na^+ も輸送できる non-gastric プロトンポンプ構造解析の足掛かりを得る。

さらに、同じ P 型 ATPase に分類されながら、イオンと比して巨大な脂質を輸送する脂質フリッパーゼの構造機能解析によって、その分子メカニズムを理解する。

3. 研究の方法

動物細胞発現系

バクテリアや酵母のオルソログではなく、創薬ターゲットとして直ちに価値を持つヒトのタンパク質の構造機能解析の為に、動物細胞発現系によって試料を大量に得る

X線結晶学

すでに得られている三次元結晶を最適化し原子分解能へ

クライオ電顕単粒子解析

反応中間体の構造を『結晶化』することなく迅速に取得することでダイナミクス理解へ

反応速度論解析及び一分子輸送アッセイ

構造に立脚した変異体のデザインと確立された機能解析による雄弁な検証

計算機によるメカニズムの検証

プロトンの配位状態に対して計算科学によって切り込む

4. 研究成果

胃プロトンポンプの結晶構造解析

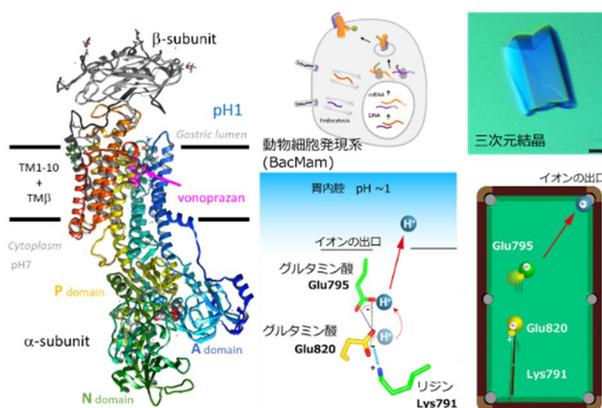
胃プロトンポンプと胃酸抑制剤との複合体の結晶構造を 2.8Å 分解能で 2 つ決定した。胃酸抑制剤の結合構造が初めて明らかとなり、今後の論理的な薬剤設計に道を開いた。

また、カチオン結合部位の構造から、胃プロトンポンプが強酸性 (pH 1) の胃液に対してどのようにして H^+ を排出するかが初めて分子レベルで説明された (右図、Abe et al., 2018, *Nature*)。

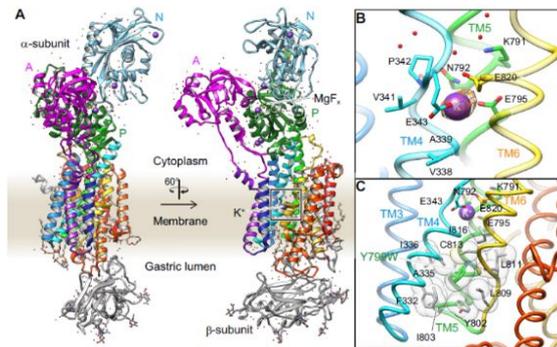
胃プロトンポンプの K^+ 結合構造

胃プロトンポンプのイオン輸送化学量論

は当時明らかになっておらず、この問題は ATP の限られたエネルギーをどのように利用するかという熱力学的な考察と関連することから重要である。そこで結晶構造解析によって結合したイオンの数を明らかにした。胃プロトンポンプには K^+ が 1 つだけカチオン結合サイトに結合し

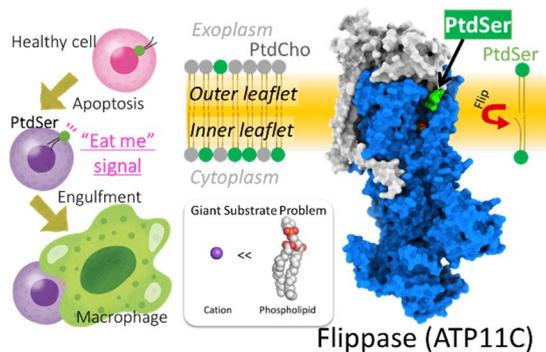


ており、これは近縁のナトリウムポンプ(2つのK⁺を結合し輸送する)と対照的な結果であった。胃プロトンポンプでは、ナトリウムポンプにおける2つのK⁺結合部位のうち、1つがH⁺の排出に重要なアミノ酸によって占有されており、その為に輸送するイオンの数が制限されることが明らかになった(右図、Yamamoto et al., 2019, *eLife*)。



