

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24870014

研究課題名(和文)電子線結晶学と酵素化学的研究に基づいた胃プロトンポンプのユニークな作動機構の解明

研究課題名(英文)Unique mechanisms of gastric proton pump revealed by

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・助教

研究者番号：60596188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：食物消化時の胃内部はpH1という強酸性状態は、胃プロトンポンプ  $H^+,K^+$ -ATPaseの駆動により達成されており、それゆえ胃潰瘍等の治療における薬剤の標的分子である。このポンプは他のイオンポンプには達成できない100万倍もの $H^+$ 濃度勾配を作り出すことができ、このメカニズムの解明が重要である。

カーボンサンドイッチ法を応用した電子線結晶学による構造解析によって、一つだけ $Rb^+$ が結合した構造解析に成功し、 $H^+,K^+$ -ATPaseが一度に輸送するイオンの量を変化させるというユニークな戦略によって、100万倍の $H^+$ 濃度勾配を達成していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In response to food intake, pH of our stomach reaches around 1. This highly acidic environment is generated by Gastric proton pump,  $H^+,K^+$ -ATPase, therefore a prominent drug target for the acid-related diseases. Besides its significant interest as a drug target, gastric  $H^+,K^+$ -ATPase faces a remarkable task of pumping protons against a million-fold gradient ranging from pH 7 in the cell to 1 in the stomach. Maintaining a potent concentration gradient of six orders of magnitude is hardly met by any other membrane pump in nature. How does the proton pump generate a million-fold  $H^+$  gradient?

A key requirement is the transport stoichiometry. By determining a single  $Rb^+$ -bound structure of  $H^+,K^+$ -ATPase by electron crystallography of 2D crystals prepared by improved carbon sandwich method, we showed the unique structural evidence of  $1H^+/1Rb^+/1ATP$  transport mode, which is prerequisite for the generation of the potent proton gradient across the membrane.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：生体エネルギー変換 胃プロトンポンプ P型ATPase 膜タンパク質 極低温電子顕微鏡 電子線結晶学

### 1. 研究開始当初の背景

ストレスの多い現代社会では、食の欧米化やピロリ菌の感染も手伝って胃に与える負担が増加し、重篤な場合は胃潰瘍や逆流性食道炎を引き起こす。またアジア圏に分布するピロリ菌は欧米型と比べ胃ガンを引き起こすリスクが高いと言われている。上記の症状の改善およびピロリ菌の除菌時には胃酸抑制剤が用いられる。その世界市場が2兆円という規模であることから、人類の健康維持にとって重要な薬剤のうちの一つである。この薬剤がターゲットとするのが、胃プロトンポンプ、 $H^+,K^+-ATPase$  である。このポンプの駆動によって胃内部は pH1 という強酸性状態（細胞内外での  $H^+$  濃度勾配として 100 万倍）に曝される。なぜ  $H^+,K^+-ATPase$  は他のイオンポンプには達成できないようなイオン濃度勾配を形成できるのか？ という問題は長い間解決されていない生物学上の重要な問題である。

### 2. 研究の目的

胃プロトンポンプ  $H^+,K^+-ATPase$  の駆動によって pH1 という環境 (100 万倍の  $H^+$  濃度勾配) が作り出される仕組みを分子レベルで理解すること、そして新たな胃酸抑制剤の開発に資することを目指す。この為に電子線結晶学によって生理的な環境に近い脂質膜中での構造解析を行う。得られた立体構造に基づいた生化学的及び酵素化学的な測定によって、機能的な側面を理解する。これら2つの方向性での研究を密接に組み合わせた構造機能連関によって、 $H^+$  輸送に特化したイオンポンプのユニークな作動機構を理解する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 電子線結晶学による立体構造解析

膜タンパク質が有るべき脂質二分子膜中での構造解析が可能な二次元結晶を作成し、電子線照射によるダメージを抑える為に液体ヘリウム温度まで試料を冷却できる極低温電子顕微鏡を用いてデータ収集することで、膜タンパク質にとって自然な構造を高分解能で得ることができる。

#### (2) 二次元結晶の極低温電子顕微鏡サンプル調整法

非常に脆く壊れやすい二次元結晶は、電子顕微鏡観察用の試料作成時に容易に崩壊することが多い。カーボンサンド法を適用することで試料作成時の乾燥を抑え、構造解析を行った (4.研究成果参照)。