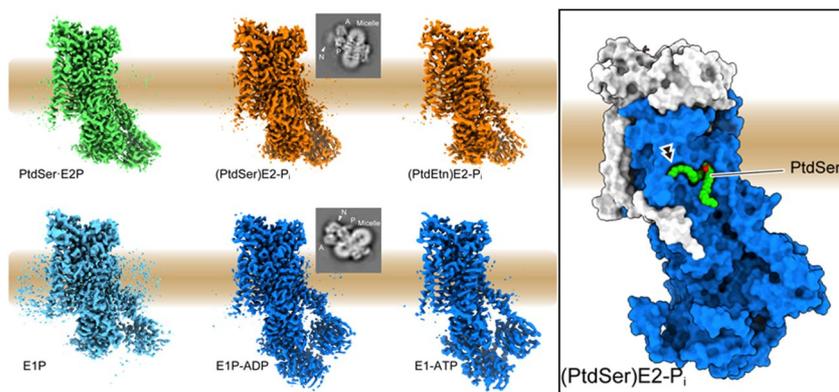
脂質フリッパーゼの結晶構造

アポトーシスの際に『Eat me』シグナルとして働くフォスファチジルセリン(PS)は、脂質フリッパーゼ ATP11C がこれを細胞膜外葉から内葉へと輸送することで、生細胞では細胞膜内葉に偏在する。死細胞ではPSが露出し、マクロファージがこれを認識して貪食することで、生体内での不要な炎症を抑えている。アポトーシスに依存したPSの露出は、ATP11Cがカスパーゼによって切断、失活することで引き起こされる。従ってATP11Cは『死を司るポンプ』ともいふべき重要な分子である。このフリッパーゼの結晶構造解析と補完的に機能解析を組み合わせることで、カスパーゼの切断サイトの構造や、脂質が輸送される通り道を初めて同定した(右図、Nakanishi et al., 2020, *JBC*)。



脂質フリッパーゼの異なる反応中間体のCryo-EM構造

ATP11Cの脂質輸送反応を理解する為に、複数のカギとなる反応中間体の構造をCryoEMによって決定した。脂質を結合した3つの構造を含む、5つの異なる反応中間体の構造、合計6つの構造解析によって、イオンと比して巨大なリン脂質がどのように細胞膜外葉から取り込まれ、どのようにタンパク質内部に閉塞されるのか、これら一連の構造変化がATPの加水分解とどのように共役しているのか、またPSとPCはどのように見分けられるのか等々、様々な重要な問いに回答を与えた(下図、Nakanishi et al., 2020, *Cell Rep*)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakanishi Hanayo, Irie Katsumasa, Segawa Katsumori, Hasegawa Kazuya, Fujiyoshi Yoshinori, Nagata Shigekazu, Abe Kazuhiro	4. 巻 295
2. 論文標題 Crystal structure of a human plasma membrane phospholipid flippase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 10180 ~ 10194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014144	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 K. Yamamoto, V. Dubey, K. Irie, H. Nakanishi, H. Khandelia, Y. Fujiyoshi, K. Abe	4. 巻 8
2. 論文標題 A single K ⁺ -binding site in the crystal structure of the gastric proton pump	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e47701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.47701	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 A. Urbani, V. Giorgio, A. Carrer, C. Franchin, G. Arrigoni, C. Jiko, K. Abe, S. Maeda, K. Shinzawa-Itoh, J. F. M. Bogers, D. G. G. McMillan, C. Gerle, I. Szabo, P. Bernardi	4. 巻 10
2. 論文標題 Purified F-ATP synthase forms a Ca ²⁺ -dependent high-conductance channel matching the mitochondrial permeability transition pore	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 4341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12331-1	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 Simon Miller, You Lee Son, Yoshiki Aikawa, Eri Makino, Yoshiko Nagai, Ashutosh Srivastava, Tsuyoshi Oshima, Akiko Sugiyama, Aya Hara, Kazuhiro Abe, Kunio Hirata, Shinya Oishi, Shinya Hagihara, Ayato Sato, Florence Tama, Kenichiro Itami, Steve A. Kay, Megumi Hatori & Tsuyoshi Hirota	4. 巻 in press
2. 論文標題 Isoform-selective regulation of mammalian cryptochromes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat. Chem. Biol.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.10.8/s41589-020-0505-1	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, Irie Katsumasa, Nakanishi Hanayo, Suzuki Hiroshi, Fujiyoshi Yoshinori	4. 巻 556
2. 論文標題 Crystal structures of the gastric proton pump	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 214 ~ 218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-018-0003-8	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 Dubey Vikas, Han Minwoo, Kopec Wojciech, Solov'yov Ilia A., Abe Kazuhiro, Khandelia Himanshu	4. 巻 8
2. 論文標題 K ⁺ binding and proton redistribution in the E2P state of the H ⁺ , K ⁺ -ATPase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-30885-w	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, Shimokawa Jun, Naito Mao, Munson Keith, Vagin Olga, Sachs George, Suzuki Hiroshi, Tani Kazutoshi, Fujiyoshi Yoshinori	4. 巻 7
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-06698-8	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