#### (3) 機能解析

##### 酵素化学的反応速度論による機能解析

ATP の加水分解と共役したイオン輸送を行う P 型 ATPase は、遊離リン酸を測定することでその酵素化学的な反応を追跡することが出来るので、古くから反応速度論的な研究が多くなされている。結晶化条件のコンフォーメー

ションの帰属等の機能解析の為にこの手法を利用した。

#### (4) 輸送基質 $^{86}Rb^+$ の閉塞量測定

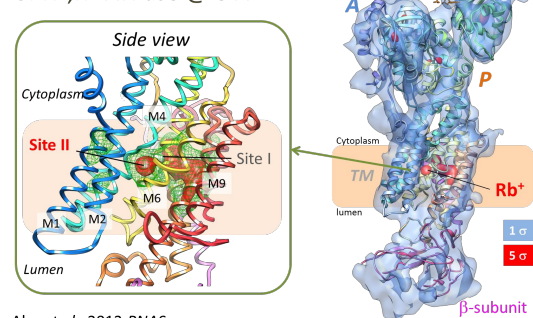
$Rb^+$  は  $Tl^+$  と同様  $K^+$  の同族体として  $H^+,K^+-ATPase$  の輸送基質として振る舞う。放射性同位体が利用可能であり、このイオンの酵素への閉塞量を測定することで、輸送イオンの化学量論を測定できる。

### 4. 研究成果

#### (1) 電子線結晶学による $Rb^+$ 結合構造の解析

$H^+,K^+-ATPase$  は ATP の化学エネルギーをイオン濃度勾配へと変換させるという性質上、イオン輸送化学量論は 100 万倍の  $H^+$  濃度勾配を達成するためのカギになる。過去の報告によれば、中性状態において 1 分子の ATP 加水分解当たり 2 つの  $H^+$  と 2 つの  $K^+$  が対抗輸送される。しかしながら、生理的条件下 (pH 1) において、1 分子の ATP 加水分解によって得られる自由エネルギー (-13 kcal/mol) では 2 つの  $H^+$  を同時に輸送した場合 100 万倍の  $H^+$  濃度勾配 (-16.7 kcal/mol) を作り出すことは熱力学的に不可能である。我々は弱酸性条件下において  $H^+,K^+-ATPase$   $Rb^+$  結合状態の構造解析を電子線結晶学によって行い、そのイオン結合部位の一つだけ  $Rb^+$  を結合した状態を捉えた (図 1)。この結果は  $^{86}Rb^+$  閉塞量の測定結果とも一致した。これらの結果から、限られた ATP 加水分解エネルギーを効率的に利用する為に、 $H^+,K^+-ATPase$  はイオン輸送化学量論を pH に応じて 2 から 1 へと変化させるというユニークな戦略を用いて、100 万倍もの  $H^+$  濃度勾配を作り出すことが明らかになった [雑誌論文]。

$Rb^+$ -bound E2~AIF structure of  $H^+,K^+-ATPase$  @ 8 Å



Abe et al., 2012 PNAS

図 1  $H^+,K^+-ATPase$   $Rb^+$  結合構造

#### (2) 一方向性輸送モデル

$Rb^+$  結合構造においても一つ注目すべき点は、 $Rb^+$  非結合状態において P ドメインと結合していた  $\beta$  サブユニットの N 末端が解離している点である。この相互作用は E2P 中間体を安定化して逆反応を抑える『ラチェット』として機能することを以前報告している [Abe K. et al., 2009, EMBO J.].  $Rb^+$  が結合した状態においては、高濃度の  $H^+$  が再結合するリスクが低く抑えられているので、この状態で

『ラチェット』が解離することで、反応が逆行しないことを担保しつつ、引き続き起こる脱リン酸化反応をスムーズに進行させることが出来ると考えられる。電子線結晶学によって求めた構造の比較から、我々は $H^+,K^+$ -ATPaseが行う一方向性輸送の機構原理を明らかにすることが出来た(図2)。

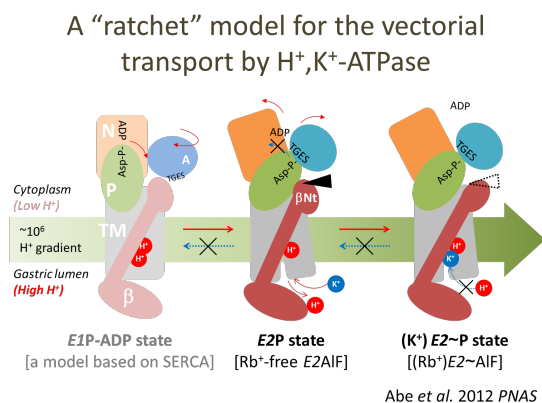


図2 一方向輸送モデル

(3)カーボンサンドウィッチ法による二次元結晶保護効果

より高分解能の構造解析を行う為に、電子顕微鏡の試料作製における技術開発を行った。非常に脆い二次元結晶は、電子顕微鏡試料作成時に起こる乾燥や、それに伴う急激な塩濃度の変化によって崩壊してしまう場合が多い。これは $H^+,K^+$ -ATPaseのような親水性部分の多い膜タンパク質に顕著にみられる現象である。我々はカーボンサンドウィッチ法と呼ばれる調整法を用いて、試料表面からの水分の蒸発を抑えることで、 $H^+,K^+$ -ATPaseの二次元結晶を保護し分解能の向上に成功した(図3)。これによって効率的な構造解析が可能となった[雑誌論文]。

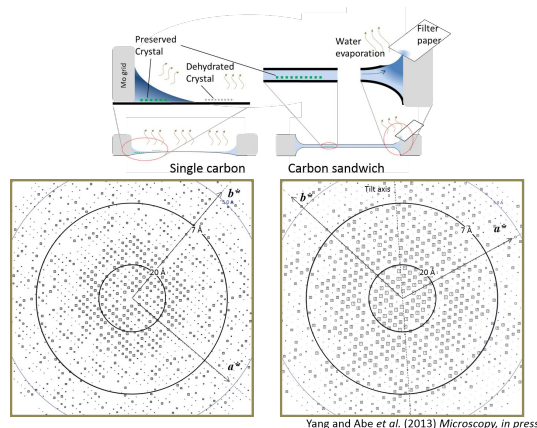


図3 カーボンサンドウィッチ法による分解能の向上

## 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 3件)

Abe, K., Tani, K., Friedrich, T. & Fujiyoshi, Y. Cryo-EM structure of gastric  $H^+,K^+$ -ATPase with a single occupied cation binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 査読有, 109, 2012, 18401-18406. (10.1073/pnas)

Suzuki, H., Ito, Y., Yamazaki, Y., Mineta, K., Uji, M., Abe, K., Tani, K., Fujiyoshi, Y. & Tsukita, S. The four-transmembrane protein IP39 of *Euglena* forms strands by a trimeric unit repeat. *Nat. Commun.*, 査読有, 4, 2013, 1766. (10.1038/ncomms2731)

Yang, F., Abe, K., Tani, K. & Fujiyoshi, Y. Carbon sandwich preparation preserves quality of two-dimensional crystals for cryo-electron microscopy. *Microscopy (Oxf)*, 査読有, 62, 2013, 597-606. (10.1093/jmicro/dft038)

[学会発表](計 8件)

阿部一啓、対向輸送カチオンを一つだけ結合した胃 $H^+,K^+$ -ATPaseの8Å分解能での立体構造、日本生化学会大会、2012年12月、福岡

阿部一啓、電子線結晶学による胃プロトンポンプの立体構造解析、日本生体エネルギー研究会(招待講演)、2012年12月、岡山大学

Abe, K. Unique properties and conserved conformational changes found in gastric  $H^+,K^+$ -ATPase. *Nagoya Symposium*, Jan, 2013, Nagoya

Abe, K. Cryo-EM structure of gastric proton pump. *FAOBMB mini symposium* (Invited), Apr, 2013, Morioka, Iwate

阿部一啓、胃プロトンポンプの生化学と電子線結晶構造解析、日本生化学会平成25年度奨励賞受賞講演、2013年9月、横浜

Abe, K., Biochemical and electron crystallographic studies of gastric proton pump. *The 86<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society*, Sep. 2013, Yokohama

阿部一啓、電子顕微鏡のイメージから膜タンパク質の立体構造を再構成する、第23回分析化学講習会 愛知地区講演会(招待講演)、2013年10月、名古屋大学

阿部一啓、胃プロトンポンプの極低温電子顕微鏡による構造解析、大阪大学タンパク質研究所セミナー 第4回神経科学と構造生物学の融合研究会(招待講演)、2013年11月、岡崎

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔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)

研究者番号: 60596188