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 15件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 阿部一啓
2. 発表標題 『細胞死を司るポンプ』脂質フリッパーゼATP11Cの結晶構造とCryoEM構造
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿部一啓
2. 発表標題 細胞膜フリッパーゼATP11Cの構造機能解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuhiro Abe
2. 発表標題 Crystal structures of the gastric proton pump - molecular basis for the binding of acid suppressants, H ⁺ -extrusion and K ⁺ -counter-transport
3. 学会等名 日本薬学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuhiro Abe
2. 発表標題 Structural basis of the proton extrusion mechanism of the gastric proton pump
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuhiro Abe
2. 発表標題 Molecular mechanisms for the drug binding, H ⁺ -extrusion and the K ⁺ counter-transport
3. 学会等名 Academia Sinica IBC seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiro Abe
2. 発表標題 Crystal structure of the gastric proton pump
3. 学会等名 World Laureates Forum 2nd conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部一啓
2. 発表標題 X線結晶学とクライオ電顕で得られた構造情報の上手な活用法 - 胃プロトンポンプの構造解析を例として -
3. 学会等名 2019年度生理研研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiro Abe
2. 発表標題 胃プロトンポンプの輸送機構に対する構造基盤
3. 学会等名 生物物理第57回年会 台湾 日本 二国間シンポジウム: X線結晶構造解析とクライオ電顕2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiro Abe
2. 発表標題 Structural basis for the H ⁺ -extrusion and the K ⁺ -occlusion of the gastric proton pump
3. 学会等名 Society of General Physiology /SOBLA 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部一啓
2. 発表標題 胃の強酸性化の分子メカニズム 胃プロトンポンプの結晶構造解析
3. 学会等名 生体エネルギー研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Abe K
2. 発表標題 Crystal structures of the gastric proton pump
3. 学会等名 AsCA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部一啓
2. 発表標題 胃の強酸性化の秘密
3. 学会等名 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 平成30年度BINDS公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部一啓
2. 発表標題 胃プロトンポンプの結晶構造によって明らかになったH ⁺ 排出機構
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Abe K
2. 発表標題 Structural basis for the H ⁺ extrusion and the transport stoichiometry of the gastric proton pump
3. 学会等名 Frontiers in P-type ATPase Research 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Abe K.
2. 発表標題 Structural and functional analysis of gastric H ⁺ ,K ⁺ -ATPase
3. 学会等名 The 15th international conference on Na,K-ATPase and related transport ATPases（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Abe K.
2. 発表標題 Structural and functional analysis of gastric proton pump and acid suppressants
3. 学会等名 ConBio2017（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞生理学研究センター
http://www.cespi.nagoya-u.ac.jp/BasicBiol/kabe/2018_HP_Abe.pdf

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
---------	---------